

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ - НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

На правах рукопису

СТРАТУЛА ОЛЬГА РОМУАЛЬДІВНА

УДК 575.11.113:633.16

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ГЕНІВ β -АМІЛАЗИ
ЗЛАКІВ**

03.00.22 – молекулярна генетика

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник
доктор біологічних наук
професор, академік НААН

Сиволап Юрій Михайлович

Одеса - 2015

ЗМІСТ

	Стор.
СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ТА МЕТОДИ	
ВИВЧЕННЯ ФЕРМЕНТУ β -АМІЛАЗИ (огляд літератури).....	11
1.1. Молекулярні маркери в дослідженні організації і мінливості	
геному і генів рослин.....	11
1.2. Дослідження поліморфізму інтронних ділянок в структурних	
генах рослин.....	13
1.3. Злаки - значення, поширення, біологічні особливості та	
хімічний склад зерна	16
1.4. Фермент β -амілаза.....	21
1.4.1. Активність β -амілази.....	25
1.4.2. Термостабільність β -амілази.....	28
1.4.3. Молекулярна організація генів β -амілази ячменю. Особливості	
будови гена <i>Bmy1</i>	30
1.5. Дослідження поліморфізму генів β -амілази за допомогою	
молекулярних маркерів.....	32
1.6. Зв'язок між β -амілазною активністю та алелями гена <i>bmy1</i>	36
1.7. Різновид дикорослого ячменю <i>Hordeum spontaneum</i> - джерело	
поліпшення агрономічно цінних ознак.....	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	41
2.1. Рослинний матеріал.....	41
2.2. Виділення ДНК.....	43
2.3. Конструювання специфічних праймерів.....	44
2.4. Ампліфікація ДНК.....	44
2.5. Клонування.....	45
2.6. Виділення плазмід.....	47
2.7. Сиквенування.....	47
2.8. Електрофорез продуктів ампліфікації в агарозних гелях.....	47
2.9. Статистична обробка даних.....	48
2.10. Загальна схема досліджень.....	49
РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНІВ	
<i>ВМУ1</i> ТА <i>ВМУ2</i>	50
3.1. Конструювання олігонуклеотидних праймерів для дослідження	
генів, що кодують β -амілазу злаків.....	50
3.2. Визначення послідовності генів β -амілази окремих видів	
	55

родини злакових.....	
3.3. Молекулярно-філогенетичний аналіз генів β -амілази.....	59
РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ β -	
АМІЛАЗИ У ВИДІВ РОДИНИ <i>POACEAE</i>	66
4.1. Дослідження міжвидового поліморфізму генів <i>Bmy1</i> і <i>Bmy2</i> у	
представників родини <i>Poaceae</i>	67
4.1.1. Поліморфізм генів β -амілази у представників триби <i>Triticeae</i>	70
РОЗДІЛ 5. ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА <i>ВМУ1</i> ЯЧМЕНЮ.....	77
5.1. Дослідження алельних варіантів β -амілази в сортах ярого	
ячменю, поширених на території східноєвропейських і	
центральноазіатських країн.....	77
5.2. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму гену	
<i>Bmy1</i> ячменю.....	82
5.2.1. Аналіз алельного стану гену <i>Bmy1</i> у сортів ярого ячменю.....	83
5.2.2. Аналіз алельного стану гену <i>Bmy1</i> у сортів озимого ячменю.....	89
5.2.3. Аналіз алельного стану гену <i>Bmy1</i> у представників дикорослих	
видів ячменю.....	91
5.2.4. Аналіз асоціацій між алельним поліморфізмом гену <i>Bmy1</i> та	
ізоформами білку β -амілази.....	92
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕННЯ.....	96
ВИСНОВКИ	107
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	109
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	110
ДОДАТОК А.....	130
ДОДАТОК Б.....	134
ДОДАТОК В.....	147
ДОДАТОК Д.....	151

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЗТ-ПЛР	-	полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією
ДС	-	діастатична сила
ПЛР -	-	полімеразна ланцюгова реакція
п.н.	-	одиниця довжини дволанцюгової молекули ДНК, рівна парі нуклеотидів
APG	-	Angiosperm Phylogeny Group
<i>Bmy1</i>	-	ген ендоспермальної β -амілази
<i>Bmy2</i>	-	ген загальної β -амілази
EPI	-	exon-primed intron-crossing
EST	-	expressed sequence tag - маркерна експресована послідовність
IGC	-	International Grains Council - Міжнародна Зернова Рада
MAS	-	marker assisted selection – добір з використанням маркерів
ME	-	Minimum Evolution - метод мінімальної еволюції
MGE	-	Mobile genetic elements - мобільні генетичні елементи
MITE	-	Miniature Inverted-repeat Transposable Elements - мініатюрні мобільні елементи з термінальними інвертованими повторами
ML	-	Maximum Likelihood – метод максимальної правдоподібності
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information

- NJ - Neighbor Joining - метод найближчих сусідів
- PNPG5 - p-nitrophenyl maltopentaose - p-нітрофеніл мальтопентаоза
- STS - Sequence-Tagged Site - унікальний фрагмент геному з відомою послідовністю
- UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages – незважений парно-груповий метод з арифметичним усередненням

ВСТУП

Актуальність теми. Одна з найважливіших задач молекулярної генетики полягає в дослідженні організації та мінливості геному рослин. Крім значного поповнення фундаментальних знань, це дає можливість створення і розвитку технологій, які дають можливість забезпечити науково обґрунтований добір вихідного матеріалу для селекції рослин. Генетичні ресурси культурних рослин та їх дикорослих родичів є ключовими об'єктами класичної та молекулярної генетики і мають потенційну цінність для розробки новітніх технологій, сталого розвитку екологічно безпечного рослинництва. Важливість вивчення геномів і окремих генів рослин підкреслює і та обставина, що до теперішнього часу кількість локалізованих і сиквенованих генів злаків все ще невелика, а такі дослідження мають істотне теоретичне і практичне значення.

Розвиток молекулярної генетики, зокрема ДНК-технологій, дозволяє використовувати молекулярно-генетичні маркери, які генеруються в результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Сформовано розділ генетико-селекційних досліджень, що базуються на використанні молекулярних маркерів - MAS (marker assisted selection) [1].

Для задач прикладної генетики та селекції більш доцільним є використання не анонімних, а зчеплених молекулярних маркерів, які ідентифікують поліморфізм в кодуючих послідовностях ДНК – генах [2]. Необхідні дослідження щодо рівня між- і внутрішньовидової мінливості екзонних та інтронних ділянок генів - для кращого розуміння фенотипового прояву і варіабельності цих сегментів генів і можливості створення ДНК-маркерів шляхом ампліфікації окремих ділянок [3].

Серед родин квіткових рослин злаки (*Poaceae*) займають особливе положення, оскільки вони мають велике економічне значення. Ендосперм хлібних злаків є головним джерелом крохмалю - найбільш поширеного вуглеводу в раціоні людини. Ферментативний гідроліз крохмалю здійснюється при впливі амілолітичних ферментів. В цьому аспекті важливими представляються молекулярно-генетичні дослідження ферменту β -амілази для таких представників родини злакових, як види триби *Triticeae*, а також дикорослих видів, що використовуються для поліпшення якості найважливіших культурних рослин. Складність селекційних досліджень в цьому напрямку багато в чому пов'язана з тим, що дана ознака не виявляється фенотипово, і методи молекулярного маркування можуть надати неоціненну допомогу практичній селекції, значно скоротивши терміни та обсяг аналізованого матеріалу при створенні нових сортів. Гени *Bmy1* та *Bmy2*, що кодують два види β -амілази злаків (ендоспермальну та загальну), складаються з семи екзонів і шести інтронів, несуть як консервативні, так і варіабельні ділянки нуклеотидної послідовності, що дозволяє використовувати їх для між- та внутрішньовидового типування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана у відділі загальної та молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центра насіннєзнавства та сортовивчення (до 30.09.2014 р. – відділ геноміки і біотехнології; до 01.04.2012 р. – відділ молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру в рослинництві) в рамках Науково-технічної програми УААН «Сільськогосподарська біотехнологія 2001-2005 рр.», Завдання 3.1.2.6. Дослідження молекулярно-генетичних особливостей сортів ячменю Півдня України, каталогізація джерел зародкової плазми ячменю (0104U002692), Науково-технічної програми НААН «Сільськогосподарська біотехнологія 2006-2010 рр.», завдання 01.26. ДНК-типуювання сортів ячменю української селекції (0106U002669) та Програми наукових досліджень НААН «Сільськогосподарська біотехнологія 2006-2010 рр.», завдання 23.01.01.03.Ф ДНК-технології ідентифікації сортів, ліній, гібридів сільськогосподарських культур, розробка молекулярно-генетичних паспортів та поповнення бази даних ДНК-типуювання (0111U006104), протягом 2004-2012 років.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала в дослідженні екзон-інтронної організації генів *Bmy1* та *Bmy2* і пошуку родо- та видоспецифічних особливостей для молекулярної ідентифікації видів злаків, встановленні алельного складу генів *Bmy1* та *Bmy2* у сортів ячменю та дослідженні їх географічного поширення.

Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

- сконструювати на основі наявної в базі даних GenBank Національного центру біотехнологічної інформації (National Centre for Biotechnology Information, NCBI) інформації специфічні праймери для дослідження генів β -амілази *Bmy1* та *Bmy2*;
- визначити нуклеотидні послідовності генів *Bmy1* та *Bmy2* окремих видів родини злакових;
- вивчити можливість використання генів *Bmy* в якості молекулярного філогенетичного маркера;

- дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy* окремих представників родини *Poaceae*;
- отримати алельні характеристики сортів ячменю за геном *Bmy1*.

Об'єкт дослідження: гени β -амілаз родини злаків.

Предмет дослідження: поліморфні ділянки генів *Bmy1* та *Bmy2*.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні методи (виділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гель-електрофорез продуктів ампліфікації, клонування і сиквенування ДНК) використовували з метою подальшого вивчення поліморфізму ДНК, для визначення нуклеотидних послідовностей фрагментів генів *Bmy*; біоінформатичні методи (вирівнювання нуклеотидних послідовностей, реконструкція філодендрограм, дизайн праймерів, ПЛР *in silico*) використовували для вивчення нуклеотидних та амінокислотних послідовностей β -амілаз, отриманих з баз даних, а також для отриманих в результаті сиквенування, дослідження філогенії β -амілаз, дизайну праймерів для подальших досліджень *in vitro*.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше визначені нуклеотидні послідовності генів *Bmy1* та *Bmy2* представників 21 виду родини *Poaceae* і проведено їх біоінформатичний аналіз. Доведено можливість застосування послідовностей β -амілази в якості молекулярного філогенетичного маркера на різних таксономічних рівнях. Проведено молекулярно-генетичне дослідження генів *Bmy1* та *Bmy2* у представників родини *Poaceae*. Вперше ідентифіковано алелі гена *Bmy1* у сортів ярого та озимого ячменю української та закордонної селекції, дикорослих форм *Hordeum*. Досліджений географічний розподіл виявлених алелів *Bmy1* у сортів ячменю, поширених на території Євро-Азійського регіону.

Практичне значення одержаних результатів. Депоновані в GenBank NCBI нуклеотидні послідовності локусів *Bmy1* та *Bmy2* 21 виду злаків та відповідні їм амінокислотні послідовності доступні для користувачів через Інтернет (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/>). В роботі вперше переконливо показано, що сконструйована система ПЛР-праймерів для аналізу генів *Bmy1* та *Bmy2* може бути використана в якості родо- й видоспецифічної, її застосування буде сприяти розширенню можливостей дослідників при молекулярно-генетичній характеристиці генів β -амілази. Інформація щодо алельного стану генів *Bmy* у зареєстрованих сортів ячменю надає можливість здійснювати підбір генотипів для застосування в селекційних програмах створення сортів ячменю з бажаними агрономічними ознаками, а саме з найбільш ефективним алелем гена β -амілази.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто проведено інформаційний пошук і проаналізовано літературні джерела за темою дисертаційної роботи, здійснено основну частину експериментальної роботи, статистичну обробку та інтерпретацію отриманих даних, підготовку публікацій до друку, оформлено дисертаційну роботу.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень представлено на Міжнародній науковій конференції «Современные проблемы генетики» (Білорусь, Мінськ, 2005 р.); III Міжнародній конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Алушта, 2006 р.); Науковій конференції «Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні» (Сімферополь, 2008 р.), V Міжнародній конференції «Геном рослин» (Одеса, 2008 р.); Міжнародній науковій конференції «Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety» (Одеса, 2010 р.); Всеукраїнській науковій конференції «Украинская научная мысль» (Київ, 2011 р.); VII Конференції з каріології, каріосистематики та молекулярної філогенії рослин (РФ, Санкт-Петербург, 2013 р.); VIII Московському міжнародному конгресі «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (РФ, Москва, 2015 р.).

Публікації. Основні етапи роботи викладено у 14 друкованих працях, у тому числі в 9 статтях, з них 5 опубліковані у виданнях, які включено до переліку фахових, у одному науково-методичному посібнику, а також у 4 тезах за матеріалами наукових конференцій.

Структура та об'єм дисертації. Дисертаційна робота викладена на 157 сторінках комп'ютерного тексту та включає 11 таблиць, 22 рисунка і 4 додатка, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій. Список використаної літератури складається з 187 джерел (з них англомовних - 125).

РОЗДІЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ТА МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ФЕРМЕНТУ β -АМІЛАЗИ (огляд літератури)

1.1. Молекулярні маркери в дослідженні організації і мінливості геному і генів рослин

Створення і застосування ДНК-маркерів є принципово новим етапом дослідження геному рослин, оскільки вони виявляють поліморфізм на рівні структури ДНК і дозволяють досліджувати конкретні послідовності генів. У рослинництві молекулярні маркери застосовують в генетиці, селекції, насінництві та при захисті авторських прав селекціонерів [4]. Стратегія оцінки нових маркерних генів останнім часом ведеться, у першу чергу, з визначенням економічного значення і затребуваності ринком продукту, що розробляється, адже види сільськогосподарських рослин представлені численними сортами, що розрізняються за багатьма агрономічними показниками. Більшість економічно важливих ознак є полігенними, що складаються з окремих генів. Аналіз внутрішньовидової мінливості, мікроеволюції, важливий для розуміння селекційного процесу [5].

Найбільше поширення ДНК-технології отримали після впровадження ПЛР-аналізу, який дозволив широко досліджувати молекулярно-генетичний поліморфізм. За допомогою методу ПЛР проводиться аналіз зразків незалежно від стадії розвитку рослин, охоплюючи практично весь геном. Можливості ПЛР-аналізу: створення необмеженої кількості маркерів, робота з будь-якою тканиною рослини, аналіз великої кількості зразків одночасно, швидкість одержання результатів [1].

Сучасна селекційна практика вимагає корегування наявних програм, адже існує нагальна необхідність детального вивчення геномів найбільш важливих у господарському відношенні рослин. Області використання поліморфних послідовностей ДНК у рослин: картування генів, хромосом і геномів, маркування генів, виділення нуклеотидних послідовностей генів, селекція за допомогою молекулярних маркерів, молекулярна паспортизація сортів, діагностика захворювань, дослідження генетичної різноманітності, філогенетичні дослідження [6, 7, 8, 9].

Молекулярні маркери повинні мати певні властивості і відповідати наступним вимогам: бути високополіморфними, визначати гетерозиготність і бути селективно нейтральними, мати рівномірний розподіл у геномі по

хромосомам, також важлива легка оцінка параметрів маркера, можливість застосування автоматизації і комп'ютерної обробки даних [1, 6, 7, 9].

Найбільш використовувані в вивченні геному рослин типи маркерних систем: RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), IRAP (Inter Retransposon Amplified Polymorphism), REMAP (REtrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), STS (Sequence Tagged Sites), SSR (Simple Sequence Repeats), SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Так, кодомінантні монолокусні маркери (SSR, STS, SNP), які характеризують індивідуальний локус, часто використовуються для популяційно-генетичних досліджень, картування генів і геномів, порівняльного картування та побудови консенсусних карт в межах одного роду або більш великих таксономічних одиниць [7]. Мультілокусні, як правило, біалельні домінантні системи (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP) застосовуються найчастіше при порівняльному аналізі, коли потрібна інформація про варіабельність як можна більшої частини генома [4].

Таким чином, можна з упевненістю стверджувати, що впровадження молекулярних методів в генетико-селекційні дослідження виводить їх на якісно новий рівень, дозволяючи оцінювати безпосередньо генотипи, а не через аналіз фенотипових ознак, що в кінцевому рахунку реалізується в створенні генотипів з наперед заданими властивостями.

1.2. Дослідження поліморфізму інтронних ділянок в структурних генах рослин

Наближається час, коли всі накопичені за останні роки відомості про різні види злаків - структура та вплив генів, метаболізм, фізіологія та фенотипи можуть бути об'єднані. Мається на увазі, що селекціонерам більше не потрібно обмежуватися досліджуванім видом в пошуку придатних варіацій - гомологічні гени та їх алелі будуть доступні для дослідників. Загальнодоступні бази даних генів і білкових послідовностей являють собою

цінний і зростаючий ресурс для генетики та селекції рослин і можуть ефективно використовуватися для розробки ПЛР-праймерів, орієнтованих на конкретні ділянки генів, з метою визначення регіонів, що забезпечують продукт ампліфікації, обґрунтований для використання в якості ДНК-маркера [3].

У світлі зростаючого обсягу даних, наданих проектами геномного секвенування і у зв'язку з відкриттям регуляторних функцій, які приписують інтронам, вивчення поліморфізму інтронних ділянок стає важливим аспектом в селекційних і генетичних дослідженнях основних видів сільськогосподарських культур. Довжина і щільність інтронів в різних геномах еукаріотів надзвичайно варіюють, від дуже нечисленних інтронів деяких грибів до сотень тисяч у вищих рослин і тварин [10]. Існують дві альтернативні теорії, що пояснюють походження і еволюцію сплайсосомних інтронів: перша - теорія ранніх інтронів, і друга, альтернативна - пізніх інтронів. Перша теорія стверджує, що численні інтрони були присутні в спільних предках еу- та прокариот і, відповідно, є дуже старими структурами. Відповідно до цієї моделі, інтрони були втрачені в геномі прокариот [11]. Альтернативна теорія стверджує, що інтрони з'явилися в генах відносно недавно, і були інсертовані в геном після поділу організмів на про- та еукаріоти. Ця модель ґрунтується на спостереженні, що сплайсосомні інтрони є тільки у еукаріот [12].

У порівнянні з екзонами, інтрони більш мінливі тому, що селективний тиск в інтронних регіонах набагато менше, ніж у екзонних, тобто швидкість накопичення мутацій в цих ділянках досить висока [10, 13, 14]. Наприклад, серед восьми сортів рису середнє число SNPs на 1000 п. н. в інтронах (12,1) більш ніж в три рази вище, порівнянно з екзонами (3,6) [15]. Послідовності ДНК, що не кодують білкові продукти, є потенційно більш варіабельними в межах одного виду, тому, відповідно, наслідки мінливості послідовностей в цих областях, як очікується, будуть менше, ніж в кодуючих послідовностях [3]. Дійсно, порівняння рівня мінливості в межах виду (поліморфізм) і

між видами (фіксовані відмінності), і дослідження поліморфних форм є потужними методами для детектування впливу відбору [16, 17]. Тому інтрони ядерних генів широко використовуються для філогенетичних досліджень близькоспоріднених видів, оскільки швидкість накопичення мутацій в некодуючих ділянках більш висока [18, 19, 20, 21, 22]. Вивчення поліморфізму інтронних ділянок стає важливим аспектом в селекційних і генетичних дослідженнях основних видів сільськогосподарських культур [23, 24].

За даними численних досліджень такі характеристики інтронів, як варіабельність довжини, положення в гені, залежність від довжини екзонів та інші, можуть бути пов'язані і з властивостями генів (експресією, транскрипцією, сплайсингом, часом життя мРНК і т.д.), і з еволюцією організму в цілому [14, 24, 25, 26, 27]. У інтронів рослин в основному досліджено їх роль в експресії генів – у рослинах кілька інтронів можуть впливати на процесинг власних генів, також деякі інтрони відповідають за ткане- або стадієспецифічну експресію генів [10]. Наприклад, Фрідман та ін. (2000) припустили, що поліморфізм в межах інтронів гена інвертази томату відповідальний за відмінності в експресії алелів цього гена [28]. Інтрони, ймовірно, являють собою більш значну мутаційну мішень, ніж до цих пір передбачалося, з урахуванням безлічі функціональних елементів, що в них містяться, у тому числі енхансери і сайленсери, які регулюють альтернативний сплайсинг, транс-сплайсинг елементи та інші регуляторні елементи, деякі з яких можуть знаходитися в протяжних інтронах [29, 30, 31].

У ряді досліджень за допомогою алель-специфічної ПЛР, шляхом розробки праймерів для ампліфікації декількох екзонів і інтронів, було показано, що відмінності в їх довжині між генотипами викликані поліморфізмом інделей в інтроні (наприклад, Chetelat та ін. (1995) проводили дослідження томату, Hongtrakul та ін. (1998) - соняшнику, Holland та ін. (2001) - кукурудзи і вівса) [3, 32, 33].

Для виявлення поліморфізму досліджуваних ділянок генів, які представляють інтерес, а саме поліморфних інтронних послідовностей, застосовують ПЛР, при якій праймери добираються до висококонсервативних ділянок екзонів. Цей підхід застосовується вже досить давно - наприклад, використання консервативних ділянок рибосомальних генів 18S і 28S еукаріот або 16S і 23S у прокаріот для ампліфікації варіабельної міжгенної ділянки *internal transcribed spacer* (ITS), що включає рибосомальний ген 5.8S [34, 35]. Деякі автори вважають за краще називати даний тип ампліфікації ДНК екзон-праймова ампліфікація інтронів (*exon-primed intron-crossing* – EPIC) [36]. Основною перевагою даного підходу є те, що немає необхідності в розробці індивідуальних маркерів, яка зазвичай включає в себе дорогі процедури клонування і секвенування геномної ДНК. Для проектування праймерів при даному підході досить наявних у базах даних послідовностей досліджених генів інших таксонів.

EPIC-маркери мають наступні переваги - праймери, компліментарні фланкуючим консервативним областям екзонів, можуть застосовуватися в широкому таксономічному діапазоні, гомологічні ампліфіковані послідовності легко визначаються шляхом порівняння їх екзонних або інтронних частин, залежно від генетичної відстані між таксонами, а також екзонні та інтронні фрагменти можуть допомогти в одночасному вивченні генетичного різноманіття на внутрішньо- та міжвидовому рівні при вивченні комплексу видів [21, 37, 38, 39]. Розроблено методи, засновані на порівнянні двох або більше геномів або між геном і EST (*expressed sequence tag*) послідовністю у рослин [13, 39, 40]. Дівашук та ін. (2011) показали, що отримані секвенси ортологів гена *Viviparous1* у *Thinopyrum ponticum* і *T.intermedium* мають висококонсервативні послідовності в області екзонів і поліморфні в області інтронів. Подібна картина у даних авторів спостерігалася при аналізі гена *Viviparous1* у видів *T. elongatum*, *T.bessarabicum*, *Pseudoroegneria stripifolia* і *Dasypyrum villosum*, відзначаючи,

що поліморфізм саме в області інтрона у білозерних пшениць викликає різницю в стійкості до проростання на корені [41].

Ключовим компонентом, який забезпечує пластичність рослинного геному, є мобільні елементи [42], які, вбудовуючись в послідовності генів, можуть впливати на їх експресію [43]. Мініатюрні мобільні елементи з термінальними інвертованими повторами (MITE) - клас мобільних елементів [44], які можуть бути зчепленими з кодуєчими районами в геномах видів *Triticeae*, кукурудзи, рису [45, 46, 47]. Є дані про поліморфні інсерції в промотори, інтрони або 3'-фланкуючі послідовності між ортологічними і паралогічними генами [45, 48, 49]. Інсерції mobile genetic elements (MGE) також можуть забезпечувати альтернативні промотори, екзони, термінатори і сайти сплайсингу [43]. Сайти MITE-вставок в окремих локусах часто поліморфні в межах виду [45, 48, 50, 51]. Ампліфікація MGE вносить істотний внесок в еволюцію геному рослин, за її рахунок відбулася в тому числі і дивергенція послідовностей споріднених видів [42].

1.3. Злаки - значення, поширення та біологічні особливості

Злаки, як найважливіший продукт харчування, знаходяться в центрі уваги численних молекулярно-філогенетичних досліджень, реконструкцій еволюційних процесів і проектів по геномному сиквенуванню. Знання генів, механізмів їх експресії та регуляції надзвичайно важливо для розуміння процесів, контролюючих зростання і обмін речовин в рослинах і в останні роки досягнуті безсумнівні успіхи в цій області [52].

Пшениця є однією з найважливіших та найпоширеніших сільськогосподарських культур у всьому світі. В роді *Triticum* L. описано 29 видів, що відносяться до трьох рівней плоїдності ($2n = 14, 28, 42$) [53]. Одним із способів розширення генетичної різноманітності пшениці є залучення генетичного потенціалу її дикорослих родичів, таких як *Aegilops*, *Triticum dicoccoides*, *T. timopheevii* [54]. Види роду *Aegilops* є найближчими родичами

культурної пшениці (*T. durum* Dest. та *T. aestivum* L.) і складають основну частину вторинного генофонду пшениці (під *Triticum* L.), при цьому види егілопс секції *Sitopsis* і вид *Aegilops tauschii* вважаються донорами відповідно В і D геномів культурної пшениці [42].

Серед культурних злаків ячмінь є однією з основних сільськогосподарських культур. В роді *Hordeum* L. описано 31 вид, один з яких - *H. vulgare* включає два підвиди: культурний - *H. vulgare* ssp. *vulgare* і дикорослий ячмінь - *H. vulgare* ssp. *spontaneum* [55]. Близько половини видів роду *Hordeum* є диплоїдними ($2n = 14$), інші види тетраплоїдні ($2n = 28$) або гексаплоїдні ($2n = 42$). Сьогодні ячмінь є четвертою за значимістю зерновою культурою в світі (після рису, пшениці і кукурудзи). Ячмінь, через біохімічні і морфофізіологічні особливості будови зернівки, більшою мірою, ніж інші культури, підходить для виробництва солоду [56]. Зерно ячменю пивоварного напряму істотно відрізняється від кормового і круп'яного [57]. Вимоги, що пред'являються до пивоварного ячменю, встановлені на основі багаторічного досвіду і наукових досліджень та затверджені державним стандартом ДСТУ 3769 - 98 "Ячмінь для пивоваріння". Для виробництва солоду можуть використовуватися сорти ярого і озимого ячменю. Якість врожаю, кліматичні умови, ґрунт і сорт - все це різні фактори, які впливають на якість солоду. М.І. Вавилов (1935) підкреслював важливість пристосованості виду і сорту до конкретних умов середовища, а також їх поведінку в різних агрокліматичних зонах. У колишньому СРСР виділяли три найважливіші ячмінні зони: 1) північну - продовольчого ячменю, 2) південну - кормового та експортного ячменю, 3) західну (Білорусія, Лісостеп України, північно-західні райони Росії і Прибалтійські республіки) - пивоварного ячменю. Цей розподіл був вельми умовним, так як зональність не виключала універсального використання ячменю у всіх районах країни. Проте вимоги, що пред'являються до ячменю, особливо до пивоварного, більшою мірою задовольняються в західній зоні, де він дає зерно, багате полісахарідами та високомолекулярними білками і найбільш придатне для пивоваріння [58, 59].

При селекції за ознакою якості солоду необхідно враховувати вплив середовища на окремі ознаки. Взаємодія генотипу і середовища - значна проблема для селекціонерів, так як умови по-різному впливають на прояв ознаки - це необхідно враховувати при застосуванні методу відбору за тією чи іншою ознакою [60].

Жито посівне (*Secale cereale* L.) ($2n = 14$) - вид культурного жита, який широко поширений у світовому землеробстві, як важлива продовольча і кормова культура. Більш стійка ніж пшениця до посухи і холодів і дає стабільні врожаї в умовах північних широт. Жито використовують для випікання хліба (друге місце після пшениці), роблять квас, одержують крохмаль, женуть спирт, також використовують як фураж.

Також в світі відбувається збільшення посівних площ тритикале ($\times$ *Triticosecale*), чому сприяє висока врожайність і широкі можливості у використанні його в харчових, технічних і кормових цілях. Наявний сортимент тритикале характеризується невисокими хлібопекарськими властивостями. Деякі озимі сорти тритикале відрізняються високою амілолітичною активністю [61].

Зерно всіх вищеперелічених злаків (а також проса, чумизи і вівса) застосовують для солодовирощування. Для більш повного оцукрювання крохмалю на спиртових заводах застосовують суміш солодів з різного зерна [62, 63]. В даний час у виробничих масштабах випускається концентрований амілолітичний препарат - ферментативно-активне солодове борошно, яке виробляють з пророслих зерен ячменю, пшениці чи жита. Солодове борошно застосовують для випікання хліба, при виробництві пива і безалкогольних напоїв.

Основною передумовою виробництва якісного солоду є сорт з високим генетичним потенціалом пивоварних ознак. Орієнтовний коефіцієнт якості пивоварних ячменів розраховується за допомогою індексу солодових властивостей, одним з показників якого є діастатична сила (ДС) [64]. Діастатична сила - це гідролітична активність амілолітичних ферментів, що

розкладають основні високомолекулярні з'єднання зерна на прості речовини, що розчинні у воді. Найважливішим із амілолітичних ферментів є β -амілаза. Діастатичну силу солоду виражають у грамах мальтози, що утворилася з розчинного крохмалю під дією 100 г солоду. Дуже хороший солод має ДС вище 250, хороший - в межах 200-250, діастатична сила нижче 150 характеризує низькі якості солоду [65]. Реакція гідролізу крохмалю ферментами є основною в ряді харчових технологій [66].

Хімічний склад зерна злаків залежить від сорту, району зростання, метеорологічних і ґрунтових умов, масового співвідношення окремих частин зерна. Так, маса зародка коливається від 2,8 до 5%, квіткових плівок - від 6 до 17%. Зріле зерно складається на 12-20% з води і на 80-88% з сухої речовини, з якої 80% - вуглеводів, 10% - білків, 3% - ліпідів і 2% - мінеральних речовин [67]. З безазотистих екстрактивних речовин основну цінність в бродильних виробництвах представляють вуглеводи: крохмаль, цукри, декстриноподібні речовини. Під дією ферментів солоду і дріжджів ці речовини перетворюються в спирт.

Основна маса вуглеводів представлена крохмалем, вміст якого залежить від генотипу і умов вирощування. Приблизний вміст крохмалю в сухій речовині у злаків: ячмінь - 62,0%, пшениця - 63,8%, жито - 63,8%, рис - 85,0%, кукурудза - 71,8%. За своїм хімічним складом (вмістом екстрактивних речовин та їх зброджуванністю) ячмінь більш інших злакових культур придатний для отримання пивоварного солоду. У сортів, вирощених на території України, вміст крохмалю в зерні може коливатися від 44 до 66% в перерахунку на суху речовину [68]. Підвищений вміст крохмалю збільшує пивоварну цінність ячменю, оскільки екстрактивні речовини солоду складаються на дві третини з цукрів, що утворилися з крохмалю під дією амілолітичних ферментів. Крохмальні зерна пшениці, жита та ячменю найбільш подібні між собою і містять два типи полісахаридів, що розрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями: лінійний полісахарид амілозу і розгалужений амілопектин. В залежності від сорту

вміст амілози в крохмалі варіює від 0 до 26%. Спостерігається зворотна кореляція між вмістом крохмалю в зерні та амілози в крохмалі. Молекули амілози уявляють довгий нерозгалужений ланцюг залишків глюкози, з'єднаної α -1,4-глікозидними зв'язками. Молекула амілопектину має розгалужену будову. Залишки глюкози в амілопектині пов'язані, як і в амілозі, α -1,4-глюкозидними зв'язками, а в точках розгалуження - α -1,6-глюкозидними зв'язками. Під дією кислот і амілолітичних ферментів крохмаль гідролізується. При гідролізі крохмалю утворюються цукри різної молекулярної маси, у зв'язку з чим цей процес називається - оцукривання крохмалю. Крохмаль розщеплюється ферментами амілазами до глюкози, мальтози та декстринів [68, 69, 70, 71].

Винятково велике біологічне значення амілаз при дозріванні і проростанні зерна, а також у ряді технологічних процесів харчових виробництв, що мають в своїй основі гідролітичні перетворення крохмалю під впливом амілаз [66].

В процесі проростання зерна ячменю продукти ферментативної деградації білка, крохмалю і клітинної стінки створюють розчин, що складається з амінокислот, дипептидів і цукрів, який надходить в ембріон і підтримує його зростання. Щиток має секреторну функцію, викликаючи виділення гідролітичних ферментів з ембріона в крохмалистий ендосперм. У процесі початкового росту ембріон виділяє рослинний гормон гіберелін, який гідролізує алеїроновий шар, що збільшує діапазон ферментів. Амілолітичні ферменти - α -амілази, β -амілази, α -глюкозідази, ліміт-декстринази та ізоамілази розщеплюють крохмалистий ендосперм поступово від проксимального до дистального кінця зерна, розкладаючи крохмаль на глюкозу і олігосахариди [72].

Більшість досліджень спрямовані на діастатичну активність солоду, а не окремих ферментів, не враховуючи важливу роль різних ферментів в наданні впливу на кількість цукру в гідролізаті крохмалю.

У галузях харчової промисловості, де крохмаль служить джерелом утворення цукрів за рахунок розщеплення його амілолітичними ферментами, найбільше значення мають α - та β -амілази. Повне розщеплення крохмалю до мальтози можливо при одночасній дії α - і β -амілаз [66]. Насіння рослин розрізняються за змістом в них α - і β -амілаз. У непророслих зернах пшениці та ячменю міститься тільки β -амілаза; α -амілаза утворюється при проростанні, а в зерні жита присутні обидва ферменти - α - і β -амілаза [73].

Солодження - це процес проростання зерен і початок їх перетворення, що проходить в природних умовах, створених на пивоварному виробництві. Технічно важливі особливості проростання - синтез гідролітичних ферментів і деградація тканин зерна. В процесі випалу солоду дія гідролітичних ферментів (за винятком α - і β -амілаз) слабшає або припиняється. α -Амілаза більш термостабільна, ніж β -амілаза, тобто при подальшому випалу солоду, може виявитися дефіцит β -амілази [72]. Основним принципом випалу є висушування, яке повинно починатися при відносно низьких температурах, що гарантує виживання самих чутливих до високих температур ферментів і супроводжується поступовим збільшенням температури, в результаті чого отримують ароматичні та кольорові зміни і повне висихання солоду [64].

1.4. β -амілаза

β -амілаза (α -1,4-глюканмальтогідролаза) - один з найважливіших ферментів ендосперму ячменю, що беруть участь в хімічних перетвореннях крохмалю [66, 68]. β -амілаза - тіол-фермент і екзофермент [74]. β -амілаза діє на молекули крохмалю, руйнуючи α -1,4 зв'язки, в результаті чого утворюється солодовий цукор - мальтоза (4-O- α -D-глюкопіраноз-D-глюкоза) - дисахарид, що складається з двох залишків глюкози [75]. Мальтоза – вуглевод, який легко дифундує і може використовуватися зародком злаку. У пивоварінні мальтоза - головний компонент сусла, що використовується як субстрат для дріжджів при бродінні і впливає на органолептичні властивості пива.

Протягом довгого часу вважалося, що гідроліз крохмалю у злаків відбувається за допомогою одних і тих же механізмів, проте згодом з'ясувалося, що метаболічний шлях синтезу крохмалю в ендоспермі злаків є унікальним і вимагає участі специфічних ізоформ ферментів, які відсутні в інших тканинах злаків, де синтезується крохмаль, а також в тканинах інших видів рослин [76]. Представники *Triticeae* (пшениця, ячмінь і жито) мають дві різні форми β -амілази, які відрізняються характером експресії гена: одна форма специфічна тільки для ендосперму (далі - ендоспермальна β -амілаза), кодується геном *Bmy1*, а інша експресується у всіх тканинах (далі - загальна β -амілаза), кодується геном *Bmy2* [77, 78, 79, 80]. Змінені в ході еволюції копії генів часто нефункціональні, але іноді здатні виконувати якісь нові функції або ж реалізуватися на різних стадіях онтогенезу рослин (нерідко спостерігаються відмінності в наборі генів конкретного сімейства). Це може служити доказом того, що для реалізації конкретного фенотипу використовується тільки частина генетичної інформації геному організму [22].

Ендоспермальна форма ферменту найбільш широко вивчена в ячмені, так як має важливе значення для пивоварної промисловості: з чотирьох ферментів, які входять в поняття «діастатична сила ячмінного солоду», тобто здатність перетворювати крохмаль в солодовий цукор, β -амілаза вважається основним та найбільш тісно корелює з діастатичною силою - виміром загальної амілолітичної активності, тобто є важливим фактором, що визначає якість солоду [64, 81, 82]. У своєму дослідженні ізоформ пшеничних β -амілаз Wagner et al. (1999) повідомляли, що ген загальної β -амілази пшениці транскрибується в різних тканинах, але відповідний йому білок не виявлений [83]. У більш пізніх дослідженнях було показано, що загальна β -амілаза присутня в зерні ячменю на різних стадіях дозрівання, проте переважна більшість β -амілази як в зерні, що розвивалося, так і в зрілому насінні відносилася до ендоспермальної форми ферменту [84]. Ендоспермальна β -амілаза накопичується в ендоспермі в ході розвитку зерна і піддається

посттрансляційним модифікаціям в процесі його проростання, на відміну від загальної β -амілази, яка в процесі проростання змінам не піддається [85]. В непророслих зернах ячменю β -амілаза може становити 1-2% від загального вмісту білка в крохмалистому ендоспермі. Ендоспермальна форма β -амілази ячменю характеризується гліцин-багатою ділянкою на С-кінці ланцюга. Подібна додаткова послідовність є у жита, але її немає у загальної форми ячмінної β -амілази, а також у β -амілаз інших рослин [86, 87, 88].

У сухому зерні ячменю β -амілаза знаходиться в двох формах: вільній або розчинній, активній, та пов'язаній, менш активній. Остання становить 75% від загальної кількості β -амілази. Імовірно, β -амілаза синтезується у вільній формі, поступово перетворюючись в білкову агрегатну форму. Обидві форми можуть бути з'єднані або пов'язані дисульфідними зв'язками. Вільна β -амілаза має багато форм, які відрізняються за ізоелектричними точками. Зв'язаний фермент головним чином з'єднаний дисульфідними зв'язками з нерозчинною масою білка ендосперму або з гранулами крохмалю. Вихід і активація β -амілази в процесі проростання супроводжуються накопиченням додаткових β -амілазних ізоформ [89, 90].

Генетичний контроль пшеничних β -амілаз здійснюють два локуси: β -Amy-1, розташований в довгих плечах хромосом 4A (локус β -Amy-A1) і 4D (локус β -Amy-D1) і β -Amy-2, який знаходиться в довгому плечі хромосоми 5A (локус β -Amy-A2). У локусу β -Amy A1 ідентифіковано два алелі, у локусу β -Amy D1 - п'ять алелів, і два алелі ідентифіковано в локусі β -Amy-A2 [91].

Кукурудзяна β -амілаза подібна загальному ферменту жита і пшениці, ендоспермальна β -амілаза в кукурудзі відсутня [92].

Sadowski та ін. (1993) вперше представили повну послідовність кДНК, що кодує загальну β -амілазу жита, яка складається з 1879 п.н. (відкрита рамка зчитування - BP3), результатом є поліпептид з 503 амінокислот. Також у даному дослідженні згадують про те, що загальна і ендоспермальна β -амілази грають різні фізіологічні ролі в процесі розвитку насіння і сходів [93]. Гени

ендоспермальної (β -Amy-R1) та загальної (β -Amy-R2) β -амілаз жита, знаходяться в хромосомах 6RL и 7RL, відповідно [94].

Piasecka-Kwiatkowska та ін. (2007) виявили відмінності в амілолітичній активності ферментів пшениці, жита і тритикале, а також те, що вона залежала від виду, різноманітності та року збору врожаю досліджуваних злаків. Найвища амілолітична активність виявлена у сортах тритикале і низька в сортах жита [78].

Заявлено про високий рівень активності α - і β -амілаз у досліджених сортів тритикале, однак одним з недоліків солоду з тритикале є отримання сусла з високим вмістом азоту і високою протеолітичною активністю, що негативно позначається на органолептичних властивостях пива, а також про те, що озимі види тритикале мають кращі пивоварні якості, ніж ярі [95].

Передбачувані функції β -амілаз: β -амілаза утворюється в зерні, що розвивається до стадії твердої стиглості. Інші амілолітичні ферменти, подібно α -амілазі, утворюються *de novo* протягом процесу проростання. Кількість β -амілази в зерні занадто висока, в 500 разів більше в порівнянні з кількістю, необхідною для деградації крохмалю при проростанні. На думку Labu та ін. (2001), β -амілаза не потрібна, принаймні, протягом початкових стадій, для гідролізу крохмалю в проростаючому насінні або підтримки рівня крохмалю, нормальній флоемній міграції та загального росту рослини. З цього вони зробили висновок, що β -амілаза має також інші функції в зерні та рослині, крім деградації крохмалю [96]. Ендоспермальна β -амілаза може бути запасним білком зі складом амінокислот, відмінним від складу гордеїнів, які є джерелом амінокислот в зерні в період спокою. У зерні ячменю більшість запасних білків типу гордеїнів не розчиняються у воді, на відміну від β -амілази. Можна стверджувати, що β -амілаза - вологоутримуючий компонент (humectant), запасаючий воду в зерні в посушливих умовах, так як в пустелі і при сухих сезонах, кількість ферменту зростає [97]. Це також підтверджує положення ферменту в ендоспермі зерна. Локалізація специфічних β -амілаз в

цитозолі листя злаків, де відсутній відповідний субстрат, також вказує на інші функції цього ферменту, крім деградації крохмалю.

1.4.1. Активність β -амілази. Повна структура β -амілази схожа із структурою ферментів, які мають субстрат типу мальтози або солоду. Ділянка С-кінця ланцюга β -амілази впливає на зв'язування з субстратом, можливо, скорочуючи просторову перешкоду для з'єднання з крохмалем. Втрата цієї ділянки не зачіпає активність β -амілази, але впливає на ізоелектричну гетерогенність і термостабільність ферменту [98].

У літературі описані кілька методів аналізу активності β -амілази. Метод McCleary і Codd (1989) був розроблений як модифікація медичного аналізу для потреб селекціонерів і фізіологів, а також для промислових цілей [99]. Santos і Riis (1996) модифікували цей метод, щоб підвищити його відтворюваність. В процесі в якості субстрату використовується р-нітрофеніл мальтопентаоза (p-nitrophenyl maltopentaose - PNPG5) в присутності надлишку α -глюкозидази. PNPG5 гідролізується β -амілазою на мальтозу і PNPG3. Потім PNPG3 розщеплюється на глюкозу і вільний р-нітрофенол, так як PNPG5 стійка до гідролізу α -глюкозидази. Реакція зупиняється при додаванні основного розчину Trizma (Trishydroxymethyl aminomethane), при цьому рівень рН підвищується до 10, проводиться фарбування фенолятом, проявляється і вимірюється - одна одиниця активності визначена як кількість ферменту в присутності надлишку α -глюкозидази, необхідного для вивільнення одного мікромоля р-нітрофенолу з PNPG5 через одну хвилину при певних умовах досліду. Перевага цього методу в тому, що α -амілаза не бере участь в реакції. Для α -амілази PNPG5 мала в якості субстрату, отже α -амілаза може тільки бути присутній в екстрактах. У подібному методі використовується 2,4-дихлорфеніл β -мальтопентаозід, де одна одиниця активності визначається як кількість ферменту, необхідного для забезпечення одного мікромоля 2,4-дихлорфенолу в хвилину [100, 101].

При вивченні β -амілази кукурудзи виявлено, що активність ферменту збільшувалася під час розвитку зернівки і багаторазово зростала на стадії паростка. Кукурудзяна β -амілаза, на відміну від ячмінної та пшеничної, синтезується в зерні в період проростання [92].

Александрова та ін. (2007) досліджували дію гіпертермії та екзогенної гіберелової кислоти на інтенсивність амілолізу в одно- і чотириденних паростках пшениці і встановили, що відповідна реакція на гіберелову кислоту залежить від віку паростків - збільшення активності амілолітичного процесу в зернівках виявлено тільки у одноденних паростків. Вони також з'ясували, що гіпертермія не призводила до зміни швидкості реакції розщеплення крохмалю в зернівках в обидва досліджених терміна [102]. Є також дані, що в одноденних паростках головну роль в гідролізі грають β -амілази, що підвищують свою активність в результаті активації латентних форм ферменту [69, 71, 103, 104].

Також вивчали рівні активності амілолітичних ферментів в солоді, приготованому з зерна чотирьох злаків (сорго, риса, кукурудзи та проса), оцінюючи придатність такого солоду для виробництва глюкозних сиропів. Найбільша активність амілолітичних ферментів спостерігалася в рисовому солоді і її оптимум знаходився в проміжку між 9-13 днями. Фермент β -амілаза переважав в солоді з усіх злаків, крім кукурудзяного, в якому домінувала α -амілаза [105].

Оскільки ячмінна ендоспермальна β -амілаза синтезується в процесі розвитку зерна, протягом дозрівання і сушки, умови зростання важливі на цих стадіях (сильна взаємодія генотипу із середовищем). За даними досліджень частка впливу середовищних факторів у загальній типовій мінливості пивоварних властивостей ячменю становить близько 70-80%, хоча роль генотипу так само значна до 20-25% [106]. Середнє щорічне число дощових днів негативно корелює з активністю β -амілази в популяції *H. spontaneum*. При вивченні географічного розподілу алелів *Bmy1* Chalmers та ін. (1992) показали, що індивідуальний фенотип, виявлений у популяції *H.*

spontaneum, пов'язаний з більш посушливими регіонами Ізраїлю. Експерименти в камері для вирощування підтверджують, що випробування посухою в період середнього заповнення зерна вело до істотного збільшення активності β -амілази [97]. McNicol та ін. (1993) вивчали зміни активності β -амілази в контрольованих умовах і виявили, що висока вологість в середині стадії наливу зерна підвищує накопичення β -амілази, в той час як тепловий стрес давав незначний ефект [107]. Пізніші дослідження Piasecka-Kwiatkowska та ін. (2007) показали, що такий кліматичний фактор як середньорічна кількість опадів, корелює з амілолітичною активністю в зерні злаків [78].

На експресію генів β -амілази в процесі розвитку зерна впливає вміст азоту [108], таким чином високі рівні β -амілази співвідносяться зі збільшеним вмістом білка в зерні [100]. Щоб підвищити активність β -амілази на 10 одиниць в польових умовах, було потрібно на 11 кг більше азотних добрив [109]. Проте, відбір культурних сортів з високим рівнем β -амілази, незалежним від вмісту білка, є важливим параметром в селекції пивоварних ячменів.

Застосування препаратів регуляторної дії при пророщуванні зерна ячменю також дозволяє інтенсифікувати процес солододорощення, підвищити термостабільність амілаз солоду та отримати лабораторний солод з більш високою (на 30-70%) амілолітичною активністю, ніж у необроблених зразках [110].

Чапля (2006) отримав дані, які вказують на те, що відмінності в амілолітичній активності солоду знаходяться в залежності від алельного стану локусу *ВМУ1*. З ізоензимом *ВМУ1Br* в порівнянні з *ВМУ1Ar*, пов'язаний більш високий рівень амілазної активності. Таким чином *ВМУ1Br* обумовлює формування зерна з кращими солодовими якостями [111].

1.4.2. Термостабільність β -амілази. Підвищення температури навколишнього середовища в період проростання зерна до оптимальної (10 -

24 °C) збільшує активність β -амілази, однак більш високі температури, необхідні при виробництві солоду, призводять до швидкої деградації ферменту, з подальшим незворотним спадом його активності. У більшості гідролаз температура, при якій вони активні, варіює від 37 °C до 60 °C. Високі температури (більше 70 °C) зазвичай чинять негативний вплив на ферменти [112].

Активність β -амілази залишається максимальною при температурі до 55 °C, але її стабільність швидко зменшується, якщо температуру збільшити. Сусло готується при температурі приблизно від 48 °C до 70 °C. Такі температурні показники потрібні для гелеутворення крохмалю, яке необхідно для швидкої і повної його деградації. Щоб збільшити виробництво здатного до бродіння цукру, β -амілаза повинна зберігати активність при високих температурах. Таким чином, потрібно поліпшити пивоварний ячмінь щодо термостабільності β -амілази, яка є спадковою характеристикою [113, 114, 115].

За даними ізоелектричного фокусування виділено три типи термотолерантних β -амілаз: *BmyI*-Sd2 - з низькою стабільністю ферменту, *BmyI*-Sd1 - термостабільна форма і *BmyI*-Sd3 - високотермостабільний тип β -амілази. Sd-2 тип розділений на два підтипи: *BmyI*-Sd2L (low) і *BmyI*-Sd2H (high) - з меншою і більшою термостабільністю відповідно [113, 114, 116, 117, 118].

У дослідженнях Eglinton та ін. (1998) дикорослий ячмінь мав вище значення T_{50} – 60,8 °C [59]. Kihara та ін. (1998; 1999) вивчили декілька зразків культурних ячменів з Японії, Європи, Північної Америки та Австралії і виявили географічне варіювання цієї величини. Більшість сортів зі Східної Азії мали високу термостабільність, в той час як більшість сортів із західних регіонів мали середні або низькі значення термостабільності [113, 114]. Протягом процесу проростання насіння ділянка С-кінця ланцюга β -амілази частково розпадається, в результаті чого утворюється кілька ізоформ і, особливо, розпадаються S-S зв'язки між С-кінцем ланцюга і ядром ферменту,

що впливає на термостабільність [119]. Видалення ділянки С-кінця ланцюга β -амілази є причиною втрати термостабільності, але функція ферменту залишається тією ж [120].

β -амілазну термостабільність можуть підвищувати також амінокислотні заміни [116, 121, 122]. Дві заміни амінокислот - Val-233-Ala і Leu-347-Ser, як передбачається, є причиною збільшення термостабільності. Обидві заміни амінокислот знаходяться в доступних для розчинника ділянках білка і тому Leu-347-Ser зменшує поверхневу гідрофобність і стабілізує структуру [116]. Cys у положенні 95 важлива для підтримки стійкості β -амілази до високих температур, тому що при зв'язуванні з субстратом S-S зв'язки роблять цю структуру більш стійкою.

Термостабільність β -амілази також може бути збільшена, якщо використовувати трансгенну стратегію. Kihara та ін. (2000) отримано фертильний трансгенний ячмінь, що синтезує термостійку β -амілазу (T_{50} – 69,0 °C) [122].

1.4.3. Молекулярна організація генів β -амілази ячменю. Особливості будови гена *Bmy1*. Ендоспермальна β -амілаза ячменю кодується геном *Bmy1*, який знаходиться на довгому плечі хромосоми 4Н, загальний фермент кодується геном *Bmy2*, локалізованим на короткому плечі хромосоми 2Н [77]. Гени *Bmy1* та *Bmy2* ячменю складаються з 7 екзонів і 6 інтронів кожний.

Нуклеотидна послідовність гена *Bmy1* ячменю складається з 5196 п.н. [84]. Відкрита рамка зчитування кодує 535 амінокислот, що відповідають молекулярній масі 59 610 а.о.м. [123].

Дані про регуляцію генів рослинних β -амілази складні і часом суперечливі. Kreis та ін. (1987) зазначили, що накопичення β -амілази головним чином залежить від кількості її мРНК. Крім того, вони помітили, що різна кількість β -амілазної мРНК у генотипів ячменю може бути наслідком впливу на транскрипцію або на стабільність мРНК або на те й інше

[123]. Rorat та ін. (1994) у своєму дослідженні стверджують, що експресія ендоспермальної β -амілази жита від 30 до 40 разів вище, ніж загальної β -амілази [69]. Судячи з літератури, на накопичення транскриптів можуть впливати різні чинники: світло, цукри, температура, відкладання крохмалю в тканинах [124, 125, 126]. Erkkila та ін. [127] припустили, що 126 п.н. MITE-вставка інтрона 3 гена *Bmy1* може виступати в ролі цис-діючого елемента, який може інгібувати транскрипцію (мініатюрні мобільні елементи з термінальними інвертованими повторами (MITE) - клас мобільних елементів, які можуть взаємодіяти з регуляторними послідовностями [43, 44, 45]); Sjakste і Zhuk [128] виявили велику кількість передбачуваних сайтів зв'язування транскрипційних факторів в інтроні 3 гена *Bmy1*. Також є літературні дані про те, що ретроелементи можуть направляти транскрипцію сусідніх унікальних послідовностей ДНК [129, 130].

Для ідентифікації молекулярних механізмів, що лежать в основі збільшення активності β -амілази в зерні лінії 86-N2-64 (потомства від зворотного схрещування *H. spontaneum* PI 296897 і сорта Adorra), були виділені і секвензовані гени *Bmy1* і транскрипти лінії 86-N2-64 і її батьків. Всі три гени *Bmy1* були ампліфіковані за допомогою ПЛР з геномної ДНК, використовуючи праймери, засновані на послідовності гена *Bmy1* сорта Naruna Nijo [127]. Окремі *Bmy1* продукти ампліфікації були отримані від кожної з трьох форм ячменю та визначено їх послідовності. Всі чотири послідовності *Bmy1* були приблизно 5 т.п.н. в довжину, включаючи ВРЗ, перервану шістьма інтронами (рис. 1.1). Послідовності генів *Bmy1* лінії 86-N2-64 та *H. spontaneum* PI 296897 виявилися повністю ідентичними. Алель *Bmy1* *H. spontaneum* PI 296897 показав високу гомологію з алелем *Bmy1* сорта Naruna Nijo.

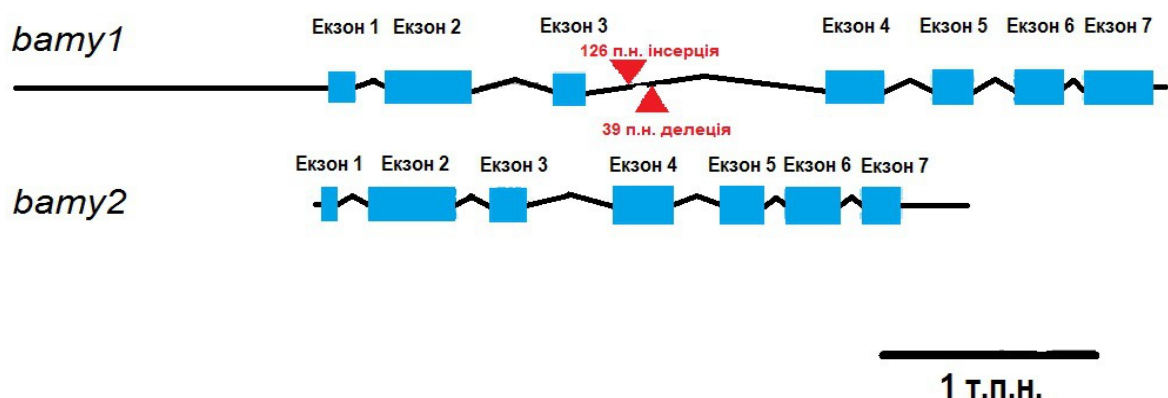


Рис. 1.2. 126 п. н. інсерція гена *Bmy1*, що формує петлю [121]

Молекулярний механізм, яким 126 або 39 п. н. послідовності інтрона 3 могли б впливати на експресію гена *Bmy1*, може тільки передбачатися. Елементи 126 п. н. послідовності можуть бути пов'язані з факторами, які модулюють ефективність транскрипції гена *Bmy1*, або можуть впливати на посттранскрипційні явища, такі як сплайсинг і стабілізація мРНК [120, 131, 132, 133]. Ahlandsberg та ін. (2002) припускають, що цей MITE-елемент інтрону бере участь в експресії гена ендоспермальної β -амілази в якості негативного фактора транскрипції неекспресуємих ділянок [134].

Види злаків найбільш схожі один з одним, у порівнянні з рослинами з інших родин [135] і, як наслідок, очікується висока ступінь подібності в структурі і послідовності ортологічних генів злаків, таких, наприклад, як гени β -амілаз. Дослідження показали, що екзон-інтронна структура в значній мірі зберігається між гомологічними генами різних видів [136]. Для видів з обмеженою наявністю поліморфних ПЛР-маркерів, послідовності з баз даних можуть легко і успішно використовуватися для створення ДНК-маркерів [3].

1.5. Дослідження поліморфізму генів β -амілази за допомогою молекулярних маркерів

Для селекції рослин особливо перспективним є використання молекулярних маркерів при створенні нових сортів. Вони надають можливість контролю введених в геном ячменю нових генів. Відбір рослин, що мають відповідний маркер, забезпечує тим самим і відбір за принципом присутності потрібного гена. Ідентифікація сортів ячменю довгий час базувалася на морфологічних особливостях рослин, а також додаткових ізоензимних і гордеїнових тестах. Пізніше багатообіцяючим методом дослідження сортів ячменю стали ДНК-маркери [4, 9]. Діагностичний ДНК-маркер мітить ген(и) основних ознак, так що немає необхідності у виконанні

непрямих і часовитратних польових тестів. Таким чином, замість відбору за ознакою селекціонер відбирає за ДНК-маркером [4].

На сьогоднішній день відомо точне розташування значної кількості генів, що пов'язані з агрономічними ознаками ячменю. Умовою для використання MAS є знання генетичної детермінації ознаки, локалізації відповідного гена або генів в хромосомі і доступність відповідного маркера [1].

Нуклеотидні вставки, делеції, а також нуклеотидні заміни визначають різноманітність алелів більшості генів [137]. За результатами секвенування послідовності ДНК виявлено, що головні відмінності у будові гена *Bmy1* ячменю знаходилися у межах третього інтрона [120].

Інтрон 3-специфічна ділянка гена *Bmy1*, що кодує ендоспермальну β -амілазу, може використовуватися як якісний маркер при ПЛР, для виявлення трьох β -амілазних алелів за допомогою специфічних праймерів [127]. Грунтуючись на відомих пивоварних якостях і опублікованих даних про діастатичну силу сортів ячменю [127], можна стверджувати, що у сортів з хорошими солодовими якостями був присутній алель гена *Bmy1* сорту Naruna Nijo (ПЛР-фрагмент розміром 516 п.н. - відсутня 126 п.н. інсерція), тоді як сорти ячменю з низькими солодовими якостями несли алель сорту Adorra (ПЛР-фрагмент довжиною 643 п.н. - присутня 126 п.н. інсерція). Алель гена *Bmy1* *H. spontaneum* (ПЛР-фрагмент розміром 477 п.н. – відсутня 126 п.н. інсерція і присутня 39 п.н. делеція) серед сортів культурного ячменю не виявлено.

Kaneko та ін. (2000, 2001), використовуючи гетерологічну експресію і QTL-аналіз, показали, що локус *bamyl* контролює також термостабільність β -амілази. Використовуючи популяцію Naruna Nijo / WI 2875 DHL, автори показали повну відповідність ПЛР-маркера з ПДРФ-зразками з відомою термостабільністю і планували використовувати інтрон 3 ПЛР-маркер як інструмент добору в селекційних програмах поліпшення пивоварних якостей ячменю [132, 138]. У світлі цього дослідження Gunkel та ін. (2002) зв'язали

відмінності в інтроні 3 *bamyl* з β -амілазною термостабільністю. Вони показали, що сорти ячменю з нетермостабільною β -амілазою містили 126 п.н. MITE-вставку в інтроні 3 гена *bamyl*, в той час як термостабільні β -амілази її не мали. Результатом низької термостабільності β -амілази є знижена концентрація мальтози в суслі, що також взаємопов'язано з низьким AAL (apparent attenuation limit), що є мірою здатності дріжджів перетворювати цукрове сусло в спирт [139]. Coventry та ін. (2003) зв'язали наявність 126 п.н. інсерції з низькими показниками діастатичної сили, активності та термостабільності β -амілази. Автори використовували інтрон 3 ПЛР-маркер для визначення присутності / відсутності 126 п.н. вставки в локусі *bamyl* і прийшли до висновку, що вони ефективні для скринінгу на β -амілазну термостабільність, активність і ДС [140].

Наразі величезні масиви інформації щодо нуклеотидних послідовностей генів доступні в базах даних за результатами секвенування геномів різних культур. Наявну геномну інформацію можна використовувати для ідентифікації і виділення нових і якісних алелів агрономічно важливих генів при створенні поліпшених сортів рослин. Виявлення алелів генів є перспективним підходом до аналізування природних алельних варіацій генів-кандидатів, контролюючих ключові агрономічні ознаки, які можуть застосовуватися в селекційних програмах, а також дозволяє простежити еволюцію алелів, виявити нові гаплотиipi і створювати алель-специфічні маркери для використання в MAS [141].

Гени β -амілази мало вивчені як філогенетичні маркери, хоча в деяких статтях обговорювалися більш широкомасштабні відносини між послідовностями β -амілаз трав (наприклад, у Wang та ін., 1997). З філогенетичної дендрограми послідовності білка β -амілази різних видів злаків [86] виведена одна з гіпотез еволюційного взаємозв'язку між послідовностями β -амілази *Poaceae*, яка передбачає, що послідовності загальної та ендоспермальної β -амілази утворюють окремі еволюційні родоводи. Друга гіпотеза полягає в тому, що дві β -амілазні форми *Triticeae*

виникли внаслідок більш пізньої дуплікації генів, за часом ближче до походження триби [78].

Одним з метододів дослідження ізоферментів є електрофоретичний розподіл екстрактів білків у поліакриламідному гелі з метою безпосереднього виявлення в гелі зон локалізації ферменту [6]. Аналіз сортів і селекційних форм ярого ячменю за ізоферментами β -амілази дозволив виділити три групи сортів, які мали один з електрофоретичних типів ферменту або суміш типів, у разі гетерогенності сорту за цією ознакою. Внутрішньовидова варіація за β -амілазою у ячменю обумовлена трьома ізоферментами ВМУ1, позначені як Ar, Br та Al, які визначають відповідні зимотики у сортів Aramir, Birka і Algerian [144, 145]. Повідомляється про зв'язок електрофоретичного варіанту білка з господарськими ознаками у ячменю. Солодові якості зразків, які несли ізоферменти ВМУ1Br значно вище, ніж у форм, що мають альтернативний β -амілазний фактор. Це стосується амілолітичної активності, білковості, пророщуємості та екстрактивності [140]. Враховуючи можливу реакцію генотипів, які мають різні ізоферменти ВМУ1, на зміну умов навколишнього середовища досліджували розподіл частот його варіантів територією східно-європейських та центрально-азіатських країн. Виявлено, що найбільша зустрічальність ізоферменту ВМУ1Ar ($\geq 50\%$) в яровій культурі характерна для районів, розташованих на півночі. При просуванні на південь частота ВМУ1Ar зменшується, а ВМУ1Br, відповідно збільшується. У південних регіонах, що відрізняються більш посушливим кліматом і підвищеним температурним режимом, поширені сорти, у яких ізоферменти ВМУ1Br зустрічаються значно частіше, ніж - ВМУ1Ar. З заходу на схід не виявляється видимих закономірностей в розподілі частот алелів фактора ВМУ1. Дані досліджень вказують, що частота поширення ізоферменту ВМУ1Ar негативно корелює з температурою навколишнього середовища і позитивно з вологозабезпеченістю регіону. Одночасно, частота альтернативного ізофермента ВМУ1Br позитивно корелює з температурою, але негативно з вологістю зони. Не виявлено істотного зв'язку між частотою

розповсюдження зазначених генетичних факторів і показником континентальності клімату. Отже, частота зустрічальності алелів локусу *ВМУ1* залежить у першу чергу від температурного чинника та від кількості опадів на даній території [145].

1.6. Зв'язок між β -амілазною активністю та алелями гена *Bmy1*

Для виявлення кореляції між алелем гена *Bmy1* *H. spontaneum* і високим рівнем активності β -амілази Erkkila та ін. (1998) досліджували популяцію з 15 індивідуальних ліній ВС-F6 від зворотного схрещування *H. spontaneum* PI 296897 і сорту Adorra, вирощених в ідентичних умовах. Два батьківських алеля *Bmy1*, що успадковані індивідуальними лініями ВС-F6, мали відмінності в ділянці інтрона 3. Використовуючи ПЛР-праймери для ампліфікації ділянки інтрона 3 *Bmy1* отримали продукти: 643 п.н. (ПЛР-фрагмент належав сорту Adorra) та 477 п.н. (ПЛР-фрагмент належав *H. spontaneum* PI 296897). Три нащадка успадкували алелі *H. spontaneum* PI 296897, решта 12 нащадків успадкували алель сорту Adorra. Загальну активність β -амілази в зерні визначали у 15 ліній ВС-F6 і у батьківських ліній. Відносна активність β -амілази 11 ліній ВС-F6 була нижчою або такою як у батьківського сорта Adorra. Активність β -амілази 4 ліній ВС-F6 була на 27-61% вище, ніж у сорту Adorra, але нижче, ніж у *H. spontaneum*.

Надалі порівняли результати, отримані при використанні інтрон 3-специфічних праймерів для скринінгу *Bmy1* алелів, з даними, отриманими при вимірюванні активності β -амілази. Зразки було згруповано згідно природі їх *Bmy1* локусів і активності ферментів. Показники активності ферменту в зерні сортів, які мали алель розміром 516 п.н., були в 1,3 рази вище, а у ліній, що несли алель розміром 477 п.н. - в 2,1 рази вище, ніж показники активності у групи з 643 п.н. алелем. Діапазон активності β -амілази в кожній групі алелів досить широкий, ймовірно тому, що активність залежить також від інших генетичних факторів. Незважаючи на абіотичні фактори, генетичний фон

активності β -амілази може збільшитися вдвічі, у порівнянні з активністю β -амілази сорта Adorra (643 п.н. ПЛР-фрагмент) [127, 131, 146, 147].

При порівнянні результатів, отриманих ПЛР-методом, з даними, отриманими за допомогою ізоелектричного фокусування (ІЕФ) білків [83], культурні сорти, що несуть алель неактивної β -амілази, відповідають Bmy1-Sd2 типу термостабільності, а культурні сорти, що несуть алель активної β -амілази, відповідають Bmy1-Sd1 типу. Було відмічено два винятки, можлива причина яких може полягати в тому, що ПЛР-метод досліджує інтрони, а ІЕФ вивчали ізоформи β -амілази [131].

1.7. Різновид дикорослого ячменю *Hordeum spontaneum* - джерело поліпшення агрономічно цінної ознаки

Результати дослідження розподілу *Bmy1* алелів в сучасних культурних сортах ячменю і в дикорослих видах *Hordeum* підтверджують, що генетична мінливість досить обмежена серед сучасних сортів. Більше 50% вивчених сортів мали 516 п.н. алелі, решта мала 643 п.н. алелі [131, 147].

Також досліджено дикорослий ячмінь, зібраний в різних середземноморських областях. Дикорослі види *Hordeum* з Кіпру, Корсики і *H. spontaneum* з областей Talpiyyot і Mehola в Ізраїлі несли алель *Bmy1* сорту Haruna Nijo, різновиди з області Negev (Ізраїль) мали алелі сорту Adorra. У формах з Atlit (Ізраїль) були виявлені обидва види алелів. Алель *H. spontaneum* PI 296897 був знайдений тільки у вихідної форми з Іудейських передгір'їв Ізраїлю [131].

Переважним методом отримання генетичної варіабільності залишається схрещування двох різних генотипів. Вихідним матеріалом для схрещування є ті батьківські форми, в потомстві яких можна чекати появи бажаних комбінацій генів. Якщо стоїть спеціальна мета, наприклад, перенесення будь-якої генетично зумовленої ознаки в продуктивний генотип, можна використовувати дикий споріднений підвид *H. vulgare* spp. *spontaneum* [60,

148]. Використання алелю гена *Bmy1 H. spontaneum* PI 296897, пов'язаного з високою активністю β -амілази в зерні, в програмах селекції сучасного ячменю може внести внесок у збільшення рівня активності β -амілази в зерні пивоварного ячменю [131].

Найбільш рання згадка дикорослого прародителя ячменю (*H. vulgare* ssp. *Spontaneum*, або *H. spontaneum*) як джерела генетичної мінливості, відноситься до 70-х років XX століття. Селекціонери ігнорували використання дикорослого ячменю в якості селекційного матеріалу, можливо через наступні причини: різниця у періодах цвітіння дикорослих і культурних форм, морфологічні невідповідності (колоски щільно притиснуті, колоскова луска щільно прилягає), обмежена доступність матеріалу з вихідних середовищ існування і т.п.

Вважається, що між величиною врожаю зернових злаків (ячменю, пшениці) з одного боку і якісними показниками зерна є негативна кореляція, але, тим не менш, існують роботи, що свідчать про можливість отримання форм ячменю з позитивним значенням двох ознак: і врожайності, і якості зерна [149].

Хімічний склад зерна дикорослого ячменю привернув увагу, коли було виявлено високий вміст білка в матеріалі з вихідних середовищ існування в Ізраїлі [150]. Вміст мінеральних елементів у зерні був головним чином вище в дикорослому ячмені, ніж в культурному [151]. Дикорослий ячмінь становить інтерес для селекції, так як він є багатим джерелом генетичної мінливості, генів адаптивності та якості зерна, втрачених в процесі окультурення і селекції.

Існує невелика кількість публікацій про передачу генів, відповідних за якість зерна, від дикорослого ячменю до культурних похідних, в той час як програми схрещувань для передачі генів стійкості до хвороб у культурного ячменю існують давно. Zhang et al. (2004) вивчали мінливість β -амілази в різновидах дикорослого ячменю. Мета даного дослідження полягала в оцінці генетичної мінливості β -амілази дикорослого ячменю за допомогою аналізу

термостабільності, а також методом ізоелектричного фокусування. Досліджено 19 видів дикорослого ячменю (27 таксонів, 337 різновидів), включаючи 174 різновиди *H. spontaneum*, а також *H. bulbosum*, *H. murinum*, *H. marinum*, *H. brachyantherum*, *H. jubatum* і *H. chilense* [152].

Аналіз термостабільності проводився таким чином. Активності термічно оброблених і не оброблених зразків вимірювали, використовуючи BETAMYL Kit (Megazyme, Ірландія) та приймали їх як активність з термообробкою / активність без термообробки [113]. Сорти культурного ячменю Haruna Nijo, Harrington і Schooner були встановлені як контрольні варіанти типів А, В і С, відповідно. З 174 різновидів *H. spontaneum*, 173 були класифіковані в А, В або С типи термостабільності, за винятком одного різновиду з Іраку, який показав проміжний тип між А і В. Частота розподілу типів термостабільності у *H. spontaneum* була подібна до такої у культурних ячменів - це А, В і С типи. У *H. spontaneum* (53%) переважав тип А. β -амілази 18 видів *Hordeum* показали більш широку мінливість, ніж *H. spontaneum*. Крім трьох типів термостабільності (А, В і С), знайдених в культурному ячмені, часто спостерігалися додаткові типи, такі як А+, АВ, ВС і С-. З 26 таксонів 13 містили тип В, і тільки *H. bulbosum* показав ті ж типи термостабільності (А, В і С), що і *H. spontaneum*. Тип А не спостерігався у жодного дикорослого виду, крім *H. bulbosum* і *H. spontaneum*. Різновиди *H. arizonicum*, *H. brachyantherum* ssp. *brachyantherum* (4x), *H. brachyantherum* ssp. *californicum*, *H. depressum* і *H. jubatum* показали вищі значення термостабільності (тип А+). β -амілазна активність *H. arizonicum* при 60 °С була 23%, набагато вище ніж у Haruna Nijo - контрольного варіанту типу А, активність якого становила 11%. При ІЕФ-аналізі показано, що ІЕФ-зразки *H. spontaneum* були дуже схожі із зразками культурного ячменю. У *H. spontaneum* були виявлені всі шість основних β -амілазних фенотипів – А-I, А-II, В-I, В-Ia, В-II і С-II [152].

З наведеного вище огляду літературних даних можна зробити висновок: дослідження злаків за генами β -амілази становлять великий інтерес в даний

час, щоб зрозуміти процеси, контролюючі зростання і обмін речовин в рослинах. Видається за необхідне створення нових праймерів з можливістю більш широкого аналізу, що включає інші види сімейства злаків, заповнення наявних прогалин у знанні послідовностей генів *Bmy* у видів злаків, для яких ще не проводилося геномного секвенування, а також для філогенетичних досліджень, що також може доповнити дані в цій галузі. Автор дисертації вважає, що вивчення алельного поліморфізму гена *Bmy1* у ярих та озимих сортів ячменю, районуваних в Україні, а також у деяких дикорослих різновидів роду *Hordeum*, становить інтерес у зв'язку із визначенням у них алельного стану генів β -амілази, що може бути важливим при поліпшенні якісних показників зерна. Використання методу MAS дає можливість класифікації сортів ячменю за ознакою активності β -амілази; підвищення пивоварних якостей ячменю за рахунок створення нових алельних комбінацій гена *Bmy1*, які збільшать активність і термостабільність ферменту; зменшення витрат часу і коштів, необхідних на проведення селекційних дослідів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Робота виконана у відділі загальної та молекулярної генетики Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства і сортовивчення (до 30.09.2014 р. – відділ геноміки і біотехнології; до 01.04.2012 р. – відділ молекулярної генетики Південного біотехнологічного центру в рослинництві); частина роботи, зв'язана з сиквенуванням та аналізом експресії виконана спільно з доцентом Гельсінського університету, науковим співробітником Інституту біотехнології (Гельсінкі, Фінляндія), кандидатом біологічних наук Календарем Р.М.

2.1. Генетичний матеріал

Матеріалом для дослідження слугували:

- 1) для визначення послідовностей генів *Bmy* - 21 вид родини *Poaceae* (*Aegilops peregrine*, *Elymus repens*, *Dasypyrum villosum*, *Phleum pretense*, *Deschampsia antarctica*, *Spartina alterniflora*, *Bromus sterilis*, *Catabrosa aquatic*, *Paracolpodium tzvelevii*, *Milium vernal*, *Colpodium versicolor*, *C. drakensbergense*, *Catabrosella araratica*, *Zingeria biebersteiniana*, *Z. Kochii*, *Z. biebersteiniana* subsp. *Trichopoda*, *Zea mays*, *Brachypodium distachyon*, *Milium effusum*, *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*, *Aegilops speltoides*), які отримані з MTT Agrifood Research Finland (Фінляндія);
- 2) для аналізу відносної інтенсивності транскрипції *Bmy1* та *Bmy2* - 8 сортів ячменю (Kymppi, Rolfi, Ansis, Adele, Kristap, CI9819, Hinalaja, Bomi), отримані з MTT Agrifood Research Finland (Фінляндія). Для аналізу використовували рослини на різних стадіях розвитку: калус, дводенне коріння, дводенний паросток, колос, листя;
- 3) для дослідження міжвидового поліморфізму *Bmy1* та *Bmy2*:
- 37 видів родини *Poaceae* (4 сорти *Hordeum vulgare* (Джау Кабутак, Палідум 107, Одеський 17, Одеський 31), *H. spontaneum*, *H. murinum*, *H. marinum*,

H. brachyantherum, *H. leporinum*, *Triticum durum*, *Aegilops speltoides*, *Agropyron cristatum*, *Amblyopyrum muticum*, *Comopyrum comosum*, *Crithodium monococcum*, *Crithopsis delileana*, *Dasypyrum villosum*, *Eremopyrum distans*, *Henrardia persica*, *Heteranthelium piliferum*, *Lophopyrum elongatum*, *Peridictyon sanctum*, *Pseudoroegneria spicata*, *Secale strictum*, *Taeniatherum caput-medusae*, *Thinopyrum bessarabicum*, *Psathyrostachys fragillis*, *fragilis*, *Psathyrostachys fragillis*, *villosus*, *Festucopsis serpentini*, *Elymus repens*, *Phleum pretense*, *Zingeria biebersteiniana*, *Colpodium versicolor*, *Spartina alterniflora*, *Bromus sterilis*, *Avena sativa*, *Brachypodium distachyon*, отримані з Ботанічного інституту ім. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург, РФ);

- 25 сортів ярого тритикале (x *Triticosecale* Witt.) (Arc en ciel, Cume, Curtido, Trimour, Sierra villuercas, Tentudia, Sierra de almaraz, Sierra de arroyo, Sierra de lobos, Camarma, Senatrit, Fronteira, Alter, Matejko, Legalo, Dublet, Wanad, Gabo Niobi, Vrodi, Thisbi, Vrito, Noe (Італія), Somtri, Logo), отримані з Gene Bank of the Slovak Republic (Словаччина);

- 36 сортів озимого тритикале (Sorento, Leontino, Pizarro, Algosio, Alekto, Trismart, NE422T, UCRTCL1-2001, UCRTCL3-2001, UCRTCL2-2001, Terrelland 22, Nutri Seeds I-18, Plains, Greneder, Mungis, Trimmer, Trizeps, Amarillo 105, Massimo, Cosinus, Aprim, Bienvenu, Constant, Wilfried, Tribeca, Innoval, Magistral, Noe (Франція), Dusi, Tatra, Blenio), отримані з Gene Bank of the Slovak Republic (Словаччина);

- 5 сортів жита (*Secale cereale* L.) (Riihi, Akusti, Iissavaara, Loppi, Hirvessalmi) отримані з MTT Agrifood Research Finland (Фінляндія);

- насіння з популяцій *Aegilops speltoides* syn. *Sitopsis speltoides* (Tausch) Á.Löve (Kishon) та *Triticum turgidum* subsp. *Dicoccoides* (Mt. Hermon, Yehudiyya), отримані з The Institute of Evolution (Хайфа, Ізраїль);

4) для геногеографічного дослідження - 249 сортів ярого ячменю - колекція, зібрана Поморцевим А.А. (Інститут загальної генетики РАН, Москва, РФ);

5) для дослідження внутрішньо-видового поліморфізму гену *Bmy1* ячменю - 106 сортів ярого ячменю, 24 сорти озимого ячменю та шість дикорослих

форм ячменю різного походження, отримані з СГІ-НЦНС та Інституту рослинництва ім. Юр'єва, Україна.

2.2. Виділення ДНК

ДНК виділяли цетавлоновим методом (за допомогою СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide) буфера) [153] з деякими модифікаціями:

1. Фрагмент паростка (частина листа або коріння) розміром 1 см в пробірці типу "Еппендорф" (1,5 мл) гомогенізували скляним товкачем з 0,5 мл лізуючого буфера (1,4 М NaCl, 0,02 М Na₃EDTA, 0,1 М трис-HCl pH 8,0, 2% СТАВ) з РНКазою А (10 мг / мл) до повної мацерації тканин.
2. Лізат інкубували на водяній бані 1 год. 30 хв, при 60 °С.
3. Проводили депротеїнізацію рівним об'ємом суміші хлороформ - ізоаміловий спирт (24:1), після чого зразки перемішували на вортексі до утворення білої емульсії.
4. Центрифугували протягом 5 хв в центрифугі "Eppendorf" при 14000 об / хв. Після центрифугування, не зачіпаючи інтерфази, водну фазу за допомогою дозатора переносили в нову пробірку.
5. Екстракцію ДНК проводили рівним об'ємом ізопропанолу, після чого центрифугували при 8000 об / хв. протягом 5 хв.
6. Надосадову рідину зливали, осад промивали 70% етанолом і осаджували при центрифугуванні протягом 5 хв при 8000 об / хв.
7. Спирт зливали, отримані зразки підсушували.
8. Отриманий осад розчиняли в 300 - 500 мкл розчину TE (0,01 М трис-HCl, pH 8,0, 1 mM Na₃EDTA).
9. Концентрацію ДНК вимірювали на флюориметрі ТКО 100 ("Hoeffer Scientific Instruments", США) в розчині 1 x TNE (0,1 М трис-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 1 mM Na₃EDTA) з 100 мкг / мл інтеркалюючого барвника Hoechst 33258.

2.3. Конструювання специфічних праймерів

Множинне вирівнювання послідовностей ДНК виконане за допомогою програми Multain [154]. Послідовності генів β -амілази отримані з бази даних NCBI. Конструювання специфічних (спрямованих) праймерів здійснювали за допомогою програми FastPCR [155]. ПЛР-праймери синтезовані в Eurofins MWG Operon. Очистку праймерів здійснювали за допомогою HPSF (High Purity Salt Free). Праймери розчиняли в 1xTE, pH 8.0. Концентрація робочого розчину становила 10 мкМ, який зберігався при - 20 °С.

В аналізі також використані STS-праймери, інформація про нуклеотидну послідовність яких отримана з літературних даних [147].

Інформація щодо використаних в роботі праймерів, їх нуклеотидна послідовність, положення праймерів на ділянці гена, довжину ПЛР-продукту і оптимальні умови відпалу ПЛР, міститься у таблицях 3.1 і 3.2.

2.4. Ампліфікація ДНК

Для ампліфікації коротких (до 2 тис. нукл.) фрагментів генів *Btu* використовували стандартний протокол для ПЛР з Taq-полімеразою. Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 25 нг ДНК, 1x PCR DreamTaq буфер з 1,5 мкМ $MgCl_2$, 0.2 мкМ dNTP, 0.3 мкМ кожного праймера та 1 одиницю DreamTaq (Fermentas, Thermo Scientific, Литва).

Розрахунок компонентів ПЛР реакції проводили за допомогою програми: <http://primerdigital.com/tools/ReactionMixture.html>.

Ампліфікацію проводили на термоциклері “Терцик” (ДНК-технология, РФ) при умовах: денатурація ДНК при 94 °С - 1,5 хв, гібридизація праймера при 60 °С - 40 сек, елонгація при 72 °С - 1 хв (заклучна елонгація - 10 хв). Проводили 35 циклів ампліфікації.

ПЛР для довгих (більше 2 тис. нукл.) фрагментів ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Німеччина) при умовах:

початкова денатурація 98 °С - 30 сек, наступні 30 циклів проводили двостадійну ПЛР: денатурація при 98 °С - 10 сек та гібридизація праймера і елонгація при 65 - 72 °С - 2 хв (заклучна елонгація при 72 °С - 5 хв). Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 25 нг ДНК, 1x Phire[®] буфер з 1.5 мкМ MgCl₂, 0.2 мкМ dNTP, 0.3 мкМ кожного праймера та 0.2 мкл Phire[®] Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Литва).

2.5. Клонування

Для клонування ПЛР продуктів, отриманих за допомогою ДНК-полімерази Phire[®], в Т / А плазмідний вектор (pCR[®] 2.1-TOPO[®], Invitrogene або pGEM-T, Promega), здійснювали їх обробку DreamTaq ДНК-полімеразою. Для цього в продукти ампліфікації, отримані за допомогою ДНК-полімерази Phire[®], додавали 2 одиниці DreamTaq ДНК-полімерази та 1 мкМ dATP. ПЛР проводили при 72 °С протягом 30 хв. Далі ПЛР-продукти очищали за допомогою QIAGEN набору QIAquick PCR Purification Kit.

Очищені ПЛР-продукти за допомогою набору QIAquick лігували з pCR[®] 2.1-TOPO[®] (Invitrogene, США) плазмідним вектором. Реакційна суміш об'ємом 6 мкл містила: 4 мкл ПЛР-продукту, 1 мкл 0,9% NaCl і 1 мкл TOPO[®] плазмідного вектора. Інкубацію проводили при кімнатній температурі протягом 30 хв.

Отриману плазмідну ДНК використовували для трансформації компетентних клітин *E. coli* штаму One Shot[®] DH5α™-T1 R (Invitrogene, США). Колонії трансформантів відбирали за допомогою синьо-білого теста).

1. У пробірку з компетентними клітинами One Shot[®] Chemically додавали 2 мкл розчину TOPO[®]. Обережно перемішували.
2. Інкубували на льоді протягом 30 хв.
3. Тепловий шок проводили при 42 °С - 30 сек і відразу переміщали зразки на лід.

4. Додавали 250 мкл SOC розчину (500 мл SOB (2% Бакто-триптон, 0.5% Бакто-дріжджовий екстракт, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂) и 10 мл 20 % глюкози).
5. Інкубували при постійному перемішуванні при 37 °С - 60 хв.
6. 100 мкл розчину клітин переносили на чашку з середовищем LB (10 г триптон, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl - до 1000 мл H₂O) і канаміцином та інкубували протягом ночі при 37 °С.

Наявність вставки перевіряли ампліфікацією з універсальними pUC праймерами M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') і M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Колонію білого кольору переносили в 1.5 мл пробірку з 200 мкл розчину LB з ампіциліном (100 мг/мл) та перемішували на вортексі.

Для проведення ампліфікації використовували стандартний протокол для ПЛР з DreamTaq полімеразою. Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 25 мкл містила: 3 мкл LB розчину з клітинами, 1х ПЛР DreamTaq буферу з 1,5 мкМ MgCl₂, 0.2 мкМ dNTP, 0.2 мкМ кожного праймера та 1 одиницю DreamTaq полімерази.

Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі Mastercycler Gradient: початкова денатурація при 95 °С - 5 хв і наступні 22 цикла: 95 °С -15 сек, гібридизація праймера при 62 °С – 30 сек, 72 °С - 2 хв, заключна елонгація при 72 °С - 5 хв. Електрофоретичний розподіл фрагментів проводили в 1.5% агарозному гелі (рис. 2.1).

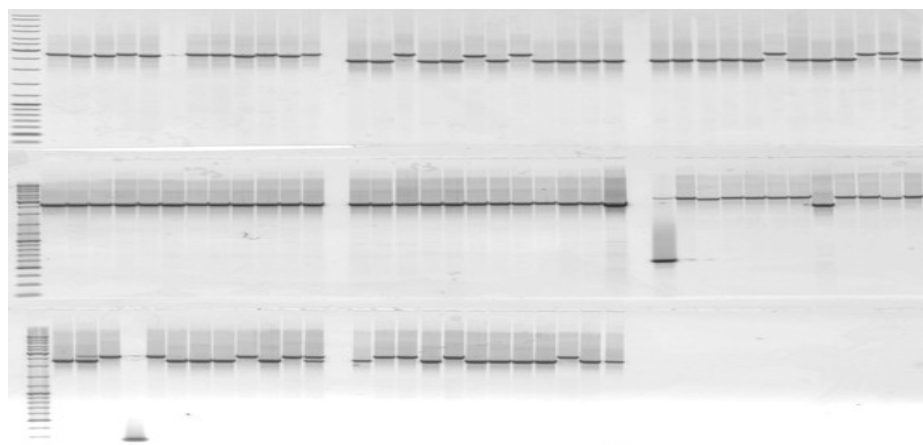


Рис. 2.1. ПЛР-аналіз 96-ти підготовлених до сиквенування колоній, перевірених на наявність вставки (праймери M13F та M13R)

2.6. Виділення плазмід

Для виділення плазмід вирощували нічні культури в розчині LB з ампіциліном або канаміцином: в 5 мл розчину LB додавали 20 мкл розчину з клітинами та інкубували в шейкері при 37 °C. Виділення та очистку плазмід проводили з використанням набору QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Нідерланди).

2.7. Сиквенування

Сиквенування вставок проводили в Інституті біотехнології (Гельсінкі, Фінляндія) з використанням капілярного сиквенатора ABI3700 (Applied Biosystems, США) методом Сенгера [156] з використанням набору реактивів (BigDye[®] Terminator chemistry): http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/dnagen/small_-scale.htm.

2.8. Електрофорез продуктів ампліфікації

Отримані продукти ампліфікації фракціонували методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі [157]. Електрофорез здійснювали протягом 5 год при напрузі 70 V в 1x TBE буфері (50 mM трис- H_3BO_3 , 2 mM Na_3EDTA , pH 8.0) в 1,5 % агарозному гелі з додаванням 10 мг / мл водного розчину інтеркалюючого барвника броміду етидію для візуалізації продуктів реакції ампліфікації. Гель фотографували в ультрафіолетовому світлі за допомогою цифрової камери.

Розміри ампліфікованих фрагментів визначали за допомогою маркера GeneRules DNA ladder mix (SM1173) (Thermo Scientific) та *pBlue Script/Msp I* (HyTest Ltd).

2.9. Обробка даних

Обробку даних проводили за допомогою комп'ютерних програм: для скринінгу бази даних нуклеотидних та амінокислотних послідовностей - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [158]; для вирівнювання нуклеотидних послідовностей – Multalin (http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html) [154], для вирівнювання амінокислотних послідовностей - COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) [159]; для дизайну олигонуклеотидних праймерів та підбору умов для ПЛР – FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>) [155]; для побудови філогенетичних дерев - MEGA 5.10 [160]. Наведені програми знаходяться в Інтернеті у вільному доступі.

Коефіцієнт кореляції - параметр, який характеризує ступінь лінійного взаємозв'язку між алелями гену *Bmy1* та ізоформами, розраховували за

формулою:

$$r_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D1%80%D1%80%D0%B5%D0%BB%D1%8F%D1%86%D0%B8%D1%8F)

[%D1%80%D1%80%D0%B5%D0%BB%D1%8F%D1%86%D0%B8%D1%8F](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D1%80%D1%80%D0%B5%D0%BB%D1%8F%D1%86%D0%B8%D1%8F))

2.10. Загальна схема досліджень

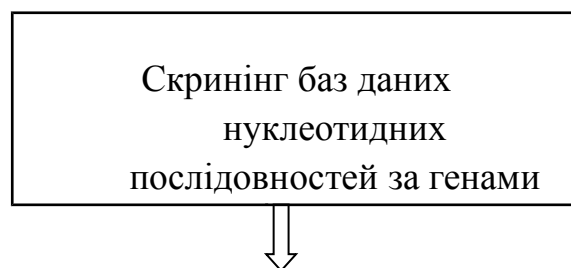




Рис. 2.2. Етапи дослідження

РОЗДІЛ 3

АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

ГЕНІВ *Bmy1* ТА *Bmy2*

3.1. Конструювання олігонуклеотидних праймерів для дослідження генів, що кодують β -амілазу злаків

Конструювання олігонуклеотидних праймерів для дослідження генів ендоспермальної та загальної β -амілаз злаків здійснювали на основі повних нуклеотидних послідовностей генів *Bmy1* (FJ161080) та *Bmy2* (DQ889983) ячменю, а також фрагментів генів і кДНК *Bmy1* та *Bmy2* ячменю, пшениці м'якої, жита, сорго та кукурудзи, які отримані з бази даних NCBI [155]. В цілому порівняли 45 нуклеотидних послідовностей відповідних генів: AB048949, AB306504, AF012343, AF061203, AF061204, AF300799, AF300800, AF414081, AF414082, AF470353, AJ301645, AK365629, AK375028, AY111979, AY454398, AY835429, AY835430, D21349, D49999, D63574, DQ889983, EF175466, EF175467, EF175468, EF175469, EF175470, EF175471, EF175472, EF175473, EU589327, EU589328, FJ161078, FJ161079, FJ161080, FJ936153, FN179393, FN179394, GU017481, NM_001112026, NM_001188314, X52321, X56785, X98504, XM_003562919, Z11772. Після проведеної процедури вирівнювання (з використанням програми Multain [154]) наявних у базах даних нуклеотидних послідовностей генів β -амілаз, виявилось, що екзони у злаків висококонсервативні, а основні відмінності в послідовностях зосереджені в інтронних ділянках. На підставі цих даних сконструйовані і синтезовані екзон-специфічні праймери, сайти для яких розташовані в ділянці гена, що представляла інтерес. Дизайн праймерів здійснювали з використанням програми FastPCR [155], яка дозволяє підібрати універсальні ПЛР-праймери до досліджених ділянок, а також прогнозувати ймовірні ПЛР-продукти (*in silico* PCR). В результаті обрано 10 специфічних праймерів для EPIC-PCR - екзон-праймованої ампліфікації інтронів *Bmy1* та *Bmy2* представників сімейства *Poaceae* з урахуванням родової і видової специфічності і внутрішньовидової консервативності. Прямі праймери підбирали до екзону 1 гена β -амілази ячменю, зворотні праймери підбирали для екзонів 4, 5 і 6. Результат пошуку компліментарних праймерам ділянок

ДНК у дослідженій послідовності *Bmy* наведений у додатку А. Інформація щодо використаних в роботі праймерів наведена в рис. 3.1 – схематичні положення праймерів на ділянці гена *Bmy1*, та в таблиці 3.1 - нуклеотидні послідовності, оптимальні умови відпалу, орієнтації праймерів.

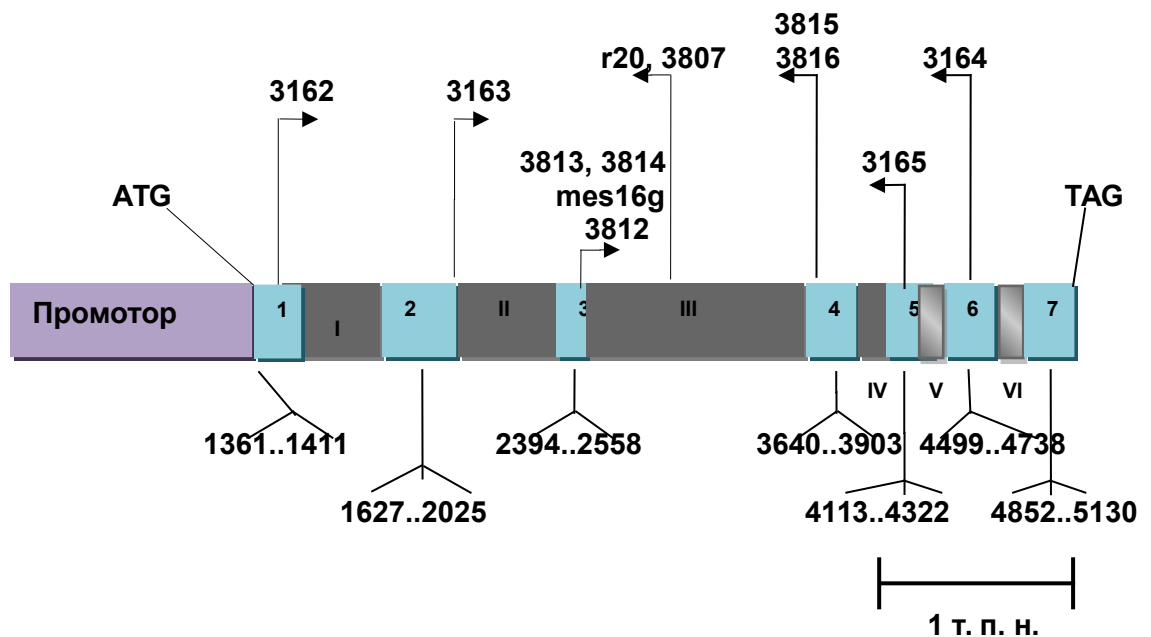


Рис. 3.1. Схема розташування праймерів в локусі *Bmy1*. Екзони представлені блакитним (1-7), інтрони - сірим (I-VI), промотор - фіолетовим кольорами. Початок трансляції та стоп-сайт відзначені як ATG і TAG. У нижній частині схеми вказані в п. н. межі екзонів. У верхній частині схеми - найменування використаних в роботі праймерів із зазначенням стрілкою їх орієнтації

Послідовності інтрон-специфічної пари праймерів (mes16g та r20), що використовувалися при аналізі алельного стану гена ендоспермальної β -амілази *Bmy1* ячменю опубліковані в роботі Erkkila та ін. (1998) [127]. Праймери mes16g і r20 використані нами у внутрішньовидовому аналізі

ячменю, є інтрон-специфічними і дозволяють ампліфікувати фрагменти в зразках, що містять ДНК тільки видів *Hordeum*.

Таблиця 3.1

Характеристика відібраних для роботи праймерів

Примітки: T_m - температура плавлення комплексу праймер-матриця

Назва	Послідовність	T_m	Місце відпалу праймерів	
			<i>Bmy1</i> (FJ161080)	<i>Bmy2</i> (DQ889983)
3162	tccaagtctacgtcatgctcc	56.4	1389→1409	54→74
3163	tgaagctgcaggccatcatgtc	60.2	1820→1841	433→454
3813	cattgaagtgggactggcccagc	62.9	2465→2488	861→884
3814	cagctggagagatgaggtaccc	58.9	2485→2506	881→902
3812	ttcccaggcatcggagaattca	58.3	2535→2556	931→952
3807	cgtttagacgtgagggaacc	55.7	3157←3176	-
3815	tccaggtacttatcatagcactgca	57.0	3635←3659	1361←1385
3816	gctgctgctgctttgaagtctgct	62.3	3660←3683	1386←1409
3165	tggaacctgtaccaccagtg	57.1	4125←4145	1850←1870
3164	cagccggaggtaggtgaatcc	59.8	4646←4666	2293←2313
mes16g	gatggtcgttcccaggcatc	57.7	2528→2546	-
r20	agggaaaccgcacgtgtgggggtcaatga	67.0	3138←3164	-

Межі екзонів гена *Bmy1*: 1 - 1361..1411 п.н., 2 - 1627..2025 п.н., 3 - 2394..2558 п.н., 4 - 3640..3903 п.н., 5 - 4113..4322 п.н., 6 - 4499..4738 п.н., 7 - 4852..5130 п.н. Межі екзонів гена *Bmy2*: 1 - 26..76 п.н., 2 - 240..638 п.н., 3 - 790..954 п.н., 4 - 1366..1629 п.н., 5 - 1838..2047 п.н., 6 - 2146..2385 п.н., 7 - 2471..2659 п.н.

ПЛР з використанням сконструйованих праймерів забезпечувала появу відповідних продуктів ампліфікації ділянки генів *Bmy1* та *Bmy2* досліджуваних представників сімейства *Roaseae* - інформація про це представлена в таблиці 3.2, в якій також розміщені дані по комбінаціях праймерів, що застосовуються в даній роботі.

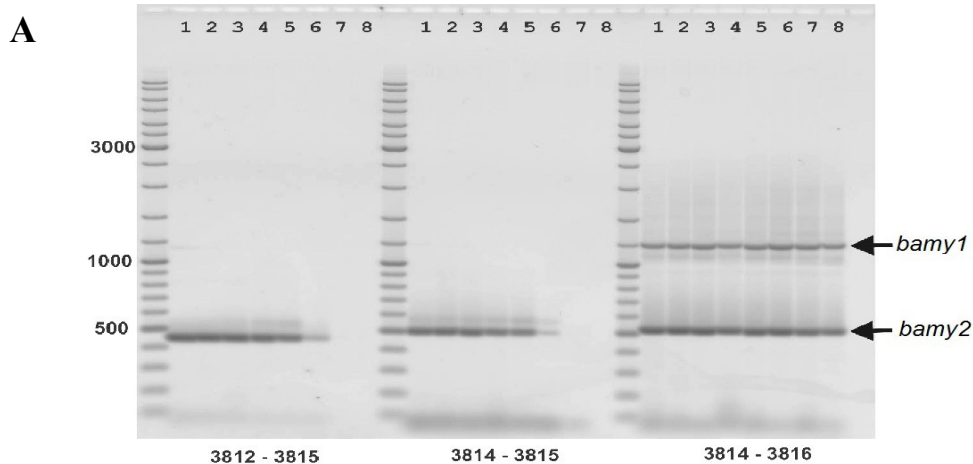
Таблиця 3.2.

Комбінації праймерів, відібрані для роботи

Пара праймерів	T _a (°C)	Розмір очікуваного ПЛР-продукту, п. н.	
		<i>Bmy1</i> (FJ161080) (з 126 п. н. MITE- вставкою в інтроні 3)	<i>Bmy2</i> (DQ889983)
mes16g - r20	60	637	-
3813 - 3807	60	713	-
3812 - 3815	62-64	1125	455
3814 - 3815	64-66	1175	505
3163 - 3816	68-72	1864	977
3162 - 3816	66-72	2295	1356
3163 - 3165	65-68	2326	1438
3162 - 3165	65-67	2757	1817
3162 - 3164	65-70	3278	2260

Примітки: T_a - оптимальна температура відпалу праймера

Для верифікації сконструйованих праймерів проводили ПЛР, при цьому підбирали умови, які дозволили б досягти максимальної чутливості і специфічності ампліфікації. Ефективність ампліфікації при різних температурах відпалу вивчали окремо для кожної пари праймерів в діапазоні від 60 до 72 °C. Як матрицю використовували ДНК сорту ячменю Палідум 107. Виявлено наявність цільових фрагментів відповідних розмірів, відповідних локусам *Bmy1* і *Bmy2*, у всіх випадках неспецифічних реакцій ампліфікації не встановлено. В результаті проведених експериментів визначена оптимальна температура відпалу праймерів (рис. 3.2).



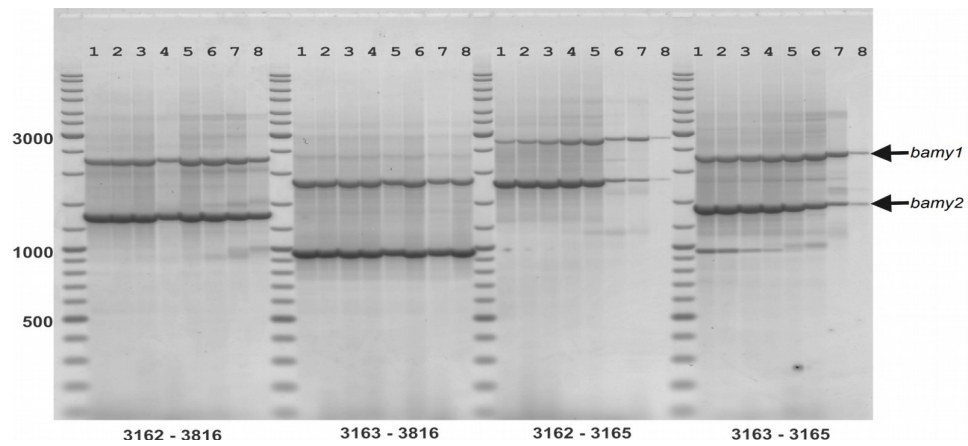
Б

Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації сорту ячменю Одеський 17 - скринінг на T_a градієнт (підбір оптимальної температури відпалу праймерів). Маркер молекулярної маси: 100 - 10 000 п.н. **А:** 3812 - 3815; 3814 - 3815; 3814 - 3816 - комбінації праймерів; 1 - 8 - температури відпалу праймерів: 1 – 61,8 °C, 2 – 63,2 °C, 3 – 64,4 °C, 4 – 65,7 °C, 5 – 67,2 °C, 6 – 68,6 °C, 7 – 69,8 °C, 8 – 71,5 °C. **Б:** 3162 - 3816; 3163 - 3816; 3162 - 3165; 3163 - 3165 - комбінації праймерів; 1 - 8 - температури відпалу праймерів: 1 – 61,6 °C, 2 – 62,7 °C, 3 – 64,1 °C, 4 – 65,7 °C, 5 – 67,4 °C, 6 – 69,1 °C, 7 – 70,6 °C, 8 – 71,8 °C

Застосування ряду екзон-специфічних праймерів, отриманих шляхом вирівнювання сиквенса генів β -амілази різних видів злаків, дозволило проводити аналіз зразків більш широкого таксономічного діапазону. В результаті застосування комбінацій отриманих праймерів (табл. 3.2) визначено послідовності генів β -амілази 21 виду родини злакових, проведено дослідження методом ПЛР 357 сортів, видів та різновидів рослин, що доповнило отримані раніше дані молекулярно-генетичних досліджень за генами *Bmy1* та *Bmy2*.

3.2. Визначення послідовності генів β -амілази окремих видів родини злакових

Одним з завдань дослідження було визначення нуклеотидних послідовностей генів β -амілази у окремих видів родини *Poaceae* і вивчення екзон-інтронних структур цих генів. Для вирішення даної задачі проведено клонування і сиквенування фрагментів послідовності ДНК *Bmy1* та *Bmy2*. Для максимального охоплення послідовності гена добрано праймери, фланкуючі крайні ділянки генів. Послідовності праймерів 3162, 3816, 3165 та 3164, використаних для сиквенування фрагментів генів *Bmy1* та *Bmy2*, їх температури відпалу і розміри очікуваних продуктів, представлені в таблицях 3.1 та 3.2. За допомогою даних праймерів отримані ПЛР-продукти, що містили фрагменти гена ендоспермальної та/або загальної β -амілази (в залежності від наявності або відсутності у дослідженого виду обох чи тільки однієї форми ферменту). У результаті розшифровані послідовності ДНК 21 виду рослин з сімейства *Poaceae* по дослідженим фрагментам генів β -амілази, для яких ще не проводилося геномне сиквенування. Нуклеотидні послідовності *Bmy1* та *Bmy2* визначені на ділянках з 1 по 4, 5 або 6 екзон. Отримані сиквенси включені в світову базу генетичних даних GenBank NCBI і доступні під номерами: HE565890 - HE565971 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>) [161]. Для фрагментів генів, визначених на ділянках з 1 по 5 і 6 екзони, також були отримані відповідні амінокислотні послідовності β -амілази. Отримані послідовності є базовим ресурсом геномних досліджень злаків та можуть бути використані при розробці специфічних праймерів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму за даними генами, при порівняльному картуванні геномів, а також для філогенетичних досліджень рослин (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Список видів злаків, послідовності яких сиквеновано

№	Вид	Положення сиквенованої ділянки між екзонами генів β-амілази		NCBI реєстраційний номер послідовностей	
		<i>Bmy1</i>	<i>Bmy2</i>	Нуклеотидних	Аміно- кислотних
1	2	3	4	5	6
1	<i>Aegilops peregrina</i>	1-6	-	HE565890, HE565891	-
2	<i>Elymus repens</i>	1-6	1-6	HE565893, HE565894	CCW36746
		1-5	1-5	HE565892	-
3	<i>Dasypyrum villosum</i>	1-5	1-5	HE565896, HE565897	CCW36747
4	<i>Phleum pratense</i>	-	1-6	HE565898, HE565899	CCW36748
5	<i>Deschampsia antarctica</i>	-	1-6	HE565900	CCW36749
			1-5	HE565901	CCW36750
6	<i>Spartina alterniflora</i>	-	1-6	HE565902, HE565903	CCW36751, CCW36752
7	<i>Bromus sterilis</i>	1-6	-	HE565904, HE565905	CCW36753, CCW36754
8	<i>Catabrosa aquatica</i>	-	1-6	HE565906, HE565907, HE565937, HE565938	CCW36755
9	<i>Paracolpodium tzvelevii</i>	-	1-6	HE565908, HE565909	CCW36756
10	<i>Milium vernale</i>	-	1-6	HE565910	CCW36757
11	<i>Brachypodium distachyon</i>	-	1-6	HE565940, HE565941	CCW36771
12	<i>Catabrosella araratica</i>	-	1-5	HE565912, HE565948, HE565949	CCW36759

Продовження табл. 3.3

1	2	3	4	5	6
13	<i>Colpodium versicolor</i>	-	1-4	HE565946	-
			1-5	HE565947	-
			1-6	HE565911	CCW36758
14	<i>Colpodium drakensbergense</i>	-	1-5	HE565913, HE565950	-
		-	1-6	HE565914, HE565915, HE565916	CCW36760

15	<i>Zingeria kochii</i>	-	1-6	HE565922, HE565924, HE565925, HE565926, HE565927, HE565928, HE565951, HE565953, HE565954, HE565955	CCW36762, CCW36763, CCW36764, CCW36765, CCW36766
			1-5	HE565923, HE565952	-
16	<i>Zingeria biebersteiniana</i>	-	1-6	HE565917, HE565918, HE565919, HE565920, HE565921	CCW36761
17	<i>Zingeria biebersteiniana</i> subsp. <i>trichopoda</i>	-	1-6	HE565929, HE565930, HE565931, HE565932, HE565933	CCW36767, CCW36768, CCW36769, CCW36770
18	<i>Zea mays</i>	-	1-5	HE565934	-
			1-6	HE565935, HE565936, HE565939	-
19	<i>Milium effusum</i>	-	1-5	HE565942, HE565945	-
			1-6	HE565943, HE565944	CCW36772, CCW36773
20	<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i>	1-4	-	HE565956, HE565957, HE565958, HE565959, HE565960, HE565969	-
		1-5	-	HE565961	-
21	<i>Aegilops speltoides</i>	1-4	-	HE565962, HE565963, HE565964, HE565965, HE565966, HE565967, HE565968, HE565970, HE565971	-

Далі, для проведення порівняльного аналізу отриманих нуклеотидних послідовностей генів β -амілази, проведено їх глобальне вирівнювання. До даного аналізу в якості зовнішньої групи додатково залучені нуклеотидні послідовності генів β -амілази, відібраних в базі даних генбанку: послідовності *Bmy2* видів *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor* (депоновані як: L10345, L10346, AF068119, D3JBK2_SORBI, EF175466, AJ301645, AB306504), генів *Bmy1* та *Bmy2* *Hordeum vulgare* (FJ161080, FJ936156, FJ936157, DQ889983), *Bmy1* *H. spontaneum* (AF061204), а також *Glycine max* (DQ015707), *Lotus japonicus* (AP006119), *Vitis vinifera* (AM479703) і *Solanum*

tuberosum (AC240290). Використані опубліковані нуклеотидні послідовності мали будову, подібну до визначених нами – також склалися з семи екзонів та шести інтронів. Вирівнювання здійснювали за допомогою програми Multain [154] окремо у групи видів, послідовності ДНК яких визначені на ділянці генів з 1 по 5 та 6 екзони (додаток Б, 1) і окремо у видів *Triticum dicoccoides* та *Aegilops speltoides*, послідовності генів *Bmy1* яких визначені з 1 по 4 екзон (додаток Б, 2).

При визначенні рівня міжвидової і внутрішньовидової варіабельності досліджених послідовностей β -амілаз показано, що ділянки, які відносяться до екзонів (у додатку Б виділені синім кольором) у злакових гомологічні на 97,3 – 99,9% (в залежності від ступеня таксономічної близькості), а відмінності в структурі екзонів ґрунтувалися на одонуклеотидних замінах. Їх довжина постійна, а основні відмінності в послідовностях генів β -амілаз знаходяться в інтронних областях. Довжини інтронів розрізнялися як між видами, так і у зразків, що належать одному виду, проте їх локалізація в гені постійна. Найменшу протяжність мали інтрони видів *Bromus sterilis* та *Deschampsia antarctica*, найбільшу – інтрони гена *Bmy1* *H. vulgare*. Характерна особливість гена *Bmy1* - незвично довгий третій інтрон (рис. 3.1 і додаток Б), розмір якого, проте, варіює у вивчаємих видів. Також з'ясувалося, що найбільш суттєві відмінності в нуклеотидних послідовностях досліджених ділянок генів знаходяться саме в третьому інтроні *bmy1*. Інтрони гена *bmy1* *A. speltoides* відрізняються найбільшою варіабельністю (додаток Б, 2). Можливо цей факт може свідчити про більш високу швидкість еволюції, характерну для даного виду. Порівняння екзон-інтронної організації генів ендоспермальної і загальної β -амілаз ячменю показало, що їх послідовності розрізняються довжиною інтронів, послідовності екзонів при цьому ідентичні. Можна припустити, що такий ступінь варіабельності інтронних ділянок генів β -амілази вказує на їх функціональну значущість в якості сигналів для регуляції транскрипції (можуть містити значущі для сплайсингу елементи, а також впливати на тканинну специфічність ферменту).

Таким чином, нами вперше визначені часткові послідовності генів *Bmy1* і *Bmy2* 21 виду злаків та охарактеризовано особливості їх екзон-інтронної організації.

3.3. Молекулярно-філогенетичний аналіз генів β -амілази

Використання молекулярних підходів при дослідженнях філогенетичних зв'язків дозволяє зіставляти далеко віддалені організми - виявляти гомологічні макромолекули, що морфологічними методами зробити неможливо. Кількість інформативних сайтів в нуклеотидних послідовностях, як правило, значно перевищує кількість ознак, що використовуються для морфологічного аналізу, а варіабельність нуклеотидних послідовностей дозволяє досліджувати спорідненість таксонів на всіх рівнях [22].

Визначені нуклеотидні послідовності генів β -амілази, а також послідовності відібрані в базі даних NCBI, використовували для порівняльного філогенетичного аналізу та побудови філогенетичних дерев (за допомогою програми MEGA 5.10 [160]), що відображали мінливість аналізованих генів (рис. 3.3, 3.4, 3.5 та додаток В). Оцінювали можливість застосування ядерних генів в якості маркерів для філогенетичних досліджень. З літературних джерел відомо, що для порівняльного аналізу філогенетичних можливостей ядерних генів на рівні таксонів високого рангу більше підходять екзони [162], а для дослідження таксономічних зв'язків на рівні роду та виду більш придатні інтрони - через більш високу швидкість накопичення мутацій в цих ділянках [163]. В якості потенційного філогенетичного маркера нами обрана ділянка генів β -амілази з 1 по 6 екзони без інтронів (для порівняння з більш віддаленими видами рослин, при цьому довжина вирівняних послідовностей складала 1280 п.н. (рис. 3.3)), та з 1 по 4 екзон, включно з інтронами (аналізували види, що належать до триби *Triticeae* і довжина вирівняних послідовностей складала 3050 п.н.). Для більш точного виявлення картини спорідненості філогенетичні дерева побудовані за допомогою різних

методів: максимальної правдоподібності (ML – Maximum Likelihood), незваженого парно-групового метода з арифметичним усередненням (UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages), найближчих сусідів (NJ - Neighbor Joining), мінімальної еволюції (ME - Minimum Evolution). Проведений нами філогенетичний аналіз злаків, заснований на порівнянні послідовностей генів *Bmy1* і *Bmy2*, які були визначені на ділянці з 1 по 6 екзони (додаток Б. 1), показав, що тип кластеризації зразків на всіх деревах (побудованих за результатами вирівнювання як екзонних послідовностей, включаючи інтрони (додаток Б, 1), так і виключно екзонів (Додаток Б. 3)) збігається і підтримується високими значеннями будстрепу. В якості основного приймали дерево, побудоване методом ML (рис. 3.3), дерева, побудовані іншими методами приведені у додатку В (рис. В1, В2, В3).

Отримана дендрограма (рис. 3.3) поділилася на два кластери. Найбільший з кластерів виявився розділеним на чотири субкластери – в перший, найбільший, увійшли послідовності гену загальної β -амілази *Bmy2* видів злаків та гену *Bmy1* виду *Dasypyrum villosum*, а також послідовності гену *Bmy2 Hordeum vulgare*. В проведеному молекулярно-філогенетичному дослідженні спостерігається безсумнівна близькість злаків *Colpodium* та *Zingeria* (дані види відмітні найменшим хромосомним набором ($2n = 4$) [164]. Для видів *Zingeria* характерний різний рівень плоїдності: *Z. biebersteiniana* - $2n = 4$, *Z. trichopoda* - $2n = 4x = 8$, *Z. kochii* - $2n = 6x = 12$. До них також долучився гексаплоїдний вид *Spartina alterniflora* – всі ці види належать до різних триб родини злаків.

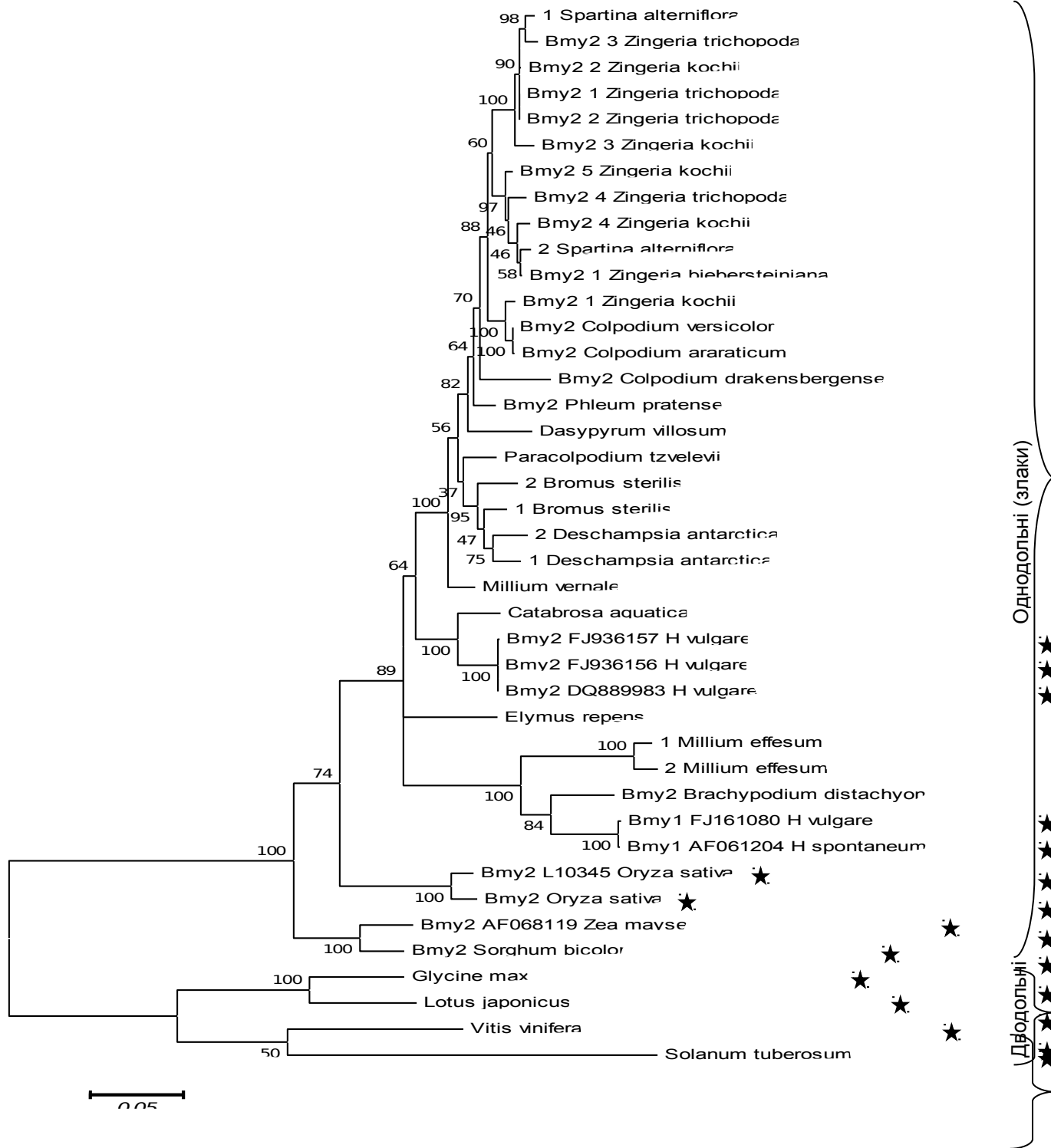


Рис. 3.3. Філогенетичне дерево, побудоване за результатами аналізу отриманих послідовностей екзонів 1 – 6 генів *Bmy1* та *Bmy2* видів рослин методом ML. Числа на схемі - бутстреп-індекс. Зірочками вказані види, сиквенси генів *Bmy1* та *Bmy2* яких отримані з бази даних NCBI

Цікавим видається положення видів *Bromus sterilis* і *Deschampsia antarctica*, які утворюють окрему кладу - у генів *Bmy* *Bromus sterilis* і

Deschampsia antarctica даних видів, за результатами вирівнювання досліджуваної вибірки, найкоротші послідовності інтронів. Максимально віддалений від інших в даному кластері *Bmy1 Elymus repens*.

Другий субкластер утворений *Brachypodium distachyon* (*Bmy2*), *H. vulgare* (*Bmy1*) та *H. spontaneum* (*Bmy1*) і їх найближчим сусідом на філогенетичному дереві, яким виявився *Milium effesum* (*Bmy2*) зі 100% рівнем bootstrap-підтримки.

Максимально диференційованими (84,3% гомології) від інших виявилися послідовності генів β-амілаз, використаних в якості зовнішньої групи - *Oryza sativa*, та *Zea mays* з *Sorghum bicolor* - ці види злаків складали два відокремлені субкластери. І, очікувано окремо, кластер з *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum* і *Glycine max* з *Lotus japonicus*.

Філограми, побудовані за результатами порівняльного аналізу ділянок з 1 по 4 екзони (включаючи інтрони) генів *Bmy1* та *Bmy2* представників триби *Triticeae*, отримані за допомогою методів NJ, ME та UPGMA (Додаток В, рис. В4 та В5). Порівняння сиквенованих нами послідовностей локусу *bamyl* у *Triticum dicoccoides* і *Aegilops speltoides* з послідовностями ДНК *H. vulgare* та *H. spontaneum* з бази даних NCBI показало, що дані послідовності майже повністю гомологічні в екзонних ділянках (99,3% – 99,9%) (додаток Б 2, 3). В якості основного приймали дерево, побудоване методом NJ (рис. 3.4), дерева ME і UPGMA в більшості деталей мали ідентичну топологію.

На даному дереві виявляється розбіжність 17 використаних в аналізі послідовностей в два кластери - перший утворили *Bmy1 T. dicoccoides*, *A. speltoides*, *H. vulgare* і *H. spontaneum*, а другий - послідовності *Bmy2 H. vulgare*. Таке групування генів ендоспермальної і загальної β-амілаз засноване тільки на поліморфізмі інтронних ділянок, так як екзони, за результатами вирівнювання, у досліджених ділянок генів мають високий ступень подібності. Аналіз денрограм свідчить про те, що в еволюційному плані нуклеотидна послідовність *Bmy2* ячменю більш схожа з генами *Bmy* інших видів злаків, ніж з власним геном *Bmy1*. Ці дані дозволяють

припустити, що гени, які кодують ендоспермальну і загальну β -амілази злаків є паралогічними.

У субкластері, сформованому зразками *T. Dicoccoides* (AABB) і *A. speltoides* (BB), спостерігається відділення послідовностей b11 і d11 *T. dicoccoides* в окрему гілку - імовірно це гени *Bmy1*, що належать геному AA двузернянки, а більша гілка даного субкластеру складена з послідовностей *T. dicoccoides* з геному BB разом з *A. speltoides*.

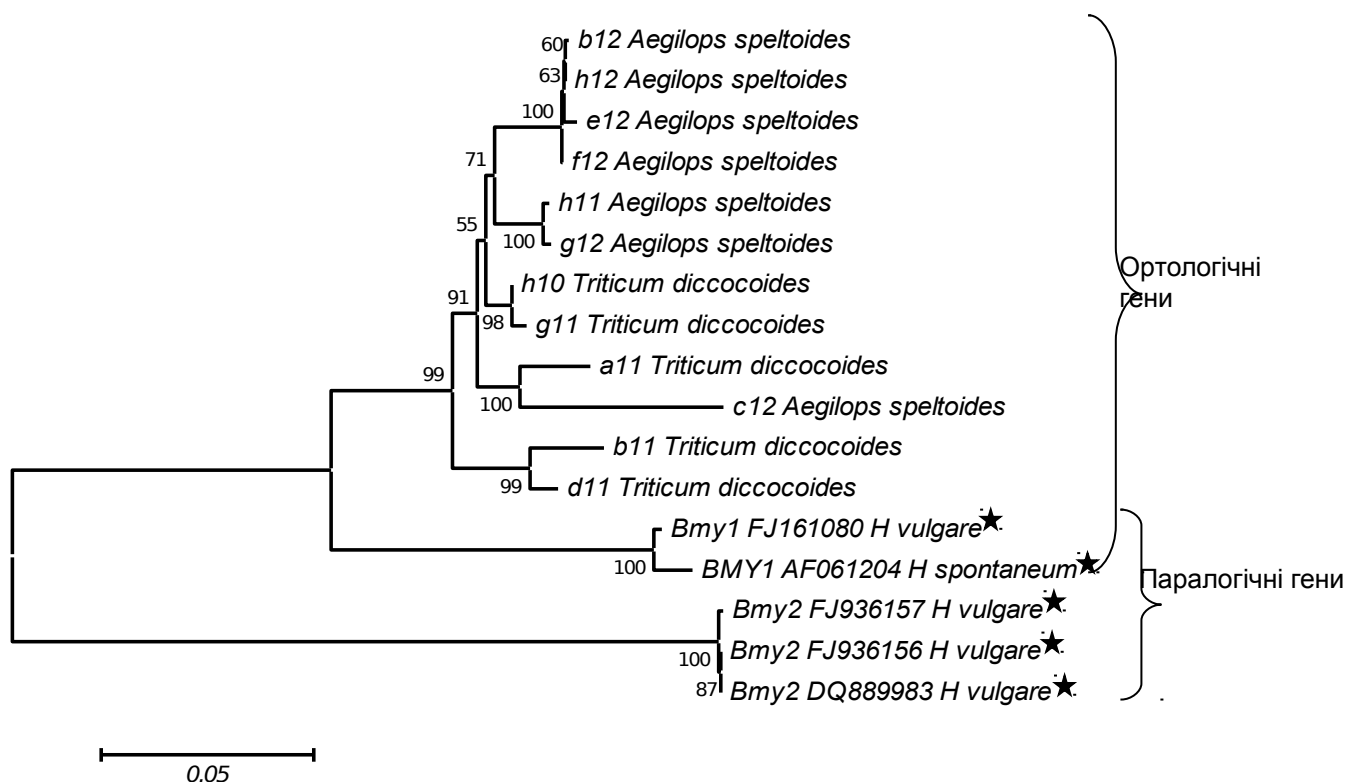


Рис. 3.4. Філогенетичне дерево, побудоване за результатами аналізу ділянок з 1 по 4 екзони, включно з ітронами, генів *Bmy1* та *Bmy2* видів злаків методом NJ. Числа на схемі - бутстреп-індекс. Зірочками вказані види, сиквенси генів яких отримані з бази даних NCBI

Для вивчення філогенії β -амілаз віддалених видів з різних класів використані 22 отримані нами амінокислотні послідовності, і також 30 відомих амінокислотних послідовностей з бази даних NCBI (реєстраційні

номери вказані у рис. 3.5). На основі цих даних виведена реконструкція філогенії β -амілаз - родинні відносини між класами однодольних і дводольних відповідають еволюційним зв'язкам між дослідженими видами.

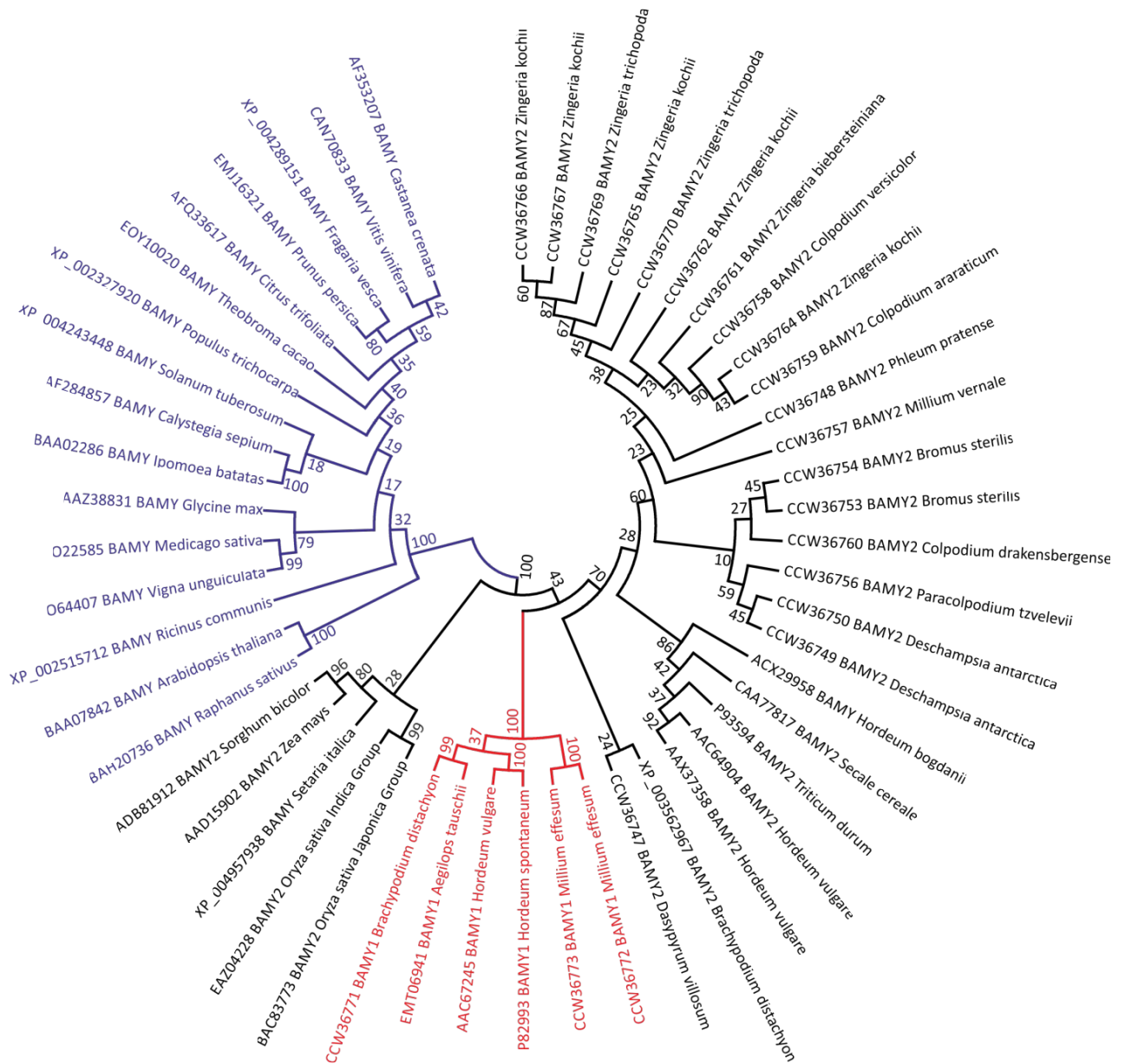


Рис. 3.5. Дендрограма філогенетичних взаємин для деяких однодольних і дводольних видів, побудована на основі амінокислотних послідовностей β -амілаз, з використанням методу мінімуму еволюції (МЕ) - фіолетовим кольором помічені дводольні види, чорним – однодольні, красним - позначені однодольні види, які мають ендоспермальну форму β -амілази.

Дендрограма, побудована на основі 52 амінокислотних послідовностей β -амілаз різних видів рослин з використанням методу мінімуму еволюції (ME), поділена на два кластери – один склали β -амілази дводольних видів (позначені синім кольором), і окремою групою в цьому кластері - β -амілази бобових, другий - β -амілази злаків, які утворили єдиний кластер, проте чітко розділений на дві відокремлені групи – перша містила види, що несли ген *Bmy2* і, відповідно, загальну форму β -амілази, а в другу увійшли види, що несли ген *Bmy1* і, таким чином, мали ендоспермальну форму ферменту (позначені червоним кольором) (рис.3.5).

На основі отриманих даних про ДНК-послідовності, а також амінокислотні послідовності β -амілаз, показані філогенетичні взаємини між родами, родинами, порядками і класами рослин. Філогенетичний аналіз отриманих даних відповідав сучасним уявленням про систематику аналізованих видів [165, 166, 167]. Таким чином, вивчені ядерні гени *Bmy* перспективні для використання в якості маркера молекулярної ідентифікації при аналізі близьких і віддалених видів рослинного царства.

Отже, встановлено зв'язок між поліморфізмом інтронів та алельним станом генів β -амілази. Праймери, що створені на основі консервативних і варіабельних ділянок нуклеотидних послідовностей *Bmy1* та *Bmy2* дозволяють використовувати їх як для визначення роду, так і для видового типування злаків.

Результати розділу висвітлено у публікаціях [168, 169, 170, 171].

РОЗДІЛ 4

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ β -АМІЛАЗИ У ВИДІВ РОДИНИ *POACEAE*

Загальноновизнано, що найбільш перспективні системи маркування насіннєвого і селекційного матеріалу засновані на оцінці поліморфізму ДНК. Молекулярно-генетичний аналіз генів *Bmy1* і *Bmy2* у різних злаків може надати нові відомості про діапазон генетичного поліморфізму (мінливості) досліджених видів, адже генетичні ресурси є важливими джерелами підвищення якісних ознак. Дослідження генів *Bmy* у дикорослих і близькоспоріднених видів злаків сприяють всебічному аналізу генетичного різноманіття у межах конкретного виду і можуть слугувати надалі для спрямованого трансгенезу чи віддаленої гібридизації для інтрогресії в культурні злаки генів, що забезпечують високий рівень активності ферменту в зерні.

Детекція молекулярно-генетичного поліморфізму генів β -амілази у представників сімейства *Poaceae* проводили за допомогою розроблених EPIC-праймерів 3162 і 3816, що дозволяли досліджувати фрагменти відразу двох генів - *Bmy1* і *Bmy2*. Слід зазначити, що обрані для відпалу праймерів ділянки екзонів (за результатами вирівнювання) проявляють високу ступінь консервативності не тільки для злаків, а й для представлених в базі даних більш віддалених видів рослин (в тому числі і на видах з мало вивченими геномами), що демонструє універсальність даної методики. При використанні даних праймерів, комплементарних консервативним фланкуючим ділянкам послідовності екзонів 1 і 4, виявляли поліморфізм інтронних ділянок - розмір аналізованої області для гена *Bmy1* ячменю склав 2295 п.н., для *Bmy2* - 1356 п.н., відповідно.

4.1. Дослідження міжвидового поліморфізму генів *Bmy1* і *Bmy2* представників родини *Poaceae*

Для вивчення міжвидової мінливості проаналізовані зразки видів злаків, представлених в таблиці 3.4., в тому числі *H. vulgare* – у якості модельного організму у вивченні генів *Bmy*. Аналіз генів *Bmy1* і *Bmy2* досліджуваної вибірки злаків показав, що їх характеристики у різних видів мають як свої особливості, так і загальні для всіх них закономірності.

При дослідженні міжвидового поліморфізму генів *Bmy1* і *Bmy2* із застосуванням ЕРІС-ПЛР у 37 представників сімейства *Poaceae* виявлений досить широкий діапазон генетичного різноманіття досліджених генів (рис. 4.1). Розрахункові розміри ПЛР-фрагментів, отриманих за допомогою FastPCR [155] для гену *Bmy1* - 2295 або 2169 п.н. і для *Bmy2* - 1365 п.н. Такі продукти ампліфікації виявлені у зразків, що містять ДНК *H. vulgare* (рис. 4.1, зразки 1 - 4) - варіювання довжини фрагмента у *H. vulgare* обумовлено 126 п.н. МІТЕ-вставкою в інтроні 3, а також у *H. spontaneum*, *H. murinum* і *T. durum* (зразки 5, 6 і 10, відповідно). Інші зразки мали відмінні від даних довжини ампліфікованої ділянки - розміри їх послідовностей перебували в межах від 1700 до 2500 п.н. для гена *Bmy1*, і від 1300 до 1500 п.н. для гена *Bmy2* (рис. 4.1). В цілому, при використанні даних ЕРІС-праймерів, в локусах генів *Bmy1* і *Bmy2* виявлено ряд алельних варіантів: 10 різних алелів для *Bmy1* (від одного до трьох ПЛР-фрагментів на зразок) і чотири алелі *Bmy2* (по одному ПЛР-фрагментів на зразок).

На рис. 4.1 - зразки з 1 по 30 - показані результати ПЛР-аналізу ДНК сортів і видів, що належать до триби *Triticeae* (табл. 3.4). Електрофорез ПЛР-продуктів представлений двома фрагментами: нижній фрагмент - відповідає ампліфікації гена *Bmy2* і верхній - гена *Bmy1*, відповідно. Згідно з літературними даними тільки представники триби *Triticeae* (до якої належать пшениця, ячмінь і жито) мають дві різні форми β-амілази - ендоспермальну (*Bmy1*) та загальну (*Bmy2*) [79, 80]. Вид *Bromus sterilis* (зразок 35), що

належить до триби *Bromeae*, містить обидва β -амілазних гена - так само, як види з триби *Triticeae*. Нами визначена нуклеотидна послідовність гена *Bmy1* *B. sterilis* (NCBI під номерами HE565904, HE565905). У зв'язку з цим можна відзначити, що присутність гена ендоспермальної β -амілази є перевагою не тільки представників *Triticeae*, але, можливо, більш широкої таксономічної групи - супертриби *Triticodae*, яка включає в себе триби *Bromeae* и *Triticeae*.

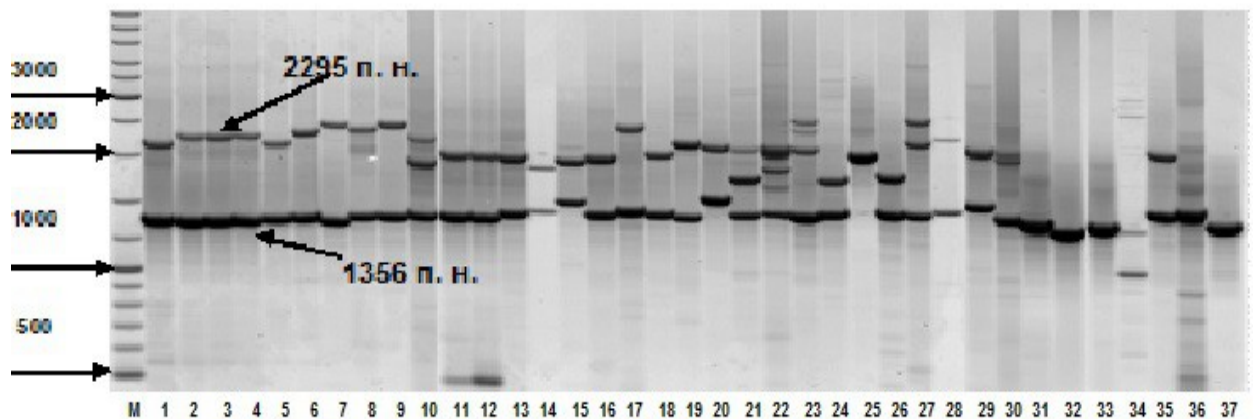


Рис. 4.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів *Bmy1* і *Bmy2* у видів родини *Poaceae*: М - маркер молекулярної ваги DNA-ladder #SM1173; 1 – *H. vulgare* (Джау Кабутак), 2 – *H. vulgare* (Палідум 107), 3 – *H. vulgare* (Одеський 17), 4 – *H. vulgare* (Одеський 31), 5 - *H. spontaneum*, 6 – *H. murinum*, 7 – *H. marinum*, 8 - *H. brachyantherum*, 9 – *H. leporinum*, 10 - *Triticum durum* (AABB), 11 - *Aegilops speltoides*, 12 - *Agropyron cristatum*, 13 - *Amblyopyrum muticum*, 14 - *Comopyrum comosum*, 15 - *Crithodium monococcum*, 16 - *Crithopsis delileana*, 17 - *Dasypyrum villosum*, 18 - *Eremopyrum distans*, 19 - *Henrardia persica*, 20 - *Heteranthelium piliferum*, 21 - *Lophopyrum elongatum*, 22 - *Peridictyon sanctum*, 23 - *Pseudoroegneria spicata*, 24 - *Secale strictum*, 25 - *Taeniatherum caput-medusae*, 26 - *Thinopyrum bessarabicum*, 27 - *Psathyrostachys fragillis, fragilis*, 28 - *Psathyrostachys fragillis, villosus*, 29 - *Festucopsis serpentinii*, 30 - *Elymus repens*, 31 - *Phleum pretense*, 32 - *Zingieria biebersteiniana*, 33 - *Colpodium versicolor*, 34 - *Spartina alterniflora*, 35 - *Bromus sterilis*, 36 - *Avena sativa*, 37 - *Brachypodium distachyon*

Види, що належать до триб *Aveneae*, *Poeae* і *Brachypodieae*: *Phleum pratense*, *Zingeria biebersteiniana*, *Colpodium versicolor*, *Spartina alterniflora*, *Avena sativa*, *Brachypodium distachyon* (зразки з 31 по 37, крім 35 (*Bromus sterilis*)) містять єдиний ген - загальної β -амілази *Bmy2*.

Таблиця 4.1

Аналіз генів *Bmy1* і *Bmy2* у видів родини Poaceae

№	Вид /сорт	Триба	Наявність ПЛР- фрагменту, що відповідає гену <i>Bmy1</i>	Наявність ПЛР- фрагменту, що відповідає гену <i>Bmy2</i>
1	2	3	4	5
1	<i>H. vulgare</i> (Джау Кабутак)	<i>Triticeae</i>	+	+
2	<i>H. vulgare</i> (Палідум 107)	<i>Triticeae</i>	+	+
3	<i>H. vulgare</i> (Одеський 17)	<i>Triticeae</i>	+	+
4	<i>H. vulgare</i> (Одеський 31)	<i>Triticeae</i>	+	+
5	<i>H. spontaneum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
6	<i>H. murinum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
7	<i>H. marinum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
8	<i>H. brachyantherum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
9	<i>H. erectifolium</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
10	<i>Triticum durum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
11	<i>Aegilops speltoides</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
12	<i>Agropyron cristatum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
13	<i>Amblyopyrum muticum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
14	<i>Comopyrum comosum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
15	<i>Crithodium monococcum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
16	<i>Crithopsis delileana</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
17	<i>Dasyphyrum villosum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
18	<i>Eremopyrum distans</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
19	<i>Henrardia persica</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
20	<i>Heteranthelium piliferum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
21	<i>Lophopyrum elongatum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
22	<i>Peridictyon sanctum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
23	<i>Pseudoroegneria spicata</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
24	<i>Secale strictum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
25	<i>Taeniatherum caput-medusae</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
26	<i>Thinopyrum bessarabicum</i>	<i>Triticeae</i>	+	+

Продовження табл. 4.1

1	2	3	4	5
27	<i>Psathyrostachys fragillis, villosus</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
28	<i>Psathyrostachys stoloniformis</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
29	<i>Festucopsis serpentinii</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
30	<i>Elymus repens</i>	<i>Triticeae</i>	+	+
31	<i>Phleum pratense</i>	<i>Poeae</i>	-	+
32	<i>Zingeria biebersteiniana</i>	<i>Aveneae</i>	-	+
33	<i>Colpodium versicolor</i>	<i>Poeae</i>	-	+
34	<i>Spartina alterniflora</i>	<i>Zoysieae</i>	-	+
35	<i>Bromus sterilis</i>	<i>Bromeae</i>	+	+
36	<i>Avena sativa</i> (Vali)	<i>Aveneae</i>	-	+
37	<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>Triticeae</i> (<i>Brachypodieae</i>)	-	+

Примітка: знаком «+» позначено наявність ПЛР-фрагментів, що відповідають генам *Bmy1* чи *Bmy2*, знаком «-» - їх відсутність

Не вдаючись до використання інших праймерів або методів, специфічність отриманих спектрів дає можливість робити попередні висновки про характер спорідненості. Фінгерпрінти, отримані на основі методу ЕРІС-ПЛР, виявляють як між- так і внутрішньовидові відмінності проаналізованих зразків (зразки 1-9 *Hordeum*, рис.4.1). ЕРІС-праймери, специфічні до ділянок екзон 1 - екзон 4 генів β -амілази злаків, виявилися придатними для того, щоб охарактеризувати генетичну різноманітність сімейства *Poaceae*, що в свою чергу дозволило розглядати їх як новий засіб для ідентифікації злаків.

4.1.1. Поліморфізм генів β -амілази у представників триби *Triticeae*.

Дослідження внутрішньовидового поліморфізму генів β -амілази у представників триби *Triticeae* проводили для сортів жита і тритикале, а також ліній *Triticum dicoccoides* і різновидів *Aegilops speltoides*. Інтерес до вивчення генів *Bmy1* і *Bmy2* цих злаків обумовлений тим, що дані види вважаються

донорами геномів культурної пшениці. Дика пшениця еммер або полба (*T. dicoccoides*) є тетраплоїдних предком культурної гексаплоїдної м'якої пшениці *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$, AABBDD) [172]. Різновиди *A. speltoides* ($2n = 2x = 14$ геном BB або SS) є носіями ряду цінних ознак, які використовуються при штучній гібридизації з культурними сортами пшениці [173]. Тритикале отриманий шляхом об'єднання хромосомних комплексів двох різних ботанічних родів - пшениці (*Triticum* ssp., AA, AABB, AABBDD) і жита (*Secale cereale*, RR) - дана культура об'єднує в собі цінні властивості цих родів. Геномна формула гексаплоїдних тритикале – AABBRR. За типом розвитку тритикале має озимі та ярі форми [174, 175].

При зіставленні отриманих результатів, виявилися три фрагмента ампліфікованої ДНК, загальні для всіх чотирьох досліджених видів - з розміром 2295 п.н. (продукт очікуваного розміру для гена *Bmy1*), приблизно 1900 п.н. (входить в спектр алелів *Bmy1*) і 1365 п.н. (асоційований з геном загальної β -амілази *Bmy2*) (рис. 4.2, 4.3, 4.4). ПЛР-продукти з розмірами 2295 і 1365 п.н. були присутні в спектрі алелів *Hordeum* (зразки 1 - 6) і *T. durum* (10) (рис. 4.1).

Аналіз поліморфізму *Bmy1* у тритикале та жита показав, що рівень їх загального поліморфізму вище, ніж у сортів ячменю (рис. 4.1), у якого було виявлено тільки два алелі гена *Bmy1*. Порівняння частот генотипів тритикале та жита показало, що велика частина спектра алелів тритикале збігалася з такими у жита (в тому числі фрагменти розміром 2295 і 1356 п.н.). Крім того, у складі алельних спектрів озимого та ярого тритикале присутні ПЛР-фрагменти з розміром приблизно 2000 п.н. (на рис. 4.2 - зразки №№ 9, 17, 18, 22, 29, 34). Дані фрагменти відсутні у жита і, можливо, отримані пшенично-житнім гібридом від пшениці (рис. 4.4 А). Виявлений у зразків тритикале ПЛР-фрагмент довжиною 1850 п.н. можливо є видоспецифічним.

У досліджених зразків озимого тритикале детектували до восьми поліморфних ПЛР-продуктів (від двох до чотирьох фрагментів ДНК в

дослідженому зразку) для гена *Bmy1* та три варіанти (від одного до двох ампліконів) для гена *Bmy2*.

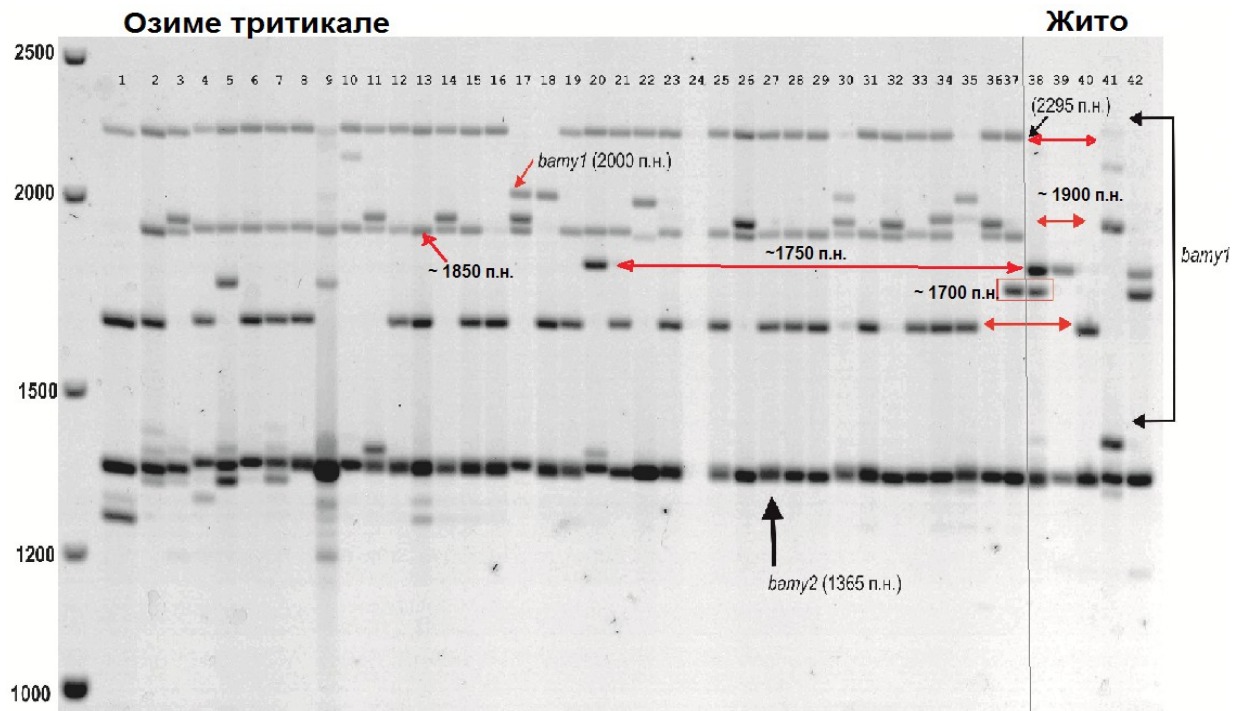


Рис. 4.2. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy1* та *Bmy2* у сортів озимого тритикале та жита (праймери 3162 і 3816). М - маркер молекулярної маси DNA Ladder #SM1173; 1-36 - сорти озимого тритикале: 1 - Benetto, 2 - NE 422T, 3 - UCRTCL 1, 4 - Greneder, 5 - Plains, 6 - Terreland 22, 7 - Mungis, 8 - Leontino, 9 - Constant, 10 - Trizeps, 11 - Tribeca, 12 - Dusi, 13 - Alekto, 14 - Cosinus, 15 - Kandar, 16 - Largus, 17 - Magistral, 18 - Noe, 19 - Pletomax, 20 - Tatra, 21 - Massimo, 22 - Nutriseeds 1-18, 23 - Bienvenu, 24 - Trismart, 25 - Trimmer, 26 - Wilfried, 27 - Pizarro, 28 - Aprim, 29 - Innoval, 30 - Amarillo 105, 31 - Blenio, 32 - Kinerit, 33 - UCRTCL-3, 34 - Algos, 35 - UCRTCL-2, 36 - Flavius; 37-41 - сорти жита: 37 - Rihi, 38 - Akusti, 39 - Iissavaara, 40 - Loppi, 41 - Hirvessalmi

У зразків ярого тритикале виявлено шість поліморфних ПЛР-продуктів (від двох до трьох фрагментів) для гена *Bmy1* і два варіанти (єдиний фрагмент) для гена *Bmy2*. Універсальним для аналізованих сортів тритикале

виявився фрагмент в 1356 п.н. гена *Bmy2*. Різноманітність варіантів гена *Bmy1* з розміром фрагмента 2295 п.н. залежить від типу розвитку тритикале - у озимих сортів даний фрагмент зустрічається у 86% випадків, а у ярих він виявлений у 48% зразків. Фрагмент у 2000 п.н. найбільш поширений серед сортів ярого тритикале - 52%, ніж серед озимого - 13%. Фрагмент у 1900 п.н. присутній у 56% сортів з досліджуваної вибірки ярого тритикале і у 27% озимого (рис. 4.2 і 4.3). ПЛР-продукти з розмірами 1700 п.н. (сорт Plains, Constant і Flavius) і 1750 п.н. (сорт Tatra) виявлені тільки у озимого тритикале.

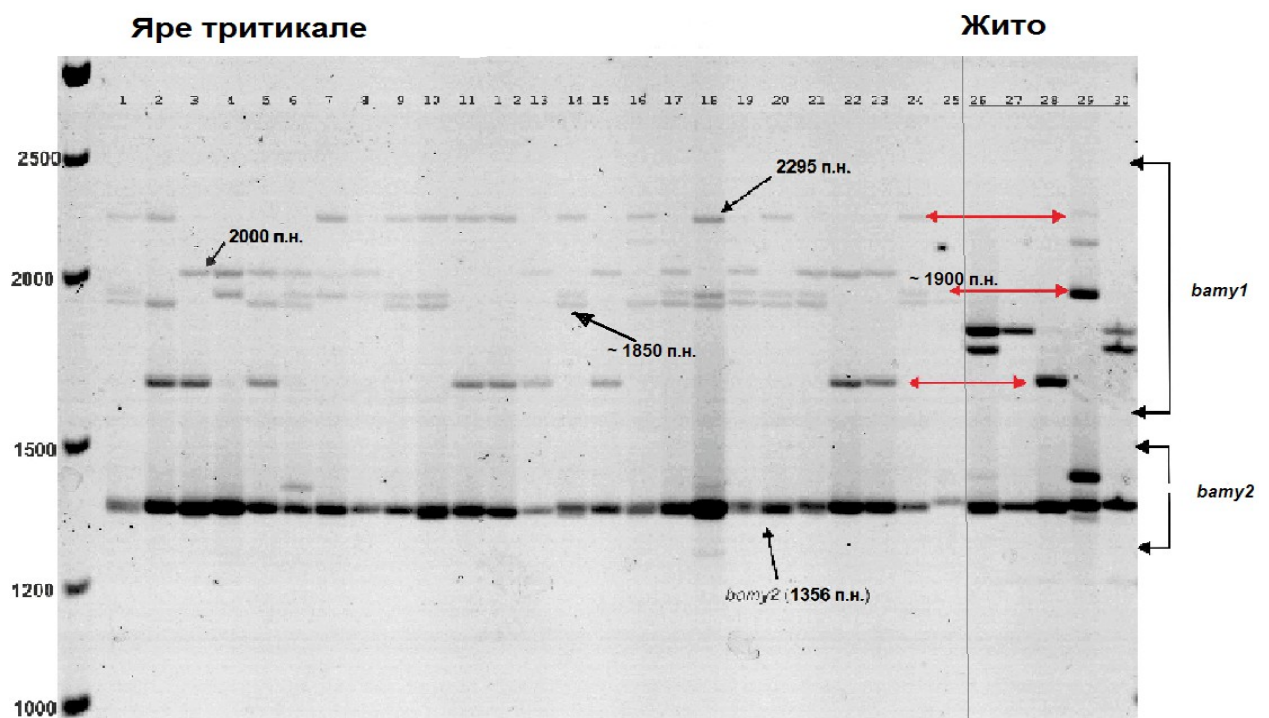


Рис. 4.3. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy1* та *Bmy2* між сортами ярого тритикале та жита (праймери 3162 і 3816). М - маркер молекулярної маси DNA Ladder #SM1173; 1-25 – сорти ярого тритикале: 1 - Arc en Ciel, 2 - Fronteiro, 3 - Tentudia, 4 - Sierra de Almaraz, 5 - Sierra de Arroyo, 6 - Sierra de Lobos, 7 - Alter, 8 - Camarma, 9 - Cume, 10 - Curtido, 11 - Vrodi, 12 - Thisbi, 13 - Vrito, 14 - Legalo, 15 - Senatrit, 16 - Trimour, 17 - Dublet, 18 - Wanad, 19 - Gabo, 20 - Logo, 21 - Matejko, 22 - Nobi, 23 - Noe, 24 - Somtri, 25 - Sierra de Villuercas; 26-30 - сорти жита: 26 - Rihi, 27 - Akusti, 28 - Iissavaara, 29 - Loppi, 30 - Hirvessalmi.

При аналізі загального поліморфізму досліджених за локусами *Bmy1* і *Bmy2* п'яти сортів жита сумарно виявлено шість поліморфних продуктів ампліфікації гена *Bmy1* (від одного до трьох ПЛР-продуктів на сорт) і два (від одного до двох) - для гена *Bmy2*.

Вивчення поліморфізму генів β -амілази пшениці двузернянки показало, що лінії *T. dicoccoides* гетерогенні за локусом *Bmy1*. У сукупності виявлені такі фрагменти ДНК: з довжиною ~ 1900 п.н. - характерний для всіх досліджених зразків *T. dicoccoides*; з довжиною ~ 2000 п.н. - зустрічався в 79% випадків (виявлений також у тритикале) і 2295 п.н. фрагмент - 16% зразків з досліджуваної вибірки несли даний продукт ампліфікації (рис. 4.4). █

Серед продуктів ампліфікації, отриманих для генів *Bmy1* і *Bmy2* форм *A. speltoides*, виявили три і два ПЛР-продукти, відповідно. Крім двох фрагментів ДНК - з розмірами 2295 і 1900 п.н., наявних також у *T. turgidum*, тритикале, жита і ячменю, у егілопсу виявлений фрагмент довжиною 2600 п.н., яка не спостерігався у перерахованих вище видів. Даний фрагмент зустрічається у 63% досліджених зразків *A. speltoides* (рис. 4.4 Б).

При зіставленні молекулярних профілів ліній *T. dicoccoides* із зразками різновидів *A. speltoides* (рис. 4.4 В) з'ясувалося, що у цих видів є спільні нуклеотидні послідовності - з розмірами 2295 і 1900 п.н. Фрагмент ампліфікації довжиною 1900 п.н. присутній в 16% випадків у зразках *A. speltoides* і на 100% представлений в *T. dicoccoides* (рис. 4.4 А, Б, В).

Аналіз нуклеотидних послідовностей генів β -амілаз злаків, проведений для виявлення причин поліморфізму в досліджених зразках видів *Triticeae*, показав, що поліморфізм ДНК, виявлений при використанні ЕРІС-праймерів 3162 і 3816, пов'язаний з відмінностями в інтронах генів β -амілази, які мають висококонсервативні послідовності в екзонах і поліморфні в інтронних ділянках. Ці дані підтвердилися після визначення нуклеотидних послідовностей генів *Bmy1* і *Bmy2* *T. dicoccoides* і *A. speltoides* (HE565956 - HE565971) і порівняння їх з уже наявними послідовностями генів β -амілаз з баз даних.

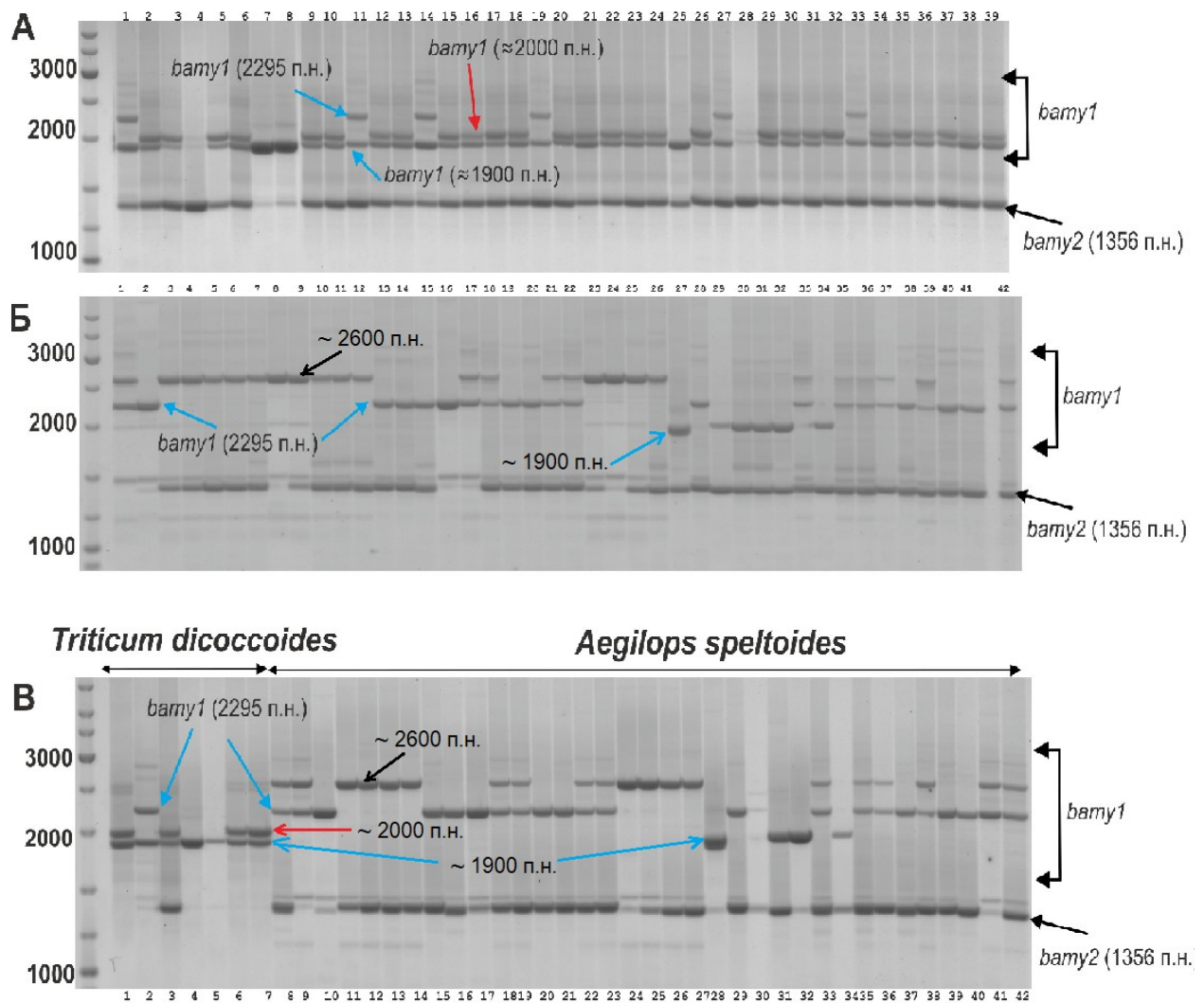


Рис. 4.4. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy1* та *Bmy2* у ліній пшениці двозернянки та різновидів *A. speltoides* (праймери: 3162 і 3816). М - маркер молекулярної маси DNA Ladder #SM1173; А - лінії пшениці *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*; Б – *A. speltoides* (syn. *Sitopsis speltoides* (Tausch) Á.Löve); В – *T. dicoccoides* (1-7) і *A. speltoides* (8-38).

Таким чином, у даній главі, на прикладі деяких видів злакових, досліджений внутрішньо- і міжвидовий поліморфізм генів β -амілази *Bmy1* та *Bmy2*. Аналіз послідовностей цих генів показав, що, будучи вирівняними, ці послідовності мають ділянки з високою гомологією в екзонних областях. Виходячи з отриманих даних, підібрані праймери для ампліфікації фрагментів генів *Bmy1* і *Bmy2* представників сімейства *Poaceae*. Показана можливість застосування отриманих праймерів для аналізу широкого

таксономічного діапазону - дані праймери родо- і видоспецифічні, так як комплементарні найбільш консервативним ділянкам ДНК злаків - ексонам. ПЛР-праймери підбирали до фланкуючих послідовностей екзонів для детекції поліморфізму в інтронних ділянках досліджених генів. Цей підхід (ЕРІС-ПЛР) ефективний при дослідженні внутрішньо- і міжвидового поліморфізму генів β -амілаз.

Проведено молекулярно-генетичний порівняльний аналіз злаків, який виявив ідентичні за молекулярною масою фрагменти в алельних спектрах вибірки видів *Poaceae*, а також при вивченні поліморфізму таких представників триби *Triticeae*, як двузернянка, егілопс, тритикале та жито. Скринінг колекції видів родини *Poaceae* дозволив отримати первинну інформацію, яка може бути використана для маркерної селекції сортів хлібних злаків.

У ході проведеного дослідження показано, що спектри, одержані при використанні ЕРІС-методу інформативні і підходять для оцінки міжвидових розбіжностей та встановлення внутрішньовидової варіабельності представників такої обширної таксономічної групи як злаки. Таким чином, геномні дані модельного організму можуть ефективно використовуватися для розробки ЕРІС-маркерів для видів, які не є модельними.

Результати розділу висвітлено у статті [176].

РОЗДІЛ 5

ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *Bmy1* ЯЧМЕНЮ

5.1. Дослідження алельних варіантів гена β -амілази в сортах ярого ячменю, поширених на території східноєвропейських і центральноазіатських країн

Для з'ясування закономірностей в поширенні алелів гена β -амілази в залежності від агрокліматичних зон, проведено дослідження колекції з 249 сортів ярого ячменю. При аналізі враховували поділ на сім регіонів вирощування, при цьому в східноєвропейську зону входили: Європейський, Прибалтійський, Білоруський і Середньо-Російський, а в центральноазіатську: Західно-Сибірський, Далекосхідний-Амуро-Уссурійський і Предалтайській регіони [144]. Для кожного сорту проводили виділення ДНК з п'яти індивідуальних паростків, потім об'єднуючи їх в суміші.

Дане дослідження проводили за допомогою пари специфічних праймерів 3162-3164 (табл. 3.2), орієнтованих на ділянку екзон 1 - екзон 6 гена *Bmy1* і таку ж за розміром ділянку гена *Bmy2* (рис. 3.1). Очікувалося, що аналіз такого протяжного відрізка генів β -амілази ячменю може призвести до виявлення більш широкого генетичного різноманіття *H. vulgare* в аналізованій обширній колекції. Дані праймери комплементарні висококонсервативним екзонним ділянкам генів ендоспермальної та загальної β -амілази і використовувалися з метою визначення варіабельних інтронних регіонів гена *Bmy1*.

В результаті ампліфікації ДНК сортів ячменю дослідженої колекції з даними праймерами виявлено два алеля в локусі *Bmy1* - з розмірами ПЛР-фрагментів 3278 п.н. і 3152 п.н. (рис. 5.1, табл. Д.1 (додаток Д)). За локусом

Vtnu2 сорти ячменю виявилися однорідними та містили ПЛР-фрагмент довжиною 2260 п.н. (рис. 5.1).

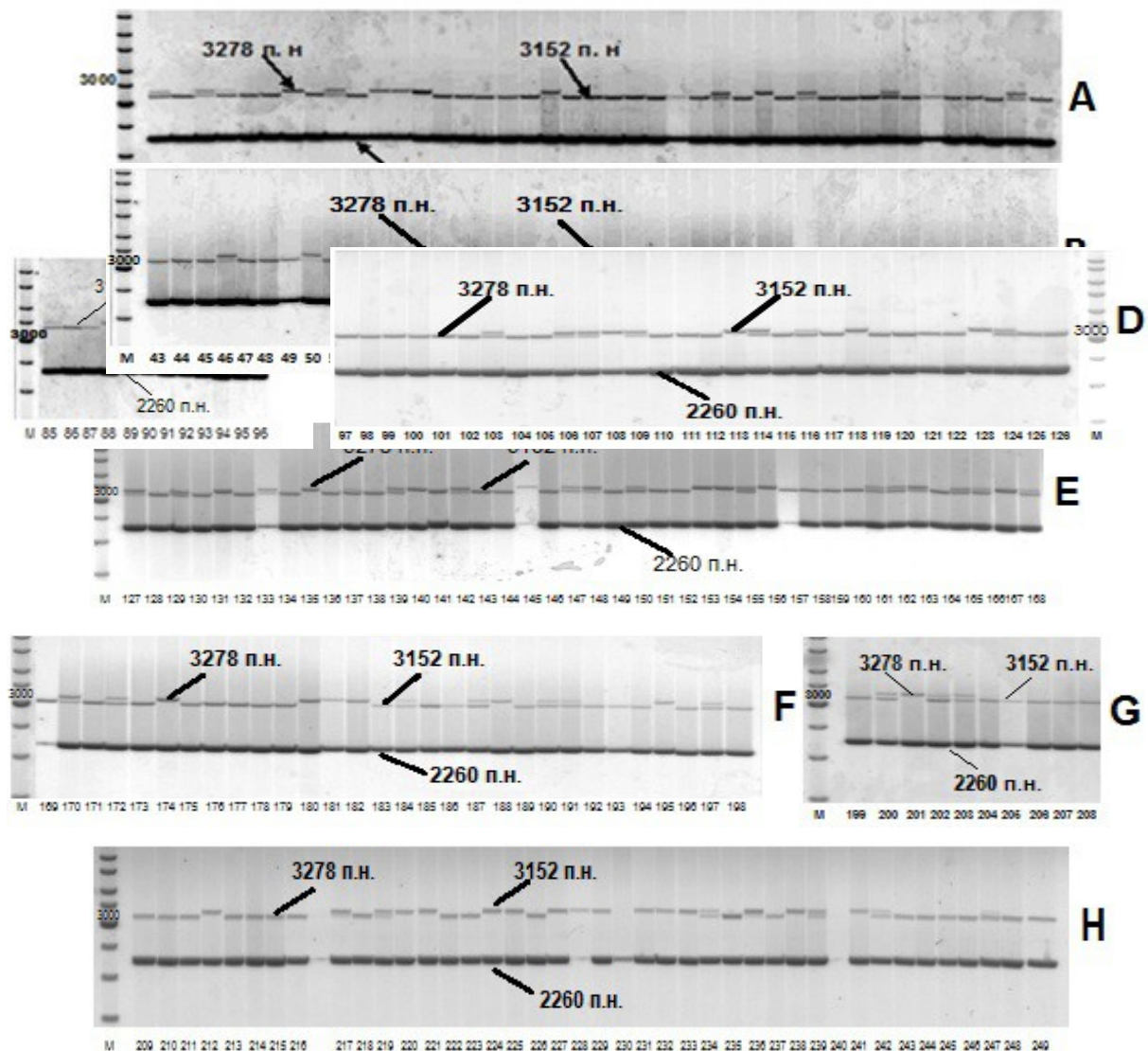


Рис. 5.1. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК 249 сортів ярого ячменю, використаних для дослідження географічного розподілу алелів локусу *Vtnu1* на території східноєвропейських і центральноазіатських країн (праймери 3162 і 3164). А – №№ 1 - 42, В – №№ 43 - 84, С - №№ 85 - 96, D – №№ 97 - 126, Е - №№ 127 - 168, F - №№ 169 - 198, G - 199 – 208, Н – 209 – 249. М - маркер молекулярної маси DNA-ladder #SM1173

Розрахункова довжина продуктів ампліфікації ДНК отримана за допомогою програми FastPCR [155] (табл. 3.2). Дані продукти ПЛР гена *Vtnu1* розрізнялися за наявністю 126 п.н. МІТЕ-вставки в інтроні 3, яку, за рядом

літературних джерел [127, 132, 138, 139, 140, 146], пов'язують з синтезом низькоактивного ферменту β -амілази.

На підставі даних ПЛР з використанням ЕРІС-праймерів показано, що сорти дослідженої колекції несли алелі *Bmy1* двох типів - з 126 п.н. МІТЕ-вставкою (3278 п.н. алель) і без неї (3152 п.н. алель). Інших алелів в локусі *Bmy1* в проаналізованій великій ділянці гена виявлено не було. Підтверджено, що різниця між генотипами ячменю в локусі *Bmy1* пов'язана з 126 п.н. транспозицією МІТЕ-елемента.

Розподіл частот зустрічальності *Bmy1* у дослідженій вибірці сортів відповідає рівнянню Харді-Вайнберга. Частота зустрічальності алелів *Bmy1* у представників аналізованої колекції: алель з молекулярною масою 3278 п.н. - 32%, алель з молекулярною масою 3152 п.н. - 68% від вибірки (табл.5.1).

При аналізі сортів колекції показано, що частота зустрічальності алелів *Bmy1* може варіювати досить значно. Незважаючи на те, що розміри вибірок сортів у досліджених регіонах варіювали, можна відзначити, що алель *Bmy1*, асоційований з ознакою активної β -амілази і розміром 3152 п.н. (не несе 126 п.н. МІТЕ-елемента інтрона 3) домінує на ділянках, розташованих на північному заході дослідженої території (табл. 5.1). Отримані результати збігаються з даними про ґрунтово-кліматичні умови Північно-Європейської частини, як найбільш оптимальні для вирощування пивоварних сортів ячменю [58, 59]. При зміщенні до регіонів вирощування, розташованих на південному сході, частота алеля *Bmy1*, асоційованого з ознакою активної β -амілази зменшується, а асоційованого з ознакою низькоактивної β -амілази - збільшується (табл. 5.1).

Проведений аналіз розподілу частот алелів гена *Bmy1* в Євро-азіатському регіоні свідчить про те, що на дослідженій території вони поширені нерівномірно.

Таблиця 5.1

Розподіл алелів *Bmy1* в сортах ячменю, розповсюджених в природно-сільськогосподарських регіонах

Географічна зона	Назви регіонів та їх кліматична характеристика	Кількість сортів, шт.	Частоти алелів, %	
			3278 п.н.	3152 п.н.
Східно-європейська	Європейський – вибірково вологий, недостатньо забезпечений теплом	28	12±6,1	88±6,1
	Прибалтійський – вибірково вологий, нижче середнього забезпечений теплом	38	32±7,6	68±7,6
	Білоруський - вологий, середньо забезпечений теплом	27	28±8,6	72±8,6
	Середньо-Російський - вибірково вологий і вологий, середньо і вище середнього забезпечений теплом	63	36±6,0	64±6,0
Центрально-азійська	Західно-Сибірський - вологий, нижче середнього забезпечений теплом	26	37±9,5	63±9,5
	Далекосхідно-Амуро-Усурійський – вологий, середньо забезпечений теплом	26	52±9,8	48±9,8
	Передалтайський - напівпосушливий і посушливий, нижче середнього забезпечений теплом	41	28±7,0	72±7,0
Всі регіони		249	32±2,9	68±2,9

Загальне співвідношення алелів *Bmy1*, у яких немає 126 п. н. MITE-елемента інтрона 3 (ознака наявності активної β -амілази) і сортів з алелями *Bmy1*, що несуть 126 п.н. MITE-елемент (ознака наявності низькоактивної β -амілази), склало приблизно 2 до 1, відповідно (рис. 5.2 А). В південних та східних областях таке співвідношення змінюється на 1,5 до 1 (рис. 5.2 В), а у сортів Північно-Європейської частини і Балтійського регіону (зони вирощування пивоварного ячменю) - на 4 до 1 (рис. 5.2 С).

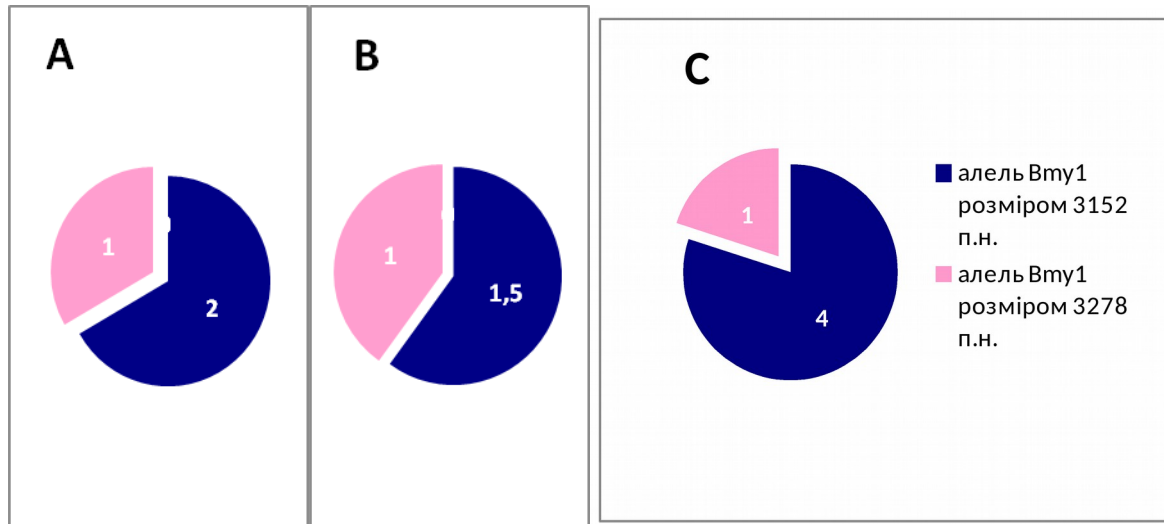


Рис. 5.2. Співвідношення алелів гена *Bmy1* в колекції сортів ярого ячменю, розповсюдженого в Євро-азіатському регіоні: А - сортів всіх географічних зон; В - сортів з південних та східних областей; С - сортів Північно-Європейської частини і Балтійського регіону.

При дослідженні колекції з'ясувалося, що географічний розподіл алелів *Bmy1* залежить від показників забезпеченості теплом регіонів, в яких районовані досліджені сорти: показано перевагу частот варіанту, асоційованого з активною β -амілазою (126 п.н. МІТЕ-елемент відсутній), у регіонах з низькою і середньої забезпеченістю теплом. Таким чином, ЕРІС-праймери до генів *Bmy*, використані в цьому дослідженні, дозволили провести порівняльні дослідження потенціалу сортів, зібраних в різних кліматичних зонах, за локусом ендоспермальної β -амілази і встановити взаємозв'язок генетичної різноманітності з адаптивністю.

5.2. Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму гена *Bmy1* ячменю

Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму гена ендоспермальної β -амілази сортів ярого та озимого ячменю української та

зарубіжної селекції, а також диких різновидів роду *Hordeum*, проводилося за допомогою ПЛР з використанням інтрон-специфічних праймерів Mes16g і r20 (табл. 3.2). Дані праймери використані для видової ідентифікації, так як є гомологічними до видоспецифічної ділянки *Bmy1* і сконструйовані на основі аналізу варіабельності інтрона 3 гена ендоспермальної β -амілази ячменю за результатами секвенування послідовності ДНК. В цілому, за ознакою присутності або відсутності 126 п.н. МІТЕ-вставки в інтроні 3 гена *Bmy1*, яку ряд дослідників [118, 127, 132, 138, 139, 146] асоціювали з ознакою наявності активної β -амілази в зерні ячменю, проведена оцінка 130 сортів ячменю - від стародавніх до сучасних, а також шести дикорослих різновидів *Hordeum*. ДНК виділяли з 20-ти індивідуальних паростків. З геномної ДНК ячменю ампліфікували інтрон3-специфічну ділянку гена *Bmy1*. Використання праймерів Mes16g і r20 дозволило ідентифікувати три алелі β -амілазного гена з притаманними їм ПЛР-продуктами: перший - присутня 126 п.н. вставка (643 п.н.), другий - відсутня 126 п.н. вставка (516 п.н.) і третій - відсутня 126 п.н. МІТЕ-вставка і наявна 39 п.н. делеція (477 п.н.). Дані алелі зв'язують з низькоактивною, активною та високоактивною β -амілазою, відповідно.

Для вивчення динаміки у часі частот варіантів у локусі *Bmy1* серед реєстрових сортів ярого ячменю ми умовно розділили ці сорти на три групи - по роках реєстрації [177, 178]: перша група - 19 представників стародавніх сортів і сортів ранньої селекції (роки реєстрації 1931 – 1980), друга група - 48 сортів ярого ячменю, внесених до реєстру в 1981 - 1999 роках, і третя група – 39 сортів, зареєстрованих у 2000 - 2010 рр.

Аналіз показав, що стародавні та сорти ранньої селекції, як і зареєстровані у 1981-1999, а також у 2000-2010 роках, містять алелі лише двох типів – активної та низькоактивної β -амілази, але різняться за співвідношенням цих алелів (рис. 5.3).

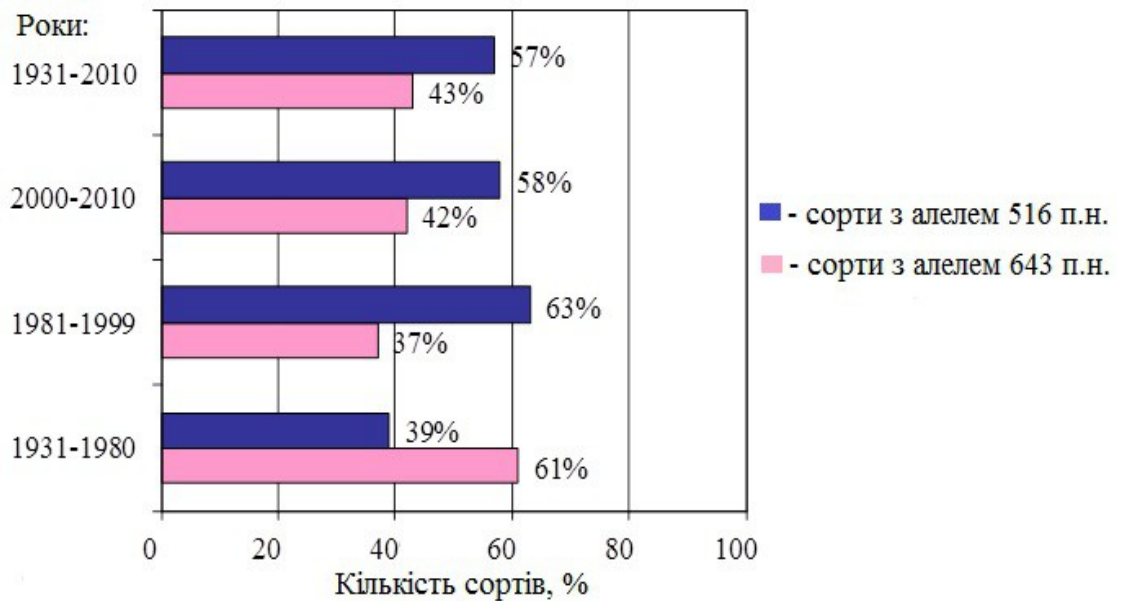


Рис. 5.3. Динаміка частот варіантів у локусі *Bmy1* серед реєстрових сортів ярого ячменю в часі. Шкала X відображає кількість сортів у відсотках, шкала Y – час реєстрації досліджуваних сортів ярого ячменю.

У сортів ячменю, зареєстрованих до 80-х років XX сторіччя, спостерігається перевага алеля низькоактивної β -амілази – даний алель на той час був виявлений у 61% зразків. У наступних роках алель низькоактивного ферменту зустрічався тільки у 37% випадків у вибірці сортів, зареєстрованих у 1981-1999 рр., та у сортів, що потрапили у реєстр з 2000 по 2010 роки зустрічальність алелю низькоактивної β -амілази - 42%.

5.2.1. Аналіз алельного стану гену *Bmy1* у сортів ярого ячменю.

Аналіз алельного поліморфізму гену *Bmy1* сортів ярого ячменю української (81 сорт) та зарубіжної (25 сортів) селекції з різними роками реєстрації (1931 - 2010 рр.) показав, що у вибірці присутні сорти, що несуть два типи алелів - низькоактивної і активної β -амілази з розміром ПЛР-фрагментів 643 і 516 п.н. відповідно. Алель високоактивної β -амілази з розміром ПЛР-фрагмента 477 п.н. в даному наборі ярих сортів культурного ячменю не виявлено. У табл. 3.6 наведено назви 106 проаналізованих за локусом *Bmy1* ярих сортів ячменю,

також зазначено рік реєстрації сорту і напрям його використання, детектовані алелі і наявність серед них алелів активної β -амілази, виражена у відсотках.

Таблиця 5.2

Характеристика варіабельності сортів ярого ячменю за локусом *Bmy1*

№	Назва сорту	Рік реєстрації	Напрямок використання*	Детектовані алелі, п.н.	Наявність алелю активної β -амілази, %
1	2	3	4	5	6
1	Медікум 46	1931	цін	643	0
2	Одеський 9	1938	цін	516	100
3	Одеський 14	1946	цін	516, 643	70
4	Нутанс 106	1948	зерн	516	100
5	Донецький 650	1951	зерн	516, 643	5
6	Одеський 18	1951	цін	516, 643	25
7	Степовий	1956	зерн	516, 643	10
8	Южний	1956	зерн	516, 643	95
9	Одеський 36	1968	зерн	643	0
10	Чорноморець	1971	цін	516, 643	85
11	Нутанс 244	1973	пв	516, 643	5
12	Донецький 6	1976	цін	643	0
13	Джау Кабутак	-	-	516	100
14	Харьковський 60	1976	зерн	643	0
15	Донецький 8	1978	цін	516, 643	50
16	Славутич	1978	цін	643	0
17	Вінницький 7	1978	пв	516	100
18	Носівський 9	1979	пв	516	100
19	Одеський 69	1980	зерн	643	0
20	Нутанс 518	1982	пв	643	0
21	Одеський 82	1982	зерн	516	100
22	Первенець	1983	зерн	516	100
23	Одеський 100	1984	пв	516	100
24	Вестник	1987	цін	516	100
25	Донецький 9	1987	зерн	643	0
26	Роланд	1987	пв	516	100
27	Нутанс 778	1988	цін	643	0

Продовження табл. 5.2

1	2	3	4	5	6
28	Романтик	1988	пв	516	100
29	Зерноградський 385	1990	зерн	516, 643	80
30	Одеський 115	1990	пв	516, 643	95

31	Подільський 14	1990	пв	516	100
32	Перелом	1991	зерн	516, 643	90
33	Прима Белорусії	1991	пв	516, 643	95
34	Прерія	1992	зерн	516, 643	5
35	Одеський 131	1993	зерн	516, 643	95
36	Палідум 107	1993	зерн	643	0
37	Рось	1993	пв	643	0
38	Андриен	1994	пв	516, 643	5
39	Каштан	1994	пв	516, 643	5
40	Одеський 151	1994	зерн	643	0
41	Спомин	1994	пв	516, 643	85
42	Гонар	1995	пв	516	100
43	Дерібас	1995	зерн	516, 643	10
44	Миронівський 86	1995	пв	516, 643	70
45	Подолян	1995	пв	516, 643	25
46	Престиж	1995	зерн	516	100
47	Марина	1995	пв	516	100
48	Миронівський 92	1996	пв	516, 643	50
49	Переможний	1996	зерн	516	100
50	Харківський 112	1996	пв	516, 643	95
51	Днепровський 257	1996	зерн	516, 643	60
52	Едем	1997	пв	516, 643	85
53	Екзотик	1997	пв	516	100
54	Звершення	1997	пв	516, 643	40
55	Незалежний	1997	пв	516, 643	5
56	Сталкер	1997	зерн	516	100
57	Стяг	1997	пв	516, 643	10
58	Адапт	1998	зерн	516, 643	95
59	Галатея	1998	зерн	516	100
60	Карат	1998	зерн	516, 643	90
61	Надія	1998	пв	516	100
62	Амулет	1999	пв	516, 643	70
63	Бадьорий	1999	пв	516, 643	85
64	Галактик	1999	пв	516	100
65	Джерело	1999	пв	516, 643	90
66	Донецький 12	1999	зерн	643	0
67	Неофіт	1999	зерн	516	100
68	Гама	2000	зерн	516, 643	5

Продовження табл. 5.2

1	2	3	4	5	6
69	Донецький 14	2000	зерн	516, 643	20
70	Зоряний	2000	пв	516, 643	90
71	Корона	2000	пв	516, 643	75

72	Лотос	2000	зерн	516, 643	80
73	Маресі	2000	пв	516, 643	80
74	Олбрам	2000	пв	516, 643	50
75	СН-28	2000	зерн	643	0
76	Тюрінгія	2000	пв	643	0
77	Фенікс	2000	зерн	643	0
78	Форум	2000	пв	643	0
79	Аскольд	2001	пв	516	100
80	Гетьман	2001	пв	516, 643	5
81	Невада	2001	пв	516	100
82	Оболонь	2001	пв	516	100
83	Пеяс	2001	пв	643	0
84	Південний	2001	пв	516, 643	5
85	Скарлетт	2001	пв	516	100
86	Табора	2001	пв	516	100
87	Целінка	2001	пв	516	100
88	Толар	2001	пв	516	100
89	Чудовий	2002	пв	516	100
90	Вакула	2003	пв	516	100
91	Пасадена	2003	пв	516	100
92	Персей	2004	пв	643	0
93	Селеніт	2004	пв	516	100
94	Чарівний	2004	пв	516	100
95	Європрестиж	2004	пв	516	100
96	Анабель	2004	пв	516	100
97	Водограй	2005	цін	516, 643	60
98	Казковий	2005	пв	516	100
99	Гелиос	2006	пв	516	100
100	Жозефін	2006	пв	516	100
101	Філадельфія	2006	пв	516	100
102	Еней2	2007	цін	643	0
103	Командор	2007	пв	643	0
104	Святогор	2010	пв	643	0
105	Воєвода	-	цін	643	0
106	Мішке	-	пв	643	0

Примітки: * - зерн – зерновий; пв – пивоварний; цін – цінний.

Аналіз отриманих результатів показав, що з 106 сортів ярого ячменю 63 виявилися однорідними за локусом *Vmy1*. Решта 43 сорти були гетерогенними і характеризувались двома продуктами ампліфікації - 516 п.н. і 643 п.н. ПЛР-фрагментами. Внутрішньосортова гетерогенність сортів ярого ячменю варіювала в діапазоні від 5 до 50% (рис. 5.4).

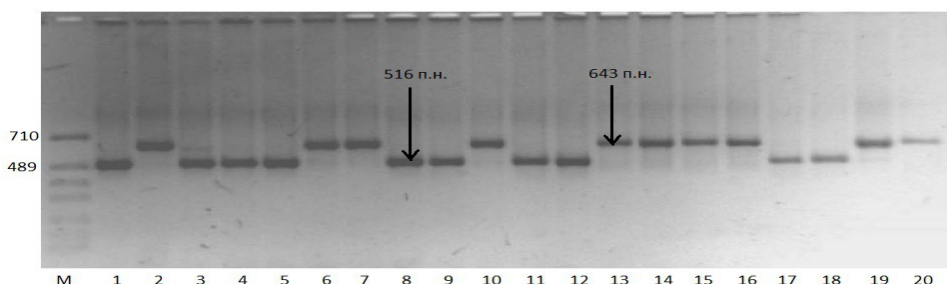


Рис. 5.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гетерогенного сорту ярого ячменю Олбрам пивоварного напрямку використання (50% алелів низькоактивної β -амілази). М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*; 1-20 - ПЛР-продукти ДНК ячменю сорту Олбрам

Із загальної кількості аналізованих сортів ярого ячменю 61 був пивоварного напрямку використання. При оцінці внутрішньосортової гетерогенності за локусом *Bmy1* вибірки пивоварних сортів з'ясувалося, що 36 з них містили від 80 до 100% алелів активної β -амілази - наприклад, сорт Оболонь (рис. 5.5). 10 сортів ярого ячменю пивоварного напрямку взагалі не несли алелів активної β -амілази, тобто проби ПЛР містили тільки одну смугу, відповідну продукту з довжиною 643 п.н., наприклад, сорт Командор (рис. 5.6).

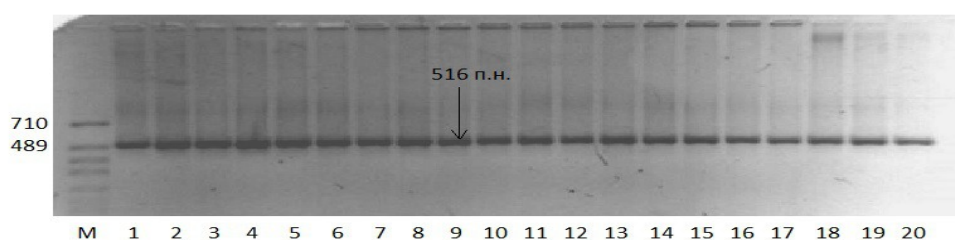


Рис. 5.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гомогенного сорту ярого ячменю Оболонь пивоварного напрямку використання (на 100 % складається з алелів активної β -амілази). М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*; 1-20 - ПЛР-продукти ДНК ячменю сорту Оболонь

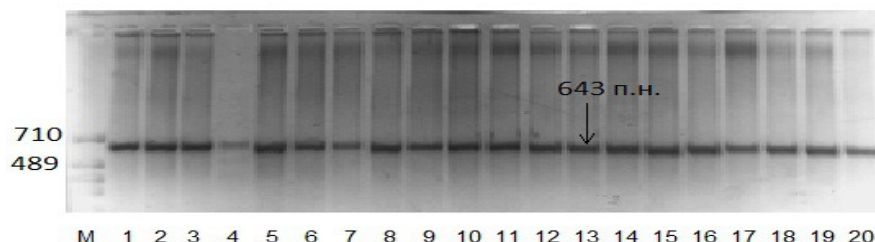


Рис. 5.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК однорідного сорту ярого ячменю Командор пивоварного напрямку використання (на 100% складається з алелей низькоактивної β -амілази). М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*; 1-20 - ПЛР-продукти ДНК ячменю сорту Командор

Від загальної кількості сортів ярого ячменю, які згідно з реєстром мають пивоварний напрям використання, 81 сорт був української селекції, з них 39 сортів пивоварного напрямку використання. З цих 39 пивоварних сортів у 22 сортів (56%) детектовано від 85 до 100% алелів активної β -амілази з розміром ПЛР-фрагмента 516 п.н.

У 45 сортів ярого ячменю, заявлених у реєстрі як зернові і цінні, спостерігалася наступна картина - 19 зернових і цінних сортів ячменю мали різні алелі β -амілазного гена, що склало 42%. 26 сортів зернового і цінного напрямку були моногенними за локусом *Bmy1*, 11 з них несли тільки алелі активної β -амілази (рис. 5.7).

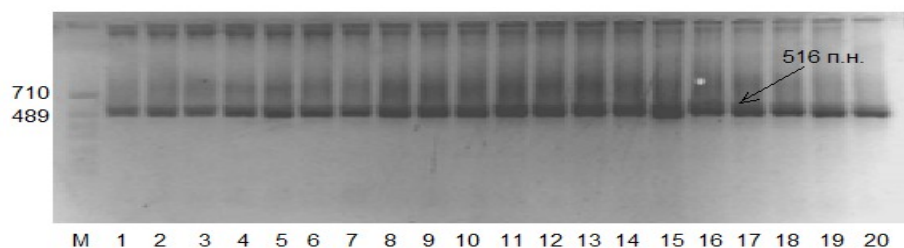


Рис. 5.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гомогенного сорту ярого ячменю Галатея зернового напрямку використання (на 100 % складається з алелів активної β -амілази). М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*; 1-20 - ПЛР-продукти ДНК ячменю сорту Галатея

Вважається, що стародавні сорти та місцеві форми сільськогосподарських рослин у результаті тривалого природного і штучного відбору краще за інших пристосовані до локальних умов зростання і

відрізняються оптимальною для даної місцевості довжиною вегетаційного періоду. Вивчення місцевих сортів важливо для отримання уявлення про основні характеристики аборигенного матеріалу. 52 сорти ярого ячменю від загальної вибірки є сортами одеської селекції, створеними в період з 1931 по 2010 роки. З них 24 сорти мали пивоварний напрямок використання і за характеристикою локусу *Bmy1* розподілилися в наступному порядку: 15 сортів містили від 85 до 100% алелів активної β -амілази і 9 сортів мали від 95 до 100% алелів низькоактивного ферменту.

На нашу думку, даний алель-специфічний ПЛР-маркер, що дозволяє характеризувати сорти ячменю пивоварного напрямку за активністю β -амілази, можливо використовувати в селекційних програмах в якості одного з додаткових тестів за таким параметром пивоварності, як диастатична сила щодо підвищення солодових властивостей ячменю за цією ознакою.

5.2.2. Аналіз алельного стану гену *Bmy1* у сортів озимого ячменю. У табл. 5.3 наведено результати оцінки внутрісорткової гетерогенності за локусом *Bmy1* у 24 сортів озимого ячменю української та іноземної селекції, що зареєстровані в 1958 - 2001 роках. Досліджені сорти озимого ячменю мали зерновий напрям використання.

Таблиця 5.3

Характеристика варіабельності сортів озимого ячменю за геном *Bmy1*

№	Назва сорту	Рік реєстрації	Напрямок використання	Детектовані алелі	Наявність алелю активної β -амілази, %
1	2	3	4	5	6
1	Аванс	2001	зерновий	643	0
2	Бемір 2	1987	зерновий	643	0
3	Буран	1993	зерновий	643	0

Продовження табл. 5.3

1	2	3	4	5	6
4	Вавілон	1991	зерновий	643	0

5	Козир	2001	зерновий	643	0
6	Кромоз	1999	зерновий	643	0
7	Манас	1995	зерновий	643	0
8	Миронівський 87	1995	зерновий	643	0
9	Михайло	2001	зерновий	643	0
10	Одеський 17	1958	зерновий	643	0
11	Одеський 31	1976	зерновий	643	0
12	Одеський 165	1995	зерновий	643	0
13	Одеський 167	1997	зерновий	643	0
14	Одеський 170	1999	зерновий	643	0
15	Оксамит	-	зерновий	643	0
16	Онега	1999	зерновий	643	0
17	Основа	1994	зерновий	643	0
18	Палідум 77	1999	зерновий	643	0
19	Радон	1994	зерновий	643	0
20	Секрет	2001	зерновий	643	0
21	Скороход	1994	зерновий	516, 643	95
22	Тайна	1993	зерновий	643	0
23	Тамань	1995	зерновий	643	0
24	Циклон	1983	зерновий	643	0

Аналіз даних показав, що сорт Скороход на 95% складався з алелів активної β -амілази (ПЛР-фрагмент з розміром 516 п.н.). Всі інші сорти були однорідними за даним локусом і склалися лише з алелів низькоактивної β -амілази (рис. 5.8).

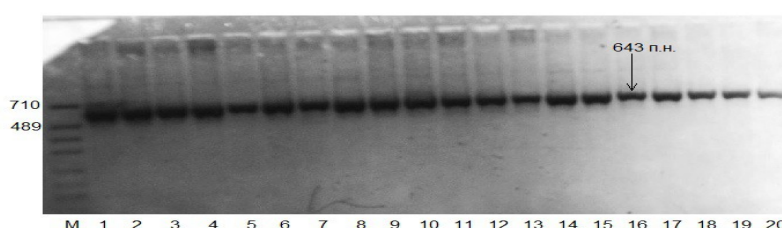


Рис. 5.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гомогенного сорту озимого ячменю Одеський 170 зернового напрямку використання (на 100 % складається з алелів низькоактивної β -амілази). М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*; 1-20 - ПЛР-продукти ДНК ячменю сорту Одеський 170

Тобто, досліджена вибірка сортів озимого ячменю на 96% складалася з алелів з розміром ПЛР-фрагмента 643 п.н. Алель високоактивної β -амілази з

розміром ПЛР-фрагмента 477 п.н. у дослідженій вибірці сортів озимого ячменю не виявлено (табл. 5.3). Із загальної кількості, що беруть участь в аналізі озимих сортів, 16 були створені в Україні і виявилися моногенними за локусом *Bmy1*.

5.2.3. Аналіз алельного стану гену *Bmy1* у представників дикорослих видів ячменю. Дослідження гена *Bmy1* у дикорослих видів *Hordeum*

показало, що чотири форми *Hordeum* були однорідні та на 100 % склалися з алелів активної β -амілази (ПЛР-фрагмент розміром 516 п.н.). *H. spontaneum* (Ізраїль, Негев) був гетерогенним та різнився за двома продуктами ампліфікації - ПЛР-фрагментами розміром 516 и 643 п.н. Різновид *H. spontaneum* (Ізраїль, Іудея) на 100 % складався з алелів високоактивної β -амілази з відповідним ПЛР-фрагментом довжиною 477 п.н. (табл. 5.4, рис. 5.9).

Таблиця 5.4

Характеристика варіабельності дикорослих різновидів роду *Hordeum* за геном *Bmy1*

Назва різновиду	Походження	Детектовані алелі	Наявність алелю активної β -амілази, %
<i>H. marinum</i>	Крим	516	100
<i>H. spontaneum</i>	Південний Дагестан	516	100
<i>H. spontaneum</i>	Ізраїль	516, 643	70
<i>H. bulbosum</i> 2n=28	Крим	516	100
<i>H. bulbosum</i>	Одеса	516	100
<i>H. spontaneum</i>	Ізраїль	477	100

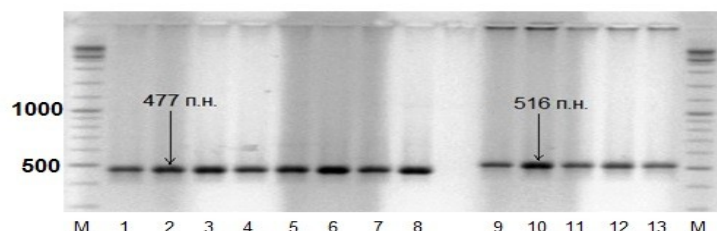


Рис. 5.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК дикорослих різновидів ячменю *H. spontaneum* (Ізраїль) та *H. bulbosum* (Україна). М – DNA-ladder #SM0331; 1 - 8 - ПЛР-продукти ДНК *H. spontaneum*, 9 - 13 - ПЛР-продукти ДНК *H. bulbosum*

Таким чином, за допомогою ПЛР-аналізу зі специфічними до ділянки інтрона 3 праймерами, виявлено низький рівень генетичної мінливості серед аналізованих дикорослих сородичів ячменю – ідентифіковано лише три алелі гена *Bmy1*.

5.2.4. Аналіз асоціацій між алельним поліморфізмом гена *Bmy1* та ізоформами білку β -амілази. Аналіз асоціацій здійснювали шляхом порівняння результатів вивчення генетичного поліморфізму методом ПЛР із алель-специфічними праймерами до гену *Bmy1* з характеристиками ізоформ β -амілази, отриманими за результатами електрофорезу в поліакриламідному гелі (люб'язно наданими д.б.н. В.П. Нецветаєвим (Білгородський НДІ сільського господарства, РФ)). Ізоформи β -амілази, позначені як ВМУ1Аг та ВМУ1Вг – електрофоретичні типи ферменту β -амілази виявлені у сортів культурного ячменю [111, 144, 145], зіставляли з алелями гена *Bmy1*, виявленими за допомогою інтрон 3-специфічних праймерів Mes16g и r20 у цих же сортів. У дослідженій вибірці спостерігали достовірну кореляцію (коефіцієнт кореляції, $r = 0.85$) між алелем ізоферменту β -амілази і 126 п.н. МІТЕ-вставкою в інтроні 3 гена *Bmy1*. ПЛР-алелі, асоційовані з активною β -амілазою (МІТЕ-вставка відсутня) відповідали ізоферменту ВМУ1Аг, а ПЛР-алелі, асоційовані з низькоактивною β -амілазою (МІТЕ-вставка присутня) - ізоферменту ВМУ1Вг. У 8 сортів (20% випадків) спостерігалися виключення з загальної схеми - у табл. 5.5 вони виділені червоним кольором. Ймовірна причина цих відхилень може полягати в рівні генетичної чистоти сортових колекцій. Так, серед даних В.П. Нецветаєва присутні сорти, у яких виявлено

розбіжності в алелях β -амілази в залежності від колекцій, з яких ці сорти відбуваються (у табл. 5.5 - сорт Роланд).

За літературними даними в культурі ярого ячменю в цілому спостерігалось невелика перевага варіанта ВМУ1Вr (57,8% аналізованої вибірки) над ВМУ1Ar (40,5%). Ізоензим ВМУ1Al зустрічався лише у 1,7% сортів. У озимій культурі ВМУ1Вr має значно більше поширення (89,4% сортів). Відповідно, зустрічальність сортів з ізоензимами ВМУ1Ar - 9,2%, ВМУ1Al - 1,4% [144]. У зимотипа ВМУ1Вr виявлено кореляцію з високим рівнем амілолітичної активності солоду [144], а також показано, що даний алель білку переважає в сортах з південних регіонів Євро-Азіатського регіону [111].

Таблиця 5.5

Відповідності двох систем ідентифікації алелів β -амілази

в сортах ярого ячменю

№	Назва сорту	Напрямок використання	Ізофермент*	Алель гена (п.н.)
1	2	3	4	5
1	Адапт	зерновий	Ar	516
2	Амулет	пивоварний	Ar+Br	516+643
3	Вінницький 7	пивоварний	Ar	516
4	Дерібас	цінний	Br	643
5	Донецький 6	цінний	Br	643
6	Донецький 8	цінний	Br	643
7	Донецький 9	цінний	Br	643
8	Донецький 650	цінний	Br	643
9	Едем	пивоварний	Ar	516
10	Еней 1	цінний	Ar	643
11	Маресі	пивоварний	Ar	516
12	Медикум 46	цінний	Br	643
13	Надія	пивоварний	Ar+Br	516
14	Незалежний	пивоварний	Br	643

Продовження табл. 5.5

1	2	3	4	5
15	Носовський 9	пивоварний	Br	516
16	Нутанс 244	пивоварний	Br	643

17	Нутанс 518	пивоварний	Br	643
18	Нутанс 778	цінний	Br	643
19	Одеський 9	цінний	Ar	516
20	Одеський 14	цінний	Br	516+643
21	Одеський 18	цінний	Ar	516+643
22	Одеський 36 (68)	зерновий	Br	643
23	Одеський 69	зерновий	Br	643
24	Одеський 82	зерновий	Ar	516
25	Одеський 100	пивоварний	Ar+Br	516
26	Одеський 115	пивоварний	Ar	516
27	Одеський 131	цінний	Ar	516
28	Одеський 151	цінний	Br	643
29	Паллідум 107	зерновий	Br	643
30	Переможний	зерновий	Ar	516
31	Прерія	зерновий	Br	643
32	Роланд	пивоварний	Ar (Br)	516
33	Романтик	пивоварний	Br	516
34	Рось	пивоварний	Br	643
35	Славутич	цінний	Br	643
36	Сталкер	зерновий	Ar	516
37	Тайфун	цінний	Ar	516
38	Харківський 60	зерновий	Br	643
39	Чорноморець	цінний	Br	516+643
40	Южний	зерновий	Ar	516

Примітки: * - за результатами, отриманими А.С. Чаплею [111]

Амілолітична активність солоду залежить від багатьох генетичних факторів, які знаходяться не менш, як у п'яти хромосомах геному ячменю. Даний параметр включає показники активності чотирьох основних амілолітичних ферментів, включаючи β -амілазу (загальну та ендоспермальну) [60]. Наше дослідження обмежувалося ділянкою інтрона 3 гена *Bmy1*, відмінності у будові якої, за літературними даними, пов'язані безпосередньо з активністю ендоспермальної β -амілази (найважливішої у період проростання зерна ячменю) [118, 121, 127, 138, 139, 146].

З отриманих даних видно, що алель гена *Bmy1* з розміром ПЛР-фрагмента 516 п.н. (126 п.н. МІТЕ-елемент інтрона 3 відсутній), властивий активній β -амілазі, в більшості випадків корелював з ізоферментом *ВМУ1Ar*

(низька амілолітична активність солоду та поширення в північних регіонах Євро-Азіатського регіону), а алель гена *Bmy1* з розміром ПЛР-фрагмента 643 п.н. (126 п.н. МІТЕ-елемент інтрона 3 присутній) - з ізоферментом ВМУ1Вr, властивий сортам з високою амілолітичною активністю солоду і переважає в сортах південних регіонів Євро-Азіатського регіону). Проведений нами аналіз розподілу частот алелів гена ендоспермальної β-амілази на території Євро-Азіатського регіону свідчить про те, що на території Північно-Європейської частини і Балтійського регіону (вважалися зонами вирощування пивоварного ячменю) значно переважають сорти ячменю, що містять алелі *Bmy1*, у яких немає 126 п.н. МІТЕ-елемента інтрона 3 (516 п. н. алель - ознака активної β-амілази). Також, згідно з даними ПЛР-аналізу *Bmy1*, 90% сортів озимого ячменю з аналізованої вибірки склалися з алелів, що несли 126 п.н. вставку, у зв'язку з наявністю якої, відзначений низький рівень активності β-амілази (643 п.н. алель). В той же час, в літературних джерелах [144] показано, що в озимій культурі найбільш поширений алель ВМУ1Вr (висока амілолітична активність солоду).

Таким чином, проаналізовано відповідність поліморфізму, виявленого при електрофорезі ізоферментів β-амілази і генетичного поліморфізму локусу *Bmy1*, який виявляється за допомогою алель-специфічних праймерів. Використання ДНК-технологій дає можливість працювати з самим носієм спадкової інформації - в нашому випадку конкретно з геном *Bmy1*, який кодує ендоспермальну β-амілазу, відповідно є ефективним інструментом для маркування ознаки активності даного ферменту. Послідовності, що кодують первинну структуру білків, безпосередньо пов'язані з фенотипом і не є селективно нейтральними з точки зору відбору.

Результати розділу висвітлено у публікаціях [179 - 187].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Одним із суттєвих досягнень молекулярної генетики в сучасному рослинництві є ідентифікація сортів і характеристика алельного стану генів, що кодують господарсько цінні ознаки. Дослідження ознак якості зерна на молекулярному рівні має велике значення для підвищення ефективності технологічних процесів переробки продукції, зокрема, при виготовленні солоду і пива. Раніше визначення сортів злаків базувалося на аналізі морфологічних ознак, доповнених характеристикою біохімічних показників ізоензимів і запасних білків. В даний час генетичні дослідження можуть не тільки контролювати спадкування окремих генів, але і вивчати їх функціональну роль з метою цілеспрямованого формування ознак якості зерна з характеристиками, необхідними для селекції та переробки зерна. У функціональній геноміці - одному з найважливіших розділів сучасної генетики - використовуються технології, які базуються на застосуванні молекулярних генетичних маркерів, що генеруються в результаті полімеразної ланцюгової реакції. Маркування господарсько важливих генів, вивчення філогенетичних відносин, ідентифікація геномів і генотипів рослин, побудова генетичних карт, клонування - проблеми, які вирішуються за допомогою молекулярних маркерів.

Нами досліджений новий молекулярний маркер - ядерний ген *Bmy*, що кодує фермент β -амілазу, який є найважливішим з амілолітичних ферментів, що беруть участь у гідролізі крохмалю в процесі проростання зерна. Тільки представники триби *Triticeae* мають дві різні форми β -амілази - ендоспермальну та загальну, що кодуються генами *Bmy1* та *Bmy2*, відповідно. Ген *Bmy1* відповідає за синтез, активність, а також температурну стабільність ендоспермальної β -амілази, які мають важливе значення для солодження, адже максимальна активність β -амілази зберігається до 55 °C і швидко зменшується при підвищенні температури. Для збільшення кількості мальтози, β -амілаза повинна бути активною також і при високих температурах. Таким чином, потрібно контролювати солодові якості зерна

щодо активності β -амілази, яка є спадковою характеристикою. Методи молекулярного маркування можуть надати неоціненну допомогу практичній селекції, значно скоротивши терміни створення нових сортів, коли складність селекційних досліджень пов'язана з тим, що дана ознака не виявляється фенотипово, як у випадку з ознакою активності і термостабільності β -амілази.

Важливим етапом роботи було визначення нуклеотидних послідовностей генів *Bmy* β -амілази та відповідних їм амінокислотних послідовностей у видів родини *Roaceae* і вивчення екзон-інтронних структур генів *Bmy*. Для здійснення сиквенування, а також для проведення подальших досліджень, були сконструйовані (при порівнянні 45 нуклеотидних послідовностей, представлених в базі даних NCBI) та синтезовані специфічні праймери для екзон-праймованої ампліфікації інтронів (EPIC-PCR) генів *Bmy1* та *Bmy2* представників родини *Roaceae* з урахуванням родової і видової специфічності і внутрішньовидової консервативності. Створені EPIC-праймери використовували також для таксономічної характеристики, досліджень внутрішньо- і міжвидового поліморфізму генів β -амілази *Bmy1* і *Bmy2* видів злакових та давали можливість проведення геногеографічного аналізу гена *Bmy1* ячменю. Оскільки праймери мали бути специфічними до групи видів, добір проводили на основі ділянок гена, консервативних в межах обраної групи, але, після проведених подальших досліджень, виявилось, що обрані для відпалу праймерів ділянки екзонів проявляють високу ступінь консервативності не тільки для злаків, а й для представлених у базі даних більш віддалених видів рослин, що демонструє універсальність даної методики.

Отримані послідовності β -амілази є базовим ресурсом геномних досліджень злаків і можуть бути використані при розробці специфічних праймерів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму за генами *Bmy*, при порівняльному картуванні геномів, а також для філогенетичних досліджень рослин. Охарактеризовано особливості екзон-інтронної

організації генів *Bmy* у досліджених видів злаків з використанням відомих нуклеотидних послідовностей β -амілаз у якості зовнішньої групи і показано, що ділянки *Bmy1* і *Bmy2* мають відмінності в довжині і нуклеотидному складі інтронних ділянок, а екзони у аналізованій вибірці злакових висококонсервативні (97,3 – 99,9% гомології). Таким чином, встановлено зв'язок між поліморфізмом інтронів та алельним станом генів *Bmy1* і *Bmy2* β -амілази.

На основі отриманих та існуючих даних про послідовності ДНК *Bmy*, а також амінокислотних послідовностей β -амілаз показані філогенетичні взаємини між близькими і віддаленими видами рослинного царства. В якості потенційного філогенетичного маркера була обрана ділянка генів β -амілази з 1 по 6 екзони (без інтронів) - для порівняння з більш віддаленими видами рослин, при цьому довжина вирівняних послідовностей складала 1280 п.н. Отримана дендрограма поділилася на два кластери. Найбільший з кластерів виявився розділеним на чотири субкластери - один з них склали послідовності гена загальної β -амілази *Bmy2* видів злаків та послідовності гена *Bmy1* виду *Dasypyrum villosum*, а другий - послідовності гена *Bmy2* *H. vulgare*. В проведеному молекулярно-філогенетичному дослідженні спостерігалася безсумнівна близькість злаків *Colpodium* та *Zingeria* (характерні найменшим хромосомним набором ($2n = 4$), до них також долучився вид *Spartina alterniflora* – всі ці види належать до різних триб родини злаків. Цікавим видається положення видів *Bromus sterilis* і *Deschampsia antarctica*, які утворюють окрему кладу - у генів *Bmy2* даних видів, за результатами вирівнювання, найкоротші послідовності інтронів. Третій субкластер утворений *Brachypodium distachyon* (*Bmy2*), *H. vulgare* (*Bmy1*) та *H. spontaneum* (*Bmy1*) і їх найближчим сусідом на філогенетичному дереві, яким виявився *Milium effesum* (*Bmy2*) зі 100% рівнем bootstrap-підтримки. Максимально диференційованими від інших (84,3% гомології) виявилися послідовності генів β -амілаз, використаних в якості зовнішньої групи - *Oryza sativa*, та *Zea mays* з *Sorghum bicolor* - ці види злаків складали

відокремлений субкластер. І, очікувано окремо, *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum* і *Glycine max* з *Lotus japonicus*.

Види, що належать до триби *Triticeae*, аналізували з 1 по 4 екзон (довжина вирівняних послідовностей складала 3050 п.н.). На отриманих дендрограмах виявився поділ 17 використаних в даному аналізі послідовностей в два кластери - перший утворили *Bmy1* - *T. dicoccoides*, *A. speltoides*, *H. vulgare* і *H. spontaneum*, а другий - послідовності *Bmy2* *H. vulgare*. Таке групування генів ендоспермальної і загальної β -амілаз засноване тільки на поліморфізмі інтронних ділянок, так як екзони у досліджуваних ділянок генів мають високий ступінь подібності (99,3% – 99,9%). Виходячи з отриманих даних про еволюційний взаємозв'язок послідовностей генів β -амілаз досліджених видів, загальна β -амілаза, за пропонованим молекулярно-генетичним маркером, достовірно відділяється від ендоспермальної β -амілази, утворюючи окремі еволюційні родоводи, тобто дві β -амілазні форми *Triticeae* виникли внаслідок дуплікації генів. Варіабельність інтронних ділянок дослідженого фрагмента гена, навіть у зразків одного виду, вказує на те, що даний фрагмент можна використовувати в якості молекулярного філогенетичного маркера як на низьких, так і на більш високих таксономічних рівнях.

Для вивчення філогенії β -амілаз віддалених видів з різних класів використані отримані та відомі амінокислотні послідовності. На основі цих даних виведена реконструкція філогенії β -амілаз - родинні відносини між класами однодольних і дводольних відповідають еволюційним зв'язкам між дослідженими видами. Дендрограма, побудована на основі амінокислотних послідовностей β -амілаз різних видів рослин розділилася на два кластери – один склали β -амілази дводольних видів, при цьому окремою групою в даному кластері відстоять β -амілази бобових, другий - β -амілази злаків, які утворили єдиний кластер, проте чітко розділений на дві відокремлені групи - β -амілаз2 (загальна форма ферменту) та β -амілаз1 (ендоспермальна форма).

Таким чином, на основі отриманих даних про ДНК-послідовності, а також амінокислотні послідовності β -амілаз, показані філогенетичні взаємини між родами, родинами, порядками і класами рослин. Філогенетичний аналіз отриманих даних відповідав сучасним уявленням про систематику аналізованих видів. Вивчені ядерні гени *Bmy* перспективні для використання в якості маркера молекулярної ідентифікації при аналізі близьких і віддалених видів рослинного царства.

На прикладі деяких видів злакових досліджених внутрішньо- і міжвидовий поліморфізм генів β -амілази *Bmy1* і *Bmy2*. Аналіз послідовностей цих генів показав, що, будучи вирівняними, ці послідовності мають найбільш варіабельні ділянки у межах з 1 по 4 екзони. В результаті були підібрані праймери для ампліфікації даних фрагментів генів *Bmy* у представників сімейства *Poaceae*. Показана можливість застосування отриманих праймерів для аналізу широкого таксономічного діапазону - дані праймери родо- і видоспецифічні, так як комплементарні найбільш консервативним фланкуючим ділянкам ДНК злаків - ексонам. Даний підхід (ЕРІС-ПЛР) ефективний при дослідженні внутрішньо- і міжвидового поліморфізму генів β -амілаз.

Проведено молекулярно-генетичний порівняльний аналіз, який виявив ідентичні за молекулярною масою фрагменти в алельних спектрах вибірки видів *Poaceae*, а також при вивченні поліморфізму таких представників триби *Triticeae*, як двузернянка, егілопс, тритикале та жито. Скринінг колекції видів родини *Poaceae* дозволив отримати первинну інформацію, яка може бути використана для маркерної селекції сортів хлібних злаків.

Для вивчення міжвидової диференціації нами проаналізовано зразки різних видів сімейства *Poaceae*. При дослідженні міжвидового поліморфізму генів *Bmy1* і *Bmy2* даних злаків був показаний досить широкий діапазон генетичної різноманітності за аналізованими генами. В цілому, при використанні розроблених ЕРІС-праймерів, в локусах генів *Bmy1* і *Bmy2* у досліджених вибірці, яка складалася з 38 злакових видів, було виявлено ряд

алельних варіантів: 10 різних алелів для *Bmy1* (від одного до трьох ПЛР-фрагментів на зразок) і чотири алелі *Bmy2* (по одному фрагменту на зразок). Розрахункові розміри ПЛР-фрагментів, отримані за допомогою FastPCR для гена *Bmy1* - 2295 (2169 п.н. - без 126 п.н. інсерції) та для *Bmy2* - 1365 п.н. Такі продукти ампліфікації виявлені у зразків, що містили ДНК культурного ячменю, *H. spontaneum*, *H. murinum*, *Triticum durum*, *Dasypyrum villosum* та *Pseudoroegneria spicata*. Інші зразки мали відмінні від цих розміри ампліфікованої ділянки і варіювали в межах від 1700 до 2500 п.н. для гена *Bmy1*, та від 1300 до 1500 п.н. для гена *Bmy2*. Вид *Bromus sterilis*, що належить до триби *Bromeae*, містив обидва β -амілазні гени - так само, як види з триби *Triticeae*. У зв'язку з цим можна відзначити, що присутність гена ендоспермальної β -амілази є перевагою не тільки представників *Triticeae*, але, можливо, більш широкої таксономічної групи - супертриби *Triticodae*, яка включає в себе триби *Bromeae* и *Triticeae*. Види, що належали до триб *Aveneae*, *Poeae* і *Brachypodieae* містили єдиний ген - загальної β -амілази *Bmy2*.

З метою вивчення біорізноманіття представників триби *Triticeae* та факторів, що його формують, а також у зв'язку з наявністю у цих культур ендоспермальної і загальної форм ферменту, становило інтерес вивчення поліморфізму генів β -амілази у сортів тритикале та жита, а також у ліній дикорослої пшениці двозернянки та різновидів *A. speltoides*, які є найближчими родичами культурної пшениці. Порівняння результатів ПЛР за локусами *Bmy1* та *Bmy2* сортів тритикале з сортами жита, а також ліній *T. dicoccoides* із різновидами *A. speltoides* показало їх еволюційну спорідненість. При порівнянні результатів, виявлено три ПЛР-фрагменти, загальні для всіх чотирьох досліджених видів – це фрагмент з розміром 2295 п.н. (продукт очікуваного розміру для гена *Bmy1*), приблизно 1900 п.н. (входить до спектру алелів *Bmy1*), та 1365 п.н. (асоційований з геном загальної β -амілази *Bmy2*). Більшість різноманітного спектру алелів *Bmy1* тритикале співпадало зі спектром алелів *Bmy1* жита, але як у озимого так

і у ярого тритикале був присутній ПЛР-фрагмент розміром 2000 п.н., відсутній у жита і, ймовірно, отриманий пшенично-житнім гібридом від пшениці, так як присутність даного ПЛР-фрагменту виявлена в аналізованих лініях пшениці двозернянки, а також і у егілопсу.

В ході проведеного дослідження показано, що спектри, одержані при використанні EPIC-методу, інформативні і підходять для оцінки міжвидових відмінностей і встановлення внутрішньовидової варіабельності представників такої обширної таксономічної групи як злаки. Не вдаючись до використання інших праймерів або методів, специфічність отриманих спектрів дає можливість робити попередні висновки про характер спорідненості. Таким чином, геномні дані модельного організму можуть ефективно використовуватися для розробки EPIC-маркерів для видів, які не є модельними. Праймери, специфічні до ділянок екзон 1 - екзон 4 генів β -амілази злаків, виявилися придатними для того, щоб охарактеризувати генетичну різноманітність сімейства *Poaceae*, що в свою чергу дозволило розглядати їх як новий засіб для ідентифікації злаків.

Вважали за необхідне провести аналіз розподілу алелів *Bmy1* у сортів ярого ячменю, районованих на території східноєвропейської та центральноазіатської географічних зон, поділених на сім регіонів вирощування залежно від агрокліматичних умов. Встановлювали закономірності у поширенні алелів даного гена, а також оцінювали генетичну різноманітність, використовуючи колекцію з 249 сортів ярого ячменю. Для ПЛР-аналізу застосовували сконструйовану пару EPIC-праймерів, орієнтованих на ділянку екзон 1 – екзон 6 гена *Bmy1*, і таку ж за розміром ділянку гена *Bmy2* - дані праймери комплементарні висококонсервативним екзонним ділянкам цих генів і використовувалися з метою визначення варіабельних інтронних регіонів. Очікувалося, що аналіз такого протяжного відрізка генів може призвести до виявлення більш широкого генетичного різноманіття виду *H. vulgare* в аналізованій обширній вибірці. В результаті ампліфікації ДНК сортів ячменю дослідженої колекції виявлені два алеля

гена *Bmy1* - з розмірами ПЛР-фрагментів 3278 п.н. і 3152 п.н., тобто досліджені сорти несли алелі *Bmy1* двох типів - з 126 п.н. МІТЕ-вставкою (3278 п.н. алель) і без неї (3152 п.н. алель). Інших алелів в локусі *Bmy1*, в проаналізованій великій ділянці гена, не виявлено. Підтверджено, що відмінність між генотипами ячменю в локусі *Bmy1* пов'язана з 126 п.н. транспозицією МІТЕ-елемента, яку зв'язують з синтезом низькоактивної β -амілази. За локусом *Bmy2* сорти ячменю виявилися однорідними і містили ПЛР-фрагмент довжиною 2260 п.н.

Отримано інформацію про поширення алелів гена *Bmy1* в сортах різних географічних зон - показано, що частота появи алелів *Bmy1* може варіювати досить значно. Можна відзначити, що алель *Bmy1*, асоційований з ознакою активної β -амілази і розміром 3152 п.н. (не несе 126 п.н. МІТЕ-елемента інтрона 3) домінує на ділянках, розташованих на північному заході вивчаємої території, що узгоджується з даними про ґрунтово-кліматичні умови Північно-Європейської частини, як найбільш оптимальні для вирощування пивоварних сортів ячменю. При зміщенні до регіонів, розташованих на південному сході, частота алеля *Bmy1*, асоційованого з ознакою активної β -амілази, зменшується, а асоційованого з ознакою низькоактивної β -амілази - збільшується. З'ясувалося, що географічний розподіл алелів *Bmy1* залежить від показників забезпеченості теплом регіонів, в яких районовані досліджені сорти: показано перевагу частот варіанту, асоційованого з активною β -амілазою (126 п.н. МІТЕ-елемент відсутній), у регіонах з низькою і середньою забезпеченістю теплом. Таким чином, ЕРІС-праймери до генів *Bmy*, використані в цьому дослідженні, дозволили провести моніторинг сортів, зібраних в різних кліматичних зонах, за локусом ендоспермальної β -амілази і встановити взаємозв'язок генетичної різноманітності з адаптивністю.

Загальновизнано, що найбільш перспективні системи маркування селекційного матеріалу засновані на оцінці поліморфізму ДНК. За допомогою специфічних праймерів Mes16g і r20, заснованих на відмінностях в будові ділянки інтрона 3 гена *Bmy1* (126 п.н. МІТЕ-

вставка), проведено дослідження 130 сортів ячменю та шести дикорослих різновидів *Hordeum*. Використання праймерів Mes16g і r20 дозволило ідентифікувати три алелі β -амілазного гена з притаманними їм ПЛР-продуктами: 1) присутня 126 п.н. вставка (643 п.н.); 2) відсутня 126 п.н. вставка (516 п.н.); 3) відсутня 126 п.н. МІТЕ-вставка і присутня 39 п.н. делеція (477 п.н.). Дані алелі зв'язують з низькоактивною, активною та високоактивною β -амілазою, відповідно.

Аналіз сортів ярого ячменю виявив, що сорти пивоварного напрямку використання містили від 50 до 100% алелів неактивної β -амілази, а сорти зернового напрямку містили ПЛР-фрагменти, зв'язані з ознакою високої активності β -амілази. З проаналізованих 106 сортів ярого ячменю, 81 сорт був української селекції, з яких 39 сортів пивоварного напрямку використання. У 22 пивоварних сортів (56%) детектовано від 85 до 100% алелів активної β -амілази з розміром ПЛР-фрагменту 516 п.н. Таким чином, у більшості досліджених українських пивоварних сортів ячменю виявили наявність алелю активного ферменту. Досліджена вибірка сортів озимого ячменю (всі сорти зернового напрямку використання) на 96% складалася з алелів низькоактивної β -амілази. ПЛР-аналіз гену *Bmy1* дикорослих видів *Hordeum* показав у них наявність алелів активної та низькоактивної β -амілази (516 п.н. та 643 п.н.), але різновид *H. spontaneum* PI 296897 (Ізраїль, Іудея) на 100% складався з алелів високоактивної β -амілази з відповідним ПЛР-фрагментом довжиною 477 п.н. Таким чином, за допомогою даних молекулярних маркерів легко ідентифікувати варіанти активної / низькоактивної β -амілази в зерні ячменю, і вони можуть бути використані в якості MAS.

Порівнювали результати вивчення генетичного поліморфізму β -амілази двома методами ідентифікації алелів - електрофорезу продуктів ПЛР з алель-специфічними праймерами до гену *Bmy1* и електрофорезу білка β -амілази в поліакриламідному гелі. У дослідженій вибірці з 40 сортів ярого ячменю спостерігали достовірну кореляцію (коефіцієнт кореляції $r = 0.85$) між ізоферментом β -амілази і 126 п.н. МІТЕ-вставкою в інтроні 3 гена *Bmy1*.

Встановлені наступні відповідності: у сортів, які несли ізофермент ВМУ1Аг виявлений алель гена *Bmy1*, відповідний активній β -амілазі, а у сортів, що мали ізофермент ВМУ1Вг - алель *Bmy1*, відповідний неактивній β -амілазі - за виключенням восьми сортів (20 % випадків). Ймовірна причина цих відхилень може полягати в рівні генетичної чистоти сортових колекцій. Так, з отриманих даних видно, що алель гена *Bmy1* з розміром ПЛР-фрагмента 516 п.н., властивий активній β -амілазі та який, за результатами геногеографічного дослідження, значно переважає в сортах ячменю, розповсюджених на території Північно-Європейської частини і Балтійського регіону (зони вирощування пивоварного ячменю), в більшості випадків корелював з ізоферментом ВМУ1Аг (сорта, що його несуть, мають низьку амілолітичну активність солоду та поширені в північних регіонах Євро-Азіатського регіону). Алель гена *Bmy1* з розміром ПЛР-фрагмента 643 п.н., властивий низькоактивній β -амілазі та поширений в сортах південних і східних областей, а також притаманний більшості сортів озимого ячменю - з ізоферментом ВМУ1Вг (висока амілолітична активність солоду і переважає в сортах з південних регіонів Євро-Азіатського регіону). Використаний при даному аналізі ДНК-маркер (сконструйований за результатами сиквенування нуклеотидної послідовності) дає більш детальну оцінку, стосовно безпосередньо ендоспермальної β -амілази.

У проведеній роботі вперше визначені нуклеотидні послідовності фрагментів генів β -амілази *Bmy1* та *Bmy2* у 21 виду з родини злаків. На основі даних нуклеотидного сиквенування генів *Bmy* і вирівнювання отриманих послідовностей з'ясована природа поліморфізму їх алелів – майже всі відмінності знаходилися в інтронних ділянках. Подальший філогенетичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів ендоспермальної та загальної β -амілази дозволив оцінити ступінь еволюційних зв'язків між генами *Bmy1* та *Bmy2*. Створена система ЕРІС-праймерів для вивчення поліморфізму за генами *Bmy*. Проведений молекулярно-генетичний аналіз генів *Bmy1* та *Bmy2* дозволив виявити внутрішньовидову генетичну різноманітність у

досліджених видів і тим самим може сприяти відбору генотипів таким чином, щоб домагатися потрібної активності β -амілаз злаків в кожному конкретному випадку. Дослідження генів β -амілази у дикорослих і близькоспоріднених видів злаків сприяють всебічному вивченню генетичного різноманіття, як в межах конкретного виду, так і в подальшому для спрямованого трансгенезу або віддаленій гібридизації для інтрогресії в культурні злаки генів, що забезпечують високий рівень активності ферменту в зерні злаків.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень істотно доповнено інформацію про нуклеотидні та амінокислотні послідовності β -амілаз представників родини *Poaceae*, показано їх філогенетичні відносини, проведено молекулярно-генетичне дослідження генів *Bmy* у представників родини *Poaceae*, досліджений географічний розподіл алелів гена *Bmy1* у сортах ячменю різного походження, ідентифіковано алелі *Bmy1* у сортах ярого та озимого ячменю української та зарубіжної селекції. Результати виконаних досліджень відповідають поставленим завданням і дозволяють зробити висновки:

1. Вперше визначено нуклеотидні послідовності (і отримані відповідні амінокислотні послідовності) фрагментів генів *Bmy1* і *Bmy2* β -амілаз у 21 виду злаків. При аналізі нуклеотидних послідовностей генів *Bmy* встановлено зв'язок поліморфізму інтронів з алельним станом генів β -амілази.

2. На основі нуклеотидних послідовностей β -амілаз злаків сконструйовані праймери, використані для сиквенування, одночасного вивчення генетичного різноманіття на внутрішньо- та міжвидовому рівні, показана можливість використання запропонованих ділянок генів *Bmy* в якості філогенетичних маркерів.

3. Встановлено філогенетичні взаємини видів рослин різних родів, родин, порядків і класів, на основі порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей β -амілаз. Кластеризація досліджених видів узгоджується з сучасними ботанічними класифікаціями. Підтверджено відокремлення ендоспермальної β -амілази злаків від загальної та виділення її в окремий кластер, засноване виключно на поліморфізмі інтронних ділянок.

4. Проведено оцінку міжвидової та внутрішньовидової варіабельності 37 видів *Poaceae* і представників триби *Triticeae* (двузернянка, егілопс, тритикале, жито) за допомогою розроблених EPIC (exon-primed intron-crossing)-маркерів, що дозволило отримати інформацію про алельний склад генів *Bmy*.

5. Отримано інформацію про поширення алелів гена *Bmy1* ярого ячменю в різних географічних зонах на території східноєвропейських та

центральноазіатських країн. 249 сортів дослідженої колекції містили алелі *Bmy1* двох типів: з 126 п.н. MITE-вставкою (3278 п.н. алель) і без неї (3152 п.н. алель), з частотою зустрічальності 32% та 68%, відповідно. Показано значну перевагу 3152 п.н. алелю в регіонах з низькою і нижче середнього забезпеченістю теплом – таким чином встановлено взаємозв'язок генетичної різноманітності з адаптивністю.

6. Вперше одержано алельні характеристики сортів ячменю за геном *Bmy1*. Виявлено низький рівень поліморфізму ячменю за даним геном – тільки два алелі гена ендоспермальної β -амілази: 516 п.н. алель (асоційований з активною β -амілазою) та 643 п.н. алель (асоційований з низькоактивним ферментом). У більшості досліджених українських пивоварних сортів ярого ячменю виявили наявність активного ферменту. Сорти озимого ячменю на 96% були носіями алелів низькоактивної β -амілази. Система ідентифікації сортів ячменю за геном *Bmy1* дає можливість оцінки вихідного селекційного матеріалу на наявність певного алеля гена β -амілази.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Визначені та депоновані в GenBank послідовності генів *Bmy1* і *Bmy2* 21 виду *Poaceae* (міжнародний рівень впровадження) є базовим ресурсом геномних досліджень злаків та можуть бути використані при розробці

специфічних праймерів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму за даними генами, при порівняльному картуванні геномів, а також для філогенетичних досліджень рослин.

Сконструйовані специфічні оригінальні олігонуклеотидні праймери можуть бути використані для визначення нуклеотидних послідовностей β -амілаз злаків, проведення генетичної характеристики сортів і видів за генами *Bmy1* і *Bmy2* і рекомендуються для практичного застосування в генетико-селекційних дослідженнях.

Отримані маркери рекомендуються для оцінки алельного стану гена *Bmy1* β -амілази при створенні сортів ячменю з ферментом певної активності.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сиволап Ю.М. Геном рослин і «молекулярна селекція» / Ю.М. Сиволап // Селекція і насінництво. - 2008. – В. 96. - С. 34-42.

2. Andersen J.R. Functional markers in plants / J.R. Andersen, T. Lübberstedt // Trends in Plant Sciences. – 2003. – Vol. 8. – P. 554-560.
3. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat / J.B. Holland, S.J. Helland, N. Sharopova, D.C. Rhyne // Genome. – 2001. – Vol. 44. – P. 1065–1076.
4. Сиволап Ю.М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю.М. Сиволап, Н.Э. Кожухова, Р.Н. Календарь // О. : Астропринт. - 2011. - 336 с.
5. Сиволап Ю.М. Мікроеволюція геному і селекція рослин. Фактори експериментальної еволюції організмів / Ю.М. Сиволап // Київ: Логос. – 2009. - Т. 6. - С. 65-69.
6. Мухина Ж.М. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно-генетических исследованиях [Электронный ресурс] / Ж.М. Мухина // Научный журнал КубГАУ. Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2011/03/pdf/19.pdf>. - 2011. - № 66 (02).
7. Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. - № 4. - С. 757-768.
8. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А.А. Банникова // Журнал общей биологии. – 2004. – Т. 65. - № 4. – С. 278-305.
9. Календарь Р.Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. - № 4. – С. 279-296.
10. Morello L. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste / L. Morello, D. Breviario // Curr Genomics. – 2008. – Vol. 9 (4). - P. 227–238.
11. Doolittle W.F. Genes in pieces: were they ever together? / W.F. Doolittle // Nature. - 1978. – Vol. 272. – P. 581-582.

12. Cavalier-Smith T. Selfish DNA and the origin of introns / T. Cavalier-Smith // *Nature*. - 1985.- Vol. 315. – P. 283-284.
13. PIP: a database of potential intron polymorphism markers / L. Yang, G. Jin, X. Zhao [et al.] // *Bioinformatics*. – 2007. - Vol. 23, I. 16. – P. 2174- 2177.
14. Ludwig M.Z. Functional evolution of noncoding DNA / M.Z. Ludwig // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2002. – Vol. 12. – P. 634–639.
15. A comparative genomics strategy for targeted discovery of single-nucleotide polymorphisms and conserved-noncoding sequences in orphan crops / F.A. Feltus, H.P. Singh, H.C. Lohithaswa [et al.] // *Plant Physiol.* – 2006. – Vol. 140. - P. 1183-1191.
16. Sawyer S.A. Population genetics of polymorphism and divergence / S.A. Sawyer, D.L. Hartl // *Genetics*. – 1992. – Vol. 132. – P. 1161–1176.
17. Hudson R.R. Levels of DNA polymorphism and divergence yield important insights into evolutionary processes / R.R. Hudson // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – Vol. 90. – P. 7425–7426.
18. Prychitko T. Alignment and phylogenetic analysis of b fibrinogen intron 7 sequences among avian orders reveal conserved regions within the intron / T. Prychitko, W. Moore // *Mol. Biol. Evol.* - 2003. - Vol. 20. - P. 762-771.
19. Rogozin I.B. Protein-coding segments: evolution of exon-intron gene structure / I.B. Rogozin // [Published Online]: 2009 - Режим доступа: https://www.google.com.ua/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.els.net%2FWileyCDA%2FElsArticle%2FrefId-a0000887.html&ei=KvBdVaX9BYqcsGGBx4CIBQ&usg=AFQjCNFEIEZblV5SkXtNLm4cAuQZJzKy_Q&sig2=tfHFBQFJbtrlvaaUSzvh9Q
20. Эволюция геномов эукариот и принцип максимальной парсимонии / И.Б. Рогозин, Ю.И. Вульф, В.Н. Бабенко, Е.В. Кунин // *Вестник ВОГиС*. - 2005. - Т. 9, № 2. - С. 141-152.

21. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR / N. Bierne, S.A. Lehnert, E. Bédier [et al.] // *Molecular Ecology*. – 2000. – Vol. 9, I. 2. – P. 233–235.
22. Антонов А.С. Геносистематика растений / А.С. Антонов. – Москва: ИКЦ «Академкнига». – 2006. – 293 с.
23. Single-nucleotide polymorphisms and insertion–deletions for genetic markers and anchoring the maize fingerprint contig physical map / I.V. Bi, M.D. McMullen, H. Sanchez-Villeda [et al.] // *Crop Sci.* – 2006. – Vol. 46. - P. 12–21.
24. cTBP: a successful intron length polymorphisms (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs / L. Braglia, A. Manca, F. Mastromauro, D. Breviario // *Diversity*. – 2010. – Vol. 2. – P. 572–582.
25. Rose A. B. Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing / A. B. Rose, J. A. Beliakoff // *Plant Physiol.* - 2000. - Vol. 122. - P. 535-542.
26. Tissue-preferential expression of a rice alpha-tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron / J.S. Jeon, S. Lee, K.H. Jung [et al.] // *Plant Physiol.* – 2000. - Vol. 123 (3). – P. 1005-1014.
27. Атамбаева Ш.А. Изменения длины интронов и экзонов в генах арабидопсиса, риса, нематоды и человека / Ш.А. Атамбаева, В.А. Хайленко, А.Т. Иващенко // *Молекулярная биология*. – 2008. – Т. 42. – P. 352–362.
28. Fridman E. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene / E. Fridman, T. Pleban, D. Zamir // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2000. – Vol. 97. – P. 4718–4723.
29. Stewart H. Functional intronic polymorphisms: Buried treasure awaiting discovery within our genes / H. Stewart // *Human Genomics*. – 2010. - Vol. 4, № 5. – P. 284–288.
30. Genome-wide prediction of cis-acting RNA elements regulating tissuespecific pre-mRNA alternative splicing / X. Wang, K. Wang, M. Radovich [et al.] // *BMC Genomics* . – 2009. - Vol. 10 (1). - P. S4.

31. Solis A.S Splicing fidelity, enhancers, and disease / A.S. Solis, N. Shariat, J.G Patton // *Front. Biosci.* - 2008. – Vol. 13. - P. 1926–1942.
32. Chetelat R.T. Introgression into tomato (*Lycopersicon esculentum*) of the *L. chmielewskii* sucrose accumulator gene (*sucr*) controlling fruit sugar composition / R.T. Chetelat, J.W. DeVerna, A.B. Bennett // *Theor. Appl. Genet.* – 1995. – Vol. 91. – P. 327-333.
33. Hongtrakul V. DFLP, SSCP, and SSR markers for delta 9-stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines / V. Hongtrakul, M.B. Slabaugh, S.J. Knapp // *Mol. Breed.* - 1998. – Vol. 4. – P. 195–203.
34. Gardes M. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts / M. Gardes, T.D. Bruns // *Molecular Ecology.* - 1993. - Vol. 2 (2). – P. 113–118.
35. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi / C.L. Schoch, K.A. Seifert, S. Huhndorf [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2012. - Vol. 109, N. 16. - P. 6241–6246.
36. Palumbi S.R. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales / S.R. Palumbi, C.S. Baker // *Mol. Biol. Evol.* – 1994. - Vol. 11. - P. 426–435.
37. Lessa E.P. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations / E.P. Lessa // *Mol. Biol. Evol.* - 1992. – Vol. 9(2). - P. 323-330.
38. Li C. Exon-primed intron-crossing (EPIC) markers for non-model teleost fishes / C. Li, J.M. Riethoven, L. Ma // *BMC Evol. Biol.* – 2010. – Vol. 10. - P. 90.
39. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes / G. Ishikawa, J. Yonemaru, M. Saito, T. Nakamura // *BMC Genomics.* – 2007. – Vol. 8. - P. 135.
40. GeMprospector - online design of cross-species genetic marker candidates in legumes and grasses / J. Fredslund, L.H. Madsen, B.K. Hougaard [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2006. - Vol. 34 (Web Server). – W. 670-675.

41. Клонирование и анализ интрон-экзонного участка гена *Viviparous1* у *Thinopyrum intermedium* и *Thinopyrum ponticum* [Электронный ресурс] / М.Г. Дивашук., П.Ю. Крупин, И.А. Фесенко [и др.] // Электронный журнал «Современные проблемы науки и образования». – 2011. - № 4. - Режим доступа: <http://www.science-education.ru/pdf/2011/4/1.pdf>.
42. Сергеева Е.М. Мобильные элементы и эволюция генома растений / Е.М. Сергеева, Е.А. Салина // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2011. - Т. 15 (2). - С. 382-397.
43. Bennetzen J.L. Transposable element contributions to plant genome evolution / J.L. Bennetzen // Plant Mol. Biol. - 2000. - Vol. 42. - P. 251–269.
44. Wessler S.R. LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes / S.R. Wessler, T.E. Bureau, S.E. White // Curr. Opin. Genet. Dev. – 1995. – Vol. 5. – P. 814-821.
45. Bureau T.E. Stowaway: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants / T.E. Bureau, S.R. Wessler // Plant Cell. - 1994. - Vol. 6. - P. 907–916.
46. Iwamoto M. Tourist C transposable elements are closely associated with genes expressed in flowers of rice (*Oryza sativa*) / M. Iwamoto, K. Higo // Mol. Genet. Genomics. - 2003. - Vol. 268 (6). - P. 771–778.
47. Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations / F. Sabot, R. Guyot, T. Wicker [et al.] // Mol. Genet. Genomics. - 2005. - V. 274. - P. 119–130.
48. Bureau T.E. A computerbased systematic survey reveals the predominance of small inverted-repeat elements in wild-type rice genes / T.E. Bureau, P.C. Ronald, S.R. Wessler // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1996. - Vol. 93. - P. 8524–8529.
49. Mason-Gamer R.J. Multiple homoplasious insertions and deletions of a *Triticeae* (*Poaceae*) DNA transposon: A phylogenetic perspective / R.J. Mason-Gamer // BMC Evolutionary Biology. - 2007. - Vol. 7. – P. 92.
50. Zhang Q. Recent, extensive and preferential insertion of members of the miniature inverted-repeat transposable element family Heartbreaker (Hbr) into

- genic regions of maize / Q. Zhang, J. Arbuckle, S.R. Wessler // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2000. - Vol. 97. - P. 1160–1165.
51. Евгеньев М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома / М.Б. Евгеньев // *Молекулярная биология.* – 2007. – Т. 41. - № 2. – С. 234-245.
52. Зеленин А.В. Геном растений / А.В. Зеленин // *Вестник российской академии наук.* – 2003. – Т. 73 (9). - С. 797-806.
53. Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей / Н.П. Гончаров // Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. – 2002. – 251 с.
54. Лоскутов И.Г. Итоги и перспективы исследований мировой коллекции овса, ржи и ячменя / И.Г. Лоскутов, В.Д. Кобылянский, О.Н. Ковалева // *Труды по прикл. бот., ген. и селекции.* – 2007. - Т. 164. - С. 80-100.
55. Bothmer R. Origin, taxonomy, and related species / R. Bothmer, N. Jacobsen // In: *Barley*. Ed. by D. Rasmussen. Wisconsin. - 1985. - P. 19-56.
56. Ильин А.В. Селекция сортов ячменя пивоваренного направления на Краснокутской селекционно-опытной станции / А.В. Ильин. – Саратов, 2011. – 173 с.
57. Трофимовская А.Я. Ячмень. Эволюция, классификация, селекция / А.Я. Трофимовская. - Л., Колос, 1972. – 295 с.
58. Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции / Н.И. Вавилов // М.-Л. - 1935. - С. 41-60.
59. Вавилов П.П. / Под ред. П.П. Вавилова [П.П. Вавилов, В.В. Гриценко, В.С. Кузнецов и др.]. // *Растениеводство.* – М.: Агропромиздат. - 1986. – 512с.
60. Лангер И. Основные принципы селекции пивоваренного ячменя / И. Лангер // [Электронный ресурс]. - 2004. - Режим доступа: www.propivo.ru
61. Щипак Г.В. Технологические свойства зерна сортов озимого тритикале / Г.В. Щипак, К.Ю. Суворова, И.А. Панченко // *Хранение и переработка зерна.* – 2009. - № 6 (120). - С. 37-38.
62. Cereals - food and agriculture organization [Electronic resource]: Definition and classification of commodities (Draft). Cereals and cereal products/ - Access mode <https://www.google.com.ua/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=>

10&cad=rja&uact=8&ved=0CFwQFjAJ&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org
 %2Fes%2Ffaodef
 %2Ffdef01e.htm&ei=vao0VfKND4v4ywOa9YHwAw&usg=AFQjCNGOi5
 glyLwggwNDl4xh8G-LGbxJSrw&bvm=bv.91071109,d.bGQ

63. Briggs D.E. Malts and Malting / D.E. Briggs. - London; New York: Blackie Academic. - 1998. – 824 p.
64. Psota V. Malting quality index / V. Psota, K. Kosař // Kvasný průmysl. - 2002. – Vol. 48. - P. 142–148.
65. Арькова Ж.А. Селекция и генетика ячменя: лекции для самостоятельного изучения / Ж.А. Арькова, А.А. Крюков // Мичуринск – наукоград РФ. – 2008. - 22 с.
66. Технология товаров. Курс лекцій / сост.: М.О. Жесткова. - Волгоград: Волгоградский институт бизнеса, 2008. - 226 с.
67. Duffus C.M. Formation of the barley grain: morphology, physiology and biochemistry / C.M. Duffus, M.P. Cochrane // In AW MacGregor, RS Bhattu, eds, Barley: Chemistry and Technology. – 1993. - P.31-72.
68. Шубенко Н. П. Пиво начинается с сорта / Н. П. Шубенко // [Электронный ресурс]: Зерно. – 2008. - № 1. – Режим доступа: www.zerno-ua.com.
69. Orzechowski S. Starch metabolism in leaves / S. Orzechowski // Acta Biochimica Polonica. - 2008. - Vol. 55, № 3. – P. 435–445.
70. Калунянц К.А. Химия солода и пива / К.А. Калунянц. - М.: Агропромиздат. - 1990. - 176 с.
71. Булгаков Н. И. Биохимия солода и пива / Н. И. Булгаков. - М.: Пищевая промышленность. – 1976. - 358 с.
72. Hough J.S. The biotechnology of malting and brewing / J.S. Hough. - Cambridge University Press. – 1985. – 168 p.
73. Differential expression of two β -amylase genes of rye during seed development / T. Rorat, J. Sadowski, W. Irzokowski [et al.] // Mol Gen Genet. – 1994. – Vol. 244 (6). – P. 563-571.

74. Thiolation and reversible immobilization of sweet potato beta-amylase on thiolsulfonate-agarose / B.M. Brena, K. Ovsejevi, B. Luna, F. Batista-Viera // J. Mol. Catal. – 1993. - Vol. 84, I. 3. - P. 381–390.
75. Differential RNA expression of Bmy1 during barley seed development and the association with b-amylase accumulation, activity, and total protein / M.A. Vinje, D.K. Willis, S.H. Duke, C.A. Henson [et al.] // Plant Physiol Biochem. – 2011. - Vol. 49. – P. 39-45.
76. James M. Starch synthesis in the cereal endosperm / M. James, K. Denyer, A. Myers // Current Opinion in Plant Biol. – 2003. – Vol. 6. – P. 215–222.
77. Identification of a second locus encoding β -amylase on chromosome 2 of barley / M. Kreis, M.S. Williamson, P.R. Shewry [et al.] // Genet Res. – 1988. – Vol. 51. - P. 13-16.
78. Piasecka-Kwiatkowska D. The biological activity of wheat, rye and triticales varieties harvested in four consecutive years / D. Piasecka-Kwiatkowska, D. Madaj, J.R. Warchalewski // Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. - 2007. – Vol. 6 (4). – P. 55-65.
79. Mason-Gamer R.J. The β -amylase genes of grasses and a phylogenetic analysis of the triticeae (*Poaceae*) / R.J. Mason-Gamer // Am. J. Bot. - 2005. - Vol. 92 (6). – P. 1045–1058.
80. Clark S.E. Characterization of barley tissue-ubiquitous-amylase2 and effects of the single nucleotide polymorphisms on the enzyme's thermostability / S.E. Clark, P.M. Hayes, C.A. Henson // Crop Sci. - 2005. – Vol. 45. - P. 1868–1876.
81. Duke S.H. A comparison of barley malt osmolyte concentrations and standard malt quality measurements as indicators of barley malt amylolytic enzyme activities / S.H. Duke, C.A. Henson // J. of the American Society of Brewing Chemists. - 2009. - Vol. 67, No. 4. - P. 206-216.
82. Validation of the *b-amyl* transcription profiling assay and selection of reference genes suited for a RT-qPCR assay in developing barley caryopsis / J. Ovesna, L. Kucera, K. Vaculova [et al.] // [Electronic resource]: – 2012. – Vol. 7, I. 7,| e41886. - access to the magazine: www.plosone.org.

83. The major beta-amylase isoforms of wheat leaves correspond to one of two ubiquitously expressed beta-amylase genes / G. Wagner, L. Zemanova, K-P. Häger, P. Ziegler // *Plant Physiology and Biochemistry*. - 1999. - № 37. - P. 515-530.
84. Differential expression of two β -amylase genes (*Bmy1* and *Bmy2*) in developing and mature barley grain / M.A. Vinje, D.K. Willis, C.A. Henson, S.H. Duke // *Planta*. - 2011. - Vol. 233 (5). - P. 1001-1010.
85. Spatiotemporal profiling of starch biosynthesis and degradation in the developing barley grain / V.V. Radchuk, L. Borisjuk, N. Sreenivasulu [et al.] // *Plant Physiology*. - 2009. - Vol. 150. - P. 190–204.
86. Characterization of a maize β -Amylase cDNA clone and its expression during seed germination / S. M. Wang, W. L. Lue, S. Y. Wu [et al.] // *Plant Physiol.* - 1997. - Vol. 113. - P. 403-409.
87. Lundgard R. [The four major forms of barley beta-amylase. Purification, characterization, and structural relationship](#) / R. Lundgard, B. Svensson // *Carlsberg Res. Commun.* - 1987. - Vol. 52. - p. 313-326.
88. Post-translation modifications of β -amylases during germination of wheat and rye seeds / D. Bureau, C. Laurie, C. Mayer [et al.] // *J. of Plant Physiology*. - 1989. - Vol. 134. - P. 44–50.
89. Buttimer E.T., Briggs D.E. Characterization of solubilized forms of bound β -amylase released by various agents / E.T. Buttimer, D.E. Briggs // *J. Inst. Brew.* - 1998. - Vol. 104. - P. 157-164.
90. Hejgaard J. 'Free' and 'bound' β -amylases during malting of barley: characterization by two-dimensional immunoelectrophoresis / J. Hejgaard // *J. Inst. Brew.* - 1978. - Vol. 84. - P. 43–46.
91. Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала / М.М. Копусь, Н.Г. Игнатьева, Н.Е. Васюшкина [и др.] // *Зерновое хозяйство России* – 2009. - № 4. - С. 23-27.
92. A study of the maize β -amylase system / C. Lauriere, C. Doyen, C. Thevenot, J. Daussant // *Plant Physiol.* - 1992. - № 100. - P. 887-893.

93. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding ubiquitous β -amylase in rye (*Secale cereale* L.) / J. Sadowski, T. Rorat, R. Cooke, M. Delseny // Plant Physiol. –1993. - № 102. – P. 315-316.
94. β -amylase β -amy-*r1*, β -amy-*r2* in rye chromosome / N.V. Kudryakova, V.I. Khoreva, V.D. Kobylyansky [et al.] // Seleksiya rzhi (materialy simpoziuma Eukarpia). – 1990. - P. 120-126, 260-263.
95. Peca R.J. Food uses of triticale / R.J. Peca // Triticale improvement and production. – 2004. – 154 p.
96. Laby R.J. The ram1 mutant of Arabidopsis exhibits severely decreased β -amylase activity / R.J. Laby, D. Kim, S.I. Gibson // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 127. - P. 1798–1807.
97. Grain isozyme and ribosomal DNA variability in *Hordeum spontaneum* populations from Israel / K.J. Chalmers, R. Waugh, J. Watters [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1992. – Vol. 84. - P. 313–322.
98. Comparative enzyme kinetics of two allelic forms of barley (*Hordeum vulgare* L.) beta –amylase / Y. Ma, D.C. Stewart, J.K. Eglinton [et al.] // J. of Cereal Science. – 2000. – Vol. 31 (3). – P. 335-344.
99. McCleary B.V. Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations / B.V. McCleary, R. Codd // Journal of Cereal Science. - 1989. – Vol. 9. – P. 17-33.
100. Santos M.M.M. Optimized McCleary method for measurement of total β -amylase in barley and its applicability / M.M.M. Santos, P. Riis // J. Inst. Brew. – 1996. – Vol. 102. – P.271-275.
101. PCR cloning and sequencing of the β -amylase cDNA from barley / N. Yoshigi, Y. Okada, H. Sahara, S. Koshino // J. Biochem - 1994. – Vol. 115. – P. 47-51.
102. Александрова И.Ф. Влияние гипертермии и экзогенной гибберелловой кислоты на активность амилаз в прорастающих зерновках пшеницы / И.Ф. Александрова, А.А. Веселова, А.С. Лебедева // Биология. Вестник

Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2007. - № 5. - С. 65–67.

103. Дарканбаев Г.Б. Амилазы зерновых и регуляция их активности / Г.Б. Дарканбаев, О.В. Фурсов // Успехи биол. химии. - 1982. - Т. 22. - С. 137–148.

104. Протеолитические ферменты как активаторы β -амилазы белковых тел созревающего зерна пшеницы / Р.К. Каракаева, М.М. Акаева, Р.К. Юсупова, О.В. Фурсов // Физиол. и биохим. культ. растен. - 1991. - Т. 23. (1). - С. 114–118.

105. Comparative assessment of amylolytic and cellulolytic enzyme activity of malts prepared from tropical cereals / N.T. Dziedzoave, A.J. Graffham, A. Westby, G. Komlaga // Food Control. – 2010. – Т. 21. – P. 1349–1353.

106. Жученко А. А. Фундаментальные и прикладные научные приоритеты адаптивной интенсификации растениеводства XXI века / А. А. Жученко. – Саратов. - 2000. – 275 с.

107. Effects of heat and water stress on malting quality and grain parameters of Schooner barley grown cabinets / P.K. McNicol, J.V. Jacobsen, M.M. Keys, I.M. Stuart // Journal of Ceareal Science. – 1993. – Vol. 18. – P. 61-68.

108. Giese H. Influence of nitrogen on nutrition on the amount of hordein, protein Z and beta-amylase messenger RNA in developing endosperms of barley / H. Giese, H.E. Hopp // Carlsberg Research Communications. – 1984. - Vol. 49. - N. 3. - P. 365-383.

109. Determination of barley nitrogen status with chlorophyll meter for high β -amylase in grains / J. Peltonen, A. Vertanen, J. Helenius [et al.] // Agricultural and Food Science. – 1995. - Vol. 4. - N. 5-6. - P. 495-501.

110. Бобков Александр Анатольевич. Влияние агрофона на углеводно-амилазный комплекс пивоваренного ячменя: дис. ... канд. техн. наук: 03.00.04 / Бобков Александр Анатольевич. - Москва, 2008. – 147 с.

111. Чапля Анрій Євгенович. Генетична диференціація культурного ячменю (*Hordeum vulgare* L.) за альтернативними біохімічними ознаками: дис. ...

- канд. біол. наук: 03.00.15 / Чапля Анрій Євгенович.– Київ, 2006. – 235 с. -
Бібліогр.: 164-192.
112. Кунце В. Технология солода и пива / В. Кунце. - СПб.: Профессия, 2001. - 912 с.
113. Kihara M. Genetic variation of β -amylase thermostability among varieties of barley, *Hordeum vulgare* L., and relation to malting quality / M. Kihara, T. Kaneko, K. Ito // Plant Breeding. – 1998. – Vol. 117. – P. 425 – 428.
114. Geographical variation of β -amylase thermostability among varieties of barley (*Hordeum vulgare*) and β -amylase deficiency / M. Kihara, T. Kaneko, K. Ito [et al.] // Plant breeding. – 1999. - Vol. 118. – 5. - P. 453-455.
115. Ahokas H. Thermostabilities of grain β -amylase and β -glucanase in finnish landrace barleys and their putative past adaptedness / H. Ahokas, M. Manninen // Hereditas. – 2000. – Vol. 132. – P. 111 – 118.
116. Eglinton J. K. Thermostability variation in alleles of barley beta-amylase / J.K. Eglinton, P. Langridge, D.E. Evans // J. of Cereal Science. – 1998. – Vol. 28. - P. 301-309.
117. Paris M. Genotyping single nucleotide polymorphisms for selection of barley β -amylase alleles / M. Paris, M.G.K. Jones, J.K. Eglinton // Plant Molecular Biology Reporter. – 2002. – Vol. 20. – P. 149-159.
118. Allele-specific markers and molecular diversity at the Bmy 1 locus determining enzyme thermostability / P. Eckstein, C. Hay, B. Rosnagel [et al.] // Czech Journ. of Genetics and Plant Breeding – 2004. - Vol. 40. - P. 64.
119. Sopanen T. Release and activity of bound β -amylase in a germinating barley grain / T. Sopanen, C. Laurière // Plant Physiol. – 1989. - Vol. 89. – P. 244-249.
120. A structural gene encoding β -amylase of barley / N. Yoshigi, Y. Okada, H. Sahara, T. Tamaki // Biosci Biotechnol Biochem. – 1995. – Vol. 59. – P. 1991-1993.
121. Mikami B. The crystal structure of the sevenfold mutant of barley beta-amylase with increased thermostability at 2.5 Å resolution / B. Mikami, H.J. Yoon, N. Yoshigi // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 285. – P. 1235-1243.

122. Improvement of β -amylase thermostability in transgenic barley seeds and transgene stability in progeny / M. Kihara, Y. Okada, H. Kuroda [et al.] // Molecular breeding. – 2000. – Vol. 6. – N. 5. – P. 511-517.
123. Primary structure and differential expression of β -amylase in normal and mutant barleys / M. Kreis, M. Williamson, B. Buxton [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1987. – Vol. 169. – P. 517-525.
124. Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress / C. Valerio, A. Costa, L. Marri [et al.] // J. Exp. Bot. – 2011. – Vol. 62. – No. 2. – P. 545–555.
125. Mita S. Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in *Arabidopsis thaliana*. / S. Mita, K. Suzuki-Fujii, K. Nakamura // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 107. – P. 895–904.
126. β -Amylase-like proteins function as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development / H. Reinhold, S. Soyk, K. Simkova [et al.] // The Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – P. 1391–1403.
127. Allele-dependent barley grain β -amylase activity / M. Erkkila, R. Leah, H. Ahokas, V. Cameron-Mills // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 117. – P. 679-685.
128. Sjakste T.G. Novel haplotype description and structural background of the eventual functional significance of the barley β -amylase gene intron III rearrangements / T.G. Sjakste, A.F. Zhuk // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 113. – P. 1063-1079.
129. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions / L.N. Van de Lagemaat, J. R. Landry, D. L. Mager, P. Medstrand // Trends Genet. – 2003. – Vol. 19. – P. 530-536.
130. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions / E. Kovalskaya, A. Buzdin, E. Gogvadze [et al.] // Virology. – 2006. – Vol. 346. – P. 373-378.
131. Erkkila Maria. Genetic variation of barley β -amylase gene expressed in grain / Maria Erkkila. - Turku: Turun Yliopisto, 2003. – 53 p.

132. Kaneko T. Genetic analysis of β -amylase thermostability to develop a DNA marker for malt fermentability improvement in barley, *Hordeum vulgare* / T. Kaneko, M. Kihara, K. Ito // Plant Breeding. – 2000. - Vol. 119 (3). – P. 197–201.
133. Erkkilä M. Special barley beta-amylase allele in a Finnish landrace line HA52 with high grain enzyme activity / M. Erkkilä, H. Ahokas // Hereditas. – 2001. – Vol. 134 (1). – P. 91-95.
134. Ahlandsberg S. An intronic element directs endosperm-specific expression of the sbellb gene during barley seed development / S. Ahlandsberg, C. Sun, C. Jansson // Plant Cell Rep. – 2002. – Vol. 20. – P. 864-868.
135. Bremer K. Angiosperm phylogeny group an ordinal classification for the families of flowering plants / K. Bremer, M.W. Chase, P.F. Stevens // Ann Missouri Bot Gard. – 1998. – Vol. 85. - P. 531–553.
136. Human and mouse gene structure: comparative analysis and application to exon prediction / S. Batzoglou, L. Pachter, J.P. Mesirov [et al.] // Genome Res. - 2000. - Vol. 10 (7). - P. 950-958.
137. Потокина Е.К. Прикладные аспекты структурной и функциональной геномики растений (на примере родов *Vicia* L. и *Hordeum* L.): автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра биол. наук: спец. 03.01.15, 03.00.05 «Биологические науки» / Потокина Елена Кирилловна. - Санкт-Петербург, 2008. – 40 с.
138. QTL mapping for enzyme activity and thermostability of β -amylase in barley (*Hordeum vulgare* L.) / T. Kaneko, W. Zhang, H. Takahashi [et al.] // Breeding Science. – 2001. - Vol. 51 (2). – P. 99-105.
139. Gunkel J. Effect of the malting barley variety (*Hordeum vulgare* L.) on fermentability / J. Gunkel, M. Voetz, F. Rath // J. of the institute of brewing. – 2002. – Vol. 108 (3). – P. 355-361.
140. Use of putative QTLs and structural genes in marker assisted selection for diastatic power in malting barley (*Hordeum vulgare* L.) / S.J. Coventry, H.M. Collins, A.R. Barr [et al.] // Aust. J. Agric. Res. - 2003. – V. 54. – P. 1241-1250.

141. Allele mining in crops: Prospects and potentials / G. Ram Kumar, K. Sakthivel, R.M. Sundaram [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2010. – Vol. 28. – I. 4. – P. 451–461.
142. Конарев В. Г. Молекулярно-биологические исследования генофонда культурных растений в ВИРе (1967–2007 гг.) / В. Г. Конарев ; [сост.: В. В. Сидорова, А. В. Конарев] - 2-е изд., доп. - Санкт-Петербург : [б. и.], 2007. - 137 с.
143. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции [Текст] : курс лекций / А.А. Созинов [Отв. ред. Л. И. Корочкин]. - Москва : Наука, 1985. - 272 с.
144. Нецветаев Владимир Павлович. Теоретические основы использования белкового полиморфизма для оптимизации селекционного процесса: дис. ... д-ра. биол. наук: 03.00.15 / Нецветаев Владимир Павлович. - Белгород, 2000. – 363 с.
145. Нецветаев В.П. Расположение α -амилазного локуса (*Bmy 1*) в хромосоме 4 ячменя / В.П. Нецветаев // *Цитология и генетика*. - 1993. - Т. 27. - С.74-78.
146. Ahokas H. Barley β -amylase and β -glucanase activities at germination in *vulgare*-type lines from backcrosses of wild, *spontaneum* strains with cv. Adorra / H. Ahokas, M. Erkkilä // *Agric Sci Finl*. – 1992. – Vol. 1. – P. 339–350.
147. Erkkila M. Intron III-specific markers for screening of β -amylase alleles in barley cultivars / M. Erkkila // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1999. – Vol. 17. – P.139-147.
148. Evolutionary history of wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) analyzed using multilocus sequence data and paleodistribution modeling / S.S. Jakob, D. Rodder, J.O. Engler [et al.] // *Genome Biol. Evol*. – 2014. - Vol. 6(3). – P. 685–702.
149. Полонский В.И. Актуальные проблемы селекции кормового ячменя / В.И. Полонский // [Электронный ресурс] - 2009. - 7 с. - Режим доступа: <http://www.kgau.ru/new/all/konferenc/konferenc/2009/16.doc>

150. Ladizinsky G. Collection of wild cereals in the upper Jordan Valley / G. Ladizinsky // Econ. Bot. - 1975.- [Vol. 29 \(3\)](#). – P. 264-267.
151. Friedman M. Comparison of grain composition and nutritional quality in wild barley (*Hordeum spontaneum*) and in a standard cultivar / M. Friedman, D. Atsmon // J. Agric. Food Chem. – 1988. - Vol. 36 (6). – P. 1167–1172.
152. Zhang W. β -amylase variation in wild barley accessions / W. Zhang, T. Kaneko, K. Takeda // Breed. Science. – 2004. - Vol. 54. – P. 41-49.
153. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Научно-метод. рук-во // [Под ред. Ю.М. Сиволапа.] – К.: Аграрна наука, 1998. - 156 с.
154. http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html
155. <http://primerdigital.com/fastpcr.html>
156. Sanger F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Niclén, A.R. Coulson // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. - 1977. - Vol. 74. - P. 5463–5467.
157. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. М. Сэмбрук. – М. Мир, 1984. – 479 с.
158. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>
160. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, D. Peterson [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739.
161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
162. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction / M.S. Springer, R.W. DeBry, C. Douady [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2001. - Vol. 18 (2). – P. 132–143.

163. Ludwig M. Functional evolution of noncoding DNA / M. Ludwig // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2002. – Vol. 12. – P. 634-639.
164. Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingieria trichopoda* (2n=8) / V. Kotseruba, D. Gernand, A. Meister, A. Houben // *Genome*. – 2003. - Vol. 46(1). – P. 156-163.
165. <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>
166. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of poales / T.J. Givnish, M. Ames, J.R. McNeal [et al.] // *Ann. Missouri Bot. Gard.* – 2010. - Vol. 97. P. 584–616.
167. Quintanar A. Phylogeny of the tribe *Aveneae* (*Pooideae*, *Poaceae*) inferred from plastid *trnT-F* and nuclear ITS sequences / Quintanar A., Astroviejo S., Catalan P. // *Am. J. Bot.* – 2007. - Vol. 94, № 9. – P. 1554–1569.
168. Стратула О.Р. Применение генов β-амилазы в качестве филогенетических маркеров / О.Р. Стратула, В.В. Коцеруба, Р.Н. Календарь // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2014. - № 4. – С. 10-21.
169. Stratula O. Comparative analysis of β-amylase genes at representatives of *Triticeae* tribe and evaluation of their possible use as phylogenetic marker / O. Stratula, R. Kalendar // *Modern Science*. - 2015 - № 2. - С. 160-167.
170. Применение генов β-амилазы в качестве филогенетических маркеров / О.Р. Стратула, Ю.М. Сиволап, В.В. Коцеруба, Р.Н. Календарь // VII Конференция по кариологии, кариосистематике и молекулярной филогении и II Школы-Симпозиума памяти Г.А. Левитского «Хромосомы и эволюция». – Санкт-Петербург, РФ. - 28-30.10.2013 г. - С. 102-104.
171. Стратула О.Р. Применение генов β-амилазы в качестве филогенетических маркеров / О.Р. Стратула, Р.Н. Календарь // VIII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 17-20.03.2015 г., Москва, РФ. - С. 125-128.
172. Peng J.H. Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, occupies a pivotal position in wheat domestication process / J.H. Peng, D. Sun, E. Nevo // *Australian J. Crop Sci.* – 2011. - Vol. 5 (9). – P. 1127-1143.

173. Mujeeb-Kazi A. Transferring alien genes from related species and genera for wheat improvement / A. Mujeeb-Kazi, S. Rajaram // Bread Wheat Improvement and Production, FAO – 2002. - № 30. – P. 199-215.
174. Molecular cytogenetic characterization of a new leaf rolling triticale / E.N. Yang, Z.J. Yang, J.F. Zhang [et al.] // Genetics and Molecular Research. – 2011. - Vol. 10 (4). – P. 2953-2961.
175. Lukaszewski A.J. Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticale / A.J. Lukaszewski // Crop Sci. – 2006. - Vol. 46. - P. 2183-2194.
176. Stratula O. Molecular genetic analysis of cereal β -amylase genes using exon-primed intron-crossing (EPIC) PCR [Електронний ресурс] / O. Stratula, J. Cockram, R. Kalendar // Field and Vegetable Crops Research. – 2014. – Vol. 51(3). – С. 175-189. - Режим доступу: <http://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/1821-3944/2014/1821-39441403175S.pdf>
177. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2004 році // Держ. служба з охорони прав на сорти рослин ; Редкол.: В.В. Волкодав (голов. ред.) та ін. - К. : Алефа, 2004. - 230 с.
178. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2010 році // Держ. служба з охорони прав на сорти рослин ; Редкол.: В.В. Волкодав (голов. ред.) та ін. - К. : Алефа, 2010. - 108 с.
179. Стратула О.Р. Аллельные варианты гена *Bmy1* ячменя в восточноевропейской и центральноазиатской зонах / О.Р. Стратула, Р.Н. Календарь, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика. - 2015. - Т. 49. - № 2. - С. 11-15.
180. Стратула О.Р. Аллельные характеристики гена β -амилазы сортов ячменя Украины / О.Р. Стратула, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика. - 2007. - № 4. - С. 20-25.
181. Стратула О.Р. Распределение аллелей β -амилазы в сортах культурного ячменя / О.Р. Стратула, Ю.М. Сиволап // Збірник наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. – 2006. – Т. 3. – С. 307-310.

182. Создание ДНК-маркеров хозяйственно-ценных генов ячменя на основе ПЦР-анализа / Бальвинская М.С., Ланцман И.В., Стратула О.Р., Сиволап Ю.М. // Збірник наукових статей «Геном рослин». – 2008. – С. 48-51.
183. Детекція господарсько-цінних ознак насіння ячменю за ДНК-маркерами / М.С. Бальвинская, Р.Н. Календар, О.Р. Стратула [та ін.] // Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний Університет» НАУ. – 2008. – Вип. 107. - С. 123-126.
184. Использование ДНК-маркеров для характеристики сортов и оценки агрономически важных признаков ячменя / М.С. Бальвинская, И.Л. Холявицкая, О.Р. Стратула [та ін.] // Сборник научных трудов “Украинская научная мысль.”. – 2011. – Вып. 1. - С. 44-46.
185. Стратула О.Р. Исследование молекулярно-генетических особенностей гена β -амилазы (*β -amy1*) у ячменей Украины / О.Р. Стратула, А.Ф. Брик, Ю.М. Сиволап // Научные труды «Молекулярная и прикладная генетика». – 17–18.11.2005 г., Минск, Беларусь. – Т. 1. – С. 113.
186. DNA-typing of barley varieties and marking of agricultural traits by PCR-analysis / M.S. Balvinska, I.L. Kholjavitska, O.R. Stratula, Yu.M. Sivolap // Abstracts of International Scientific Conference “Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety”. – 07-10.09.2010, Odessa. – С. 37.
187. Молекулярні маркери у розвитку теорії і практики селекції ячменю. Науково-метод. посібник / Ю.М. Сиволап, М.С. Бальвінська, О.О. Захарова, Р.М. Календар, О.Р. Стратула // Одесса: «Астропринт», 2014. – 88 с.

Position: 3138<-3164 27bp100% Tm = 66.9°C

```
<-agtaactggggtgtgcacgccaaggga-5
      |||||||||||||||||||||
attcattgacccccacacgtgcggttcctcacg
```

In silico пошук праймеру(ів) по: gb|fj161080.1| *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*
в-амілаза 1 (ген *bmy1*):

3162 5'-tccaagtctacgtcatgctcc

Position: 1389->1409 21bp100% Tm = 56.4°C

```
5-tccaagtctacgtcatgctcc->
      |||||||||||||||||||
acaggttcagatgcagtacgaggaca
```

3163 5'-tgaagctgcaggccatcatgtc

Position: 1820->1841 22bp95% Tm = 55.7°C

```
5-tgaagctgcaggccatcatgtc->
      ||||||| |||||||||||||
cgacttcgatgtccggtagtagcaag
3814 5'-cagctggagagatgaggtaccc
```

Position: 2485->2506 22bp100% Tm = 58.9°C

```
5-cagctggagagatgaggtaccc->
      |||||||||||||||||||
gggtcgacctctctactccatggtagt
```

3812 5'-ttcccaggcatcggagaattca

Position: 2535->2556 22bp100% Tm = 58.3°C

```
5-ttcccaggcatcggagaattca->
      |||||||||||||||||||
gcaaggggtccgtagcctcttaagtagca
```

3815 5'-tccaggtacttattcatagcactgca

Position: 3635<-3659 25bp88% Tm = 43.2°C

<-acgtcacgatactattcatggacct-5
 |||||
 attgcagtgcctatgataaatacctacaagca

3816 5'-gctgctgctgctttgaagtctgct

Position: 3660<-3683 24bp100% Tm = 60.3°C

<-tcgtctgaagtttcgtcgtcgtcg-5
 |||||
 caagcagacttcaaagcagcagcagcggcg

3165 5'-tggaaccttgtaccaccagtg

Position: 4125<-4145 21bp100% Tm = 57.7°C

<-gtgaccaccatgttccaaggt-5
 |||||
 ttcactggtggtacaaggttccaagcc

In silico пошук праймеру(ів) по: gb|dq889983.1| *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* в-амілаза 2 (ген *bmy2*):

3162 5'-tccaagtctacgtcatgctcc

Position: 54->74 21bp100% Tm = 56.4°C

5-tccaagtctacgtcatgctcc->
 |||||
 acaggttcagatgcagtacgagggcca

3163 5'-tgaagctgcaggccatcatgtc

Position: 433->454 22bp 95% Tm = 57.0°C

5-tgaagctgcaggccatcatgtc->
 | ||||||||||||||||
 cgagttcgacgtccggtagtagcaag

3814 5'-cagctggagagatgaggtaccc

Position: 881->902 22bp 95% Tm = 53.7°C

5-cagctggagagatgaggtaccc->
 | ||||||||||||||||
 gggccgacctctctactccatgggtagg

3812 5'-ttcccaggcatcggagaattca

Position: 931->952 22bp 100% Tm = 58.3°C

5-ttcccaggcatcggagaattca->
 ||||||||||||||||
 agaagggtccgtagcctcttaagtagca

3815 5'-tccagggtacttatcatagcactgca

Position: 1361<-1385 25bp 100% Tm = 56.9°C

<-acgtcacgatactattcatggacct-5
 ||||||||||||||||
 tctgcagtgcctatgataagtagcctggaagca

3816 5'-gctgctgctgctttgaagtctgct

Position: 1386<-1409 24bp 100% Tm = 60.3°C

<-tcgtctgaagtttcgtcgtcgtcg-5
 ||||||||||||||||
 gaagcagacttcaaagcagcagcagcgaag

3165 5'-tggaaccttgtaccaccagtg

Position: 1850<-1870 21bp 95% T_m = 56.1°C

<-gtgaccaccatggtccaaggt-5

|||||
ttcactggtggtacagggttccaaacc

Додаток Б

1) Результати вирівнювання послідовностей генів *β*-амілази *Bmy1* та *Bmy2* з 1 по 6 екзон (синім кольором виділені екзони)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Bmy1_FJ161080_H_vulv	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy1_AF016104_H_spon	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
1_Millium_effusum	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Brachypodium_d1	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_FJ936156_H_vulv	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_DQ889983_H_vulv	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_FJ936157_H_vulv	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Catabrosa_aquatica	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Elymus_repens	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
1_Spartina_alternifl	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_1_Zingeria_tric	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_2_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_3_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_4_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_5_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_6_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Colopodium_versi	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Colopodium_arara	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_1_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
2_Spartina_alternifl	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_4_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_5_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_6_Zingeria_koch	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Colopodium_versi	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Colopodium_arara	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Dasypyrum_villosum	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Pleum pratense	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
1_Bromus sterilis	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
2_Bromus sterilis	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
1_Deschampsia antar	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
2_Deschampsia antar	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Paracolopodium tevele	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Millium vernale	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_AF08119_Zea_m	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Sorghum bicolor	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_10345 Oryza_sa	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Oryza sativa	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Glycine_max	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Lotus japonicus	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Vitis vinifera	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Solanum tuberosum	TC	CAAG	GTAC	GTG	TC	CTCC	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400		
Bmy1_FJ161080_H_vulv	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Bmy1_AF016104_H_spon	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
1_Millium_effusum	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Bmy2_Brachypodium_d1	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Bmy2_FJ936156_H_vulv	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Bmy2_DQ88983_H_vulv	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Bmy2_FJ936157_H_vulv	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Catabrosa_aquatica	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
Elymus_repens	CT	CAAT	-GAGT	ATT	TTT	TG	TACT	TAAC	CTT	GACT	CAACT	TCAT	TTG	TGAAT	TAATAA	TAG	CTGG	ACCC	GTG	AGT	CTG	
1_Spartina_alternifl	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_1_Zingeria_tric	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_2_Zingeria_koch	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_3_Zingeria_tric	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_3_Zingeria_koch	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_4_Zingeria_koch	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_5_Zingeria_koch	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_6_Zingeria_koch	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_Colopodium_versi	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_Colopodium_arara	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Dasypyrum_villosum	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_Pleum pratense	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
1_Bromus sterilis	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
2_Bromus sterilis	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
1_Deschampsia antar	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
2_Deschampsia antar	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Paracolopodium tevele	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Millium vernale	GACCT	TAGAT	GAGG	CTTTT	GT	ACT	GACCT	TGAC	TTTCT	TTT	CTG	TGT	G	AAAA	-----	CAGCT	TGAT	GTT	GAG	CTG	CAC	AA
Bmy2_AF08119_Zea_m	GAA	TGTT	ACAC	CCCCCCCCCCCCCCCC	TTTTTTT	GTG	CACT	CTGCT	TGCT	TGCG	GACAGT	CACT	TGGAT	AT	CAT	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_Sorghum bicolor	GAA	TGTT	ACAC	CCCCCCCCCCCCCCCC	TTTTTTT	GTG	CACT	CTGCT	TGCT	TGCG	GACAGT	CACT	TGGAT	AT	CAT	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
Bmy2_10345 Oryza_sa	AGT	TTT	GTG	TACAC	-----	TGACCT	CACT	CTT	TGCG	GATAT	GATG	CTG	TGAT	GTT	GTG	TGCT	GAC	CAAC	CAAGT	CTG	GAG	AGC
Bmy2_Oryza sativa	AAT	TG	GTG	TACAC	-----	TACCT	-AAT	CTG	TT	CGAGAT	GATG	CTG	TGAT	GTT	GTG	TGCT	GAC	CAAC	CAAGT	CTG	GAG	AGC
Glycine_max	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Lotus japonicus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Vitis vinifera	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Solanum tuberosum	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
Bmy1_FJ161080_H_vulg	AATC	-AGTCTAGAGCCTACAA	AAAAAAAAA	-CATCGAAGGTCCTGAGCGGATGGG	TTTCGACAACCC	TTTAGCTTTCATGCATCTTT	TTGGGAAGGGTGAA	AAACACCGCTCCTTT	TAAGTCGATTGATCGAGG	CAGCCTCTATT	TTTGTAGCTATCAGGAAATACAA	AAATTAATAGCTAGTGTCTATTT								
Bmy1_AF061204_H_spon	AATC	-AGTCTACAGCTATCA	AAAAAAAAA	ATCGAAGGTCCTGAGCGGATGGG	TTTCGACAACCC	TTTAGCTTTCATGCATCTTT	TTGGGAAGGGTGAA	AAACACCGCTCCTTT	TAAGTCGATTGATCGAGG	CAGCCTCTATT	TTTGTAGCTATCAGGAAATACAA	AAATTAATAGCTAGTGTCTATTT								
Bmy2_1_millium	AAATATAGTCTACAGCCTAC	ATATAAAA	-CATCGAAGGTCCTGAGCGGATGGG	TTTCGACAACCC	TTTAGCTTTCATGCATCTTT	TTGGGAAGGGTGAA	AAACACCGCTCCTTT	TAAGTCGATTGATCGAGG	CAGCCTCTATT	TTTGTAGCTATCAGGAAATACAA	AAATTAATAGCTAGTGTCTATTT									
2_Millium_oeffense	AAATATAGTCTACAGCCTAC	ATATAAAA	-CATCGAAGGTCCTGAGCGGATGGG	TTTCGACAACCC	TTTAGCTTTCATGCATCTTT	TTGGGAAGGGTGAA	AAACACCGCTCCTTT	TAAGTCGATTGATCGAGG	CAGCCTCTATT	TTTGTAGCTATCAGGAAATACAA	AAATTAATAGCTAGTGTCTATTT									
Bmy2_Brachypodium_di	AAAG	-AGTCTAGCTCTAC	CAACAAAAA	-CATCGAAGGTCCTGAGCGGATGGG	TTTCGACAACCC	TTTAGCTTTCATGCATCTTT	TTGGGAAGGGTGAA	AAACACCGCTCCTTT	TAAGTCGATTGATCGAGG	CAGCCTCTATT	TTTGTAGCTATCAGGAAATACAA	AAATTAATAGCTAGTGTCTATTT								
Bmy2_FJ936156_H_vulg		-TTTGATTTT	GATAGGTCAGTGTGCTCAT	GTGTAGCA																
Bmy2_DQ889983_H_vulg		-TTTGATTTT	GATAGGTCAGTGTGCTCAT	GTGTAGCA																
Bmy2_FJ936157_H_vulg		-TTTGATTTT	GATAGGTCAGTGTGCTCAT	GTGTAGCA																
Catabrosa_aquatica		-TTTGATTTT	TAATAGGCC	CAGTGTGCTC	CACGTAGCA															
Elymus_repens		-TTTGATTTT	GCGATT	TTGATCGGAAT	-GTACCTCAT	GTGTGGGA														
1_Spartina_alternifl		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAATATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_1_zingeria_tric		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAATATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_2_zingeria_tric		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAATATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_2_zingeria_koch		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAATATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_3_zingeria_tric		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAATATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_3_zingeria_koch		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_4_zingeria_tric		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_Colpodium_arara		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_1_zingeria_koch		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-CCACT	-GTAGC														
Spartina_alternifl		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_4_zingeria_tric		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-CCACT	-GTAGC														
Bmy2_1_zingeria_tric		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_4_zingeria_koch		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_5_zingeria_koch		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_Colpodium_drake		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Brachypodium_pinnatifidum		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_Puleium pratense		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
1_Bromus sterilis		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
2_Bromus sterilis		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
2_Deschampsia antarctica		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
1_Deschampsia antarctica		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Paracolpodium trzeveletii		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Millium vernale		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_AF068119_Zea_mays		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_Zea_mays bicolor		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_Z10345_Oryza_sativa		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Bmy2_Oryza sativa		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Glycine_max		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Solanum_lajonsquense		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														
Solanum_tuberosum		-TTTGATTTT	GATAGTAGG	-TACTAGTATGC	-TCACG	-GTAGC														

	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
Bmy1_FJ161080_H_vulg	AATAGTGTGACGAAGCTTTGAT-																		TCTCTCTTTGTGGCTGTGA		
Bmy1_AFP061204_H_spon	AATAGTTGTGACGAAGCTTTGAT-																		TTTCTCTTTGTGGCTGTGA		
1_Millium_effesum	-----																		CTTTTCTTTGTCTACACA		
2_Millium_effesum	-----																		CTTTTCTTTGTCTACACA		
Bmy2_Brachypodium_di	-----																		CTTCTCTTTGTTTTGTGA		
Bmy2_FJ936156_H_vulg	-AAGCTT--TGA																		TTCTCTCTTTGTCTTCGTA		
Bmy2_DQ889983_H_vulg	-AAGCTT--TGA																		TTTCTCTTTGTCTTCGTA		
Bmy2_FJ936157_H_vulg	-AAGCTT--TGA																		TTTCTCTTTGTCTTCGTA		
Catabrosa_aquatica	-AAGCTT--TGA																		TTCTCTCTTTGTGGCTGCCA		
Elymus_repens	-AGCTTTAAATTGG																		TTCTCCTTTGTGGGTGTGA		
1_Spartina_alternifl	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT----GGCTGTGA		
Bmy2_1_Zingeria_tric	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT----GGCTGTGA		
Bmy2_2_Zingeria_tric	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT----GGCTGTGA		
Bmy2_2_Zingeria_koch	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT----GGCTGTGA		
Bmy2_3_Zingeria_tric	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT----GGCTGTGA		
Bmy2_3_Zingeria_koch	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTATGACTGGCTGTGA		
Bmy2_Colpodium_tvele	-ACGCCTTGATCAT																		TCCTTGTGGCTGGCTGTGA		
Bmy2_Colpodium_arara	-ACGCCTTGATCAT																		TCCTTGTGGCTGGCTGTGA		
Bmy2_1_Zingeria_koch	-ACGCCTTGATCAT																		TCCTTGTGGCTGGCTGTGA		
Spartina_alternifl	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTATGACTGGCTGTGA		
Bmy2_4_Zingeria_tric	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT----GGCTGTGA		
Bmy2_1_Zingeria_died	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTATGACTGGCTGTGA		
Bmy2_4_Zingeria_koch	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTATGACTGGCTGTGA		
Bmy2_5_Zingeria_koch	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTT---CTGGCTGTGA		
Bmy2_Colpodium_drake	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTGTGGCTGGCTGTGA		
Bmy2_Panicum_villosum	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTGTGGCTGGCTGTGA		
Bmy2_Phleum pratense	-AAGCTTTGATCAT																		TCCTTATGGCTGGCTGTGA		
1_Bromus sterilis	-AAGCTTTGATCGT																		TCCTTTG--TGCGTGTGA		
2_Bromus sterilis	-AAGCTTTGATCAC																		TCCTTTG--TGCGTGTGA		
Deschampsia_antarc	-AAGCTTTGATCA																		TCCTTTG--TGCGTGTGA		
1_Deschampsia_antarc	-AAGCTTGATCAT																		TCCTTTG--TGCGTGTGA		
Paracolpodium_tzele	GATCATTC																		CCCTG--TGCGTGTGA		
Milium_vernale	AGGCTTTGATGCT																		CTTTTG--TGCGTGCA		
Bmy2_AFP068119_Zea_ma	-----																		TCCTCTCTGTTGTTG		
Bmy2_Sorghum_bicolor	-----																		CCGCTCTCTCTCTCTGTGG		
Bmy2_L10345_Oryza_sa	-----																		CTCTGTCTGTGGCTGTGA		
Bmy2_Oryza_sativa	-----																		CTCTGTCTGTGGCTGTGA		
Glycine_max	-----																		TGTTCTGTTGTA		
1_Zea_mays	ACACACATGGATAGTATGATCTAAACAAATGATGTCAGTATATCTCTGATTTGAAATAGATGATAATTCATTTTGGATTTAAAAAGATTGCACAGCTTCGCGAGACTTCTAAATGTACAGTTAAACTATATATAGATCTTGGACATTTGAAGTAGTGTGCTAAATAATTAATTTGGGTTTAACTCTGGCTGATG																		TATATGATGATG		
Vitis_vinifera	-----																			TCCTGATGCATCT	
Solanum_tuberosum	-----																				

[illegible][illegible]

Genomic tracks showing recombination rates and genetic markers across a chromosome. The top track displays recombination rates in cM/Mb for various species, with a color scale from 0.00 (blue) to 0.10 (red). Below this, 19 tracks show genetic markers for different species, with markers highlighted in red. The bottom track shows the physical distance in Mb, ranging from 2210 to 2400. The tracks are labeled with species names and marker IDs.

Species and Marker IDs shown in the tracks:

- Bmy1_FU61080_H_vulg
- Bmy1_AF061204_H_spon
- 1_Millium_effesum
- 2_Millium_effesum
- Bmy2_Brachypodium_di
- Bmy2_F936156_H_vulg
- Bmy2_D988983_H_vulg
- Bmy2_F936157_H_vulg
- Catabrosa_aquatica
- Elymus_repens
- 1_Spartina_alternifl
- Bmy2_1_Zingieria_tric
- Bmy2_2_Zingieria_tric
- Bmy2_2_Zingieria_koch
- Bmy2_3_Zingieria_tric
- Bmy2_3_Zingieria_koch
- Bmy2_Colpodium_versi
- Bmy2_Colpodium_arara
- Bmy2_1_Zingieria_koch
- 2_Spartina_alternifl
- Bmy2_4_Zingieria_tric
- Bmy2_1_Zingieria_bieb
- Bmy2_4_Zingieria_koch
- Bmy2_5_Zingieria_koch
- Bmy2_Colpodium_drake
- Dasypyrum_villosum
- Bmy1_Ptilium_pyratense
- 1_Bromus_sterilis
- 2_Bromus_sterilis
- 2_Deschampsia_antarc
- Deschampsia_antarc
- Paracolpodium_tzvele
- Millium_vernale
- Bmy2_AF068119_Zea_ma
- Bmy2_Sorghum_bicolor
- Bmy2_L10345_Oryza_sa
- Bmy2_Oryza_sativa
- Glycine_max
- Lotus_japonicus
- Vitis_vinifera
- Solanum_tuberosum

Bmy1_FJ161080_H_vulv
 Bmy1_AF061204_H_spon
 1_Millium_effusum
 Bmy2_Brachypodium_di
 Bmy2_FJ936156_H_vulv
 Bmy2_DQ889983_H_vulv
 Bmy2_FJ936157_H_vulv
 Catabrosa_aquatica
 Elymus_repens
 1_Spartina_alternifl
 Bmy2_2_Zingeria_tric
 Bmy2_2_Zingeria_koch
 Bmy2_3_Zingeria_tric
 Bmy2_3_Zingeria_koch
 Bmy2_Colopodium_vera
 Bmy2_Colopodium_arara
 Bmy2_1_Zingeria_koch
 2_Spartina_alternifl
 Bmy2_4_Zingeria_tric
 Bmy2_1_Zingeria_bieb
 Bmy2_4_Zingeria_koch
 Bmy2_3_Zingeria_koch
 Bmy2_Colopodium_drake
 Dasypyrum_villosum
 Bmy2_Phleum pratense
 1_Bromus_sterilis
 1_Deschampsia_antarc
 2_Deschampsia_antarc
 1_Deschampsia_antarc
 Paracolopodium_tevele
 1_Millium_vernale
 Bmy2_AF068119_Zea_ma
 Bmy2_Borghum_bicolor
 Bmy2_10345_Oryza_sa
 Bmy2_Oryza_sativa
 Glycine_max
 Lotus_japonicus
 Vitis_vinifera
 Solanum_tuberosum

Bmy1_FJ161080_H_vulv
 Bmy1_AF061204_H_spon
 1_Millium_effusum
 Bmy2_Brachypodium_di
 Bmy2_FJ936156_H_vulv
 Bmy2_DQ889983_H_vulv
 Bmy2_FJ936157_H_vulv
 Catabrosa_aquatica
 Elymus_repens
 1_Spartina_alternifl
 Bmy2_2_Zingeria_tric
 Bmy2_2_Zingeria_koch
 Bmy2_3_Zingeria_tric
 Bmy2_3_Zingeria_koch
 Bmy2_Colopodium_vera
 Bmy2_Colopodium_arara
 Bmy2_1_Zingeria_koch
 2_Spartina_alternifl
 Bmy2_4_Zingeria_tric
 Bmy2_1_Zingeria_bieb
 Bmy2_4_Zingeria_koch
 Bmy2_3_Zingeria_koch
 Bmy2_Colopodium_drake
 Dasypyrum_villosum
 Bmy2_Phleum pratense
 1_Bromus_sterilis
 1_Deschampsia_antarc
 2_Deschampsia_antarc
 Paracolopodium_tevele
 1_Millium_vernale
 Bmy2_AF068119_Zea_ma
 Bmy2_Borghum_bicolor
 Bmy2_10345_Oryza_sa
 Bmy2_Oryza_sativa
 Glycine_max
 Lotus_japonicus
 Vitis_vinifera
 Solanum_tuberosum

Bmy1_FJ161080_H_vulv
 Bmy1_AF061204_H_spon
 1_Millium_effusum
 Bmy2_Brachypodium_di
 Bmy2_FJ936156_H_vulv
 Bmy2_DQ889983_H_vulv
 Bmy2_FJ936157_H_vulv
 Catabrosa_aquatica
 Elymus_repens
 1_Spartina_alternifl
 Bmy2_2_Zingeria_tric
 Bmy2_2_Zingeria_koch
 Bmy2_3_Zingeria_tric
 Bmy2_3_Zingeria_koch
 Bmy2_Colopodium_vera
 Bmy2_Colopodium_arara
 Bmy2_1_Zingeria_koch
 2_Spartina_alternifl
 Bmy2_4_Zingeria_tric
 Bmy2_1_Zingeria_bieb
 Bmy2_4_Zingeria_koch
 Bmy2_3_Zingeria_koch
 Bmy2_Colopodium_drake
 Dasypyrum_villosum
 Bmy2_Phleum pratense
 1_Bromus_sterilis
 1_Deschampsia_antarc
 2_Deschampsia_antarc
 Paracolopodium_tevele
 1_Millium_vernale
 Bmy2_AF068119_Zea_ma
 Bmy2_Borghum_bicolor
 Bmy2_10345_Oryza_sa
 Bmy2_Oryza_sativa
 Glycine_max
 Lotus_japonicus
 Vitis_vinifera
 Solanum_tuberosum

Glycine_max	AAGACATCAGAGTTGCTGGAGAAATGCACCTTCCAAGGTATGATGCCACAGCTTACAACCAATCATACTGAATGCAAGACCGCAAGGTGTCAACAACATGGCCCTCCAAACTAAGCATGTTCCGGAGTAACATACCTTCGTCTA
Lotus_japonicus	AACACATCGAAGTTGCTGGAGAAATGCACCTTCCAAGGTATGATGCCACAGCTTATAACCAATCATAATTGAATGCAAGACCAAGGTGTCAACAAGATGGCCCTCCAAAGTTCCGGATGTATGGAGTAACATACCTTCGTCTA
Vitis_vinifera	AGAAATATTGAAGTTGCTGGTGAGAATGCACCTTGAAGGTATGATCGTTCTGGCTATAATCAATCCTTCTAAATGCTAGGCCAAATGGAGTCAACAAGATGGTCCACCAAGCTGAAGATGTCTGGGGTGACATACCTTCGTCTTA
Solanum_tuberosum	AGAACATTGATGTAGCAGGTGAGAATGCACCTTGAAGATATGACGGCTATGCTACACCAATCCTTCTCAACGCTAGGCCAAATGGTATCAACAAAACGGTCCACCAAACTAAAAATGGCTGGGCTGACTTACCTTCGATTA

2) Результати вирівнювання послідовностей генів β -амілази *Bmy1* та *Bmy2* з 1 по 4 екзон.

[illegible]

[illegible]

Figure 1: Phylogenetic tree and sequence alignment of the *hvg* gene across various species. The tree on the left shows relationships between species, with bootstrap values indicated. The alignment on the right shows the nucleotide sequence of the *hvg* gene for each species, with positions 1 to 2400 indicated at the top. The alignment is color-coded by nucleotide: A (green), C (blue), G (red), and T (black). The alignment shows a high degree of conservation across species, with some variations highlighted in red. The alignment is divided into three main sections: positions 1-1000, 1000-2000, and 2000-2400. The alignment is also divided into three main sections: positions 1-1000, 1000-2000, and 2000-2400. The alignment is also divided into three main sections: positions 1-1000, 1000-2000, and 2000-2400.

Genomic alignment tracks for the *H. vulgare* FJ936157 region. The figure displays multiple tracks of sequence alignment across a genomic region from 2410 to 3000 bp. The top track shows the reference sequence (H. vulgare FJ936157) with a scale bar from 2410 to 3000 bp. Below this are tracks for various *H. vulgare* strains (FJ161080, AF061204, DQ899883, FJ936156, FJ936157) and their corresponding H. vulgare strains (FJ161080, AF061204, DQ899883, FJ936156, FJ936157). The tracks are color-coded: red for H. vulgare FJ936157, green for H. vulgare FJ936156, blue for H. vulgare FJ936157, and black for H. vulgare FJ936157. The tracks show sequence alignment with gaps (dashes) and mismatches (colored letters). The bottom track shows the reference sequence (H. vulgare FJ936157) with a scale bar from 2410 to 3000 bp.

3) Результати вирівнювання послідовностей екзонів генів β -амілази *Bmy1* та *Bmy2* з 1 по 6 екзон, включаючи сайти сплайсингу.

Bmy1_FJ161080_H_vulg

Bmy1_AF061204_H_spon

Millium_effesum

Brachypodium_distach

Bmy2_FJ936156_H_vulg

Bmy2_DQ889983_H_vulg

Bmy2_FJ936157_H_vulg

Catabrosa_aquatica

Elymus_repens

[illegible]

Spartina_alternifl

Zingeria_trichpoda

Zingeria_kochii

[illegible]

Colpodium_versicolor

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCGCTGGATGTGGT

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCGTTGGA

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCGCTAGATGTGG

Dasypodium villosum

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCGCTGGAT

Phleum pratense

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCG

Bromus sterilis

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCG

Deschampsia antarctica

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCGCTGGAT
CAGTGGGTGGGGGACATCGGGCGCTGGAGACCTGAC

Paracolpodium tzvele

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCGCTGGATGTGG
CAGTGGGTGCGGGACATCGGGCGCTAGTGACCCCGACATTT

TCCAAGTCTACGTCATGCTCCCTGTAAGCG
CAGTGGGGTGGGGGACGTCGGGCGGCTACCGAC

Bmy2 AF068119_Zea ma

TCCAGGTCATAGTCATGCTCCCG**GTAAGCG**CTGGGATGICA
CAGTGGGTGCGGGACGTCGGCAAAAAGCAACCCCGACATCT

Sorghum bicolor

CAGTGGGTGCGGGACGTCGGCGAGGACAAT

L10345_Oryza_sativa

CAGTGGGTGCGGATCGTCGGCAGCGACGCCCGACAT

Oryza_sativa

CAGTGGGTGCGGGTCGTTGGTGTG

CAGTGGGTGCTTGACATTGGAC

Додаток В

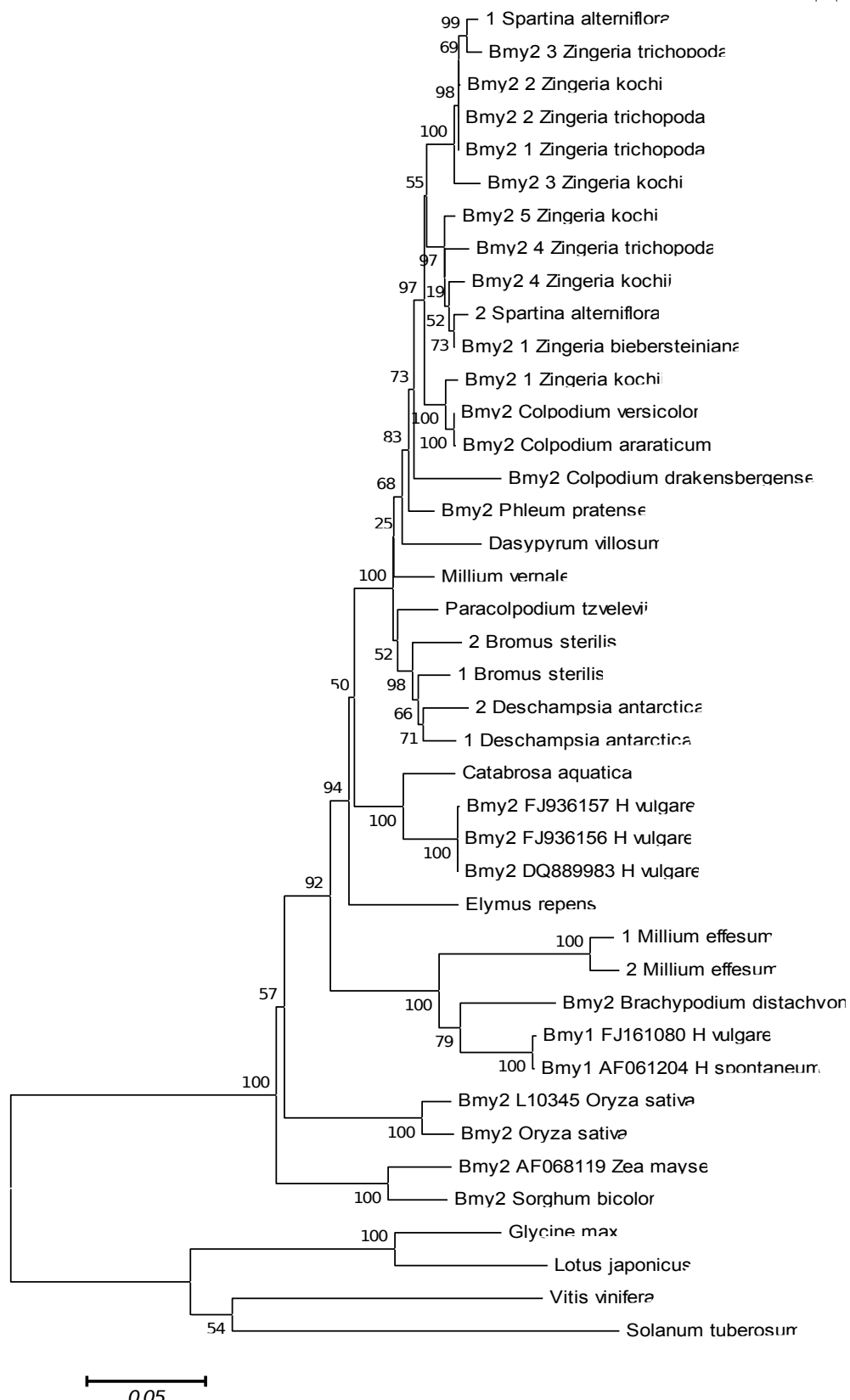


Рис. В1. Філогенетичне дерево, побудоване за результатами аналізу отриманих послідовностей екзонів 1 – 6 генів *Bmy1* та *Bmy2* видів рослин методом NJ.

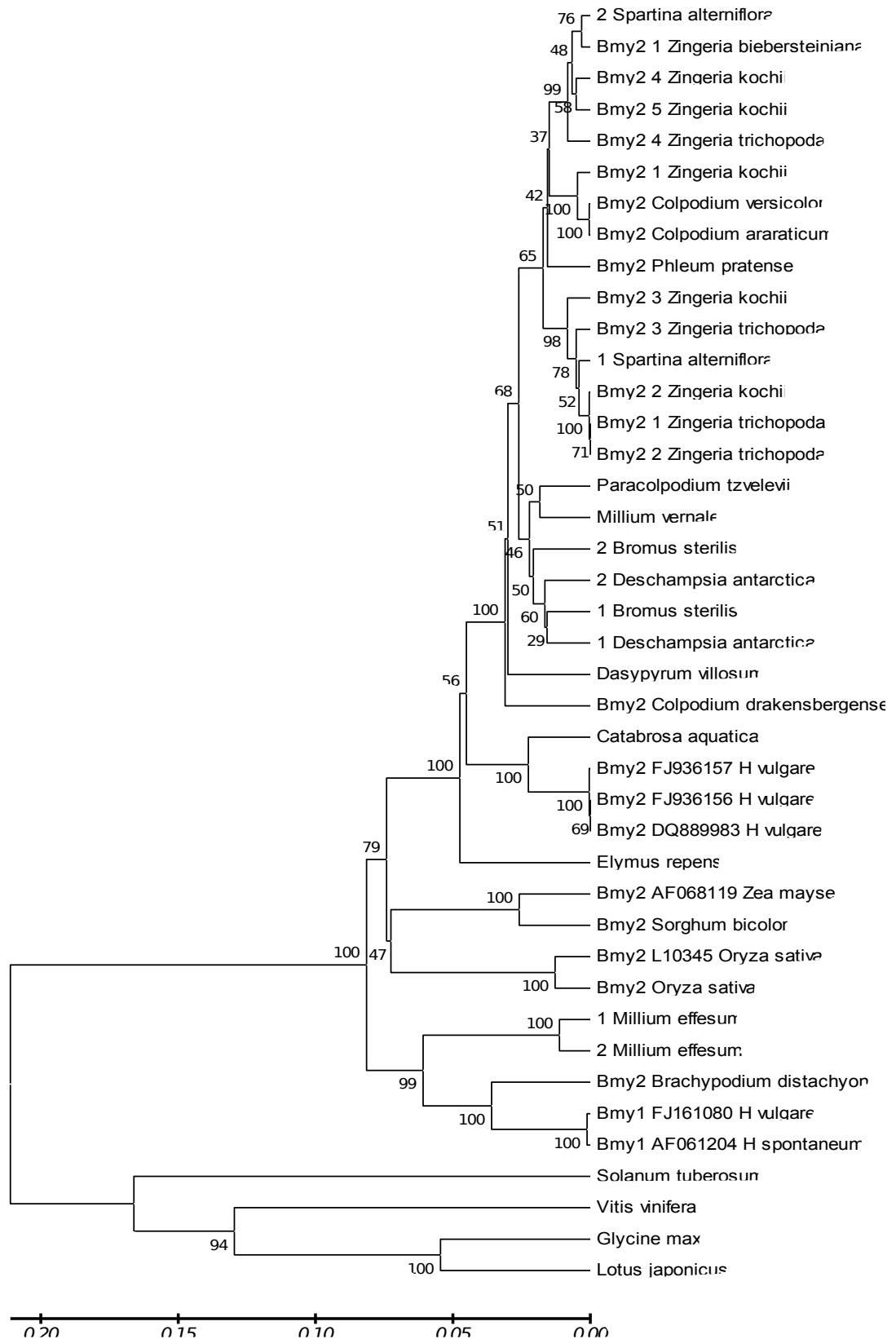


Рис В2. Філогенетичне дерево, побудоване за результатами аналізу отриманих послідовностей екзонів 1 – 6 генів *Bmy1* та *Bmy2* видів рослин методом UPGMA.

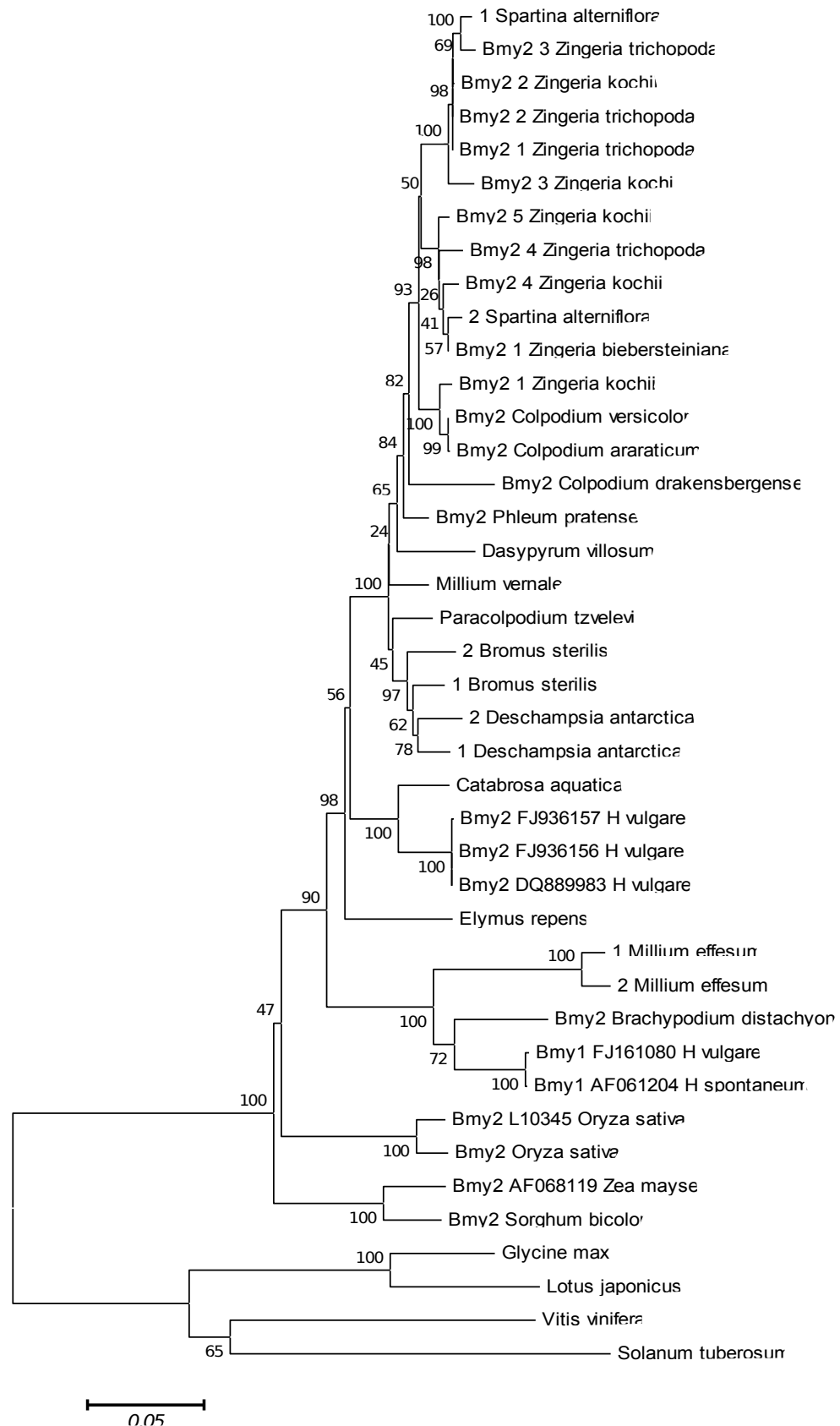


Рис. В3. Філогенетичне дерево, побудоване за результатами аналізу отриманих послідовностей екзонів 1 – 6 генів *Bmy1* та *Bmy2* видів рослин методом МЕ.

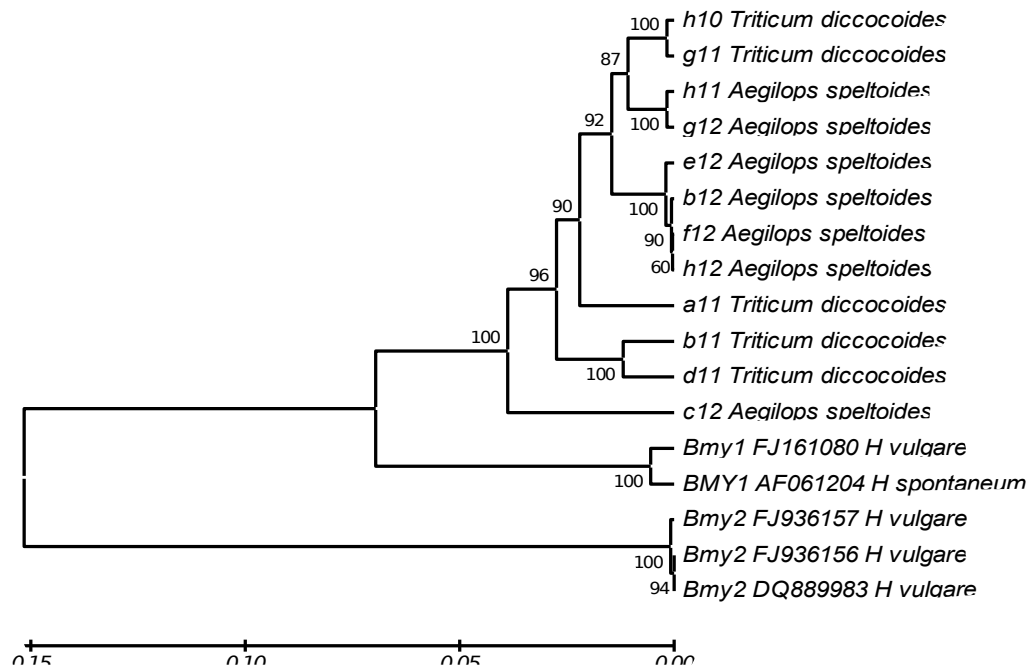


Рис. В4. Філогенетичні дерева, побудовані за результатами аналізу ділянок з 1 по 4 екзони, включно з ітронами, генів *Bmy1* та *Bmy2* видів злаків методом UPGMA.

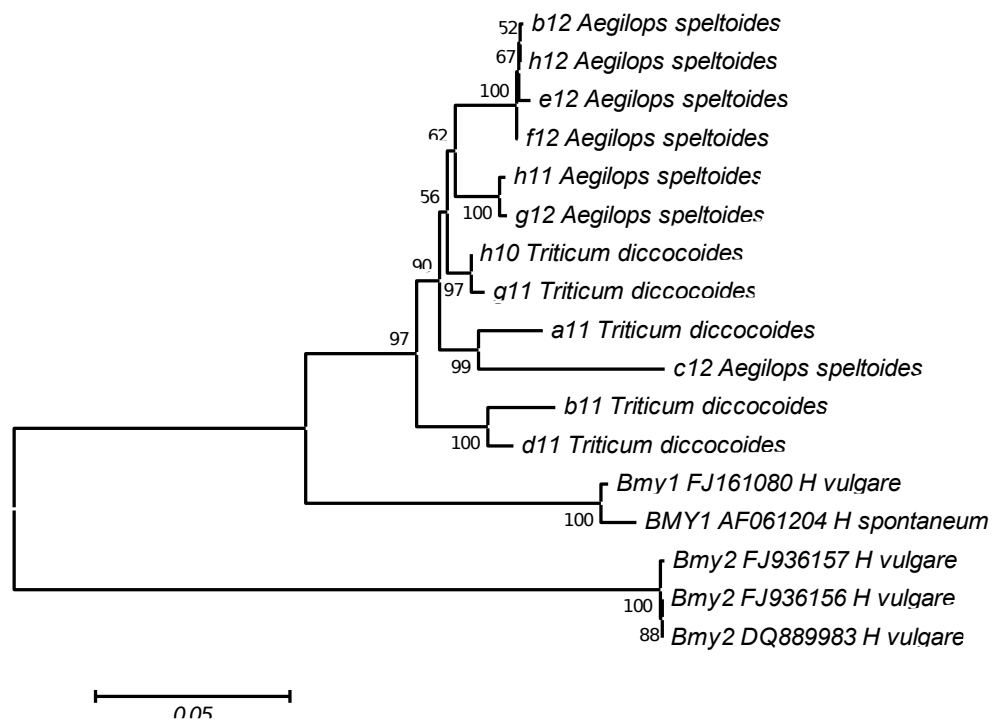


Рис. В5. Філогенетичні дерева, побудовані за результатами аналізу ділянок з 1 по 4 екзони, включно з ітронами, генів *Bmy1* та *Bmy2* видів злаків методом ME.

Додаток Д

**Ідентифікація алельних варіантів гена *Vmy1* в колекції сортів ярого
ячменю, розповсюджених на території східноєвропейської та
центральноазіатської географічних зон**

Таблиця Д.1.

Алельні варіанти гена *Vmy1* в колекції сортів ярого ячменю, поширених на
території східноєвропейської та центральноазіатської географічних зон

№	Колекційний номер сорту	Алелі гену <i>Vmy1</i> 0 – 3152 п.н., 1 – 3278 п.н., 2 – 3152 + 3278 п.н.	Область	Регіон
1	2	3	4	5
1	k-2544	2	Естонія	Прибалтійський
2	k-16921	0		
3	k-2143	2		
4	k-2787	2		
5	k-2548	0		
6	k-2547	0		
7	k-10607	1		
8	k-16926	0		
9	k-16925	2	Латвія	
10	k-16868	0		
11	k-17925	1		
12	k-17920	1		
13	k-17915	1		
14	k-16816	0	Литва	
15	k-1272	0		
16	k-1082	0		
17	k-357	0		
18	k-9379	0		
19	k-9355	1		
20	k-9349	0		
21	k-9338	0	Архангельська обл.	Європейський
22	k-9332	0		
23	k-9316	0		
24	k-9530	0		
25	k-9536	0		
26	k-9537	0		

1	2	3	4	5
27	k-9687	2	Архангельська обл.	Європейський
28	k-9456	0		
29	k-9462	1		
30	k-9466	0	Комі	
31	k-9460	2		
32	k-9486	0		
33	k-9475	0		
34	k-9478	0		
35	k-16380	2		
36	k-9751	0		
37	k-6433	0	Ленінградська обл.	
38	k-6431	0		
39	k-9815	0		
40	k-9821	0		
41	k-4407	2		
42	k-4188	0		
43	k-2018	0		
44	k-9776	0		
45	k-9770	0		
46	k-9767	2		
47	k-9766	0		
48	k-9898	0		
49	k-9900	0	Псковська обл.	Прибалтійський
50	k-4414	1		
51	k-4413	0		
52	k-4410	0		
53	k-4411	0		
54	k-6434	0		
55	k-16031	1		
56	k-9762	2		
57	k-9850	0	Новгородська обл.	
58	k-9852	2		
59	k-9855	1		
60	k-9864	0		
61	k-9878	0		
62	k-9860	0		
63	k-9880	0		
64	k-9885	0		
65	k-9886	1		
66	k-6459	0		

1	2	3	4	5
67	k-4869	0	Марій Ел	Середньо-Російський
68	k-10074	1		
69	k-4389	0	Калінінградська обл.	Білоруський
70	k-5417	0		
71	k-5424	2		
72	k-6276	0		
73	k-6272	0		
74	k-6270	0		
75	k-6268	0		
76	k-6261	2		
77	k-6287	0		
78	k-6280	1		
79	k-4160	2	Калужька обл.	Середньо-Російський
80	k-1955	1		
81	k-2193	0		
82	k-2201	1		
83	k-2202	0		
84	k-2208	1		
85	k-2223	2		
86	k-2186	0		
87	k-2234	0		
88	k-2021	1		
89	k-5340	1	Ростовська обл.	
90	k-5338	1		
91	k-5337	1		
92	k-9213	2	Удмуртія	Західно-Сибірський
93	k-4637	2		
94	k-4154	0		
95	k-5108	0		
96	k-5014	0	Куйбишевська обл.	Середньо-Російський
97	k-9840	0	Вологодська обл.	
98	k-9843	0		
99	k-9848	0		
100	k-9621	0		
101	k-9837	0		
102	k-9833	0		
103	k-9830	2		
104	k-9827	0		
105	k-9825	0		
106	k-9824	2		

1	2	3	4	5
107	k-6446	2	Ярославська обл.	Середньо-Російський
108	k-6443	1		
109	k-6441	2		
110	k-4435	0		
111	k-4433	0		
112	k-4320	0		
113	k-2697	1		
114	k-3696	2		
115	k-3694	0		
116	k-4321	2		
117	k-9509	0	Костромська обл.	
118	k-9511	1		
119	k-9513	0		
120	k-3859	0		
121	k-3857	0		
122	k-3856	0		
123	k-3853	1		
124	k-4383	2		
125	k-4738	0	Кіровська обл.	
126	k-4729	0		
127	k-4740	2		
128	k-4741	0		
129	k-9581	2		
130	k-4742	0		
131	k-9551	1		
132	k-4289	0		
133	k-16419	2		
134	k-16395	0		
135	k-4187	1	Пермська обл.	Західно-Сибірський
136	k-4185	0		
137	k-4522	0	Білорусь	Білоруський
138	k-5321	0		
139	k-5320	2		
140	k-5315	1		
141	k-7118	0		
142	k-6741	2		
143	k-4267	0		
144	k-6420	0		
145	k-6412	1		
146	k-6410	0		

1	2	3	4	5
147	k-9895	2	Великі Луки (Псковська обл.)	Білоруський
148	k-9908	2		
149	k-9910	0		
150	k-9907	2		
151	k-9911	0		
152	k-6436	0		
153	k-4412	1		
154	k-5032	1	Смоленська обл.	Середньо-Російський
155	k-5027	2		
156	k-4881	1	Московська обл.	
157	k-4878	0		
158	k-4877	0		
159	k-4876	0		
160	k-6439	0	Івановська обл.	
161	k-6438	2		
162	k-4380	2		
163	k-4375	2	Володимирська обл.	
164	k-18367	0	Свердловська обл.	Західно-Сибірський
165	k-4807	2		
166	k-18367	2		
167	k-4503	1	Тюменська обл.	
168	k-2139	2		
169	k-4961	0	Омська обл.	
170	k-4955	2		
171	k-4959	0		
172	k-4962	2		
173	k-4972	0		
174	k-4963	1		
175	k-4964	0		
176	k-4965	0		
177	k-4968	0		
178	k-8399	0		
179	k-5043	0	Томська обл.	
180	k-4211	1		
181	k-4210	1		
182	k-10084	1	Новосибірська обл.	
183	k-10336	0	Алтайський край	Передалтайський
184	k-16509	2		

1	2	3	4	5
185	k-16512	0	Алтайський край	Переделтайський
186	k-16515	0		
187	k-16518	2		
188	k-16521	1		
189	k-5858	0		
190	k-16499	2		
191	k-5860	2		
192	k-5861	0		
193	k-18071	0	Красноярська обл.	
194	k-4812	0		
195	k-4813	1		
196	k-4814	0		
197	k-16023	2		
198	k-5824	0		
199	k-5820	0		
200	k-5819	2		
201	k-2948	1		
202	k-2925	2		
203	k-4836	2	Іркутська обл.	
204	k-2556	0		
205	k-2935	0		
206	k-4815	0	Чита (Забайкальський край)	
207	k-4818	0		
208	k-4819	0		
209	k-4821	0		
210	k-4824	0		
211	k-4831	0		
212	k-4833	1		
213	k-10696	0	Якутія	
214	k-10727	0		
215	k-10735	0		
216	k-8674	0		
217	k-7980	2		
218	k-7978	2		
219	k-2443	0		
220	k-5260	2		
221	k-10711	1		
222	k-11288	1		Бурятія
223	k-6744	0		

1	2	3	4	5
224	k-2969	0	Амур	Далекосхідно-Амуро-Усурійський
225	k-2965	1		
226	k-4999	1	Примор'є	
227	k-18645	0		
228	k-4994	1		
229	k-15130	1		
230	k-15124	1		
231	k-15123	1		
232	k-7993	1		
233	k-15147	1		
234	k-15144	1		
235	k-6376	2		
236	k-11077	0	Хабаровський край	
237	k-11076	2		
238	k-11078	0		
239	k-11082	1		
240	k-18160	2	П.Сахалін	
241	k-3738	1	Казахстан	
242	k-4314	2	Карелія	
243	k-4313	0		
244	k-2174	0		
245	k-9745	0		
246	k-9743	0		
247	k-9739	2		
248	k-9734	0		
249	k-9727	0		

Примітки: назви регіонів і областей збережено у відповідності з оригіналом [138].