

УДК 577.21:633.16:575.113.2

О.В. Степаненко, Б.В. Моргун, О.І. Рибалка, А.І. Степаненко, Є.В. Кузьмінський

ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛЬНИХ ВАРИАНТІВ ГЕНА *WAX* СЕРЕД ВІТЧИЗНЯНИХ І ЗАРУБІЖНИХ СОРТІВ ЯЧМЕНЮ

The objective of the present study was to apply of the molecular marker system for detection of the allelic variants of the *Wax* gene. Starch pasting properties are very important factors in malting, food processing and feed quality of barley cultivars. Therefore, it is important to control of the amylose/amylopectin ratio in the barley starch. The *Wax* locus of barley (*Hordeum vulgare* L.) is responsible for the amylose endosperm biosynthesis. The *Wax* gene may be found among the barley cultivars in several allelic variants: 2 functional active alleles encoding GBSS I protein and one null-allele with the inactivated enzyme. The most reliable way to assess the allelic state of *Wax* gene is to use molecular marker based on polymerase chain reaction. Among the 126 barley samples studied (cultivars and breeding lines) by a codominant molecular marker system all of the three allelic variants of *Wax* gene were identified. Two samples representing with the cultivars Candle and Alamo carried the null-allele of the *Wax* gene. The results of the present study can be efficiently used to identify genotypes with the null-allele of the *Wax* gene for developing and characterization of the new barley varieties.

Keywords: barley (*Hordeum vulgare* L.), *Wax* genes, PCR, molecular markers, starch.

Вступ

Крохмаль становить близько 70 % основного запасуючого органу зернівки (ендосперму) злаків. Гранули крохмалю складаються з двох гомополісахаридів: лінійної амілози (20–25 %) та розгалуженого амілопектину (70–75 %). Полісахариди крохмалю побудовані із залишків *D*-глюкози, об'єднаних в амілозі та лінійних ланцюгах амілопектину α -1–4-зв'язками, а в точках розгалуження амілопектину – міжланцюговими α -1–6-зв'язками [1].

Коливання співвідношення амілози й амілопектину в крохмальних гранулах значною мірою впливає на технологічні властивості зерна та його поживну цінність.

Синтез амілопектину контролюється багатьма ферментами, в т.ч. SBE (глюканрозгалужуючий фермент). В однодольних знайдено три ізоформи фермента – SBEI, SBEII α та SBEII β . Одночасний сайленсинг обох генів SBEII α і SBEII β (але не одного) веде до підвищення вмісту амілози в зернах злакових до 70 % [2]. Синтез амілопектину кодується багатьма генами: ферментами-синтетазами крохмалю SSI, SSII, SSIII; ферментами розгалуження ланцюга крохмалю SBEI, SBEII α , SBEII β ; ферментами де-розгалуження ланцюга крохмалю DBE [3].

Головним ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтаза крохмалю GBSSI (granule-bound starch synthase I, GenBank accession number: P09842) з молекулярною масою близько 60 кДа, яка має назву Wx-протеїн. У ячменю активність ферменту GBSSI

та відповідно прояв ознаки ваксі визначає ген *Wax*, який локалізований на короткому плечі хромосоми 7Н.

Природні *Wax* мутанти ячменю мають не 100 % амілопектину в складі крохмалю, а співвідношення 2–10 % амілози та 90–98 % амілопектину. В результаті досліджень було отримано також ячмінь, який не містив амілози у крохмалі і мав відмінні від мутантних *Wax* форм властивості [4]. У світовому сортовому різноманітті виявлено дві функціональні алелі гену й один нуль-алель, або алель *wax* [5].

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.), який несе нуль-алель за геном *Wax*, на відміну від звичайних сортів, має підвищений вміст простих цукрів: глюкози, фруктози, сахарози і розчинної клітковини у формі β -глюканів. Вважають, що ячмінь *wax* має підвищений вміст β -глюканів у зв'язку з тим, що у нього генетично блокований процес трансформації глюкози в крохмаль і метаболізм за участю глюкози стає частково спрямованим на біосинтез β -глюканів. Амілопектин майже повністю розщеплюється в організмі людини. β -глюкани майже не перетравлюються у шлунково-кишковому тракті людського організму, але мають дієтичну цінність, оскільки під дією мікрофлори вони утворюють ряд важливих коротколанцюгових жирних кислот (оцтова, пропіонова, бутилова). Ячмінь з алелем *wax* містить на 32–41 % більше β -глюканів порівняно зі звичайним ячменем. Крім того, зерно ячменю *wax* має у середньому на 25 % вищий вміст ліпідів, ніж зерна звичайного ячменю. У деяких мутантних формах голозерного ячменю, створених

нещодавно в Канаді, знайдено до 15–16 % β -глюканів. Отже, перспективним є виробництво продуктів харчування та кормів для тварин на основі ячмінного зерна, що несе нуль-алель за геном *Wax*, оскільки вони мають високу дієтичну цінність за рахунок підвищеного вмісту β -глюканів порівняно зі звичайним ячменем [6].

Для валідації молекулярної маркерної системи можна проводити фарбування подрібнених зернівок ячменю розчином йоду. Реакція базується на тому, що при взаємодії йоду з крохмалем амілоза утворює сполуки включення (клатрат) каналного типу. Цей процес супроводжується зміною бурого забарвлення йоду на синьо-фіолетове (довжина хвилі $\lambda_{\text{макс}} = 620\text{--}680$ нм). Амілопектин, на відміну від амілози, дає з йодом червоно-фіолетове забарвлення ($\lambda_{\text{макс}} = 520\text{--}555$ нм) [7, 8].

Постановка задачі

Метою роботи були розроблення та оптимізація умов проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для визначення алельних станів гена *Wax* і аналіз наявної колекції загальної ДНК районованих вітчизняних та зарубіжних сортів і селекційних ліній ячменю.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 126 сортів та ліній ячменю вітчизняної і зарубіжної селекції, надані Селекційно-генетичним інститутом – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення НААН України та Інститутом фізіології рослин та генетики НАН України. Подальші дослідні роботи проводилися на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Виділення загальної рослинної ДНК проводили ЦТАБ методом [9] з модифікаціями із замороженої зеленої маси та зерна. Якість і концентрацію виділеної загальної ДНК визначали спектрофотометрично на приладі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35. Полімеразна ланцюгова реак-

ція з використанням низхідної методики (Touch-down) на ген *Wax* ячменю проводилася з праймерами, запропонованими [5], на ампліфікаторі Thermo Scientific Arctic. Кожна реакція містила 30 нг загальної рослинної ДНК, а для ампліфікації використовували 0,5 од. DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific).

Умови реакції: початкова денатурація при 94 °С – 3 хв, 8 циклів – денатурація при 94 °С – 30 с, при температурі вищій за температуру відпалу праймерів – 62 °С – 30 с і з кожним циклом температура зменшується на 1 °С, елонгація при 72 °С – 1 хв 10 с та ще 28 циклів – денатурація при 94 °С – 30 с, при температурі відпалу праймерів – 54 °С – 30 с, елонгація при 72 °С – 1 хв 10 с та 5 хв фінальна елонгація. Продукти ампліфікації візуалізували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 1,2 %-му агарозному гелі натрій боратному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію [10].

Структуру гену GBSSI ячменю та схему ідентифікації алельних варіантів гена *Wax* ячменю наведено на рис. 1.

При наявності функціональних алелів дико-го типу очікуються амплікони розміром 802 п.н. чи 1010 п.н. Амплікон розміром 592 п.н. вказує на присутність нуль-алелю за цим геном і відповідно модифікований склад крохмалю. У випадку гетерозиготного організму спостерігали наявність ампліконів кількох типів.

Результати та їх обговорення

Аналіз рослинного матеріалу для визначення алельного стану гена *Wax* проводили за допомогою специфічного молекулярного маркера, запропонованого у [5]. Ця система дає можливість визначати як гомозиготні, так і гетерозиготні рослини, тобто є кодомінантною. Результати типових ампліфікацій наведено на рис. 2 і 3.

Зразки 1–11, 13–15 містять амплікони розміром 802 п.н., 1010 п.н. чи обидва, що свідчить про наявність алелю дико-го типу. Зразок

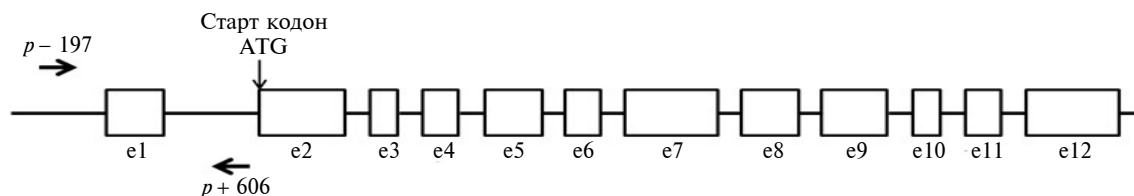


Рис. 1. Схема структури гена GBSSI ячменю; 12 екзонів (e) позначені прямокутниками. Стрілками показано місця посадки специфічних праймерів для ідентифікації алельних варіантів гена *Wax* ячменю [5]

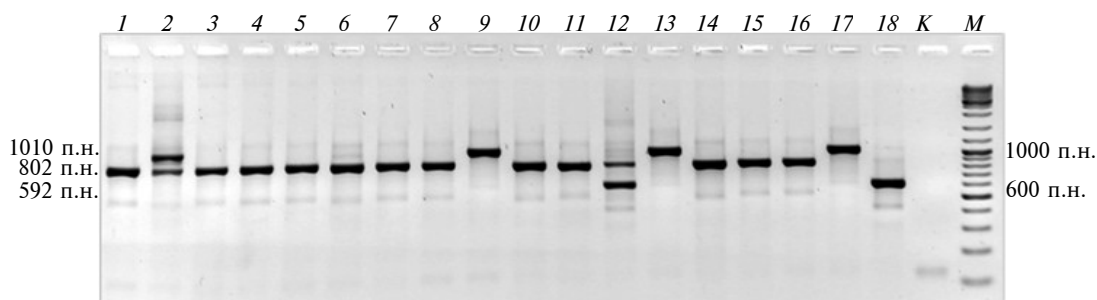


Рис. 2. Електрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wax* ячменю. Розмір фрагментів маркера вказано праворуч. Доріжки: 1 – сорт Одеський 36; 2 – сорт Чорноморець; 3 – сорт Нут; 4 – сорт Славутич; 5 – сорт Одеський 69; 6 – сорт Одеський 70; 7 – сорт КВС Бамбіна; 8 – сорт Beatrise; 9 – сорт Дала; 10 – сорт Goldenpromise; 11 – сорт Ksanady; 12 – сорт Alamo; 13 – сорт Еней; 14 – лінія Goldenpromise Тр 2×5; 15 – сорт Хадар; 16 – контрольний сорт Розаліна, який несе алель 802 п.н.; 17 – контрольний сорт Danuta, який несе алель 1010 п.н.; 18 – контрольний сорт Candle, який несе нуль-алель 592 п.н.; K – негативний контроль, ТЕ буфер; M – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

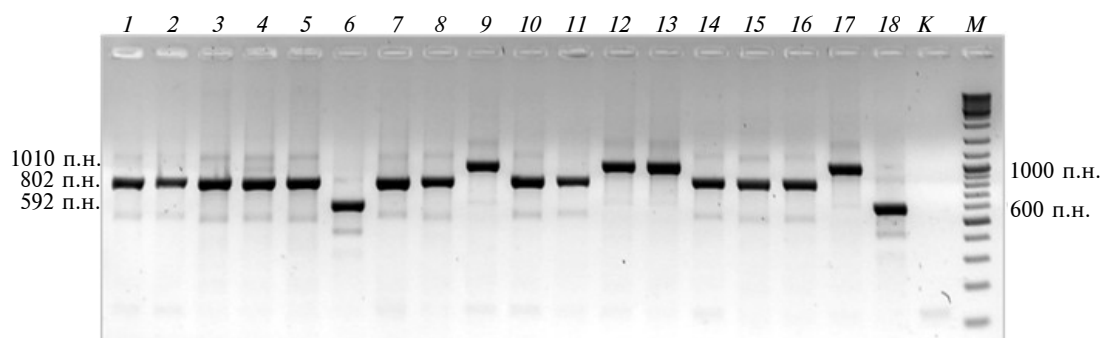


Рис. 3. Електрофореграма результатів полімеразної ланцюгової реакції на ген *Wax* ячменю. Розмір фрагментів маркера вказано праворуч. Доріжки 1 – сорт Клер; 2 – сорт Модерн; 3 – сорт Gainer; 4 – сорт Козацький; 5 – лінія Golden promise Тр 4×5+у10; 6 – сорт Alamo; 7 – сорт Ахілес; 8 – лінія Golden promise Тр 3 у10; 9 – сорт Annabell; 10 – сорт Лука; 11 – сорт JB Maltasia; 12 – сорт Галичин; 13 – сорт Командор; 14 – сорт Shakira; 15 – сорт Ахілес № 40; 16 – контрольний сорт Розаліна; 17 – контрольний сорт Danuta; 18 – контрольний сорт Candle; K – негативний контроль; M – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

12 є гетерогенним, оскільки має як алель дикого типу, так і нуль-алель. Як контроль наявності алелей дикого типу використовували сорти Розаліна, який несе алель 802 п.н. (доріжка 16) та Danuta, який несе алель 1010 п.н. (доріжка 17) і нуль-алелю – сорт Candle (доріжка 18), характеристики яких відомі з літератури. В якості негативного контролю ПЛР використо-

ували реакційну суміш, у яку замість загальної ДНК додавали розчинник, ТЕ буфер.

Зразки 1–5, 7–15 містять амплікони розміром 802 п.н. або 1010 п.н., що свідчить про наявність алелів дикого типу. Зразок 6 має амплікон розміром 592 п.н., що свідчить про наявність нуль-алеля. Розподіл алельного стану досліджуваних зразків наведено в таблиці.

Таблиця. Результати дослідження ячменю по наявності *Wax*-алелів

№	Зразок	<i>Wax/wax</i>
1	Abissinian	1010 п.н.
2	Alamo	592/802 п.н.
3	Alamo	592 п.н.
4	Albert	1010 п.н.
5	Annabell	1010 п.н.
6	Arabische	1010 п.н.

№	Зразок	<i>Wax/wax</i>
64	Ебсон	802 п.н.
65	Едем	802 п.н.
66	Еней	1010 п.н.
67	Енріке	802 п.н.
68	Зоряний	802 п.н.
69	Ілот № 3	802 п.н.

Продовження таблиці

№	Зразок	Wax/wax
7	Azimuth	802 п.н.
8	Beatrise	802 п.н.
9	Bellona	802/1010 п.н.
10	Bojos	802 п.н.
11	Candle	592 п.н.
12	Danuta	1010 п.н.
13	Daura	802 п.н.
14	Fibon	802 п.н.
15	Gainer	802 п.н.
16	Golden Promise	802 п.н.
17	Golden Promise Tr2x5	802 п.н.
18	Golden Promise Tr3 y10	802 п.н.
19	Golden Promise Tr4x5+10y	802 п.н.
20	Henley	802 п.н.
21	<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>trifurcatum</i>	1010 п.н.
22	JB Maltasia	802 п.н.
23	Jenifer	802 п.н.
24	Jenifer (Київ)	802 п.н.
25	Jet	1010 п.н.
26	Kanga	802 п.н.
27	KBC Aniciana	802 п.н.
28	Kristalia	802 п.н.
29	Ksanady	802 п.н.
30	Mal 7	802 п.н.
31	Marthe	802 п.н.
32	McGwire	802 п.н.
33	McGwire	802 п.н.
34	Negro Manbredi	802 п.н.
35	Orlande	802 п.н.
36	Philadelphia	802 п.н.
37	Shakira	802 п.н.
38	Sulto	802 п.н.
39	Адепт	1010 п.н.
40	Ахілес	802 п.н.
41	Ахілес № 40	802 п.н.
42	Барка	802 п.н.
43	Беатрикс	802 п.н.
44	Вакула	802 п.н.
45	Вестнік	802 п.н.
46	Водограй	1010 п.н.
47	Воевода	802 п.н.
48	Воевода	802/1010 п.н.
49	Всесвіт	802/1010 п.н.
50	Галактик	802/1010 п.н.
51	Галатєя	802 п.н.
52	Галичин	1010 п.н.
53	Гамбрінус	802 п.н.
54	Геліос	802 п.н.

№	Зразок	Wax/wax
70	Ітиль	1010 п.н.
71	Казковий	802 п.н.
72	Квенч	802 п.н.
73	КВС Бамбіна	802 п.н.
74	Клер	802 п.н.
75	Ковзан	802 п.н.
76	Козацький	802 п.н.
77	Командор	1010 п.н.
78	Командор	1010 п.н.
79	Лука	802 п.н.
80	Лука	802 п.н.
81	Медікум 46	802 п.н.
82	Модерн	802 п.н.
83	Модерн (Київ)	802 п.н.
84	Незалежний	802 п.н.
85	Нут 244	802 п.н.
86	Нут 778	1010 п.н.
87	Нутанс 106	802 п.н.
88	Нутанс 518	802 п.н.
89	Оболонь	802 п.н.
90	Одеський 100	802/1010 п.н.
91	Одеський 111	802 п.н.
92	Одеський 115	802 п.н.
93	Одеський 131	1010 п.н.
94	Одеський 14	802 п.н.
95	Одеський 151	1010 п.н.
96	Одеський 18	802 п.н.
97	Одеський 36	802 п.н.
98	Одеський 69	802 п.н.
99	Одеський 70	802 п.н.
100	Одеський 82	802 п.н.
101	Одеський 9	1010 п.н.
102	Палідум 107	1010 п.н.
103	Палідум 32	1010 п.н.
104	Первенець	802 п.н.
105	Переможний	802 п.н.
106	Південний	1010 п.н.
107	Прерія	1010 п.н.
108	Престиж	802 п.н.
109	Розаліна	802 п.н.
110	Романтик	802 п.н.
111	Рось	802 п.н.
112	Святогор	802 п.н.
113	Святогор	802 п.н.
114	Селеніт	802 п.н.
115	Скарлет	802 п.н.
116	Славутич	802 п.н.
117	Сталкер	802 п.н.

Закінчення таблиці

№	Зразок	Wax/wax
55	Геліос	802 п.н.
56	Геліос 1	802 п.н.
57	Геліус	802 п.н.
58	Гетьман	802 п.н.
59	Гладіс	802 п.н.
60	Дала	1010 п.н.
61	Дерибас	802 п.н.
62	Джарзей	802 п.н.
63	Дружба	802 п.н.

№	Зразок	Wax/wax
118	Степовий	802 п.н.
119	Тайфун	1010 п.н.
120	Хадар	802 п.н.
121	Чарівний	802 п.н.
122	Чорноморець	802/1010 п.н.
123	Чудовий	1010 п.н.
124	Шармай	802 п.н.
125	Южный	802/1010 п.н.
126	Юкатан	802 п.н.

Загалом серед гомогенних зразків виявлено 91 такий, що має функціональний алель, який вирізняється розміром амплікону в 802 п.н.; 25 зразків з розміром амплікону 1010 п.н., та два зразки ваксі ячменю – Candle та Alamo, які несуть нуль-алель (амплікон 592 п.н.).

Частота виявлення у досліджуваній вибірці гомогенних зразків становить 93,6 %, а гетерогенних – 6,4 %. Зразки, що мають функціональний алель, виявляються у 98,4 % досліджуваних сортів та селекційних ліній, а нуль-алель наявний лише в 1,6 %.

Висновки

У рамках дослідження було розроблено та оптимізовано умови проведення ПЛР з використанням нисхідної методики для виявлення поліморфізму гена *Wax* ячменю. Визначення алельного стану гена було проведено для 126 зразків ячменю, серед яких було виявлено 91 гомогенний зразок (72,2 %), що має функціональний алель, який вирізняється розміром амплікону в 802 п.н.; 25 гомогенних зразків (19,8 %) з розміром амплікону 1010 п.н.; 7 гетерогенних (5,6 %), що містять амплікони двох видів 802 та 1010 п.н. Сорт Alamo був досліджений для двох різних вибірок: одна виявила гетерогенність та несе нуль-алель у 592 п.н., разом із функціональ-

ним алелем у 802 п.н., а друга – містить гомогенне *wax* зерно. Це підкреслює беззаперечну важливість використання молекулярно-генетичних підходів для виявлення чистоти сортів, особливо при роботі з неоднорідним матеріалом. Крім того, серед досліджуваної вибірки було виявлено ще один *wax* сорт Candle, що проявлялося у наявності амплікону розміром 592 п.н. на електрофореграмі. Обидва *wax* сорти були створені у Канаді (Prof. Brian Rossnagel, CDC, Saskatchewan). Серед вітчизняних сортів ячменю спостерігається відсутність *wax* (нуль-алелю). Це цілком підтверджує той факт, що в Україні до цього часу не велася селекція сортів ячменю ваксі. В той же час селекція ячменів ваксі активно розвивається за кордоном, особливо у напрямі створення сортів ячменю харчового та кормового напрямів використання зерна. Селекція ячменів ваксі ініційована у Селекційно-генетичному інституті (м. Одеса). Розроблена і оптимізована процедура детекції алеля *wax* може бути ефективно використана при селекції сортів ячменю ваксі.

Подальші дослідження будуть присвячені детекції та вивченню перспективних високоамілозних зразків ячменю.

Список літератури

1. M. James and K. Denyer, "Starch synthesis in the cereal endosperm", *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 6, pp. 215–222, 2003.
2. A. Regina et al., "High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 103, pp. 3546–3551, 2006.
3. Копусь М.М., Игнатъева Н.Г., Васюшкина Н.Е. та ін. Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала // *Зерн. хоз. России.* – 2009. – № 4. – С. 23–27.

4. *N. Ishikawa et al.*, "Artificial induction and characterization of amylose-free mutants of barley", *Barley Genet. Newsl.*, vol. 24, pp. 49–53, 1995.
5. *E. Domon et al.*, "The insertion/deletion polymorphisms in the waxy gene of barley genetic resources from East Asia", *Theor. Appl. Genet.*, vol. 104, pp. 132–138, 2002.
6. *Кирдогло Е.К., Полищук С.С., Червонис М.В.* Методология и результаты селекции ячменя пищевого использования // *Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции.* – 2013. – **171**. – С. 240–253.
7. *Яковишин Л.А.* Избранные главы биоорганической химии. – Севастополь: Стрижак-пресс, 2006. – 196 с.
8. *Метрологічна характеристика методу спектрофотометричного визначення вмісту амілози в крохмалі зерна селекційних ліній пшениці* / І.В. Петрова, О.М. Хохлов, С.В. Чеботар, Ю.М. Сиволап // *Фізіологія і біохімія культ. рослин.* – 2010. – **42**, № 2. – С. 146–152.
9. *M. Somma*, "Extraction and purification of DNA. Session 4", in *Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. User Manual*, M. Querci, M. Jermini, Eds. Luxembourg: DJ joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, p. 229, 2006.
10. *J.R. Brody and S.E. Kern*, "History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis", *Anal. Biochem.*, vol. 333, pp. 1–13, 2004.

Рекомендована Радою
фізико-математичного факультету
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції
10 лютого 2014 року