УДК 575.22:633.111.1 https://doi.org/10.7124/FEEO.v27.1336

СІРАНТ Л. В.✉, САНДЕЦЬКА Н. В.
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17
✉ *luba_va@ukr.net, (097) 324-17-05*

ГЕНЕТИЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ СОРТІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ ЗА ЛОКУСАМИ ГОРДЕЇНІВ

Мета. Дослідити генетичне різноманіття за локусами гордеїнів сортів ячменю ярого, придатного для вирощування в Україні. ***Методи.*** Для ідентифікації генотипу за локусами гордеїнів проводили фракціонування білка методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) у кислому середовищі. ***Результати.*** У 26 сортів ячменю ярого ідентифікували генотипи за локусами гордеїнів Hrd A, Hrd B, Hrd F. Виявлені відмінності між сортами за частотою трапляння певних алелей локусів запасних білків. ***Висновки.*** Виявлено високий рівень алельної мінливості в локусах Hrd A, Hrd B, Hrd F. У генетичному пулі сортів ячменю ярого, що пропонуються для вирощування в Україні, виявлена тенденція розповсюдження певних алелей локусів гордеїнів : Hrd A (A2, A4, A12,A18, A23, A32), Hrd B (B1, B5, B6, B8, B17, B19,B21 B35, B29,B67, B164,), Hrd F (F1, F2, F3, F0).

Ключові слова: *Hordeum vulgare* L., ярий ячмінь, запасні білки, гордеїни, алелі.

Ячмінь (*Hordeum vulgare* L.) – найдавніший хлібний злак, який людина використовувала для харчування. Саме ячмінний хліб був першим хлібом людства. Ця сільськогосподарська культура поширена в усіх країнах світу. Висока адаптивна здатність ячменю і короткий період дозрівання дозволяють отримувати врожаї як у південних районах, так і на півночі України. За посухостійкістю ця рослина переважає пшеницю. Зерно ячменю використовується на корм худобі, у пивоварінні, на харчові потреби (перлова, ячна крупа, ячмінне борошно). Вчені стверджують, що ячмінь — джерело здоров'я і довголіття. Рибалка О. І. та співавтори [1] у монографії, присвяченій культурі ячменю харчового напрямку, повідомляють, що сьогодні фахівці з функціонального харчування звертають велику увагу на продукти із зерна цього злаку. Високий вміст дієтичної клітковини (в-глюканів) у зерні ячменю знижує холестерин у крові і сприяє сповільненню перетворення крохмалю в глюкозу у крові. Ячмінь є превентивним харчовим засобом проти трьох найтяжчих недугів: діабету, серцево-судинній патології і раку [1].

Ріст виробництва зерна в країні ставить перед селекцією і генетикою ячменю завдання створення врожайних сортів із комплексом господарсько-цінних ознак: стійких до хвороб і умов середовища та покращення пивоварних властивостей, кормової і харчової цінності культури. Господарсько-цінні ознаки мають складний генетичний контроль, а умови вирощування впливають на їх прояв.

Для дослідження різноманіття ячменю за генетичними ознаками використовують метод біохімічно-генетичних маркерів, де головні переваги – генотиповість, неопосередкованість плейотропією, кодомінантність [2]. Серед білкових маркерів ячменю особливе значення мають запасні білки: гордеїни і глютеліни. У зернівці їх є велика кількість, і вони легко екстрагуються. Спирторозчинні запасні білки ячменю гордеїни найбільш високо поліморфні [3]. Спектри гордеїнів як надійну маркерну систему було запропоновано у разі розділення цих білків у кислому – з лактатом алюмінію [4] і у лужному – за присутності додецилсульфату натрію (ДСН) буферах [5]. Блочний характер успадкування, просторове розділення компонентів різних локусів на електрофореграмах дозволяє ідентифікувати стабільні алелі гордеїнів, що різняться за кількістю і рухливістю компонентів [6].

У генетичному контролі запасних білків гордеїнів беруть участь 7 локусів: Hrd A, Hrd B, Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd F, Hrd G [6]. Локуси успадковуються зчеплено і знаходяться на короткому плечі хромосоми 5 [7]. Найбільш поліморфними є такі локуси: Hrd A, Hrd B, Hrd F, що підтверджується дослідженнями [4]. Сформовано каталоги локусів гордеїнів у кислих та лужних умовах електрофоретичного розділення, проте на сьогодні єдиної класифікації гордеїнів не існує. Детальну класифікацію гордеїнів запропонували Созінов А. А., Нецвєтаєв В. П. та співавтори [6]. Каталоги алелей гордеїнкодую-

© **СІРАНТ Л. В., САНДЕЦЬКА Н. В.**

чих локусів наведено в праці Поморцева А. А., Нецвєтаєва В. П. та співавторів [6]. Результати отримані під час розділення цих білків у трубках крохмального гелю з алюміній-лактатним буфером [8].

Встановлення походження і закономірностей розповсюдження певних алелей гордеїнкодуючих локусів у сортів, які вирощуються в різних кліматичних зонах, є необхідним для реалізації генетичного потенціалу сорту, підтримки і збереження ідентичності, чистоти і відповідності сорту, а також дає змогу раціонального використання і ефективного вирощування в різних агроекологічних зонах України. Сорти іноземної селекції можуть слугувати вихідним матеріалом для схрещувань із місцевими ячменями як донори цінних ознак.

Тому метою роботи було дослідити генетичну мінливість локусів гордеїнів сортів ячменю ярого різного походження, придатних для вирощування в Україні.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були 26 сортів ярого ячменю, отримані від солодових і пивоварних підприємств, сільськогосподарських господарств та приватних підприємців різних областей України. 24 сорти занесено до Державного реєстру сортів рослин України [9].

Для визначення генотипу сортів за локусами гордеїнів проводили електрофоретичний аналіз білка в 100 окремих зернівках кожного сортозразка за модифікованою методикою В. Бжезинського [10]. Неочищені зернівки подрібнювали, заливали 70 % етанолом 200 мкл, настоювали 2 години, ценрифугували 3 хв за 5000об/хв, відбирали 100 мкл екстракту і випарювали етанол за температури 50°С. Сухий осад розчиняли в розчині 5,5 М сечовини.

Розділяючий та концентруючий гелі нашаровували водою. Для проведення аналізу готували розчини: SGB (1,2 г гістидину, 1,6 г крижаної оцтової кислоти на 50 мл води) і MSS (30,4 г акриламіду, 1,6 г метиленбісакриламіду, 4,55 мл заліза сірчанокислого та 245 млг аскорбінової кислоти на 100 мл розчину). Розділяючий гель містив 22 мл розчину MSS, 67,5 мл 4,44 М сечовини, 4,5 мл води. Концентруючий гель мав такий склад: 4,25 мл SGB, 3,9 мл MSS, 16,8 мл 4,44 М сечовини.

Електродний буфер нижній на 900 мл води иістив 3 мл мурашиної кислоти, а верхній – удвіч розбавлений. Для полімеризації додавали ТЕМЕД та 10 % розчин $(NH_4)_2S_2O_8$.

Пластини гелю з білковими компонентами фіксували і фарбували протягом ночі в розчині, який містив крижану оцтову кислоту, трихлороцтову кислоту, етиловий спирт та барвник Cumassi Blue R-250. Після фарбування гелі відмивали у воді протягом дня.

Ідентифікацію проводили згідно з номенклатурою Поморцева А. А. [7] з тестуванням алелів локусів Hrd A, Hrd B, Hrd F. За ідентифікації ми не враховували мінорні локуси Hrd C, Hrd D, Hrd E, Hrd G.

Результати та обговорення

Дослідження показали, що поліакриламідний гель має хороші розділяючі властивості. Білки екстраговані 70 % етанолом, як і на крохмальному гелі, чітко діляться на три зони рухливості, три основні групи поліпептидів, що відповідають ряду рухливості блоків: Hrd A<Hrd B<Hrd F.

За результатами аналізу електрофоретичних спектрів у таблиці наведені алельні варіанти гордеїнів досліджуваних сортів згідно з номенклатурою Поморцева А. А.[7].

Дослідження поліморфізму локусів гордеїнів сортів ячменю ярого показало внутрішньосортову варіабельність сортів за цими локусами. Сорти іноземної селекції характеризувалися гомогенністю, лише вітчизняний сорт Гетьман – гетерогенний. У ході аналізу виявлено, що у сорту Гетьман спостерігалася гетерогенність за гордеїнкодуючими локусами Hrd A, Hrd B, Hrd F.

У локусі Hrd A в проаналізованих сортів ячменю ідентифіковано 6 алелей. Із найбільшою частотою траплялася алель A2 – 55,6 %. Цю алель мали сорти з України, Білорусії, Росії, Великобританії, Данії, Нідерландів, Німеччини, Франції, Чехії, Швеції, вона є домінуючою у культурі ячменю [4]. Електрофореграми гордеінів сортів ячменю ярого представлені на рисунку. Алель A 23 траплялася у сортів України, Данії, Нідерландів, Німеччини (22,2 %). Частоти алелей A32 і A12 становили 7,4 % і траплялися у сортів Німеччини, вітчизняної та російської селекції відповідно. Алелі A4 і A18 траплялися у сортів Франції і Білорусії (3,7 % відповідно).

За результатами електрофоретичного аналізу гордеїнів найбільш поліморфними були продукти експресії локусу Hrd B. Виявлено 11 алелей цього локусу. З найбільшою частотою (22,2 % і 18,5 %) виявлялися алелі B19 та B17

відповідно. З частотою 14,8 % і 11,1 % набули розповсюдження алелі B8 та B1 відповідно. Сорти з алелю B5 і алелю B164 мали частоту 7,4 %. Частка сортів з алелями B6, B21, B29, B35, B67 не перевищувала 3,7 %. Продукти експресії цього локусу виявилися найбільш інформативними для сортової ідентифікації. Це підтверджується і в літературних джерелах [7]. Слід згадати результати селекції останніх років: прослідковується розповсюдження певних алелей локусу Hrd B (B17, B 19) у сортах іноземної селекції.

У локусі Hrd F ідентифіковано 3 алелі і один нуль-алель (відсутність гордеїнів). Поліморфізм гордеїнів у цьому локусі значно менший, ніж в інших локусах. Алелі цього локусу теж різняться за частотою: F0 – 3,7 %, F1 – 33,3 %, F2 – 18,5 %, F3 – 44,4 %. За електрофоретичною рухливістю компоненти цього локусу не дуже відрізняються один від одного. Локуси Hrd B і Hrd F тісно зчеплені. Більшість варіантів B гордеїнів трапляються у поєднанні з певними алелями F гордеїнів [7].

Ідентичні електрофоретичні спектри гордеїну мали сорти Скарлет, Ксанаду, а також сорти Ебсон, Шармай, Барке, Толар, Джерзей і Беатріс, Квенч, Аннабель, Ястреб і Південний.

Це є наслідком процесу звуження генетичної різноманітності в результаті селекційної діяльності людини [13]. Для ідентифікації досліджуваних сортів використовували додаткові маркери. Сорти, схожі за спектрами гордеїнів, можна розрізнити, провівши додатково електрофорез альбумінів [12] чи глютелінів [14].

Таким чином, сорти ячменю ярого, що надійшли на аналіз і пропонуються для вирощування в Україні, характеризуються як значним різноманіттям, так і відмінностями в частотах алелей локусів гордеїнів.

Білкові маркери використовуються вже майже 40 років для дослідження проблем генетики, селекції, насінництва. Бурхливо розвиваються нові тенології і підходи (молекулярні методи ідентифікації, які аналізують поліморфізм ДНК). Та, незважаючи на це, вони є надійним інструментом у вирішенні практичних, теоретичних і навіть стратегічних питань для України у галузі селекції, насінництва і насіннєвого контролю. Сортовий комітет ISTA продовжує розглядати електрофорез білків як головний арбітражний лабораторний метод контролю насіння [14].

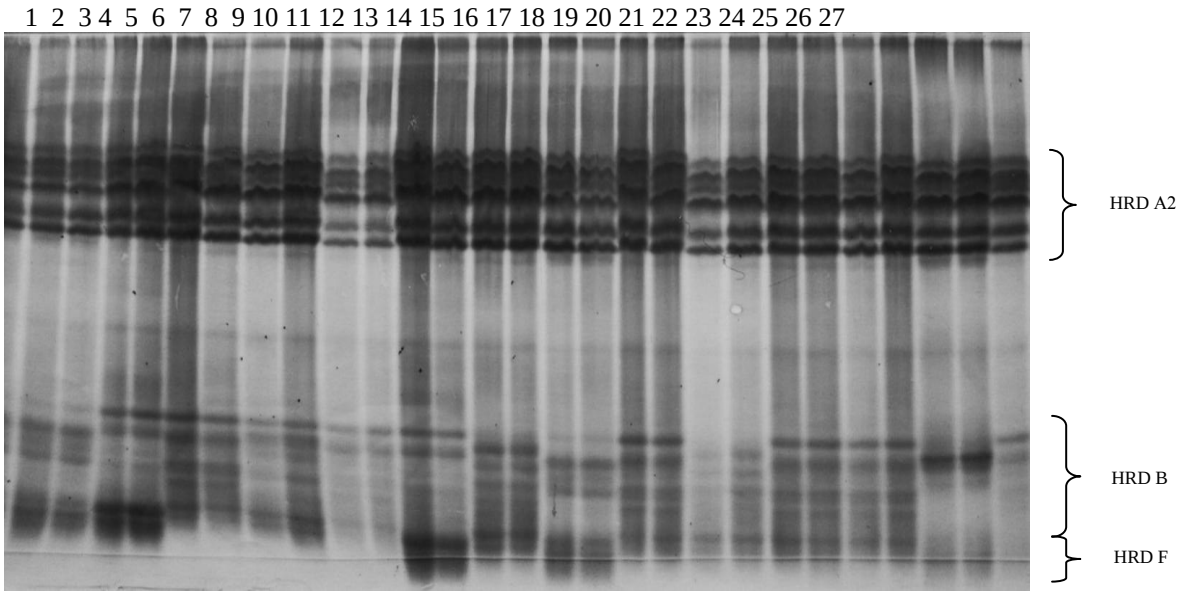

Рис. Електрофореграми гордеїнів сортів ячменю ярого: доріжки, що відповідають сортам, позначені цифрами: 1, 2 – Ястреб, 3, 4 – Квенч, 5, 6 – Шармай, 7, 8 – Гладіс, 9, 10 – Барке, 11, 12 –Аннабель, 13, 14 – Ксанаду, 15, 16 – Південний, 17, 18 – Табора, 19, 20 – Скарлет, 21, 22 – Толар, 23, 24 – Ебсон, 25, 26 – Роланд, 27 – Гонар.

Таблиця. Генотипи за локусами гордеїнів сортів ячменю ярого

Сорт	Країна походження	Рік реєстрації	Алельні варіанти гордеїнів у локусах			Якість
			A	B	F	
Гонар	Білорусія	1995	2	19	3	пивоварний
Пріма Білорусії	Білорусія	***НД	18	67	1	пивоварний
Квенч	**ВБ	2011	2	17	3	пивоварний
Себастьян	Данія	2008	23	6	2	пивоварний
Шармай	Данія	2011	2	19	1	пивоварний
Джерзей	Нідерланди	2000	23	8	2	пивоварний
Кангу	Нідерланди	2009	23	164	3	пивоварний
Гладіс	Нідерланди	2010	2	17	3	пивоварний
Тюрінгія	Німеччина	2000	32	29	3	пивоварний
Барке	Німеччина	2003	2	19	1	пивоварний
Аннабель	Німеччина	2004	2	17	3	пивоварний
Ксанаду	Німеччина	2005	2	5	1	пивоварний
КВС Ірина	Німеччина	2014	23	17	3	пивоварний
Беатріс	Німеччина	2009	23	8	2	пивоварний
Ясний	Росія	*НВ	12	17	3	пивоварний
Ястреб	Росія	*НВ	2	1	3	фуражний
Одеський 115	Україна	***НД	12	8	2	пивоварний
Гетьман	Україна	2001	2+32	35+21	1+0	пивоварний
Південний	Україна	2001	2	1	3	пивоварний
Вакула	Україна	2003	23	1	3	пивоварний
Табора	Франція	2005	2	19	1	пивоварний
Експлоєр	Франція	2013	4	164	3	зерновий
Скарлет	Чехія	2001	2	5	1	пивоварний
Толар	Чехія	2001	2	19	1	пивоварний
Ебсон	Чехія	2008	2	19	1	пивоварний
Роланд	Швеція	1987	2	8	2	пивоварний

Примітки: *НВ – сорт, не внесений до Держреєстру сортів рослин України, **ВБ – Великобританія, ***НД – немає даних відомостей.

Висновки

Досліджувані сорти ячменю ярого, що пропонуються для вирощування в Україні, характеризуються значним різноманіттям і частотою зустрічальності алелей гордеїнкодуючих локусів: алель А2 домінує з частотою 55,6 %, також спостерігається тенденція розповсюдження алелей В19, В17 – 22,2 % і 18,5 % відповідно та F3 – 44,4 %.

Встановлено, що використаний метод розділення гордеїнів у поліакриламідному гелі (ПААГ) у кислому середовищі за модифікованою методикою В. Бжезинського є ефективним, екологічно безпечним, дешевим, легкодоступним, дає чіткий поділ гордеїнів і може бути рекомендований для лабораторних аналізів.

References

1. Rybalka A. I., Morgun B. V., Polishchik S.S. Barley as a product of functional nutrition. Kyiv: Logos, 2016. 568 s. [in Ukrainian] / Рибалка О. І., Моргун Б. В., Поліщук С. С. Ячмінь як продукт функціонального харчування. К.: Логос, 2016. 568 с.
2. Konarev V.G. Molecular - biological studies of the gene pool of cultivated plants in VIR (1967-2007). 2nd edition supplemented (compiled by Sidorova V.V., Konarev A.V.). St. Petersburg: VIR, 2007. 134 s. [in Russian] / Конарев В.Г. Молекулярно - биологические исследования генофонда культурных растений в ВИРе (1967- 2007 гг.). Издание 2-е дополненое (составители: Сидорова В.В., Конарев А. В.). СПб.: ВИР, 2007. 134 с.doi: 10.30906/1999-5636-2015-11-2-6.
3. Sozinov A. A. Polimorphism of protein and its importance in genetics and plant breeding. Moscow: Nauka, 1985. 272 s. [in Russian] / Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с. doi: 10.1007/BF01108633.

4. Pomortsev A.A., Hetsvetaev V. P., Sozinov A. A. Polymorphism of cultured barley (*Hordeum vulgare* L.) for hordeins. *Genetics.* 1985.T.21, №4. P.629-639. [in Russian] /Поморцев А.А., Нецветаев В.П., Созинов А.А. Полиморфизм культурного ячменя по гордеинам. *Генетика.* 1985. Т21, №4. С.629-639.
5. Shewry P.R., Pratt H.M., Faulks A.J. et all. The storage protein (hordein) polypeptide pattern of barley (*Hordeum vulgare* L.) in relation to varietal identification and disease. J. *Nat. Inst. Agric. Bot*. 1979. Vol 15. P.45-51. doi:10.1093/jexbot/53.370.947.
6. Sozinov A. A., Netsvetaev V. P., Grigoryan E.M., Obraztsov I. S. Mapping of Hrd locuses in barley (*Hordeum vulgare* L.) Emed. Vav. At Bach. *Genetics*.1978. T.14, №9. P.1610-1619. [in Russian] / Созинов А.А., Нецветаев В.П., Григорян Э.М., Образцов И.С. Картирование локусов Hrd у ячменя *Hordeum vulgare* L. Emed. Vav. et Bacht. *Генетика.* 1978. Т.14, №9. С.1610 -1619.
7. Pomortsev A.A., Netsvetaev V. P., Ladogina M. P. and Kalabushkin B. A. Hordein polymorphism in spring barley varieties. *Genetics*. 1994. T.30. №5. P.604-614. [in Russian] / Поморцев А.А., Нецветаев В. П., Ладогина М. П., Калабушкин Б. А. Полиморфизм гордеинов у сортов ярого ячменя. *Генетика*. 1994. Т.30, №5. С.604-614.
8. Sozinov A. A., Poperelya F. A. Method of vertical disk electrophoresis in starch gel and the genetic principle of cassification of wheat gliadins. Odessa: VSGI, 1978. 16 s. [in Russian] / Созинов А. А., Попереля Ф. А. Методика вертикального дискового электрофореза в крахмальном геле и генетический принцип кассификации глиадинов пшеницы. Одесса: ВСГИ, 1978. 16 с.
9. State register of plant varieties suitable for dissemination in Ukraine in2019.Kyiv, 2019. URL:https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin (last accessed: 20.02.20). [in Ukrainian] / Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні на 2019 рік. К.,2019. URL: https://sops.gov.ua/reestr-sortiv-roslin (дата звернення 20.02.2020).
10. Brzezinski W., Mendelenski P. Improved PAGE procedure for identification of wheat, triticale, barley and oat cultivar. *XII EUCARPIA Congr*. (Febr. 28, 1989). Gottingen: Vortrage fur Pflanzenzuchtung, 1989. P.15.
11. Antonyuk M. Z., Ternovskaya T. K., Sozinov A. A. Identification of the units of electrophoretic components of storage protein bloks, which are encoded by genes of three aegilops species. *Physiology and biochemistry of cultivated plants*. 1994. T26, №5. P.474-481. [in Russian] / Антонюк М.З., Тарнавская Т.К., Созинов А.А. Идентификация блоков электрофоретических компонентов запасных белков, кодируемых генами трех видов эгилопса. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1994. Т. 26, № 5. С.474-481. doi:10.18.523/2617-4529.2018.3-12.
12. Sirant L. V., Dykun M. O., Pochinok V.M/, Zavalna G. V. Identification spectra of proteins brewing barley varieties. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2013. T.12. P. 306-309. [in Ukrainian] / Сірант Л.В., Дикун М. О., Починок В. М., Завальна Г. В. Ідентифікація білкових спектрів пивоварних сортів ячменю. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2013. Т.12. С.306-309.
13. Altukhov Yu. P., Pukhalsky V. A., Politov D. V., Kalabushkin B. A., Upelniek V. P. The dynamics of population gene pools of plants. In the book. The dynamics of populations of gene pools under anthropogenic influences / ed. Yu.P. Altukhov. Moscow: Nauka, 2004. P.295-413. [in Russian] / Алтухов Ю. П., Пухальский В. А., Политов Д. В., Калабушкин Б. А., Упелниек В.П. Динамика популяционных генофондов растений. В кн. Динамика популяций генофондов при антропогенных воздействиях /под ред. Ю. П. Алтухова. М.: Наука. 2004. С.295-413.
14. Gubareva N.K., Gavrilyuk I.P., Konarev A.V. Identification of crop varieties by electrophoretic spectra of storage proteins. *Agrarian Russia*. 2015. № 11. [in Russian] / Губарева Н.К., Гаврилюк И. П., Конарев А. В. Идентификация сортов сельскохозяйственных культур по электрофоретическим спектрам запасных белков. *Аграрная Россия*. 2015. №11. doi:10.30906/1999-5636-2015- 11-21-27.

SIRANT L.V., SANDETSKA N.V.
Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17, e-mail: luba_va@ukr.net

GENETIC DIVERSITY OF SPRING COMMON BARLEY VARIETIES AT HORDEIN LOCI

Aim. The aim of the study was to investigate the varieties of hordein loci of spring barley suitable for cultivation in Ukraine. ***Methods.*** To identify the genotype by the loci of the hordein, we used the method of separating the hordeins in polyacrylamide gel (PAAG) in acidic medium by the Brzezinski method with modifications. ***Results.*** In 26 varieties of spring barley, genotypes were identified by the hordein loci of Hrd A, Hrd B and HrdF. Differences between alleles of storage protein loci were found in the frequency with which they were distributed among varieties. ***Conclusions.*** Found a high level of allelic variability. In barley varieties there is a tendency for the distribution of certain alleles of loci of hordein storage proteins of barley: Hrd A (A2,A4, A12,A18, A23, A32), Hrd B (B1, B5, B6, B8, B17, B19, B21,B29, B35,B67, B164,), Hrd F (F1, F2, F3, F0).

Keywords: *Hordeum vulgare* L., spring barley, storage proteins, hordeins, alleles.