

## АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА *bam1* ЯЧМЕНИ В ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ И ЦЕНТРАЛЬНОАЗИАТСКОЙ ЗОНАХ

О.Р. СТРАТУЛА<sup>1</sup>, Р.Н. КАЛЕНДАРЬ<sup>2</sup>, Ю.М. СИВОЛАП

<sup>1</sup> Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Одесса  
E-mail: olgastratula@rambler.ru

<sup>2</sup> Национальный центр биотехнологии, Астана, Казахстан

*Приведены результаты анализа распределения аллелей *bam1* у сортов ярового ячменя, районированных на территории восточноевропейской и центральноазиатской географических зон. Распространение аллелей гена *bam1* в различных агроклиматических условиях Евро-Азиатского региона определяли с помощью EPIC (Exon-Primed Intron-Crossing) ПЦР-анализа. Сконструированы EPIC-праймеры, комплементарные консервативным участкам генов эндоспермальной и общей  $\beta$ -амилаз. Изучение исходного материала коллекции ярового ячменя позволило дифференцировать сорта по наличию 126 п.н. вставки интрона 3 гена *bam1*, которую связывают с низкоактивной  $\beta$ -амилазой. Полученные данные свидетельствуют о низком уровне варьирования гена *bam1* культурного ячменя, а также показывают географическое распределение аллелей.*

**Ключевые слова:**  $\beta$ -амилаза, интрон, генетическое разнообразие.

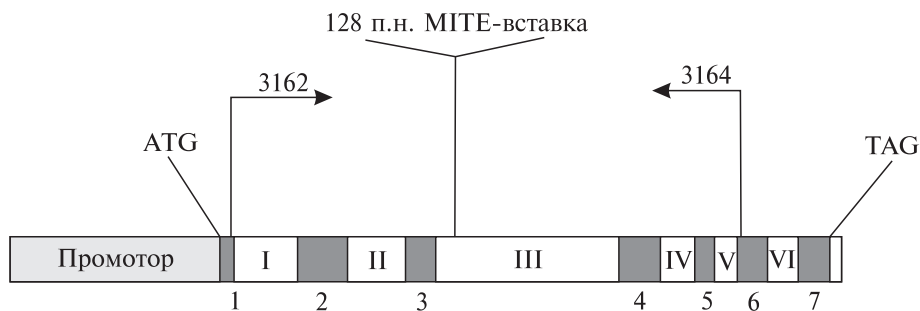
**Введение.** Ячмень – одна из широко распространенных и высокоурожайных зерновых культур. Зерно ячменя является сырьем для пивоварения и производства круп, а также ценным кормом для животных. Ячмень легко приспосабливается к контрастным условиям климата и разнообразию почв, поэтому возделывается практически во всех регионах. В Евро-Азиатском регионе Вавиловым и др. [1] выделены три важнейшие зоны культивирования: 1) северная – продовольственного ячменя; 2) южная – кормового ячменя; 3) западная (Белоруссия, Лесостепь Украины, северо-запад России и Прибалтика) – пивоваренного ячменя. Это подразделение весьма условно, так как зональность не исключает универсального использования ячменя в регионах. Требованиям, предъявляемым к ячменю, особенно к пивоваренному, в большей степени соответствуют сорта западной зоны, где формируется богатое полисахаридами зерно с низким содержа-

нием белка и наиболее пригодное для пивоварения [1].

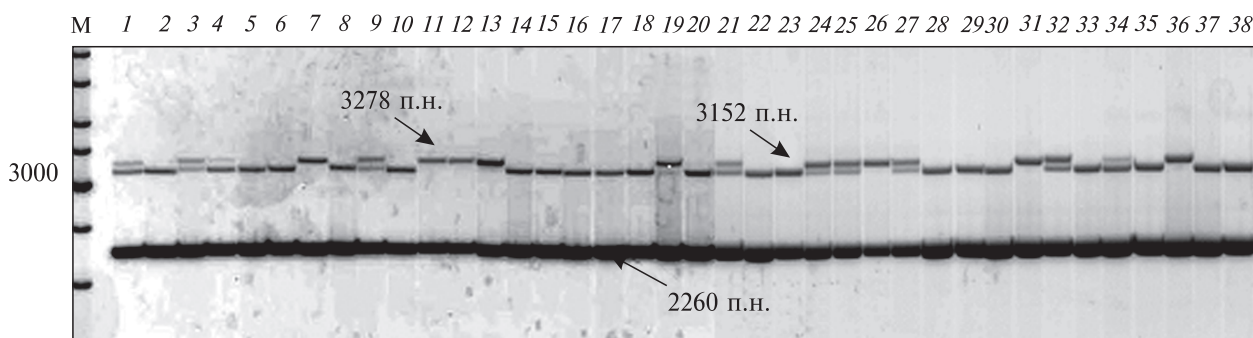
Зерно с высокими солодовыми свойствами – это основная предпосылка производства качественного солода [2]. Немаловажное значение для пивоварения имеет диастатическая сила – амилолитическая активность ферментов, которая является одним из параметров индекса солодовых свойств [3]. Ключевым амилолитическим ферментом является  $\beta$ -амилаза (1,4- $\alpha$ -D-глюканмальтогидролаза). В процессе гидролиза крахмала при прорастании зерна  $\beta$ -амилаза расщепляет  $\alpha$ -1,4-гликозидные связи, в результате чего образуются высокомолекулярные декстрины и мальтоза – дисахарид, который легко диффундирует и может использоваться прорастающим зародышем [4], а также является главным компонентом суслу [5]. Эндоспермальная  $\beta$ -амилаза ячменя кодируется геном *bam1*, локализованным на длинном плече хромосомы 4Н [6].

Представляет интерес исследование вариабельности гена, кодирующего эндоспермальную  $\beta$ -амилазу ячменя. В настоящее время в генетико-селекционных исследованиях успешно применяется анализ молекулярно-генетического полиморфизма при помощи EPIC-ПЦР – экзон-праймированная амплификация интронов [7].

Ряд исследователей выявили, что наличие 126 п.н. MITE-вставки (*Stowaway*-транспозон) в третьем интроне гена *bam1* эндоспермальной  $\beta$ -амилазы ячменя негативно сказывается на активности и термостабильности фермента [8–14]. MITE (Miniature inverted-repeat transposable element) – класс коротких мобильных «несамостоятельных» транспозонов, которые часто локализуются вблизи генов или в интронах [15–21]. Активность транспозонов вблизи генов может сказаться на экспрессии гена вплоть до его инактивации, а также приводить



**Рис. 1.** Схема расположения праймеров в локусе *bamy1*: 1–7 – экзоны; I–VI – интроны; ATG – начало трансляции, TAG – стоп-сайт. В верхней части схемы – использованные в работе праймеры с указанием их ориентации



**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК с праймерами 3162 и 3164 сортов ярового ячменя, выращиваемых в Прибалтийском регионе. М – маркер молекулярной массы DNA-ladder #SM1173

к дупликации [22] при неравном кроссинговере. Подтверждение влияния 126 п.н. МТЕ-вставки интрона 3 на синтез низкоактивной  $\beta$ -амилазы получено с помощью анализа активности фермента в зерне исследованных сортов ячменя [8, 13]. Таким образом, упомянутая транспозиция может использоваться при создании ПЦР-маркера для детекции низкоактивных форм  $\beta$ -амилазы [8–14].

Целью нашей работы была характеристика аллельного состояния генов *bamy1* сортов из коллекции ярового ячменя восточноевропейских и центральноазиатских регионов с помощью ПЦР-анализа.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования служила коллекция, состоящая из 249 сортов ярового ячменя, районированных в разное время на территории восточноевропейской и центральноазиатской зон. Коллекция получена от В.П. Нецветаева и А.А. Поморцева (собрана в ВИРе). Каталожные номера исследованных образцов и их генотипы по упомянутому локусу приведены в табл. 1. (<http://cytgen.com/articles/4920011s.pdf>). ДНК выделяли из пятидневных этиолированных про-

ростков с помощью СТАБ (цетилтриметиламмоний бромид) буфера: 2 М NaCl, 20 мМ Na<sub>3</sub>ЭДТА, 100 мМ Трис-НСl, рН 8,0 при 25 °С, 2 % СТАБ. ДНК пяти индивидуальных проростков объединяли в балки. Количество ДНК определяли на ДНК-флуориметре («Hoefler», США).

Специфические для генов  $\beta$ -амилазы EPIC-праймеры подбирали с учетом множественного выравнивания последовательностей генов  $\beta$ -амилазы (программа Multain [23]). Использовали 45 последовательностей ДНК генов  $\beta$ -амилазы, полученных из базы данных NCBI (скрининг базы данных нуклеотидных последовательностей проводился с помощью программы BLAST [24]). Дизайн «универсальных» для генов  $\beta$ -амилазы EPIC-праймеров осуществляли согласно программе FastPCR [25]. Праймеры (качество HPSF – High Purity Salt Free Purification) синтезированы в Eurofins MWG Operon (Германия).

В исследовании задействованы следующие EPIC-праймеры: 3162 (5'-ТССААГТСТАСГТ-САТГСТСС-3', локализация праймера – 1389 → 1409 в экзоне 1 гена *bamy1*) и 3164 (5'-СА-

GCCGGAGGTTAGGTGAATCC-3', локализация праймера – 4646 ← 4666 в экзоне 6 гена *bamy1*).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала: 50 мМ КСl, 20 мМ Трис-НСl рН 8,4 (25 °С), 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 % Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 300 нМ каждого праймера, 20 нг ДНК и 1 ед. Таq-полимеразы.

Протокол реакции амплификации: начальная денатурация – 2 мин при 95 °С, денатурация – 20 с при 95 °С, отжиг – 60 с при 65 °С, элонгация – 2 мин при 72 °С, заключительная элонгация – 5 мин при 72 °С, всего 32 цикла. Для амплификации ДНК использовали приборы «Терцик» («ДНК-Технология», РФ).

Для тестирования продуктов амплификации использовали 1%-ные агарозные гели с последующим окрашиванием бромистым этидием и фотографированием цифровой видеокамерой с оранжевым фильтром.

#### Результаты исследований и их обсуждение.

При анализе 249 сортов ячменя учитывали деление на девять регионов выращивания, при этом в восточноевропейскую зону входили Европейский, Балтийский, Белорусский, Среднерусский, Южнороссийский и Предуральский регионы, а в центральноазиатскую – Западносибирский, Дальневосточный Амуро-Уссурийский и Предалтайский регионы.

Настоящее исследование генов β-амилазы осуществляли с помощью пары специфических праймеров, ориентированных на участок экзон 1 – экзон 6 гена *bamy1* и такой же по размеру участок гена *bamy2* (рис. 1). Ожидалось, что анализ такого протяженного отрезка генов β-амилазы ячменя может привести к выявлению более широкого генетического разнообразия вида *Hordeum vulgare* в анализируемой обширной коллекции. Изученные праймеры комплементарны высококонсервативным экзонным участкам генов эндоспермальной и общей β-амилазы и использовались с целью определения вариабельных интронных регионов гена *bamy1*.

В результате амплификации ДНК сортов ячменя исследованной коллекции с праймерами 3162 и 3164 выявлены два аллеля в локусе *bamy1* с размерами ПЦР-фрагментов 3278 и 3152 п.н. По локусу *bamy2* сорта ячменя оказались однородными и содержали ПЦР-фрагмент длиной 2260 п.н. Расчетная длина продуктов амплификации ДНК получена с помощью программы

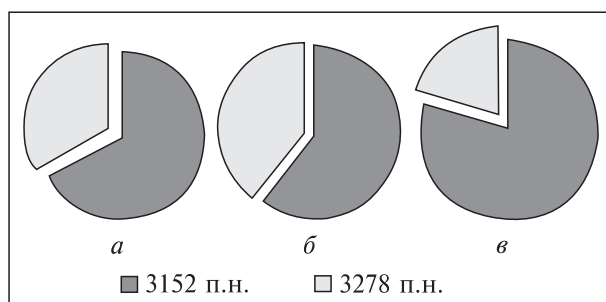


Рис. 3. Соотношение аллелей гена *bamy1* в коллекции сортов ячменя, распространенного в Евро-Азиатском регионе: а – сортов всех географических зон; б – сортов из южных и восточных областей; в – сортов Североевропейской части и Балтийского региона

FastPCR [25]. Продукты ПЦР гена *bamy1* различались по наличию 126 п.н. МІТЕ-вставки в третьем интроне (рис. 2).

На основании данных ПЦР с использованием ЕРІС-праймеров показано, что сорта исследуемой коллекции несли аллели *bamy1* двух типов – с 126 п.н. МІТЕ-вставкой (3278 п.н. аллель) и без нее (3152 п.н. аллель). Иных аллелей в локусе *bamy1* в проанализированном обширном участке гена с помощью экзон-специфических праймеров выявлено не было

Таблица 2. Распространение аллелей локуса *bamy1* в природно-сельскохозяйственных регионах

Регион	Размер выборки	Частоты аллелей локуса <i>bamy1</i> , %	
		3278 п.н.	3152 п.н.
<i>Восточноевропейская зона</i>			
Европейский	28	12	88
Балтийский	38	32	68
Белорусский	27	28	72
Среднерусский	60	33	67
Предуральский	7	29	71
Южнороссийский	3	100	0
<i>Центральноазиатская зона</i>			
Западносибирский	19	40	60
Дальневосточный			
Амуро-Уссурийский	26	52	48
Предалтайский	41	28	72
Всего	249	32	68

(табл. 1). Подтверждено, что различие между генотипами ячменя в локусе *bamy1* связано с 126 п.н. транспозицией МІТЕ-элемента.

Распределение частот встречаемости *bamy1* в исследованной выборке сортов подсчитывали согласно уравнению Харди-Вайнберга (полученную частоту аллеля принимали за 1 в случае гомогенности сорта и за 0,5 в случае гетерогенности сорта). Частота встречаемости аллелей *bamy1* у представителей анализируемой коллекции составила у аллеля с молекулярной массой 3278 п.н. – 32 %, у аллеля с молекулярной массой 3152 п.н. – 68 % от выборки (табл. 2).

При анализе сортов коллекции показано, что частота встречаемости аллелей *bamy1* может варьировать весьма значительно. Несмотря на то, что размеры выборок сортов в исследованных регионах варьировали, можно отметить, что аллель *bamy1* размером 3152 п.н., ассоциируемый с признаком активной β-амилазы (не несет 126 п.н. МІТЕ-элемента интрона 3), доминирует на участках, расположенных на северо-западе интересующей территории (табл. 2). Эти результаты совпадают с данными о почвенно-климатических условиях Североевропейской части как наиболее оптимальных для выращивания пивоваренных сортов ячменя [1]. При смещении к регионам выращивания ячменя, расположенным на юго-востоке, частота аллеля *bamy1*, ассоциированного с признаком активной β-амилазы, уменьшается, а ассоциированного с признаком низкоактивной β-амилазы – увеличивается (табл. 1).

Проведенный анализ распределения частот аллелей гена *bamy1* в Евро-Азиатском регионе свидетельствует о том, что на исследованной территории они распространены неравномерно. Общее соотношение аллелей *bamy1*, у которых нет 126 п.н. МІТЕ-элемента интрона 3 (признак наличия активной β-амилазы), и сортов с аллелями *bamy1*, несущих 126 п.н. МІТЕ-элемент (признак наличия низкоактивной β-амилазы), составило примерно 2 : 1 соответственно (рис. 3, а). В южных и восточных областях такое соотношение меняется на 1,5 : 1 (рис. 3, б), а у сортов Североевропейской части и Балтийского региона (зоны выращивания пивоваренного ячменя) – 4 : 1 (рис. 3, в).

При исследовании коллекции выяснилось, что географическое распределение аллелей *bamy1*

зависит от показателей обеспеченности теплом регионов, в которых районированы исследованные сорта: показано преимущество частот варианта, ассоциированного с активной β-амилазой (126 п.н. МІТЕ-элемент отсутствует), в регионах с низкой и средней обеспеченностью теплом. Таким образом, использованные ЕРІС-праймеры к генам *bamy1* и *bamy2* позволили провести сравнительные исследования потенциала сортов, собранных в различных климатических зонах, по локусу эндоспермальной β-амилазы.

*Авторы приносят благодарность д-ру биол. наук А.А. Поморцеву (Институт общей генетики РАН, Москва), заведующему отделом селекции и семеноводства ячменя СГИ акад. А.А. Линчевскому и заместителю директора Института растениеводства им. В.Я. Юрьева канд. биол. наук В.К. Рябчуну за предоставление семян сортов ячменя. Статья финансирована по гранту «Изоляция генов и поиск новых аллелей генома пшеницы» Национального центра биотехнологии Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.*

#### ALLELIC VARIANTS OF THE GENE *bamy1* BARLEY IN EASTERN EUROPEAN AND CENTRAL ASIAN AREAS

*O.R. Stratula, R.N. Kalendar, Yu.M. Sivolap*

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation, Odessa National Center for Biotechnology, Astana, Kazakhstan E-mail: olgastratula@rambler.ru

The collections of varieties of spring barley cultivars from the Eastern European and Central Asian areas were analyzed by exon-specific PCR (EPIC) for β-amylase genes. The endosperm β-amylase gene (*bamy1*) was differentiated by the presence of 126 bp MITE insertion into intron 3 that is associated with low activity β-amylase. The findings suggest that a low level of genetic variation for *bamy1* gene within climatic zones is associated with individual breeding program for each climatic zone.

#### АЛЛЕЛЬНІ ВАРІАНТИ ГЕНА *bamy1* ЯЧМЕНЮ В СХІДНОЄВРОПЕЙСЬКІЙ І ЦЕНТРАЛЬНОАЗІАТСЬКІЙ ЗОНАХ

*O.P. Стратула, Р.М. Календар, Ю.М. Сиволап*

За допомогою сконструйованих екзон-специфічних ЕРІС-праймерів, комплементарних консервативним ділянкам генів ендоспермальної і загальної β-амілаз, вивчали матеріал колекції сортів ярого ячменю, ра-

йонованих на території східноєвропейських та центральноазиатських зон. Це дозволило диференціювати даний матеріал за наявністю 126 п.н. вставки інтрона 3 гена *bmy1*, яку пов'язують з низькоактивною β-амілазою. Отримані дані свідчать про низький рівень варіювання гена *bmy1* культурного ячменю, а також показують географічний розподіл алелів.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. и др. Растениеводство / Под ред. П.П. Вавилова. — М.: Агропромиздат, 1986. — 512 с.
2. Psota V., Kosar K. Malting Quality // Ferment. Prum. — 2002. — **48**. — P. 142.
3. Лангер И. Основные принципы селекции пивоваренного ячменя. — 2004. www.proprivo.ru
4. James M., Denyer K., Myers A. Starch synthesis in the cereal endosperm // Curr. Opin. Plant Biol. — 2003. — **6**. — P. 215–222.
5. Hough J.S. The biotechnology of malting and brewing. — Cambridge : Univ. press, 1985 — 168 p.
6. Kreis M., Williamson M., Buxton B. et al. Primary structure and differential expression of β-amylase in normal and mutant barleys // Eur. J. Biochem. — 1987. — **169**. — P. 517–525.
7. Bierne N., Lehnert S.A., Bédier E. et al. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR // Mol. Ecol. — 2000. — **9**, № 2. — P. 233–235.
8. Paris M., Jones M.G.K., Eglinton J.K. Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley β-amylase alleles // Plant Mol. Biol. Rep. — 2002. — **20**. — P. 149–159.
9. Erkkila M., Leah R., Ahokas H., Cameron-Mills V. Allele-dependent barley grain β-amylase activity // Plant Physiol. — 1998. — **117**. — P. 679–685.
10. Eckstein P., Hay C., Rossnagel B. et al. Allele-specific markers and molecular diversity at the Bmy 1 locus determining enzyme thermostability // Czech. J. Genet. Plant Breed. — 2004. — **40**. — P. 64.
11. Kaneko T., Kihara M., Ito K. Genetic analysis of β-amylase thermostability to develop a DNA marker for malt fermentability improvement in barley, *Hordeum vulgare* // Plant Breed. — 2000. — **119**, № 3. — P. 197–201.
12. Kaneko T., Zhang W., Takahashi H. et al. QTL mapping for enzyme activity and thermostability of β-amylase in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Breed. Sci. — 2001. — **51**, № 2. — P. 99–105.
13. Gunkel J., Voetz M., Rath F. Effect of the malting barley variety (*Hordeum vulgare* L.) on fermentability // J. Inst. Brewing. — 2002. — **108**, № 3. — P. 355–361.
14. Belicka I., Bleidere M., Legzdina L. et al. Allelic diversity of the beta-amylase gene *bmy1* in Latvian barley breeding lines // Acta Biol. Univ. Daugavp. — 2010. — **10**, № 1. — P. 17–22.
15. Wessler S.R., Bureau T.E., White S.E. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes // Curr. Opin. Genet. Dev. — 1995. — **5**. — P. 814–821.
16. Bureau T.E., Wessler S.R. Stowaway: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants // Plant Cell. — 1994. — **6**. — P. 907–916.
17. Iwamoto M., Higo K. Tourist C transposable elements are closely associated with genes expressed in flowers of rice (*Oryza sativa*) // Mol. Genet. Genom. — 2003. — **268**, № 6. — P. 771–778.
18. Sabot F., Guyot R., Wicker T. et al. Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations // Mol. Genet. Genom. — 2005. — **274**. — P. 119–130.
19. Bureau T.E., Ronald P.C., Wessler S.R. A computer-based systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1996. — **93**. — P. 8524–8529.
20. Zhang Q., Arbuckle J., Wessler S.R. Recent, extensive and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family Heartbreaker (Hbr) into genic regions of maize // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2000. — **97**. — P. 1160–1165.
21. Евгенийев М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома // Мол. биология. — 2007. — **41**, № 2. — С. 234–245.
22. Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вавилов. журн. генетики и селекции. — 2011. — **15**, № 2. — С. 382–397.
23. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering // Nucl. Acids Res. — 1988. — **16**, № 22. — P. 10881–10890.
24. Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. — 1990. — № 215. — P. 403–410.
25. Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis // Genomics. — 2011. — **98**, № 2. — P. 137–144.

Поступила 22.11.13