

О.Р. СТРАТУЛА, Ю.М. СИВОЛАП
Южный биотехнологический центр в растениеводстве
Украинской академии аграрных наук
и Министерства образования и науки Украины,
Одесса, Овидиопольская дор., 3
E-mail: genom2005@ukr.net

АЛЛЕЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕНА β -АМИЛАЗЫ СОРТОВ ЯЧМЕНЯ УКРАИНЫ



Сорта сельскохозяйственных растений традиционно характеризуют описанием морфологических признаков совместно с биохимическими показателями. В настоящее время эти данные могут быть дополнены благодаря ДНК-технологиям, которые позволяют использовать молекулярно-генетические маркеры, генерируемые в результате ПЦР. Маркеры аллелей генов, кодирующих экономически важные признаки (активность β -амилазы), могут использоваться для ускорения селекционного процесса путем контроля за растениями, несущими нужный аллель, на ранних этапах селекции. Изучен аллельный состав 99 сортов ярового и озимого ячменя пивоваренного, зернового и ценного направлений использования. Приведены данные ПЦР-анализа с использованием ДНК-маркера к гену β -амилазы и показано, что сорта ячменя могут состоять из генотипов с различными аллелями гена β -amy1.

© О.Р. СТРАТУЛА, Ю.М. СИВОЛАП, 2007

Введение. Одной из важных проблем современного растениеводства является идентификация сортов и характеристика аллельного состояния генов, кодирующих хозяйственно ценные признаки. Идентификация и определение генетической однородности сортов ячменя имеет большое значение для повышения эффективности технологических процессов переработки продукции, в частности, при изготовлении солода и пива. Определение сортов традиционно базируется на анализе морфологических признаков, дополненных характеристикой биохимических показателей изоэнзимов и запасных белков гордеинов [1]. Развитие молекулярной генетики, в частности ДНК-технологий, позволило использовать молекулярно-генетические маркеры, генерируемые в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР). Создана база данных ДНК-типирования сортов ячменя на основе анализа 20 микросателлитных маркеров, в которой уникально дифференцированы сорта, и аллельный состав анализируемых локусов отражен в виде генетических формул [2]. В перспективе эти данные будут дополняться показателями локусов (генов), кодирующих экономически важные признаки. Маркеры аллелей могут использоваться для характеристики популяционного состава сорта с целью создания линейных сортов, соответствующих европейским и мировым стандартам однородности.

Современные пивоваренные сорта ячменя должны отвечать ряду требований, в том числе и по комплексу солодовых свойств. Качество солода является результатом гидролитической активности амилолитических ферментов (так называемая диастатическая сила), важнейшим из которых является β -амилаза, гидролизующая крахмал с образованием мальтозы и декстринов [3, 4]. Активный фермент позволяет получить большее количество мальтозы (сахар, способный к брожению) до того, как под воздействием температуры, необходимой для приготовления суслу, β -амилаза начнет деградировать [5]. Взаимозависимости между процентным содержанием крахмала и активностью β -амилазы у сортов ячменя не выявлено [6].

Эндоспермальная β -амилаза кодируется геном β -amy1, который локализован на длинном плече хромосомы 4Н. Интрон III-специфический участок этого гена может использоваться как качественный маркер при ПЦР для выявления

ния трех β -амилазных аллелей с помощью специфических праймеров [7], что может обеспечить ценный механизм отбора, который мог бы использоваться для предсказания диастатической силы в ячмене на стадии проростка.

Основываясь на известных пивоваренных качествах сортов ячменя и опубликованных данных об их диастатической силе, можно утверждать, что сортам с хорошими пивоваренными свойствами и, соответственно, имеющим высокоактивную β -амилазу присущ аллель (ПЦР-фрагмент) 516 п.н., тогда как непивоваренные сорта (низкая активность β -амилазы) имели 643 п.н. ПЦР-фрагмент. Третий, 477 п.н. ПЦР-фрагмент, связанный с наиболее высокими показателями активности β -амилазы и обнаруженный в ряде форм *Hordeum spontaneum*, не найден в зерне известных сортов культурного ячменя [3].

Цель нашей работы заключалась в исследовании полиморфизма локуса β -*amy1* в сортах ячменя, зарегистрированных в Украине.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили 99 (78 яровых и 21 озимый) сортов ячменя, зарегистрированных в Украине. В табл. 1–3 приведены характеристики исследуемых сортов – их происхождение и разделение по каталогу на пивоваренные, зерновые и ценные.

ДНК выделяли из пятидневных этиолированных проростков с помощью цетавлона В (СТАВ). Для каждого сорта проводили выделение ДНК из 20 индивидуальных проростков. Количество ДНК определяли с использованием ДНК-флюориметра («Hoefег», США).

Интрон III-специфическую последовательность гена β -*amy1* амплифицировали из геномной ДНК различных сортов ячменя.

ПЦР проводили с 20 образцами каждого сорта. Реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала: 50 мМ KCl, 20 мМ Tris-HCl pH 8,4 (25 °C), 3 мМ MgCl₂, 0,01 % Tween 20, 5 %-ный глицерин, по 0,15 мМ каждого dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера, 100 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы.

Для ПЦР применяли следующий температурный режим: начальная денатурация – 1,5 мин при 94 °C, денатурация – 30 с при 94 °C, отжиг – 40 с при 60 °C, элонгация – 1 мин при 72 °C, заключительная элонгация –

10 мин при 72 °C. Проводили 35 циклов амплификации. Для амплификации ДНК использовали приборы «Терцик» («ДНК-Технология», Россия).

Для тестирования продуктов амплификации использовали 2 %-ные агарозные гели с последующим окрашиванием бромистым этидием и фотографированием в УФ-свете на фотопленку «Микрат-300» (Россия). Документирование профилей ДНК на гелях проводили с помощью системы видеодокументации «Image Master VDS» («Amersham Pharmacia Biotech», Австрия). Фотографирование окрашенных гелей производили цифровой видеокамерой. С помощью компьютерного обеспечения LISKAP цифровое видеоизображение продуктов разделения в геле переносили в компьютер.

Результаты исследований и их обсуждение. Анализ полученных результатов показал, что из 78 яровых сортов 41 оказался однородным по локусу β -*amy1*, что составило 52 %. Внутрисортовая гетерогенность остальных яровых сортов варьировала в диапазоне от 5 до 50 % (табл. 1 и 2). У 21 озимого сорта наблюдали почти 100 %-ную гомогенность (табл. 3). Гетерогенные сорта различались по двум продуктам амплификации – 516 п.н. ПЦР-фрагменту, который связан с признаком высокой активности β -амилазы в зерне, и 643 п.н. ПЦР-фрагменту, связанному с низкой β -амилазной активностью. Третий, 477 п.н. ПЦР-фрагмент, присущий формам с наиболее высокими показателями активности β -амилазы (некоторые формы *H. spontaneum*), в указанном наборе сортов культурного ячменя не обнаружен.

В табл. 1 представлены 54 сорта ячменя, заявленные в реестре как пивоваренные. Из них 31 сорт ячменя содержит аллели одного вида (рис. 1). При оценке внутрисортовой гетерогенности по локусу β -*amy1* выборки пивоваренных сортов Гетьман (рис. 2), Звершения, Каштан, Командор, Мироновский 92, Мишке, Незалежный, Олбрам (рис. 3), Пеяс, Пивденный, Подолян, Рось, Стяг, Тюрингия, Форум от 50 до 100 % содержали аллели низкоактивной β -амилазы (643 п.н. ПЦР-фрагмент). Из общего количества пивоваренных сортов ячменя 32 сорта были украинской селекции – 56 % этих сортов были гетерогенными по локусу β -*amy1*.

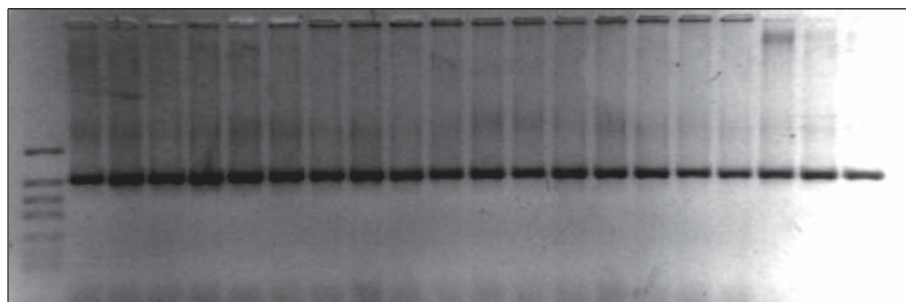


Рис. 1. Электрофореграмма однородного пивоваренного сорта Оболонь (100 % аллелей активной β -амилазы)

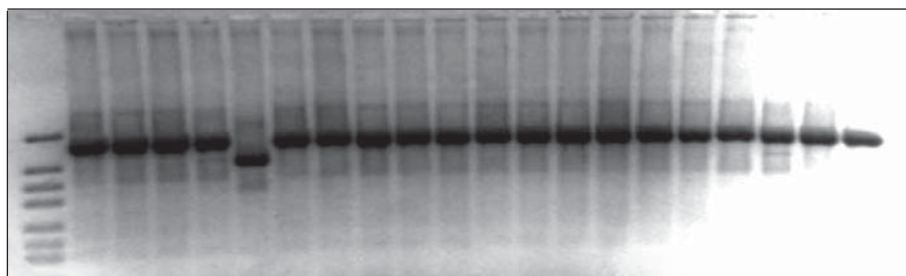


Рис. 2. Электрофореграмма гетерогенного пивоваренного сорта Гетьман (95 % аллелей неактивной β -амилазы)

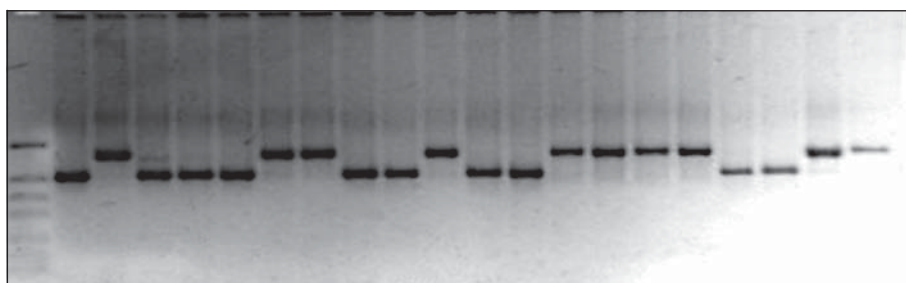


Рис. 3. Электрофореграмма гетерогенного пивоваренного сорта Олбрам (50 % аллелей неактивной β -амилазы)

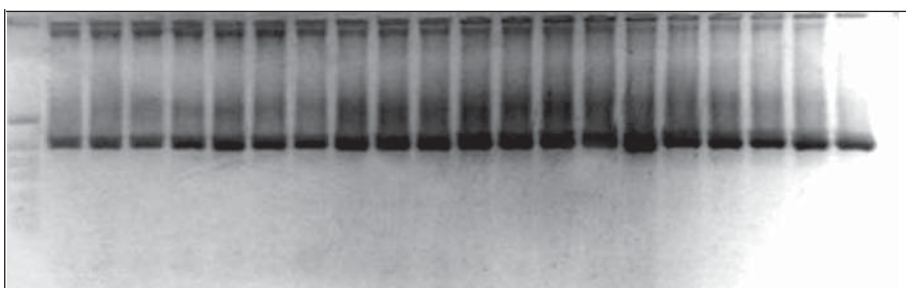


Рис. 4. Электрофореграмма гомогенного зернового сорта Галатея (100 % аллелей активной β -амилазы)

Таблица 1
Оценка внутрисортовой гетерогенности по локусу β -*amy1* у пивоваренных сортов ярового ячменя

Сорт	Оригинатор	Частота встречаемости генотипов, п.н.		
		643	516	477
Амулет	Чехия	0,3	0,7	0
Анабель	Германия	0	1	0
Андриен	Нидерланды	0,95	0,05	0
Аскольд	Украина (МИП)	0	1	0
Бадьорий	Украина (ИР)	0,15	0,85	0
Вакула	Украина (СГИ)	0	1	0
Галактик	Украина (СГИ)	0	1	0
Гелиос	Украина (СГИ)	0	1	0
Гетьман	Украина (СГИ)	0,95	0,05	0
Гонар	Белоруссия	0	1	0
Джерело	Украина (ИР)	0,1	0,9	0
Европрестиж	Бельгия	0	1	0
Жозефин	Франция	0	1	0
Зоряный	Украина (СГИ)	0,1	0,9	0
Звершеня	Украина (ИР)	0,6	0,4	0
Казковый	Украина (СГИ)	0	1	0
Каштан	Украина (ИР)	0,95	0,05	0
Командор	Украина (СГИ)	1	0	0
Корона	Украина (МС)	0,25	0,75	0
Мареси	Германия	0,2	0,8	0
Марина	Германия	0	1	0
Мироновский 92	Украина (МС)	0,95	0,05	0
Мироновский 86	Украина (МС)	0,3	0,7	0
Мишке	Франция	1	0	0
Невада	Франция	0	1	0
Незалежный	Украина (СГИ)	0,95	0,05	0
Одесский 100	Украина (СГИ)	0	1	0
Одесский 115	Украина (СГИ)	0,05	0,95	0
Одесский 115 (2n)	Украина (СГИ)	0,05	0,95	0
Олбрам	Чехия	0,5	0,5	0
Оболонь	Украина (СГИ)	0	1	0
Пасадена	Нидерланды	0	1	0
Пеяс	Чехия	1	0	0
Пивденный	Украина (СГИ)	0,95	0,05	0
Подольский 14	Украина (СГИ)	0	1	0
Подольян	Украина (ВС)	0,75	0,25	0
Прима Бело-руссии	Белоруссия	0,05	0,95	0
Роланд	Швеция	0	1	0
Рось	Украина (СГИ)	1	0	0
Селенит	Украина (СГИ)	0	1	0
Скарлет	Чехия	0	1	0
Спомин	Украина (СГИ)	0,15	0,85	0
Стяг	Украина (НАУ)	0,9	0,1	0
Табора	Франция	0	1	0
Толар	Чехия	0	1	0

Продолжение табл. 1

Сорт	Оригинатор	Частота встречаемости генотипов, п.н.		
		643	516	477
Тюрингия	Германия	1	0	0
Филадельфия	Германия	0	1	0
Форум	Чехия	1	0	0
Харьковский 112	Украина (ИР)	0,05	0,95	0
Целинка	Франция	0	1	0
Чаривный	Украина (СГИ)	0	1	0
Чудовый	Украина (СГИ)	0	1	0
Эдем	Украина (СГИ)	0,15	0,85	0
Экзотик	Украина (ИР)	0	1	0

Таблица 2
Оценка внутрисортовой гетерогенности по локусу β -*amy1* у ценных и зерновых сортов ярового ячменя

Сорт	Оригинатор	Частота встречаемости генотипов, п.н.		
		643	516	477
Адапт	Украина (СГИ)	0,05	0,95	0
Водограй	Украина (СГИ)	0,4	0,6	0
Галатея	Украина (СГИ)	0	1	0
Гама	Украина (ИР)	0,95	0,05	0
Днепровский 257	Украина (ДОН)	0,4	0,6	0
СН-28	Украина (КИС)	1	0	0
Дерибас	Украина (СГИ)	0,9	0,1	0
Донецкий 9	Украина (ДОН)	0,7	0,3	0
Донецкий 12	Украина (ДОН)	1	0	0
Донецкий 14	Украина (ДОН)	0,8	0,2	0
Зерноградский 385	Россия	0,2	0,8	0
Карат	Украина (ВИАВ)	0,1	0,9	0
Лотос	Украина (ВС)	0,2	0,8	0
Надия	Украина (ИЗТ)	0	1	0
Неофит	Украина (ВИАВ)	0	1	0
Одесский 131	Украина (СГИ)	0,5	0,95	0
Одесский 151	Украина (СГИ)	1	0	0
Паллидум 107	Украина (СГИ)	0,8	0,2	0
Перелом	Россия	0,1	0,9	0
Переможный	Украина (СГИ)	0	1	0
Прерия	Украина (СГИ)	0,95	0,05	0
Сталкер	Украина (СГИ)	1	1	0
Феникс	Украина (ИР)	0	0	0
Эней	Украина (СГИ)	0	0	0

Из 24 сортов ячменя из табл. 2, относящихся согласно реестру к ценным и зерновым, 10 были моногенными по локусу β -*amy1*. Сорта

Таблица 3
Оценка внутрисортовой гетерогенности по локусу β -*amy1* у сортов озимого ячменя

Сорт	Оригинатор	Частота встречаемости генотипов, п.н.		
		643	516	477
Аванс	Россия	1	0	0
Бемир 2	Украина (МС)	1	0	0
Буран	Украина (КС)	1	0	0
Вавилон	Россия	1	0	0
Козир	Россия	1	0	0
Кромоз	Чехия	1	0	0
Манас	Украина (СГИ)	1	0	0
Мионовский 87	Украина (МИП)	1	0	0
Михайло	Россия	1	0	0
Одесский 165	Украина (СГИ)	1	0	0
Одесский 167	Украина (СГИ)	1	0	0
Одесский 170	Украина (СГИ)	1	0	0
Онега	Украина (КС)	1	0	0
Основа	Украина (СГИ)	1	0	0
Паллидум 77	Украина (МС)	1	0	0
Радон	Украина (МС)	1	0	0
Секрет	Россия	1	0	0
Скорород	Россия	0,05	0,95	0
Тайна	Украина (СГИ)	1	0	0
Тамань	Украина (СГИ)	1	0	0
Циклон	Россия	1	0	0

Адапт, Водоград, Галатя (рис. 4), Днепровский 257, Зерноградский 385, Карат, Лотос, Надя, Нефит, Одесский 131, Перелом, Переможный, Сталкер содержали от 60 до 100 % аллелей высокоактивной β -амилазы (516 п.н. ПЦР-фрагмент).

Из 22 зерновых сортов украинской селекции 12 имели различные аллели β -амилазного гена, что составило 54 %.

В табл. 3 продемонстрированы результаты оценки внутрисортовой гетерогенности по локусу β -*amy1* у 21 сорта озимого ячменя. Они показали, что сорт Скорород на 95 % состоит из аллелей высокоактивной β -амилазы (516 п.н. ПЦР-фрагмент), остальные сорта были однородны по данному локусу и состояли только из аллелей неактивной β -амилазы (643 п.н. ПЦР-фрагмент). В Украине были созданы 13 озимых сортов, и все они оказались моногенными по локусу β -*amy1*.

В связи с полученными результатами и литературными данными о том, что активность β -амилазы является одним из важнейших параметров для пивоварения (диастатическая сила) [1, 4], можно утверждать, что не все сорта ячменя, названные пивоваренными, однородны по указанному признаку.

Известно, что корреляция между процентным содержанием крахмала и активностью β -амилазы в зерне ячменя отсутствует. Содержание белка, крахмала и активность β -амилазы в семенах ячменя зависят от генотипа растений [6]. Пример – сорт Надя (направление использования – зерновое), содержание белка в зерне – 10,6 %, при этом сорт на 100 % содержит аллели высокоактивной β -амилазы. Сорт Гонар (направление использования – пивоваренное), содержание в зерне белка – 12 %, крахмала – 59,8 %, а также 100%-ное содержание аллелей высокоактивной β -амилазы.

Использование маркера для отбора аллелей активной β -амилазы может ускорить селекционный процесс путем контроля на ранних этапах селекции в расщепляющейся популяции за растениями, несущими нужный аллель.

Система идентификации сортов ячменя по гену β -*amy1* может быть использована для пополнения каталога генотипов сортов, что позволит упорядочить имеющиеся в Украине сорта по данному признаку на пивоваренность.

Авторы приносят благодарность зав. отделом селекции ячменя СГИ акад. А.А. Линчевскому и директору Института экспертизы сортов Госслужбы по охране прав на сорта растений Украины канд. биол. наук А.Н. Гончару за предоставление семян сортов ячменя.

SUMMARY. Allelic diversity in a set of 99 spring and winter barley varieties for the different direction of use (brewing, cereal and valuable) has been studied. PCR analyses with β -amylase DNA-marker have shown that the genotypes of different barley varieties can include different alleles of β -*AMY1* gene.

РЕЗЮМЕ. Вивчили алельний склад 99 сортів ярого та озимого ячменю пивоварного, зернового та цінного напрямків використання. За даними ПЛР-аналізу з використанням ДНК-маркера до гена β -амілази показано, що сорти ячменю можуть складатися з генотипів з різними алелями гена β -*amy1*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cullis B.R., Smith A.B., Panozzo J.F., Linf P.* Barley malting quality: are we selecting the best? // *Austral. J. Agr. Res.* – 2003. – **54**. – P. 1261–1275.
2. *Бальвинская М.С., Roder M., Сиволап Ю.М.* SSRP-анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя южноукраинской селекции // *Докл. Рос. академии с.-х. наук.* – 2001. – № 5. – С. 3–7.
3. *Erkkila M., Leah R., Ahokas H., Cameron-Mills V.* Allele-dependent barley grain β-amylase activity // *Plant Physiol.* – 1998. – **117**. – P. 679–685.
4. *Fox G.P., Panozzo J.F., Li C.D., Lance R. CM., Inkerman P.A., Henry R.J.* Molecular basis of barley quality // *Austral. J. Agr. Res.* – 2003. – **54**. – P. 1081–1101.
5. *Sjakste T., Roder M.* Distribution and inheritance of β-amylase alleles in north European barley varieties // *Hereditas.* – 2004. – **141**. – P. 39–45.
6. *Нуржанова А.А., Седловский А.И., Хакимжанов А., Сариев Б.С.* Скрининг районированных сортов и перспективных форм пивоваренного ячменя по биохимическим параметрам, определяющим пивоваренные качества зерна // *Актуальные проблемы генетики: Тез. докл. – М., 2003. – Т. 1. – С. 182–183.*
7. *Erkkila M.* Intron III-specific markers for screening of β-amylase alleles in barley cultivars // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1999. – **17**. – P. 139–147.

Поступила 11.05.06