

УДК 577.21+633.16

## КОМПЛЕКСНА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ОЦІНКА ГЕНОФОНДУ ЯЧМЕНЮ ЯРОГО ЗА НАПРЯМАМИ ВИКОРИСТАННЯ

О.В. СТЕПАНЕНКО<sup>1,2</sup>, В.А. МУЗАФАРОВА<sup>3</sup>, А.І. СТЕПАНЕНКО<sup>1</sup>,  
Є.В. КУЗЬМІНСЬКИЙ<sup>2</sup>, В.К. РЯБЧУН<sup>3</sup>, Б.В. МОРГУН<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук  
України

03143 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

<sup>2</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут  
ім. І. Сікорського»

03056 Київ, просп. Перемоги, 37

<sup>3</sup>Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук  
України

61060 Харків, Московський просп., 142

<sup>4</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Серед 26 колекційних сортів та ліній ячменю ярого виявлено цінні для різних напрямів використання зразки за комплексом агрономічних і біохімічних ознак. Схарактеризовано алельний стан генів *Vmy1*, який визначає активність і термо-стабільність β-амілази, *Lox-1*, що детермінує синтез ліпоксигенази-1, *Itr1*, відповідального за наявність чи відсутність СМе-протеїну, та *Wax*, який кодує ключовий фермент синтезу амілози крохмалю ендосперму.

**Ключові слова:** ячмінь ярий, молекулярні маркери, ген *Vmy1*, ген *Lox-1*, ген *Itr1*, *Wax* ген.

Ячмінь є однією з важливих сільськогосподарських культур за універсальністю використання й поширенням. Зерно ячменю — найпоживніший концентрований корм для тварин, цінна сировина для харчової і пивоварної промисловості. Кожен напрям його використання потребує специфічного комплексу властивостей зерна, що, у свою чергу, зумовлює необхідність добору та (або) створення відповідних сортів ячменю. Загальними характеристиками сортів для різних напрямів є урожайність, адаптивність, пристосованість до механізованого вирощування й переробки продукції. Характеризують і добирають селекційний матеріал за цими ознаками на підставі даних польових дослідів, які проводять за рутинними методиками. Водночас параметри якості зерна для встановлення використання сорту визначають складнішими лабораторними методами, які не завжди забезпечують однозначні й надійні результати.

Розвиток молекулярної генетики, у тому числі ДНК-технологій, уможливив використання молекулярно-генетичних маркерів, які базуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), для характеристики

якісних і кількісних показників цінних сільськогосподарських культур. Зокрема, створення сортів пивоварного ячменю — складний багатоконпонентний процес, який у сучасній селекції реалізується в результаті тісної співпраці селекціонерів і молекулярних генетиків. У процесі створення харчового й фуражного ячменю також дуже важливим є чіткий добір генотипів з алелями, корисними для обраного кінцевого продукту, та елімінація небажаних ознак.

Сорти для пивоваріння мають відповідати вимогам щодо комплексу солодових властивостей. Якість солоду — результат гідролітичної реакції амілолітичних ферментів, основним із яких є  $\beta$ -амілаза, що гідролізує крохмаль з утворенням мальтози і декстринів [9, 14, 15]. Активний фермент забезпечує отримання більшої кількості мальтози (цукор, здатний зброджуватись) [15].

Ендоспермальна  $\beta$ -амілаза кодується геном *Bmy1* (Genbank accession AV306504.1), локалізованим на довгому плечі хромосоми 4Н. Алелі гена, які зумовлюють різні активність і термостабільність  $\beta$ -амілази, можна ідентифікувати за поліморфізмом III інтрону гена *Bmy1* [13, 18]. Сорти з добрими пивоварними властивостями містять високоактивну  $\beta$ -амілазу, тоді як у непивоварних сортах активність  $\beta$ -амілази низька [9]. Виявлено три алелі гена *Bmy1.a*, *Bmy1.b*, *Bm1.c*, кожен з яких при експресії мав різні активність і термостабільність  $\beta$ -амілази в солоді [10, 20]. Активність  $\beta$ -амілази в зерні сортів з алелями *Bmy1.b* була вищою за відповідний показник у представників з алелем *Bmy1.a* в 1,3 раза; значення активності ферменту в зерні єдиного знайденого представника з алелем *Bmy1.c* виявилось у 2,1 раза вищим за показник сортів з алелем *Bmy1.a* [10].

Досить важливою пивоварною ознакою є активність ферменту ліпоксигенази-1 у пиві, що кодується геном *Lox-1* (Genbank accession L35931; AK252639), розміщеним на 4-й хромосомі ячменю. Ліпоксигеназа-1 каталізує утворення 9-гідропероксиду, що призводить до утворення сполук, які псують смакові властивості пива: *транс-2*-ноненалю і тригідроксіоктодецилової кислоти. *Транс-2*-ноненаль вважають основною причиною так званого картонного смаку пива, яке значний час контактувало з повітрям. Інший продукт окиснення — тригідроксіоктодецилова кислота — негативно впливає на якість пива у категоріях стабільності піни і смаку [21].

Відсутність ліпоксигеназної активності, бажана для пивоварної промисловості, співвідноситься з наявністю у зерні гомозиготного рецесивного алеля *lox-1*, тоді як домінантний алель *Lox-1* корелює з проявами активності ферменту, які знижують стабільність піни і псують смакові якості пива [16].

Крохмаль є важливою сировиною для багатьох галузей промисловості. Щоб отримати крохмаль із певними властивостями, його хімічно модифікують [6]. Альтернативою цьому є створення сортів ячменю з різним фракційним складом у зерні крохмалю, тобто різним співвідношенням у ньому амілопектину й амілози, зокрема з високим вмістом амілопектину [8]. Ген *Wax* ячменю (Genbank accession KF 697170.1) відповідає за синтез амілози в молекулах крохмалю ендосперму. Ген *Wax* може бути представлений кількома алельними варіантами: два функціональні алелі, що кодують GBSSI, та нуль-алель з неактивним ферментом. Ген *Wax* полегшує перетравлюваність, зброджуваність у виробництві біоетанолу.

Зразки ячменю з нуль-алелем за геном *Wax* на відміну від інших характеризуються підвищеним вмістом простих цукрів: глюкози, фруктози, сахарози і розчинної клітковини у формі β-глюканів. Вважають, що в ячмені *wax* підвищений вміст β-глюканів, тому що в нього генетично блокований процес трансформації глюкози в крохмаль і метаболізм за участю глюкози частково спрямовується на біосинтез β-глюканів. Амілопектин майже повністю розщеплюється в організмі людини. β-Глюкани практично не перетравлюються у шлунково-кишковому тракті людського організму, але вони дієтично цінні, оскільки під дією мікрофлори утворюють низку важливих коротколанцюгових органічних кислот (ощтова, пропіонова, бутилова) [23].

Здатність пива до помутніння зумовлена наявністю СМе протеїну, що є інгібітором трипсину/α-амілази. Він кодується геном *HvItr1* (Genbank accession X65875.1), який містить два алелі: активний *SE+ve*, що продукує СМе-протеїн, та неактивний *SE-ve*, за наявності якого біосинтез цього протеїну не відбувається, й отже, зумовлює високу якість пива [4].

Метою нашої роботи було виявити серед колекційних зразків ячменю ярого цінних для різних напрямів використання за комплексом агрономічних і біохімічних ознак, схарактеризувати алельний стан генів *Vmy1*, *Lox-1*, *Itr1*, *Wax*, відібрати цінні зразки, які експресують активну й термостабільну β-амілазу, неактивну форму ліпоксигенази-1, відсутність СМе протеїну, а також нуль-алель гена *Wax*.

## Методика

Матеріалом дослідження були 26 зразків ячменю ярого з ознакової колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України різного еколого-географічного походження: 8 зразків з України, 6 — із Росії, 5 — із Казахстану, по 2 зразки з Білорусі й Канади, по 1 — з Німеччини, Великої Британії, Австрії. За різновидами 19 зразків належали до var. *nutans*, 2 зразки — до var. *nudum*, по 1 — до var. *medicum*, *submedicum*, *nigrescens*, *violaceum*, *ricotense*. Більшість зразків (23) — дворядні, 3 — шестирядні; 23 зразки — пливчасті, 3 — голозерні.

Цей набір представлений зразками пивоварного напрямку використання (15 сортів): Патрицій, Сварожич, Святогор, Московський 86, Ясний, Владімір, Приазовський 9, Сусин, Арна, Сєвер 1, Асем, Туран 2, Margret, Бровар, Messina; зернового — Взірець, Вереск; фуражного напрямку використання — Совіра, Кучмінь, Бахус, зразками зі зниженим вмістом амілози — 09-210, 09-794, CDC Candle, ВМ-МГФ, Mebere, зразком Glacier AL.38 із високим вмістом амілози.

Зразки вивчено й описано за морфологічними ознаками, класифіковано за господарськими, біологічними властивостями і хімічним складом відповідно до методик, наведених у працях [3, 5].

Колекційні зразки оцінено на стійкість до основних хвороб і шкідників на штучному й природному інфекційних фонах згідно з методичними вказівками, викладеними у працях [1, 3].

Експериментальні результати оброблено статистично методом дисперсійного аналізу за Б.А. Доспеховим [1].

Насіння висівали на полях спеціальної сівозміни дослідного поля Інституту рослинництва (ІР) ім. В.Я. Юр'єва НААН (сmt Елітне,

Харківський р-н, Харківська обл.). Грунти — чорнозем потужний слабковилужений. Попередник ярого ячменю — горох. Агротехніка — загальноприйнята для зони Лісостепу України. Висівали насіння в ранні строки — в I і II декади квітня.

Оцінювання зразків у польових умовах проводили у 2011—2013 рр. Посів здійснювали селекційною сівалкою ССФК 7. Площа ділянок становила 2 м<sup>2</sup> з шириною міжрядь 15 см, зразки висівали в триразовому повторенні. Стандарт — сорт Взірєць — розміщували через кожні 20 номерів колекційних зразків. Біохімічні аналізи виконували в лабораторії якості зерна та біосировини ІР ім. В.Я. Юр'єва НААН України. Вміст білка в зерні визначали на приладі «Инфралюм ФТ 10».

При проведенні молекулярного аналізу загальну рослинну ДНК виділяли з 5-добових проростків за допомогою цетилтриметиламонійброміду (ЦТАБ) [19]. Для кожного сорту виділяли ДНК з 20 індивідуальних проростків.

Аналізували поліморфізм трьох генів, які зумовлюють пивоварну якість ячменю (*Itr1*, *Bmy1*, *Lox-1*), та гена *Wax*, який детермінує синтез амілози у зернівці, за допомогою уніплексних і мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій за попередньо оптимізованих умов. Продукти ампліфікації гена *Lox-1* додатково гідролізували ендонуклеазою RsaI [7, 8, 10].

Реакційні суміші містили специфічні праймери у концентраціях: 0,5—0,75 мкМ (табл. 1), 10×Dream Taq™ Green Buffer (Thermo Scientific), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфату (Thermo Scientific), 0,5 од. полімерази Dream Taq™ DNA Polymerase (Thermo Scientific), 30 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл.

ТАБЛИЦЯ 1. Перелік використаних праймерів та очікуваних продуктів ампліфікації

№ з/п	Послідовність, посилання	Розмір амплікону, пн, алель	Ген
1	5'-CAACTAACAGAAAGTCAGAAAGC-AC-3'; 5'-AGGGCAGTTGGGCGAA-3' [22]	455 — SE+ve	<i>Itr1</i>
2	5'-CAACTAACAGAAAGTCAGAAAGC-AC-3' 5'-AGGGCAGTTG-GGCGTA-3' [22]	455 — SE-ve	
3	5'-GATGGTCGTTCCAGGCATC-3' 5'-AGGGAACCGCACGTGTGGGGTCAA-TGA-3' [14]	643 — <i>Bmy1.a</i> , 516 — <i>Bmy1.b</i> , 477 — <i>Bmy1.c</i>	<i>Bmy1</i>
4	5'-CCATCACGCAGGGCATCCTG-3' 5'-GCGTTGATGAGCGTCTGCCG-3' [16]	Після рестрикції Rsa I: 700, 300, 220 — алель дикого типу <i>Lox A</i> 700, 520 — нуль- алель <i>lox A</i>	<i>Lox-1</i>
5	5'-CAAACAGACGACAAGCGGAGAA-3' 5'-TAGAAAAAGAAAACATCAAGCA-3' [12]	802 пн — алель <i>Wax</i> дикого типу 1010 пн — алель <i>Wax</i> дикого типу 592 пн — нуль-алель <i>wax</i>	<i>Wax</i>

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі в 1×SB буфері [11] з використанням як барвника бромистого етидію концентрацією 0,5 мг/мл.

### Результати та обговорення

За результатами польових оцінок зразків колекції ярого ячменю виявлено, що зразки Взірєць, Стятогор, Сварожич, Московський 86, Ясний мали високу врожайність — на рівні 623–773 г/м<sup>2</sup> (табл. 2). За масою 1000 зернин виділялись зразки Сварожич (56,1 г), 09-210 (51,7 г), Взірєць (52,6 г), Кучміль (52,3 г). Найбільш скоростиглими з тривалістю вегетаційного періоду 70 діб були зразки Сварожич, Приазовський 9, Арна, Взірєць.

Як відомо, в зерні пивоварного ячменю має бути підвищений вміст крохмалю (60–70 %), а вміст білка — низький (9–11 %), оскільки за високого вмісту білка ускладнюється фільтрування пива на заводі й погіршується якість. Вміст білка має також і економічне значення: за збільшення його вмісту на 1 % на пивоварному заводі вихід екстракту зменшується на 0,8 %.

За допомогою біохімічного аналізу виявлено високий вміст білка (14,2–16,0 %) в зерні ячменю сортозразків Патрицій, 09-794, 09-210, Совіра, Кучміль, Вереск, CDC Candle, ВМ-МГФ, Mebere, High Amylose Glacier AL.38, Messina, що за напрямом використання належать до зернових і фуражних. До цієї групи входять також зразки з нуль-алелями гена *Wax*.

У сортів пивоварного напряму використання ми виявили низький вміст білка — 11,0–13,7 %, зокрема сорт Сусин містив 11,0 % білка і 60,9 % крохмалю.

Для молекулярного аналізу сортів ячменю з метою вивчення алельного різноманіття досліджуваних генів були проведені ПЛР з використанням специфічних праймерів до поліморфних ділянок генів.

На електрофореграмі досліджені зразки розподілялись на дві групи залежно від алельного стану гена *Vmy1*: для сортів з алелем *Vmy1.a* характерна поява амплікону розміром 643 пн, для сортів з алелем *Vmy1.b* — амплікон розміром 516 пн (рис. 1).

При ампліфікації гена *Wax* ідентифікували амплікони розміром 802 або 1010 пн (алелі дикого типу) й амплікон 592 пн (нуль-алель) (рис. 2).

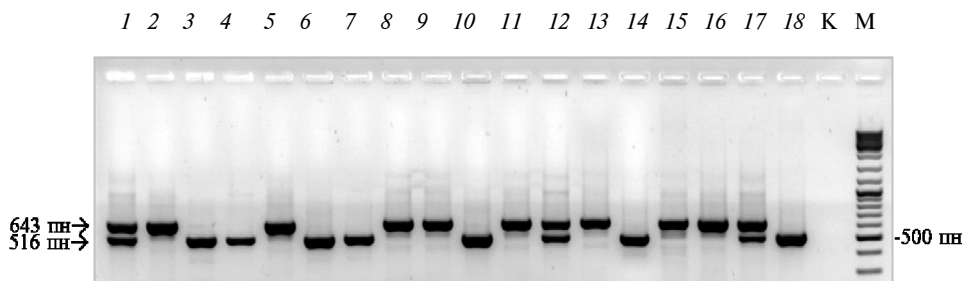


Рис. 1. Електрофореграма результатів ампліфікації ділянки гена *Vmy1*:

1–15 — досліджувані зразки; 16–18 — позитивні контролю; тут і на рис. 2—4: К — негативний контроль (без ДНК); М — маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix

## КОМПЛЕКСНАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕНОФОНДА

ТАБЛИЦЯ 2. Характеристика зразків колекції ярого ячменю за цінними господарськими ознаками (2011–2013 рр.)

Зразок	Різновид	Країна походження*	Вегетаційний період, доба	Висота рослин, см	Урожайність, г/м <sup>2</sup>	Маса 1000 зернин, г	Вміст білка в зерні, %	Вміст крохмалю в зерні, %
09-210	<i>nutans</i>	У	72	68	484	51,7	14,9	59,2
09-794	<i>medicum</i>	У	74	76	558	48,7	15,0	56,9
CDC Candle	<i>nudum</i>	К	76	56	145	34,2	14,2	58,3
Glacier AL.38	<i>rikotense</i>	ВБ	73	57	312	47,5	14,8	57,3
Margret	<i>nutans</i>	Н	76	58	482	50,2	11,7	59,7
Mebere	<i>nudum</i>	К	78	42	179	31,1	14,8	58,7
Messina	<i>nutans</i>	А	75	56	422	48,2	14,4	59,5
Арна	<i>nutans</i>	Каз.	70	66	349	46,6	12,1	58,5
Асем	<i>nutans</i>	Каз.	74	69	563	46,3	13,6	58,5
Бахус	<i>nutans</i>	Р	76	69	500	45,5	12,1	59,2
Бровар	<i>nutans</i>	Б	75	61	277	43,8	12,7	59,2
Вереск	<i>nutans</i>	Р	78	68	379	45,5	16,2	57,2
Взірець (національний стандарт)	<i>submedicum</i>	У	70	61	773	52,6	12,1	59,4
Владімір	<i>nutans</i>	Р	78	60	444	46,0	13,7	58,1
ВМ-МГФ	<i>violaceum</i>	Б	74	57	198	33,2	14,7	59,2
Кучмінь	<i>nigrescens</i>	У	75	67	300	52,3	13,9	57,5
Московський 86	<i>nutans</i>	Р	75	55	735	49,8	13,1	57,5
Патрицій	<i>nutans</i>	У	73	65	368	42,4	13,5	59,1
Приазовський 9	<i>nutans</i>	Р	70	66	347	45,3	12,8	57,5
Сварожич	<i>nutans</i>	У	76	70	637	56,1	13,4	59,2
Святогор	<i>nutans</i>	У	77	60	623	49,6	12,8	58,2
Севєр 1	<i>nutans</i>	Каз.	77	60	503	47,3	13,3	59,4
Совіра	<i>nutans</i>	У	77	62	477	50,9	14,6	58,5
Сусин	<i>nutans</i>	Каз.	78	64	437	50,3	11,0	60,9
Туран 2	<i>nutans</i>	Каз.	77	67	511	48,9	12,6	55,6
Ясний	<i>nutans</i>	Р	76	56	647	49,1	13,2	58,9

\*У – Україна, К – Канада, ВБ – Велика Британія, Н – Німеччина, А – Австрія, Каз. – Казахстан, Р – Росія, Б – Білорусь.

Результати аналізу алельного стану гена *Lox-1* сортів ячменю наведено на рис. 3. Для сортів-носіїв домінантного алеля *Lox A* очікували амплікони 700, 300 і 220 пн, рецесивного алеля *lox A* — 700 і 520 пн.

Визначення алельного стану гена *Itr1* ґрунтується на двох ПЛР із використанням двох наборів праймерів. У сортів з алелем *SE+ve* виявлено амплікон 455 пн за використання першого набору праймерів, з алелем *SE-ve* — за використання другого набору. Результати ампліфікації гена *Itr1* (другий набір) наведено на рис. 4.

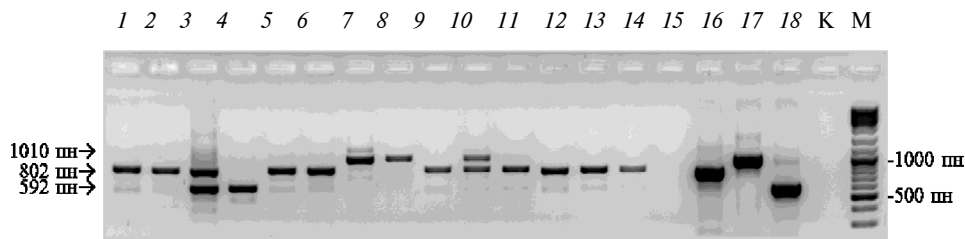


Рис. 2. Электрофореграма результатів ампліфікації ділянки гена *Wax*:

1–15 — досліджувані зразки; 16–18 — позитивні контролі

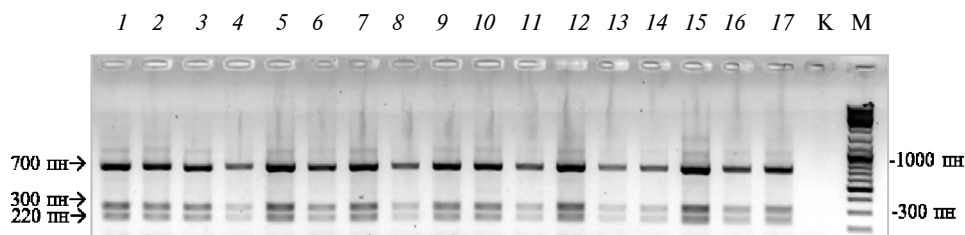


Рис. 3. Электрофореграма результатів ампліфікації ділянки гена *Lox-I* з наступним гідролізом ендонуклеазою *Rsa I*:

1–16 — досліджувані зразки; 17 — позитивний контроль

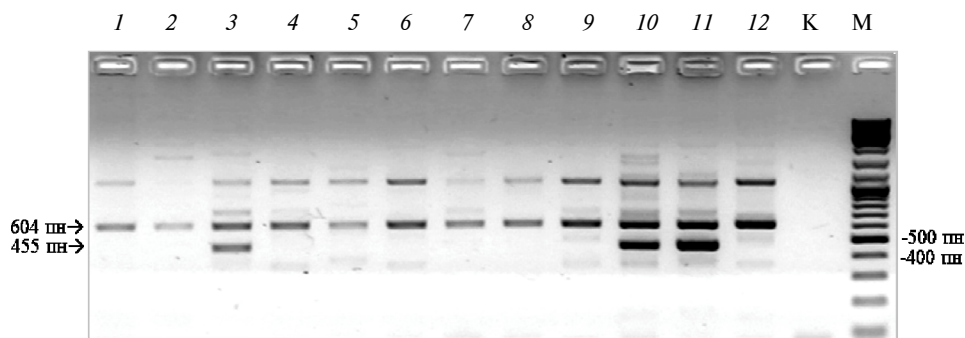


Рис. 4. Электрофореграма результатів ампліфікації ділянки гена *ItrI*:

1–11 — досліджувані зразки; 12 — позитивний контроль

Розподіл алельного стану досліджуваних зразків наведено в табл. 3. Виявлено, що 11 сортів ячменю (Сварожич, Святогор, Кучміль, Московський 86, Вереск, Владімір, Сусин, Арна, Север 1, CDC Candle, Messina) містять алель *Vmy1.a* гена *Vmy1*. У геномі інших 10 зразків (09-210, 09-794, Взірець, Совіра, Бахус, Приазовський 9, Margret, ВМ-МГФ, Mebere, Glacier AL.38) ген *Vmy1* був представлений алелем *Vmy1.b* (середня термостабільність β-амілази). П'ять зразків містили алелі *Vmy1.a* і *Vmy1.b* (Патрицій, Ясний, Асем, Туран 2, Бровар). Віднайдення вигідних для пивоваріння сортів із погляду алельного стану гена *Vmy1* збагатить вітчизняну селекцію схрещуванням українських сортів, яким властиві високі пивоварні характеристики зерна, із зарубіжними сортами з активною й термостабільною β-амілазою.

КОМПЛЕКСНАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕНОФОНДА

ТАБЛИЦЯ 3. Молекулярно-генетична характеристика досліджуваних зразків ячменю за чотирма локусами

Зразок	Алель гена <i>Itr1</i>	Помутніння	Алель гена <i>Vmy1</i>	Прогнозована термостабільність β-амілази	Амплікон гена <i>Wax</i> , пн	Алель гена <i>Wax</i>	Рекомендований напрям використання згідно з держреєстром
09-210	*	Н.в.	<i>Vmy1.b</i>	Середня	592/802	<i>Wax/wax</i>	Фураж
09-794	<i>SE-ve</i>	—	<i>Vmy1.b</i>	Середня	592	<i>wax</i>	Фураж
CDC Candle	<i>SE+ve</i>	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	592	<i>wax</i>	Фураж
Glacier AL.38 High Amylose	Н.в.	Н.в.	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Н.в.	Н.в.	Фураж
Margret	*	Н.в.	<i>Vmy1.b</i>	Середня	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Mebere	<i>SE-ve</i>		<i>Vmy1.b</i>	Середня	802	<i>Wax</i>	Фураж
Messina	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Фураж
Арна	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Асем	*	Н.в.	<i>Vmy1.a/Vmy1.b</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Бахус	*	Н.в.	<i>Vmy1.b</i>	Середня	802/1010	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Бровар	*	Н.в.	<i>Vmy1.a/Vmy1.b</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Вереск	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Фураж
Взірець	*	Н.в.	<i>Vmy1.b</i>	Середня	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Владімір	<i>SE-ve</i>	—	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
ВМ-МГФ	<i>SE+ve</i>	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	592	<i>wax</i>	Фураж
Кучміль	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	1010	<i>Wax</i>	Фураж
Московський 86	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Патрицій	*	Н.в.	<i>Vmy1.a/Vmy1.b</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Фураж
Приазовський 9	*	Н.в.	<i>Vmy1.b</i>	Середня	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Сварожич	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Святогор	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Север 1	*	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Совіра	<i>SE+ve</i>	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	1010	<i>Wax</i>	Фураж
Сусин	Н.в.	Н.в.	<i>Vmy1.a</i>	Низька	Н.в.	Н.в.	Пивоваріння
Туран 2	*	Н.в.	<i>Vmy1.a/Vmy1.b</i>	Низька	802/1010	<i>Wax</i>	Пивоваріння
Ясний	*	Н.в.	<i>Vmy1.a/Vmy1.b</i>	Низька	802	<i>Wax</i>	Пивоваріння

Примітка: \* — нетиповий алель; Н.в. — не визначено; *SE-ve* — алель стійкості до помутніння пива під час зберігання; *Wax* — домінуючий алель (алель дикого типу), який зумовлює синтез амілази; *wax* — нуль-алель, який визначає відсутність амілази у зернівці.

При визначенні алельного стану гена *Lox-1* виявлено, що всі досліджувані сорти містили домінуючий алель *Lox-1A*. Отже, пиво, зварене із цих сортів, міститиме активну ліпоксигеназу-1, яка окиснює гідропероксидами поліненасичені жирні кислоти в пиві, що призводить



до утворення сполук, які знижують смакові якості цього напою. Аналізом генетичних варіантів ферменту ліпоксигенази-1 зразків з колекції виявлено відсутність у наявних сортах алеля *lox1 A*.

Серед досліджених зразків алель *SE+ve* виявлено у трьох (Совіра, ВМ-МГФ, CDC Candle), алель *SE-ve* — також у трьох (09-794, Владімір, Mebere), у решти зразків типових алелів не виявлено. Пиво, зварене із зерна зразків, що несуть алель *SE+ve*, мутніє під час зберігання. Цей алель є також у сортів ячменю фуражного і зернового напрямів використання.

Наявність домінантного гена *Wax* (алель дикого типу) зумовлює синтез амілози, рецесивного *wax* (нуль-алель) — відсутність амілози у зернівці, що пов'язано з повним блокуванням синтезу ферменту GBSSI, й отже, амілози. У цьому разі крохмаль складається переважно з амілопектину. В трьох зразках із досліджуваної вибірки — 09-794, ВМ-МГФ, CDC Candle з нуль-алелем (амплікон 592 пн) виявлено рецесивний ген *wax*, що відповідає за добрі якісні показники зерна. Один зразок 09-210 містив гени *Wax/wax*, два зразки — невизначені алелі, решта зразків — домінантний ген *Wax*. Загалом серед гомогенних зразків виявлено 16 із функціональним алелем, який вирізняється розміром амплікону в 802 пн; 2 зразки — з розміром амплікону 1010 пн і 3 — ваксі ячменю (амплікон 592 пн). Зразок 09-210 гетерогенний, оскільки має як алель дикого типу, так і нуль-алель (592 і 802 пн), гетерогенні також Туран 2 і Бахус із розмірами ампліконів 802/1010 пн. У зразках, що містять амплікони розміром 802 і 1010 пн чи обидва, наявні алелі дикого типу. Такі результати безперечно підтверджують важливість використання молекулярно-генетичних підходів для виявлення чистоти сортів, особливо при роботі з неоднорідним матеріалом.

Таким чином, на основі результатів польових досліджень 26 зразків колекції ярого ячменю встановлено, що зразки Взірець, Святогор, Сварожич, Московський 86, Ясний мали значну врожайність на рівні 623—773 г/м<sup>2</sup>. За масою 1000 зернин ліпшими виявились зразки Сварожич (56,1 г), 09-210 (51,7 г), Взірець (52,6 г), Кучмінь (52,3 г). Найбільш скоростиглі з тривалістю вегетаційного періоду 70 діб — Сварожич, Приазовський 9, Арна, Взірець. За допомогою біохімічного аналізу визначено зразки з високим вмістом білка в зерні (14,2—16,0 %) — Патрицій, 09-794, 09-210, Совіра, Кучмінь, Вереск, CDC Candle, ВМ-МГФ, Mebere, High Amylose Glacier AL.38, Messina. За напрямом використання вони належать до зернових, фуражних. У сортів пивоварного напрямку використання ми виявили низький вміст білка 11,0—13,7 %, у сорту Сусин він становив 11,0 %, вміст крохмалю — 60,9 %.

У результаті визначення алельного складу за допомогою ДНК маркерів і ПЛР встановлено, що зразки ячменю 09-794, Владімір і Mebere містять неактивний алель *SE-ve*, який блокує біосинтез СМепротеїну й не допускає помутніння пива при зберіганні. У геномі 10 зразків (09-210, 09-794, Взірець, Совіра, Бахус, Приазовський 9, Margret, ВМ-МГФ, Mebere, Glacier AL.38) наявний ген *Bmy1.b* із середньою термостабільністю β-амілази, що сприяє виробництву пива за вищої температури, й отже, вищої якості. Три зразки з дослідженої вибірки (09-794, ВМ-МГФ, CDC Candle) містили рецесивний ген *wax* (нуль-алель), що вказувало на знижений вміст амілози у зернівці через блокування ферменту GBSSI й відповідно поліпшення зброджу-

вальных влаивостей і вищий вихід спирту. Ці форми, що несуть схарактеризовані алелі, можуть слугувати цінними донорами в майбутніх селекційних програмах.

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
2. Международный классификатор СЭВ рода *Hordeum* L. — Л., 1983. — 52 с.
3. Методические указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистости листьев. — Ленинград—Пушкин, 1987. — 20 с.
4. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса / Под ред. В.Д. Кобылянского, А.Я. Трофимовской. — Л., 1981. — 31 с.
5. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. — Прага, 1988. — 321 с.
6. Наумов О.Г., Козаченко М.Р., Васько Н.І. та ін. Селекція *Waxy* ячменю // Селекція і насінництво. — 2014. — Вип. 105. — С. 60—69.
7. Степаненко А.І., Моргун Б.В., Степаненко О.В. та ін. Розповсюдження алелів гена *HvITR1*, що кодує інгібітор трипсину СМЕ (ВТІ-СМЕ) та колоїдальну стабільність пива, серед сортів ячменю, зареєстрованих в Україні // *Biotechnol. Acta*. — 2014. — 7, N 6. — P. 75—82.
8. Степаненко О.В., Моргун Б.В., Рибалка О.І. та ін. Виявлення алельних варіантів гена *Wax* серед вітчизняних і зарубіжних сортів ячменю // *Наук. вісті НТУУ «КПІ»*. — 2014. — № 3 (95). — С. 78—83.
9. Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. Аллельные характеристики гена β-амилазы сортов ячменя Украины // *Цитология и генетика*. — 2007. — 41, № 4. — С. 20—25.
10. Шаверський А.А., Степаненко А.І., Жолнер Л.Г. та ін. Дослідження алельного поліморфізму генів *bmy1* і *lox-1* ячменю, пов'язаних із пивоварними характеристиками зерна // *Наук. вісті НТУУ «КПІ»*. — 2014. — № 3 (95). — С. 88—94.
11. Brody J.R., Kern S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Anal. Biochem.* — 2004. — 333. — P. 1—13.
12. Domon E. The insertion/deletion polymorphisms in the waxy gene of barley genetic resources from East Asia // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — 104. — P. 132—138.
13. Erkkila M.J. Intron III specific markers for screening of β-amylase alleles in barley cultivars // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 1999. — 17. — P. 139—147.
14. Erkkila M.J., Leah R., Ahokas H., Cameron-Mills V. Allele-dependent barley grain β-amylase activity // *Plant Physiol.* — 1998. — 117. — P. 679—685.
15. Fox G.P., Panozzo J.F., Li C.D. et al. Molecular basis of barley quality // *Austr. J. Agr. Res.* — 2003. — 54. — P. 1081—1101.
16. Hirota N., Kaneko T., Kuroda H. et al. Characterization of lipoxygenase-1 nullmutants in barley // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — 111, N 8. — P. 1580—1584.
17. *Modified Starches: Properties and Uses* / O.B. Wurzburg ed. — Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1986. — P. 404—425.
18. Sjakste T., Roder M. Distribution and inheritance of β-amylase alleles in north European barley varieties // *Hereditas*. — 2004. — 141. — P. 39—45.
19. Stewart C.N., Via L.E. A Rapid CTAB DNA Isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR // *Appl. Bio Techniques*. — 1993. — 14 (5). — P. 748—749.
20. Vinje M.A., Duke H.S., Henson C.A. Utilization of different *Bmy1* intron III alleles for predicting β-amylase activity and thermostability in wild and cultivated barley // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 2010. — 28, is. 3. — P. 491—501.
21. Yang G., Schwarz P.B., Vick B.A. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes in germinating barley // *Amer. Assoc. Cereal Chem.* — 1993. — 70. — P. 589—595.
22. Ye L., Dai F., Qin L. et al. Allelic diversity of a beer haze active protein gene in cultivated and Tibetan wild barley and development of allelic specific markers // *J. Agric. Food Chem.* — 2011. — 59. — P. 7218—7223.
23. Ye L., Huang L., Huang Y. et al. Haze activity of different barley trypsin inhibitors of the chloroform/methanol type (BTI-Cme) // *Food Chem.* — 2014. — 165. — P. 175—180.

Отримано 04.07.2017

КОМПЛЕКСНАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕНОФОНДА  
ЯЧМЕНЯ ЯРОВОГО ПО НАПРАВЛЕНИЯМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*О.В. Степаненко<sup>1,2</sup>, В.А. Музафарова<sup>3</sup>, А.И. Степаненко<sup>1</sup>, Е.В. Кузьминский<sup>2</sup>, В.К. Рябчун<sup>3</sup>,  
Б.В. Моргун<sup>1,2,4</sup>*

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>2</sup>Национальный технический университет «Киевский политехнический институт им. И. Сикорского»

<sup>3</sup>Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева Национальной академии аграрных наук Украины, Харьков

<sup>4</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Среди 26 коллекционных сортов и линий ячменя ярового обнаружены ценные для различных направлений использования образцы по комплексу агрономических и биохимических признаков. Охарактеризовано аллельное состояние генов *Bmy1*, которое определяет активность и термостабильность β-амилазы, *Lox-1*, детерминирующий синтез липоксигеназы-1, *Itr1*, ответственного за наличие или отсутствие СМе-протеина, и *Wax*, который кодирует ключевой фермент синтеза амилозы крахмала эндосперма.

COMPLEX MOLECULAR-GENETIC EVALUATION OF SPRING BARLEY GENE POOL  
BY USE DIRECTIONS

*O.V. Stepanenko<sup>1,2</sup>, V.A. Muzafarova<sup>3</sup>, A.I. Stepanenko<sup>1</sup>, Ye.V. Kuzminskiy<sup>2</sup>, V.K. Ryabchun<sup>3</sup>,  
B.V. Morgun<sup>1,2,4</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine  
148 Akademika Zabolotnoho St., Kyiv, 03143, Ukraine

<sup>2</sup>National Technical University «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute»  
37 Prosp. Peremohy, Kyiv, 03056, Ukraine

<sup>3</sup>V. Ya. Yuryev Plant Production Institute, National Academy of Agricultural Sciences of  
Ukraine

142 Moskovsky ave., Kharkiv, 61060, Ukraine

<sup>4</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kiev, 03022, Ukraine

Among the 26 collectible varieties and lines of spring barley, samples valuable for various directions of using in the complex of agronomic and biochemical features were discovered. In addition, the allelic state of the *Bmy1* gene that determines the activity and thermal stability of β-amylase, *Lox-1*, which determines the synthesis of lipoxygenase-1, *Itr1*, responsible for the presence or absence of CMe protein and *Wax*, which encodes the key enzyme for the amylose synthesis of starch endosperm, is characterized.

*Key words:* spring barley, molecular markers, *Bmy1* gene, *Lox-1* gene, *Itr1* gene, *Wax* gene.