

УДК 575.113.2:633.16:663.421

А.А. Шаверський, А.І. Степаненко, Л.Г. Жолнер, С.С. Поліщук, Б.В. Моргун

**ДОСЛІДЖЕННЯ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *Bmy1* І *LOX-1* ЯЧМЕНЮ, ПОВ'ЯЗАНИХ ІЗ ПИВОВАРНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ЗЕРНА**

This work was aimed at allelic status identification of the barley genes *Bmy1* and *LOX-1* in the collection, consisted of 103 domestic and foreign cultivars, and also selection lines. Research of the collection was held using polymerase chain reaction (PCR) with a subsequent analysis of gene *LOX-1* allelic polymorphism via restriction of amplification products. Results of the PCR and restriction were visualized using gel-electrophoresis method. It was defined that 63 barley cultivars would be promising for brewing because of their middle activity and thermostability of  $\beta$ -amylase in malt. There was not a single cultivar or selection line with allele *loxA*, which was responsible for non-active type of lipoxygenase enzyme in beer, in the barley collection. Obtained results indicate low frequency of brewing alleles' occurrence. Further searching with the help of the newest molecular markers for allelic diversity identification of genes *Bmy1* and *LOX-1*, and, additionally, expansion of the general collection of barley cultivars and selection lines, will allow better differentiation of cultivars and choose among them the most advantageous ones that will become raw material for quality beer.

**Keywords:** polymerase chain reaction, allelic polymorphism,  $\beta$ -amylase, lipoxygenase-1, brewing, barley.

**Вступ**

Ключовим фактором належності певного сорту ячменю до класу пивоварного вважається здатність зерна ефективно перетворювати крохмаль на зброджувані цукри [1]. Таке перетворення здійснюють чотири основні ферменти:  $\alpha$ -амілаза,  $\beta$ -амілаза,  $\alpha$ -глюкозидаза та декстриназа. Серед цих ензимів  $\beta$ -амілаза є найважливішою, оскільки має найвищу активність каталітичного відщеплення  $\beta$ -мальтози з нередукуючих кінців молекули крохмалю [2].

Доведено, що активність і термостабільність  $\beta$ -амілази визначається алельним станом III-го інтрону гена *Bmy1* на довгому плечі четвертої хромосоми ячменю. III-й інтрон гена *Bmy1* є поліморфним. Знайдено три його алелі: *Bmy1.a*, *Bmy1.b* і *Bmy1.c*, кожен із яких при експресії показує різні рівні активності та термостабільності  $\beta$ -амілази в солоді [3]. За результатами дослідів [4], алель *Bmy1.a*, який був знайдений у сорті Адора (Adorra; GenBank accession number (GBAN): EF634056.1), має інсерції 126 п.н. і 38 п.н.; алель *Bmy1.b*, знайдений у сорті Харінгтон (Harrington; GBAN: DQ890000.1), містить вставку 38 п.н., але не має 126 п.н.; алель *Bmy1.c*, що властивий єдиному дикому типу ячменю – *Hordeum vulgare ssp. spontaneum* PI 296897 (GBAN: DQ890010.1), не містить жодної з цих інсерцій. Встановлено, що значення активності  $\beta$ -амілази у зернах сортів з алелем *Bmy1.b* було вищим за відповідний показник у представників алеля *Bmy1.a* у 1,3 разу; значення активності ферменту в зерні єдиного представника алеля *Bmy1.c* виявилось

у 2,1 разу вищим за показник сортів з алелем *Bmy1.a* [5]. При визначенні термостабільності сортів [6] виявилось, що представники алелів *Bmy1.a*, *Bmy1.b* і *Bmy1.c* мали відносну залишкову активність, що дорівнювала 3,6; 26,4 і 58,7 % відповідно.

Іншою важливою пивоварною ознакою є активність ферменту ліпоксигенази-1 у пиві, який кодується геном *LOX-1* (четверта хромосома ячменю). Ліпоксигеназа-1 каталізує утворення 9-гідроперекису, що призводить до утворення сполук, які псують смакові властивості пива: транс-2-ноненалю і тригідроксиоктодецилової кислоти. Транс-2-ноненаль вважається основною причиною так званого "картонного смаку" пива, яке значний час контактувало з повітрям. Інший продукт окиснення – тригідроксиоктодецилова кислота – негативно впливає на якість пива у категоріях стабільності піни та смаку [7].

Цікавість до гена *LOX-1* з точки зору пивоваріння пояснюється алельним поліморфізмом: відсутність ліпоксигеназної активності, яка є бажаною для пивоварної промисловості, співвідноситься з наявністю у зерні гомозиготного рецесивного алельного стану *loxA*, у той час як наявність домінантного алелю *LoxA* корелює з проявами активності ферменту, які псують стабільність піни та смакові якості пива [8].

Встановлення алельних станів генів *Bmy1* і *LOX-1* дасть можливість здійснити селекцію за допомогою молекулярних маркерів низки найвигідніших для пивоваріння сортів ячменю. Це дасть змогу вітчизняним виробникам пива, ви-

користовуючи відповідні сорти ячменю, оптимізувати процес пивоваріння та випускати більш якісний продукт.

### Постановка задачі

Метою роботи є визначення сортів і селекційних ліній ячменю, які містять вигідні для пивоваріння алельні стани генів *Bmy1* і *LOX-1*, експресуючи активну і термостабільну β-амілазу та неактивну форму ліпоксигенази-1 відповідно.

### Матеріали і методи дослідження

Об'єктами дослідження були 103 зразки сортів і селекційних ліній ячменю з колекції районуваних вітчизняних та зарубіжних сортів ячменю, які були надані Селекційно-генетичним інститутом – НЦНС НААН України (Одеса) та Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України (Київ). Місцями походження сортів були Україна, Німеччина, Чехія, Канада, Франція, Нідерланди та Великобританія. Лабораторні дослідження проводилися на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, м. Київ.

Для молекулярно-генетичного аналізу алельного поліморфізму генів *Bmy1* і *LOX-1* загальну ДНК виділяли з проростків за загальноприйнятою методикою, використовуючи ЦТАБ-буфер [9]. Визначення алелів генів *Bmy1* і *LOX-1* здійснювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), користуючись опублікованими специфічними праймерами (табл. 1).

ПЛР проводився в термоциклері (Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler). При визначенні алелів гена *Bmy1* і *LOX-1* до складу реакційної суміші об'ємом 20 мкл входили: 30 мкмоль ДНК, 0,75 од. Таq полімерази (DreamTaq Polymerase – Thermo Scientific), 0,5 мкмоль кожного праймера.

Умови ПЛР для гена *Bmy1*: денатурація – 4 хв при 94 °С; далі 34 цикли (30 с – 94 °С; 30 с – 57 °С; 41 с – 72 °С); 5 хв при 72 °С; 2 хв – 22 °С.

ПЛР на ген *LOX-1* проводилась за принципом низхідної ПЛР (Touchdown PCR) за таких умов: денатурація – 4 хв при 94 °С; далі 5 циклів (30 с – 94 °С; 30 с – 70 °С; 41 с – 72 °С); 30 циклів (30 с – 94 °С; 30 с – 65 °С; 41 с – 72 °С); 5 хв при 72 °С; 2 хв – 22 °С.

Рестрикційний аналіз алельного стану гена *LOX-1* проводили у загальному об'ємі 30 мкл, який містив 10 мкл продуктів ПЛР, 2 мкл 10× буферу Tango (Thermo Scientific), 4 од. активності ендонуклеази *RsaI*. Реакцію інкубували за температури 37±1 °С протягом 1,5 год. Продукти рестрикції розділяли в 1,2 %-ному агарозному гелі, документували цифровим фотоапаратом Canon EOS 600D та обробляли зображення програмами GIMP і MS Office PowerPoint.

### Результати і їх обговорення

Для проведення молекулярного аналізу сортів ячменю з метою вивчення алельного різноманіття генів *Bmy1* (рис. 1) і *LOX-1* (рис. 2) були підібрані параметри проведення ПЛР із застосуванням градієнта температур відпалу праймерів і використанням літературних джерел.

На електрофореграмі (рис. 1) спостерігали розподілення досліджуваних зразків сортів на дві групи залежно від алельного стану гена *Bmy1*: для сортів з алелем *Bmy1.a* характерна поява амплікону розміром 643 п.н., у той час як сортам з алелем *Bmy1.b* властивий амплікон довжиною 516 п.н. Таким чином, при порівнянні результатів електрофорезу 16 зразків із маркером молекулярних мас (зразок М на рис. 1) та з позитивними контролюми (зразки С<sup>(a)</sup> і С<sup>(b)</sup> на рис. 1) були встановлені алельні стани для 16 зразків, що наведені в описі до електрофореграми.

Таблиця 1. Послідовності алель-специфічних праймерів, застосованих у роботі

Назва	Послідовність праймера, 5' → 3'	Очікуваний фрагмент, п.н.	Цільовий ген	Літературне джерело
<i>b-amy 1F</i>	GATGGTTCGTTCCAGGCATC	477 ( <i>Bmy1.c</i> ), 516 ( <i>Bmy1.b</i> ), 643 ( <i>Bmy1.a</i> ).	III-й інтрон гена <i>Bmy1</i>	[5]
<i>b-amy 1R</i>	AGGGAACCGCACGTGTGGGGTCAATGA			
<i>LOX-1 F</i>	CCATCACGCAGGGCATCCTG	Після рестрикції ендонуклеазою <i>RsaI</i> : 700 + 300 + 220 ( <i>LoxA</i> ); 700 + 520 ( <i>loxA</i> )	<i>LOX-1</i>	[8]
<i>LOX-1 R</i>	GCGTTGATGAGCGTCTGCCG			

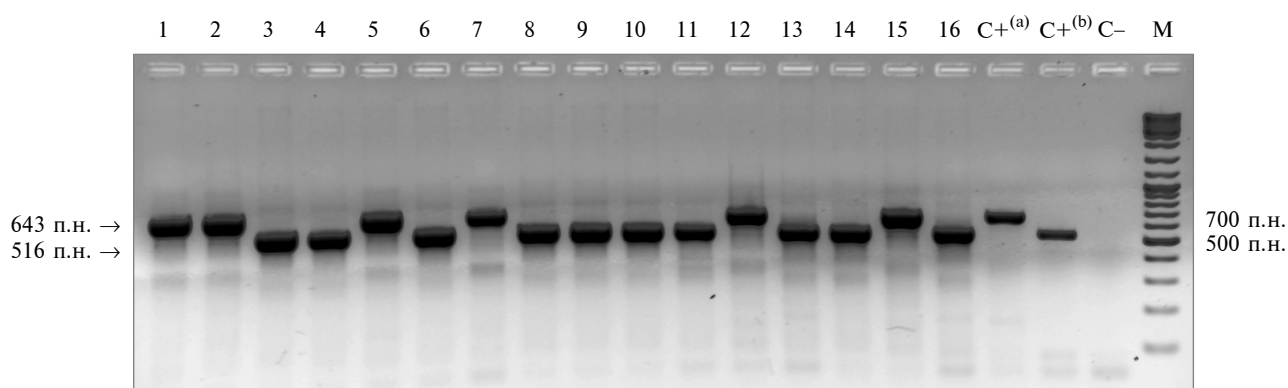


Рис. 1. Електрофореграма тесту на виявлення алелів *Bmy1.a* (643 п.н.) і *Bmy1.b* (516 п.н.) гена *Bmy1*. Доріжка 1 – сорт Henley, 2 – Ilot, 3 – Daura, 4 – Kangoo, 5 – Belana, 6 – Malz, 7 – Christalia, 8 – Marthe, 9 – Kovzan, 10 – Boios, 11 – Annabell, 12 – Henrike, 13 – Jennifer, 14 – Quench, 15 – KWS Aliciana, 16 – Святогор. Позитивні контролі: C<sup>+(a)</sup> – алель *Bmy1.a* сорту Ітіль, C<sup>+(b)</sup> – алель *Bmy1.b* сорту Зоряний. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix. C<sup>-</sup> – негативний контроль, буфер TE

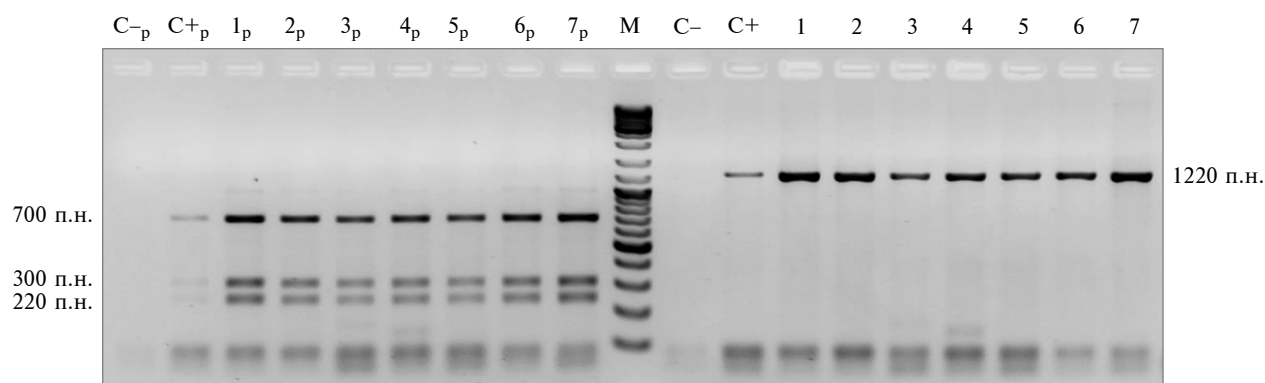


Рис. 2. Електрофореграма аналізу виявлення алелів *LoxA* (700+300+220 п.н.) і *loxA* (700+520 п.н.) гена *LOX-1* з використанням ендонуклеази *RsaI* (зразки з індексом "р" – після обробки рестриктазою) у сортах: доріжка 1 – KWS Aliciana, 2 – Quench, 3 – Jennifer, 4 – Henrike, 5 – Annabell, 6 – Boios, 7 – Kovzan. Позитивний контроль (C<sup>+</sup>) – алель *LoxA* сорту CDC Kendall [9]. М – маркер молекулярних мас GeneRuler™ DNA Ladder Mix. C<sup>-</sup> – негативний контроль, буфер TE

При проведенні дослідження було виявлено, що 6 сортів ячменю (Henley, Ilot, Belana, Christalia, Henrike і KWS Aliciana) містять алель *Bmy1.a* гена *Bmy1*. У геномі інших 10 сортів (Daura, Kangoo, Malz, Marthe, Kovzan, Boios, Annabell, Jennifer, Quench і Святогор) ген *Bmy1* був представлений алелем *Bmy1.b*. Таким чином, можна стверджувати, що 10 сортів із алелем *Bmy1.b* будуть перспективні у пивоварінні.

Описаним методом був проведений аналіз усієї колекції ячменю.

Приклад аналізу алельного стану гена *LOX-1* сортів ячменю наведено на рис. 2. На електрофореграмі показані продукти ампліфікації ПЛР на праймери *LOX-1 F* та *LOX-1 R* (зразки № 1–7 і C<sup>+</sup>), а також результати по-

дальшої рестрикції ендонуклеазою *RsaI* (зразки № 1<sub>p</sub>–7<sub>p</sub> і C<sup>+</sup><sub>p</sub>). Аналіз показав, що всі досліджувані сорти (KWS Aliciana, Quench, Jennifer, Henrike, Annabell, Boios, Kovzan) мали домінуючий алель *LoxA*. Отже, пиво, зварене із цих сортів, буде містити активну ліпоксигеназу-1.

Ідентично були проведені дослідження на визначення алельного стану гена *LOX-1* для всіх інших сортів із колекції.

У табл. 2 наведений результат аналізу алельного поліморфізму колекції ячменю на ген *Bmy1*. У таблиці вказані сорт, його походження, алельний стан гена *Bmy1*, очікувана термостабільність і якість зерна сорту за Державним реєстром сортів рослин, придатних для поширення в Україні в 2013 р. [10].

Таблиця 2. Розподілення сортів і селекційних ліній ячменю за алелями гена *Vmy1*

Сорт, селекційна лінія	Походження	Фрагмент 126 п.н.	Фрагмент 39 п.н.	Алель	Термостабільність	Якість
Annabell	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Barke	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Beatrix	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Belana	Німеччина	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	Пивоварний
Bojos	Чехія	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	Пивоварний
CDC Alamo	Канада	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в*
CDC Candle	Канада	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	Пивоварний
CDC Gainer	Канада	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	н/в
CDC McGwire	Канада	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Claire	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Cristalia	ВБ**	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Danuta	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Datcha	Франція	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Daura	н/в	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в
Ebson	Чехія	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Gladys	Нідерланди	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Golden Promise	Україна	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в
Golden Promise (л. тр.*** 2x5)	Україна	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в
Golden Promise (л. тр. 3y10)	Україна	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в
Golden Promise (л. тр. 4x5+y10)	Україна	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в
Henley	Австралія	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	н/в
Henrike	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
<i>Hordeum vulgare</i> var. <i>trifurcatum</i>	Україна	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	н/в
JB Maltasia	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Jennifer	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Jersey	Нідерланди	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Kango	Нідерланди	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
KBC Aliciana	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
KBC Bambina	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Ksanadu	Німеччина	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	Пивоварний
Malz	Чехія	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Marthe	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Фуражний
Philadelphia	США	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	н/в
Quench	ВБ**	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Rosalina	Данія	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Scarlett	Чехія	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Shakira	Німеччина	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Адапт	Україна	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Фуражний
Ахілес	Україна	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	н/в
Вакула	Україна	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Вестнік	Україна	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	н/в
Водограй	Україна	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Воєвода	Україна	+	+	<i>Vmy1.a</i>	Низька	Пивоварний
Всесвіт	Україна	—	+	<i>Vmy1.b</i>	Середня	Пивоварний

Продовження табл. 2

Сорт, селекційна лінія	Походження	Фрагмент 126 п.н.	Фрагмент 39 п.н.	Алеель	Термостабільність	Якість
Галактик	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	Пивоварний
Галатея	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Галичин	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Гамбрінус	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Геліос	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	Пивоварний
Гетьман	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	Пивоварний
Дерибас	Україна	+	+	гетерог.	Низька	н/в
Дружба	Україна	+	+	гетерог.	Низька	н/в
Едем	Україна	+	+	гетерог.	Низька	н/в
Еней	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	Пивоварний
Зоряний	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	Пивоварний
Ілот	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	Фуражний
Ігіль	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Казковий	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Ковзан	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	Пивоварний
Козацький	Україна	+	+	гетерог.	Низька	Фуражний
Командор	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	Пивоварний
Лука	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Медікум 46	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Модерн	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	Фуражний
Незалежний	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Нутанс 106	Україна	+	+	гетерог.	Низька	н/в
Нутанс 244	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Нутанс 518	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Нутанс 778	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Оболонь	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 9	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 14	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Одеський 18	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 36	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Одеський 69	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Одеський 70	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 100	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 111	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Одеський 115	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 131	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Одеський 151	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Одеський 518	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Палідум 32	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Палідум 103	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Первенець	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Переможний	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Південний	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	Пивоварний
Прерія	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	н/в
Престиж	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Романтик	Україна	–	+	<i>Вту1.б</i>	Середня	н/в
Рось	Україна	+	+	гетерог.	Низька	н/в
Святогор	Україна	+	+	<i>Вту1.а</i>	Низька	Пивоварний

Кінець табл. 2

Сорт, селекційна лінія	Походження	Фрагмент 126 п.н.	Фрагмент 39 п.н.	Алель	Термостабільність	Якість
Селеніт	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	Пивоварний
Славутич	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	н/в
Сталкер	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	Фуражний
Степовик	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	Низька	Пивоварний
Тайфун	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	н/в
Хадар	Україна	+	+	<i>Bmy1.a</i>	Низька	Фуражний
Чарівний	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	н/в
Чорноморець	Україна	+	+	гетерог.	Низька	н/в
Чудовий	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	н/в
Южний	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	н/в
Юкатан	Україна	–	+	<i>Bmy1.b</i>	Середня	Пивоварний

Примітки: \*н/в – немає відомостей; \*\*ВБ – Великобританія; “гетерог.” – гетерогенний, тобто наявні обидва алелі, що вказує на генетичну різноманітність сорту; \*\*\*л. тр. – трансформована лінія.

Було визначено алельний стан гена *Bmy1* для 103 зразків ДНК, виділених із колекції вітчизняних і зарубіжних сортів ячменю та селекційних ліній. У досліджуваній колекції представлено 32 зарубіжні сорти ячменю (31 % колекції) та 71 вітчизняний сорт (відповідно, 69 % колекції).

Дані дослідів показали, що 63 сортів ячменю (61 % загальної кількості сортів) мали алель *Bmy1.b*, 33 сортів ячменю (32 % колекції) мали алель *Bmy1.a*, а у 7 сортів (7 % загальної кількості рослин) було визначено гетерогенний стан гена *Bmy1*. Сортів ячменю з алелем *Bmy1.c* у колекції не знайдено.

Якщо враховувати розподіл сортів за територіальним фактором, то видно, що із досліджуваних вітчизняних сортів (71 зразок) колекції ячменю 37 сортів (52 % колекції) мають алель *Bmy1.b*, 27 сортів (38 % загальної кількості зразків) – алель *Bmy1.a*, 7 сортів (10 %, відповідно) мають обидва алелі. Серед зарубіжних сортів, чисельність яких становить 32 зразки, 26 сортів (81 % колекції) мали алельний стан *Bmy1.b* і лише 6 сортів (18 %, відповідно) – алель *Bmy1.a*. Така статистика підсумків дослідження свідчить про багатше алельне різноманіття, яке притаманне представникам зарубіжної селекції ячменю. Отже, подальший пошук перспективних для пивоваріння алелів за ознакою гена *Bmy1* буде доцільно проводити при збільшенні загальної кількості сортів закордонної селекції або із залученням мутантних ліній, диких типів. Знаходження вигідних для пивоваріння сортів з точки зору алельного стану гена *Bmy1* дасть змогу збагатити вітчизняну селекцію схрещуванням український сортів, яким

властиві високі пивоварні характеристики зерна, із новознайденими зарубіжними сортами з активною та термостабільною β-амілазою.

У результаті проведення дослідів з аналізу алельного стану гена *LOX-1* алелю *loxA* знайдено не було. Вибірка ячменю, яка складалася зі 103 зразків вітчизняної та зарубіжної селекції, не містила сортів із зазначеним вище алельним станом. Отже, всі сорти ячменю із колекції під час приготування з них пива будуть мати активну ліпоксигеназу-1, яка окиснює гідроперекисами поліненасичені жирні кислоти у пиві, призводячи до утворення сполук, які псують смак цього напою.

## Висновки

У результаті молекулярно-генетичного аналізу в колекції сортів ячменю було знайдено 63 перспективні для використання зразки за фактором активності та термостабільності β-амілази.

Аналіз генетичних варіантів ферменту ліпоксигенази-1 у колекції показав, що наявні сорти не несуть алель *loxA*.

Як відсутність алелю *Bmy1.c* у колекції ячменю у випадку аналізу гена *Bmy1*, так і факт незнаходження алельного стану *loxA* свідчать про високу територіальну обмеженість та унікальність таких алелів. Стан обмеженості алельного різноманіття генів *Bmy1* і *LOX-1* може бути покращений за рахунок залучення в селекцію донорів рідкісних алелів. Так, для отримання високоперспективних сортів пивоварного ячменю необхідно впроваджувати нові, відповідні до пивоварних вимог алелі та комбіна-

ції алелів у створювані сорти. Розширення генетичного різноманіття сортів і чітке розмежування у призначенні (фуражний, пивоварний, харчовий ячмінь) за генетичним фактором приведе до цілеспрямованої та успішної промислової і сільськогосподарської діяльності.

Перспективами дослідження активності та термостабільності  $\beta$ -амілази є визначення алельних станів сортів ячменю із колекції за альтер-

нативним критерієм – маркерами одонуклеотидного поліморфізму SNP (Single Nucleotide Polymorphism), які визначають 7 гаплотипів гена *Bmy1*.

Подальшим напрямом дослідження генетичних варіантів ензиму ліпоксигенази-1 є аналіз алельного стану гена *LOX-1* більшої вибірки вітчизняних і зарубіжних сортів, а також селекційних ліній ячменю.

### Список літератури

1. S.E. Clark *et al.*, "Effects of single nucleotide polymorphisms in beta-amylase1 alleles from barley on functional properties of the enzymes", *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 41, no. 9, pp. 798–804, 2003.
2. S.H. Duke and C. A. Henson, "A comparison of barley malt amylolytic enzyme activities as indicators of malt sugar concentrations", *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, vol. 67, pp. 99–111, 2009.
3. M.A. Vinje *et al.*, "Utilization of different *Bmy1* intron III alleles for predicting  $\alpha$ -amylase activity and thermostability in wild and cultivated barley", *Plant Molecular Biological Report*, vol. 28, is. 3, pp. 491–501, 2010.
4. J. Gunkel *et al.*, "Effect of the malting barley variety (*Hordeum vulgare* L.) on fermentability", *J. Inst. Brew.*, vol. 108, pp. 355–361, 2002.
5. J.M. Erkkilä, "Intron III-specific for screening of  $\alpha$ -amylase alleles in barley cultivars", *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 17, pp. 139–147, 1999.
6. W. Zhang *et al.*, " $\alpha$ -Amylase variation in wild barley accessions", *Breeding Sci.*, vol. 54, pp. 41–49, 2004.
7. G. Yang *et al.*, "Purification and characterization of lipoxxygenase isozymes in germinating barley", *Am. Assoc. Cereal Chem.*, vol. 70, pp. 589–595, 1993.
8. N. Hirota *et al.*, "Characterization of lipoxxygenase-1 null mutants in barley", *Theoretical & Applied Genetics*, vol. 111, is. 8, pp. 1580–1584, 2005.
9. M.G. Murray and W.F. Thompson, "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA", *Nucleic Acids Res.*, vol. 8, is. 19, pp. 4321–4325, 1980.
10. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні в 2013 році. – К.: Український інститут експертизи сортів рослин, 2013. – С. 30–37.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ "КПІ"

Надійшла до редакції  
14 лютого 2014 року