

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ  
НАН УКРАЇНИ»

**СТРАТУЛА ОЛЬГА РОМУАЛЬДІВНА**

УДК 575.11.113:633.16

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

03.00.22 – молекулярна генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Селекційно-генетичному інституті - Національному центрі насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України (м. Одеса)

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
академік НААН України  
**Сиволап Юрій Михайлович,**  
Селекційно-генетичний інститут - Національний  
центр насіннезнавства та сортовивчення,  
завідувач відділу геноміки і біотехнології

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор,  
**Волков Роман Анатолійович,**  
Чернівецький національний університет  
імені Юрія Федьковича, завідувач кафедри  
молекулярної генетики та біотехнології

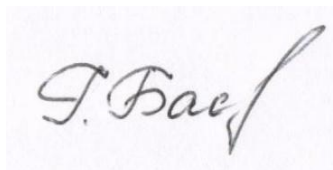
кандидат біологічних наук, доцент,  
**Антонюк Максим Зиновійович,**  
Національний університет «Києво-Могилянська  
академія», завідувач лабораторії генетики та  
клітинної біології кафедри біології

Захист відбудеться « 27 » жовтня 2015 р. о 14-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 при ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А.  
Факс: (044) 434-37-77

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А.

Автореферат розісланий « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради, к.б.н.



**Г.Я. Басєр**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**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 дозволяють забезпечити науково обґрунтований підбір вихідного матеріалу для селекції рослин. Генетичні ресурси культурних рослин та їхніх 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) (Сиволап, 2008).

Для задач прикладної генетики та селекції більш доцільним є використання не анонімних, а зчеплених молекулярних маркерів, які ідентифікують поліморфізм в кодуючих послідовностях ДНК – генах (Andersen et al., 2003). 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 (Holland et al., 2001) .

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  $\beta$ -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 *Vmy1* та *Vmy2*, що кодують два види  $\beta$ -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 центру насіннезнавства 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 2011-2015 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 *Vmy1* та *Vmy2* і пошуку родо- та видоспецифічних особливостей для молекулярної ідентифікації видів злаків, встановленні алельного складу генів *Vmy1* та *Vmy2* 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  $\beta$ -амілази *Vmy1* та *Vmy2*;

- визначити нуклеотидні послідовності генів *Vmy1* та *Vmy2* окремих видів родини злакових;

- вивчити можливість використання генів *Vmy* в якості молекулярного філогенетичного маркера;

- визначити географічне поширення алелів *Vmy1* у сортів ячменю, районованих на території східноєвропейських та центральноазіатських країн;

- дослідити молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Vmy* окремих представників родини *Poaceae*;

- отримати алельні характеристики сортів ячменю за геном *Vmy1*.

**Об'єкт дослідження:** гени  $\beta$ -амілаз родини злаків.

**Предмет дослідження:** поліморфні ділянки генів *Vmy1* та *Vmy2*.

**Методи дослідження:** молекулярно-генетичні методи (виділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гель-електрофорез продуктів ампліфікації, клонування і сиквенування ДНК); біоінформатичні методи (вирівнювання нуклеотидних послідовностей, реконструкція філодендрограм, дизайн праймерів, ПЛР *in silico*).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше визначені нуклеотидні послідовності генів *Vmy1* та *Vmy2* представників 21 виду родини *Poaceae* і проведено їх біоінформатичний аналіз. Доведено можливість застосування послідовностей  $\beta$ -амілази в якості молекулярного філогенетичного маркера на різних таксономічних рівнях. Проведено молекулярно-генетичне дослідження генів *Vmy1* та *Vmy2* у представників родини *Poaceae*. Вперше ідентифіковано алелі гена *Vmy1* у сортів ярого та озимого ячменю української та закордонної селекції, дикорослих форм *Hordeum*. Досліджений географічний розподіл виявлених алелів *Vmy1* 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ТА МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ФЕРМЕНТУ $\beta$ -АМІЛАЗИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)**

В огляді літератури висвітлено основні етапи досліджень організації і мінливості генів рослин за допомогою молекулярних маркерів, вивчення

поліморфізму інтронних ділянок в структурних генах рослин. Обговорена молекулярна організація генів  $\beta$ -амілази, особливості їх будови. Розглянуто можливість використання дикорослих видів у якості джерела поліпшення агрономічно цінних ознак. Обґрунтовано актуальність та доцільність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом для дослідження внутрішньовидового поліморфізму гена *Vmy1* слугували сорти ярого та озимого ячменю різних років створення, а також дикорослі форми ячменю різного походження. Колекцію з 249 сортів ярого ячменю різного походження використовували для аналізу географічного розподілу алелів *Vmy1* (отримана від д.б.н. А.А. Поморцева (Інститут загальної генетики РАН, Москва, РФ). Для визначення послідовностей генів *Vmy* - 21 вид родини *Poaceae* (Agrifood Research Finland (Фінляндія)). Для дослідження міжвидового поліморфізму *Vmy1* та *Vmy2*: 37 видів родини *Poaceae* (отримані з Ботанічного інституту ім. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург, РФ)), 25 сортів ярого та 36 сортів озимого тритикале (отримані з Gene Bank of the Slovak Republic (Словаччина); п'ять сортів жита (отримані з MTT Agrifood Research Finland (Фінляндія)), насіння *Aegilops speltoides* syn. *Sitopsis speltoides* (Tausch) Á.Löve та *Triticum turgidum* subsp. *Dicoccoide* (отримані з The Institute of Evolution (Хайфа, Ізраїль). Допомогу в отриманні матеріалу люб'язно надав доцент університету Гельсінкі, к.б.н., завідувач лабораторії геноміки рослин та біоінформатики РГП "Національний центр біотехнології" (Астана, Казахстан) Р.М. Календар.

В роботі використано методи досліджень: виділення ДНК (Сиволап и др., 1998); алель-специфічна ПЛР; клонування і сиквенування ДНК; електрофорез у агарозному гелі; BLAST-аналіз; конструювання специфічних праймерів здійснювали за допомогою FastPCR; вирівнювання нуклеотидних та амінокислотних послідовностей за допомогою програм Multain та COBALT, відповідно; кластерний аналіз з використанням програми MEGA 5.10. Наведені програми знаходяться в Інтернеті у вільному доступі.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Аналіз нуклеотидних послідовностей генів *Vmy1* та *Vmy2*.** Першим етапом роботи стало визначення нуклеотидних послідовностей генів *Vmy*  $\beta$ -амілази у окремих видів родини *Poaceae* і вивчення екзон-інтронних структур цих генів. Для здійснення сиквенування, а також для проведення подальших досліджень (в результаті порівняльного аналізу 45 нуклеотидних послідовностей, представлених в базі даних National Center for Biotechnology Information (NCBI), при якому виявлені поліморфні ділянки, що дозволяють їх використання в якості специфічних маркерів) сконструйовані та синтезовані праймери для екзон-праймованої ампліфікації інтронів (exon-primed intron-crossing, EPIC-PCR) генів *Vmy1* та *Vmy2* представників родини *Poaceae* з урахуванням родової і видової специфічності і внутрішньовидової консервативності (табл. 1). Оскільки праймери мали бути специфічними до групи видів, підбір 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.

Таблиця 1

**Характеристика праймерів, використаних для аналізу генів *Vmy1* та *Vmy2***

Назва	Послідовність	T <sub>m</sub>	Місце відпалу праймерів	
			<i>Vmy1</i>	<i>Vmy2</i>
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	cgtttagacgtgaggaacc	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	gatggtcgtcccaggcatc	57,7	2528→2546	-
r20	aggaaccgcacgtgtggggtcaatga	67,0	3138←3164	-

Примітки: T<sub>m</sub> - температура плавлення комплексу праймер-матриця

У результаті застосування отриманих праймерів вперше визначені нуклеотидні послідовності β-амілаз (accession numbers HE565890 - HE565971) та відповідні амінокислотні послідовності (accession numbers CCW36746 - CCW36773) депоновані в GenBank NCBI. Отримані дані є базовим ресурсом геномних досліджень злаків і можуть бути використані при розробці специфічних праймерів для визначення молекулярно-генетичного поліморфізму за генами *Vmy*, при порівняльному картуванні геномів, а також для філогенетичних досліджень рослин. Охарактеризовано особливості екзон-інтронної організації генів *Vmy* у досліджених видів злаків, для чого провели порівняльний аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей генів β-амілаз з використанням відомих послідовностей у якості зовнішньої групи. Показано, що *Vmy1* і *Vmy2* мають відмінності в розмірі і нуклеотидному складі інтронних ділянок, а екзони в аналізованій вибірці злакових висококонсервативні (97,3 – 99,9% гомології). Таким чином, встановлено зв'язок між поліморфізмом інтронів та алельним станом генів β-амілази.

На основі отриманих та існуючих даних про послідовності ДНК *Vmy*, а також амінокислотних послідовностей β-амілаз показані філогенетичні взаємини між близькими і віддаленими видами Царства рослин. 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. За результатами вирівнювання побудовано дендрограму, яка поділилася на два кластери. Найбільший з кластерів виявився розділеним на чотири субкластери - один з них склали отримані

послідовності гена загальної  $\beta$ -амілази *Bmy2* видів злаків та *Bmy1* виду *Dasypyrum villosum*, з відомими послідовностями гена *Bmy2* *Hordeum vulgare*. Спостерігали безсумнівну 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. 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 від інших (84,3% гомології) виявилися послідовності генів  $\beta$ -амілаз злаків, використаних в якості зовнішньої групи - *Oryza sativa*, (третьої субкластер) та *Zea mays* з *Sorghum bicolor* (четвертий субкластер). І, очікувано окремо, кластер з *Vitis vinifera*, *Solanum tuberosum* і *Glycine max* з *Lotus japonicus*.

Види, що належать до триби *Triticeae*, аналізували з 1 по 4 екзон, включаючи інтрони - довжина вирівняних послідовностей складала 3050 п.н. На отриманих дендрограмах виявився поділ 17 послідовностей на 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  $\beta$ -амілаз засноване тільки на поліморфізмі інтронних ділянок, так як екзони у досліджених ділянок генів мають високий ступінь подібності (99,3% – 99,9%). Виходячи з отриманих даних про еволюційний взаємозв'язок послідовностей генів  $\beta$ -амілаз досліджених видів, загальна  $\beta$ -амілаза, за пропонованим молекулярно-генетичним маркером, достовірно відділяється від ендоспермальної  $\beta$ -амілази, утворюючи окремі еволюційні родоводи, тобто дві  $\beta$ -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  $\beta$ -амілаз віддалених видів з різних класів використані отримані та відомі амінокислотні послідовності. На основі цих даних виведена реконструкція філогенії  $\beta$ -амілаз - родинні відносини між класами однодольних і дводольних відповідають сучасним ботанічним класифікаціям (рис. 1). Дендрограма, побудована на основі амінокислотних послідовностей  $\beta$ -амілаз різних видів рослин, розділилася на два кластери – один склали  $\beta$ -амілази дводольних видів, при цьому окремою групою в даному кластері відстоять  $\beta$ -амілази бобових, другий -  $\beta$ -амілази злаків, які утворили єдиний кластер, проте чітко розділений на відокремлені групи -  $\beta$ -амілаз2 (загальна форма ферменту) та  $\beta$ -амілаз1 (ендоспермальна форма).



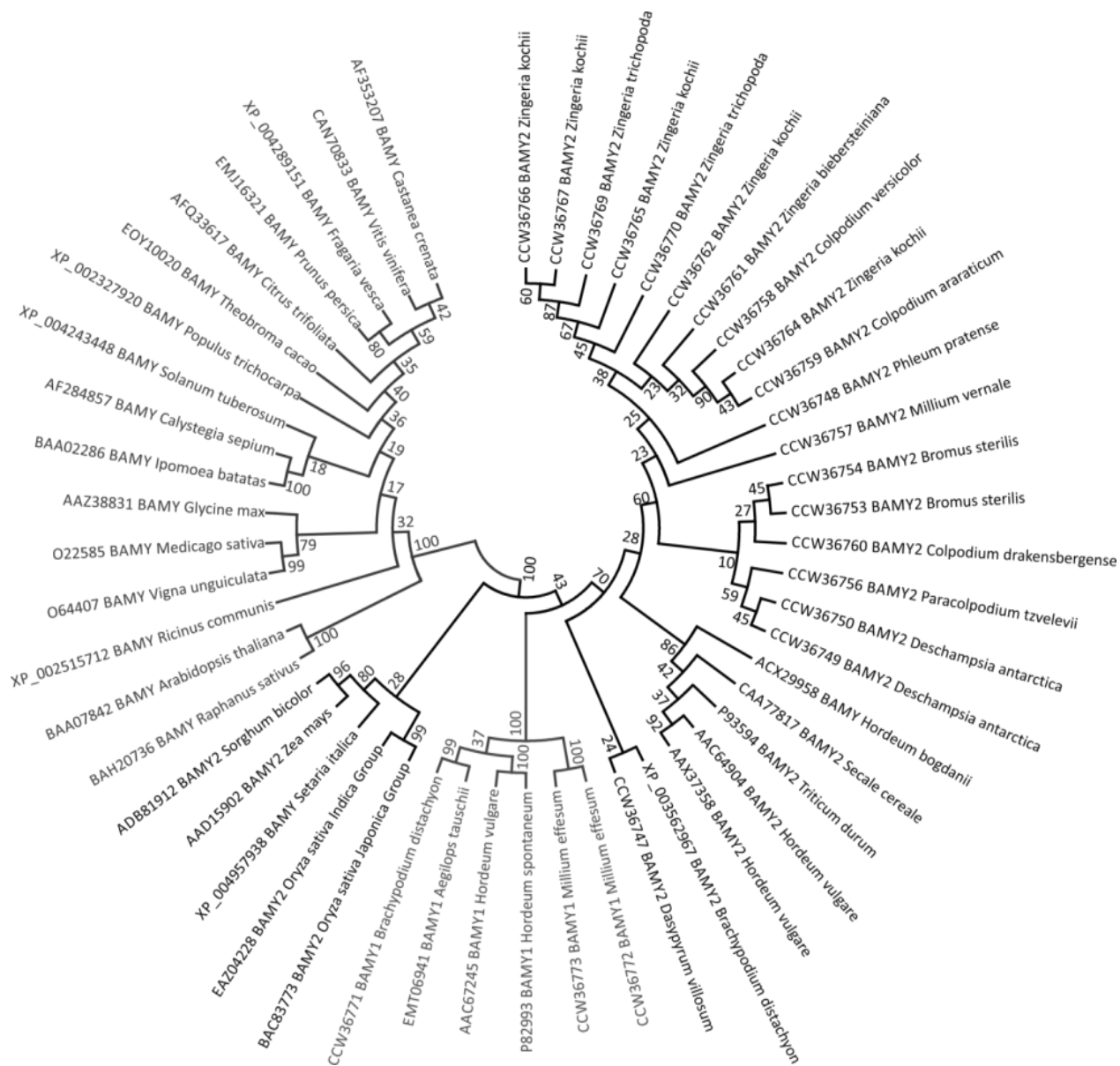


Рис. 1. Дендрограма філогенетичних взаємин для деяких однодольних і дводольних видів, побудована на основі амінокислотних послідовностей  $\beta$ -амілаз, з використанням методу мінімуму еволюції

Таким чином, на основі отриманих даних про ДНК-послідовності, а також амінокислотні послідовності  $\beta$ -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 *Vmy* перспективні для використання в якості маркера молекулярної ідентифікації при аналізі близьких і віддалених видів рослинного царства.

**Молекулярно-генетичний аналіз генів  $\beta$ -амілази у видів родини *Poaceae*.** Враховуючи результати аналізу вирівнювання послідовностей генів *Vmy1* і *Vmy2*, який показав, що дані послідовності мають найбільш варіабельні ділянки у межах з 1 по 4 екзони, вирішено дослідити внутрішньо- і міжвидовий поліморфізм цих генів на прикладі деяких видів злакових.

В результаті були підібрані праймери для ампліфікації даних фрагментів генів *Vmy* у представників родини *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 (EPIC-ПЛР) ефективний при дослідженні внутрішньо- і міжвидового поліморфізму генів  $\beta$ -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 родини *Poaceae*. При дослідженні міжвидового поліморфізму генів *Vmy* даних злаків показаний досить широкий діапазон генетичної різноманітності за аналізованими генами (рис. 2).

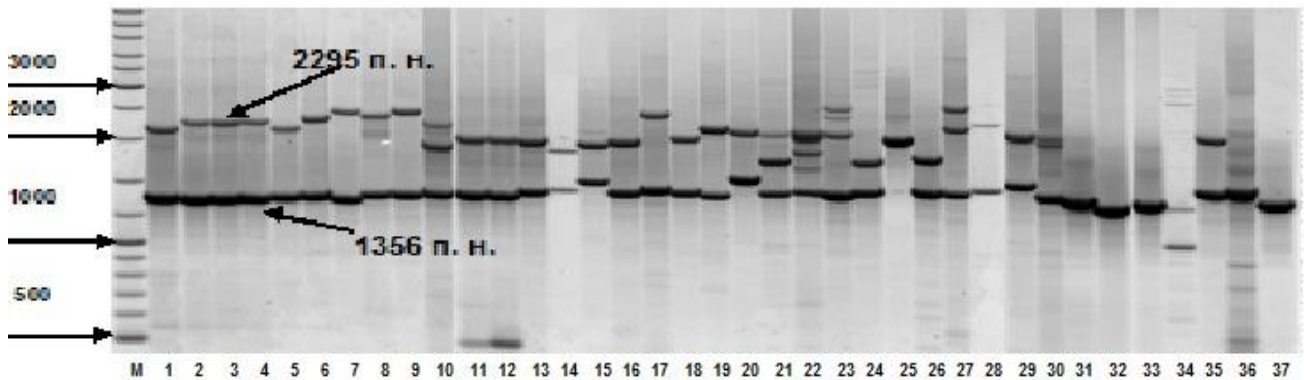


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації генів *Vmy1* і *Vmy2* у видів родини *Poaceae*: *H. vulgare*, сорти 1 - Джау Кабутак, 2 – Палідум 107, 3 - Одеський 17, 4 – Одеський 31, 5 - *H. spontaneum*, 6 – *H. murinum*, 7 – *H. marinum*, 8 - *H. brachyantherum*, 9 – *H. leporinum*, 10 - *Triticum durum*, 11 - *Aegilops speltoides*, 12 - *Agropyron cristatum*, 13 - *Amblyopyrum muticum*, 14 - *Comopyrum comosum*, 15 - *Crithodium monococcum*, 16 - *Crithopsis delileana*, 17 – *D. 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 serpentini*, 30 - *Elymus repens*, 31 - *Phleum pretense*, 32 - *Zingeria biebersteiniana*, 33 – *Colpodium versicolor*, 34 - *Spartina alterniflora*, 35 - *Bromus sterilis*, 36 - *Avena sativa*, 37 - *B. distachyon*; М - маркер молекулярної маси DNA-ladder #SM1173

В цілому, при використанні розроблених EPIC-праймерів, в ділянках генів *Vmy* і *Vmy2* у дослідженій вибірці, яка складалася з 37 видів злаків, виявлено ряд алельних варіантів: 10 різних алелів для *Vmy1* (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 *H. vulgare*, *H. spontaneum*, *H. murinum*, *T. durum*, *D. villosum* та *P. spicata*. Інші зразки мали відмінні від цих видів 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 *B. sterilis*, що належить до триби *Bromeae*, містив обидва  $\beta$ -амілазні гени - так само, як види з триби *Triticeae*. У зв'язку з цим можна відзначити, що присутність гена ендоспермальної  $\beta$ -амілази є перевагою не тільки представників *Triticeae*, але, можливо, більш широкою таксономічної групи - супертриби *Triticodae*, яка включає в себе триби *Bromeae* і *Triticeae*. Види, що належали до триб *Aveneae*, *Poeae* і *Brachypodieae*, містили єдиний ген - загальної  $\beta$ -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  $\beta$ -амілази у сортів тритикале та жита, а також у різновидів дикорослої пшениці двозернянки та *A. speltooides*, які є найближчими родичами культурної пшениці. Порівняння результатів ПЛР за генами *Bmy1* та *Bmy2* сортів тритикале з сортами жита, а також *T. dicoccoides* із *A. speltooides* показало їх еволюційну спорідненість (рис. 3, 4, 5).

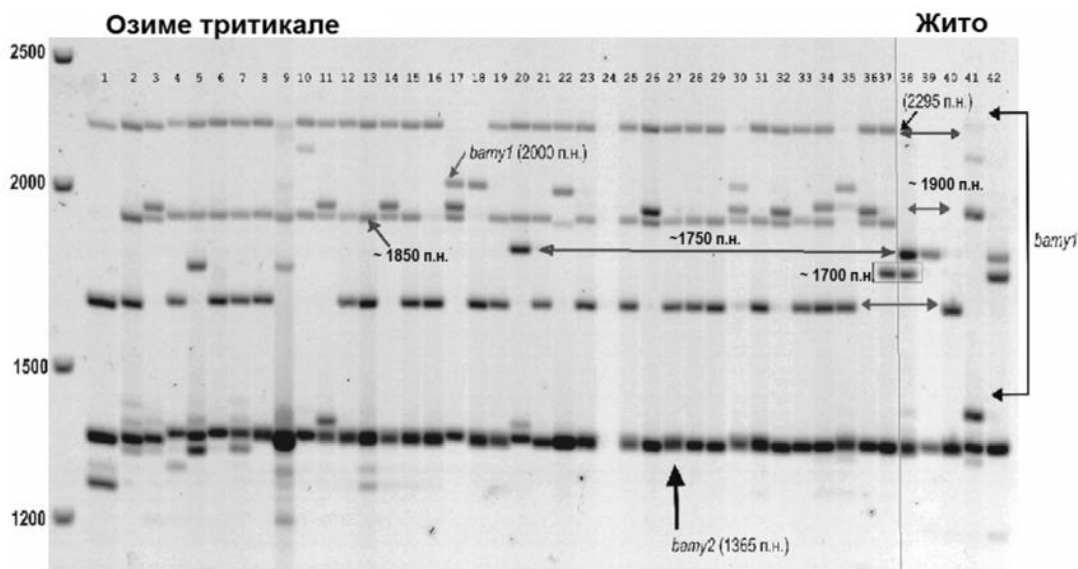


Рис. 3. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy1* та *Bmy2* між сортами тритикале озимого та жита. Сорти тритикале: 1 - Benetto, 2 - NE 422T, 3 - UCRTCL 1, 4 - Greneder, 5 - Plains, 6 - Terreland 22, 7 - Mungis, 8 - Leontino, 9 - Constant, 10 - Trizeps, 11 - Tribeca, 12 - Dusi, 13 - Alekto, 14 - Cosinus, 15 - Kandara, 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 - Algosos, 35 - UCRTCL-2, 36 - Flavius; сорти жита: 37 - Rihi, 38 - Akusti, 39 - Iissavaara, 40 - Loppi, 41 - Hirvessalmi; M - маркер молекулярної маси DNA Ladder #SM1173

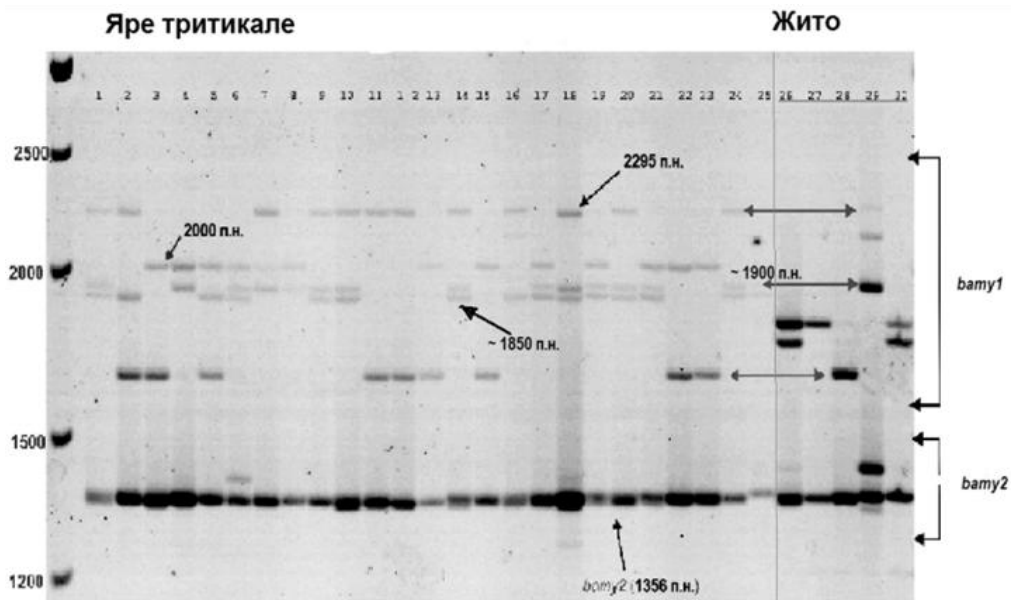


Рис. 4. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy1* та *Bmy2* між сортами тритикале ярого та жита. Сорти тритикале: 1 - Arc en Ciel, 2 - Fronteiro, 3 - Tentudia, 4 - Sierra de Almaraz, 5 - Sierra de Arroyo, 6 - Sierra de Lobos, 7 - Alter, 8 - Camarma, 9 - Cume, 10 - Curtido, 11 - Vrodi, 12 - Thisbi, 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; сорти жита: 26 - Riihi, 27 - Akusti, 28 - Iissavaara, 29 - Loppi, 30 - Hirvessalmi. М - маркер молекулярної маси DNA Ladder #SM1173

При порівнянні результатів, виявлено три ПЛР-фрагменти, загальні для всіх чотирьох досліджених видів – це фрагмент 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  $\beta$ -амілази *Bmy2*) (рис. 3, 4, 5).

Більшість різноманітного спектру алелів *Bmy1* тритикале співпадало зі спектром алелів *Bmy1* жита, але як у озимого (рис. 3), так і у ярого (рис. 4) 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 зразках пшениці двозернянки (рис. 5А), а також у егілопсу (рис. 5Б).

В ході проведеного дослідження показано, що спектри, одержані при використанні ЕРІС-методу, інформативні і підходять для оцінки міжвидових відмінностей і встановлення внутрішньовидової варіабельності представників такої обширної таксономічної групи, як злаки. Специфічність отриманих спектрів дає можливість робити попередні висновки про характер спорідненості.

Таким чином, відомі геномні дані організмів можуть ефективно використовуватися при розробці ЕРІС-маркерів для видів з невизначеними ДНК-послідовностями. Праймери, специфічні до ділянок екзон 1 - екзон 4 генів  $\beta$ -амілази злаків, виявилися придатними для того, щоб охарактеризувати

генетичну різноманітність родини *Poaceae*, що дозволило розглядати їх як новий засіб для ідентифікації злаків.

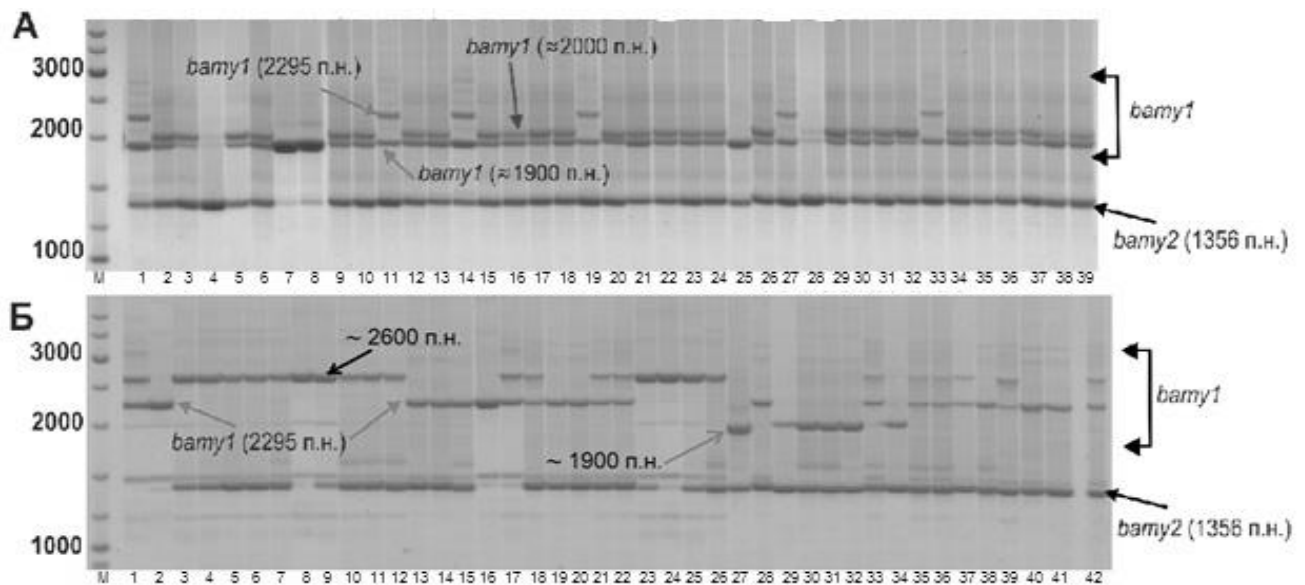


Рис. 5. Молекулярно-генетичний поліморфізм генів *Bmy1* та *Bmy2* у: А) *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* (1-39) та Б) *A. speltoides* (1-42). М - маркер молекулярної маси DNA Ladder #SM1173

**Вивчення поліморфізму гена *Bmy1* ячменю.** Наступним етапом роботи був аналіз розподілу алелів *Bmy1* у сортів ячменю ярого, районуваних на території східноєвропейської та центральноазіатської географічних зон, поділених на дев'ять регіонів вирощування залежно від агрокліматичних умов. Встановили закономірності поширення алелів даного гена, а також оцінювали генетичну різноманітність, використовуючи колекцію з 249 сортів ярого ячменю. Для ПЛР-аналізу застосовували сконструйовану пару ЕРІС-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. Очікували, 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 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) (рис. 6).

Інших алелів у гені *Bmy1*, в проаналізованій великій ділянці гена, не виявлено. Підтверджено, що відмінність між генотипами ячменю в гені *Bmy1* пов'язана з 126 п.н. транспозицією МІТЕ-елемента, яку зв'язують з синтезом низькоактивної  $\beta$ -амілази. За геном *Bmy2* сорти ячменю виявилися однорідними і містили ПЛР-фрагмент розміром 2260 п.н.

Отримано інформацію про поширення алелів гена *Vmy1* у вибірках сортів різних географічних зон. Показано, що частота появи алелів *Vmy1* може варіювати досить значно (табл. 2).

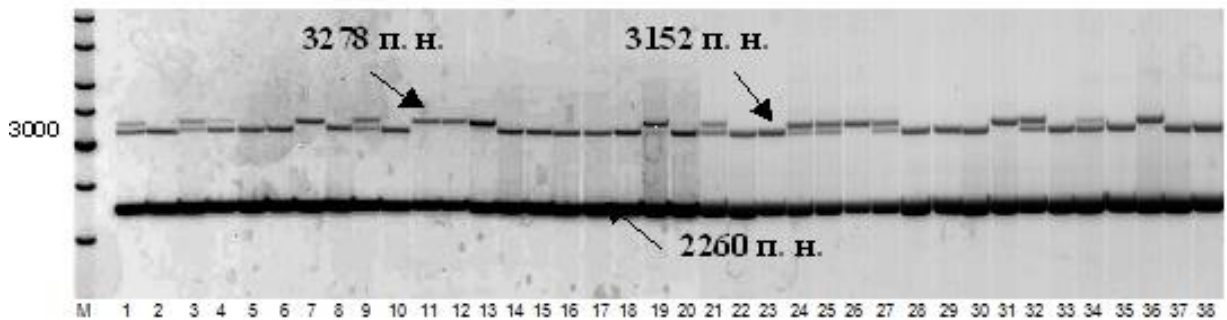


Рис. 6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів ярого ячменю, розповсюджених в Прибалтійському регіоні вирощування (1-38). М - маркер молекулярної маси DNA-ladder # SM1173

Таблиця 2

**Розподіл алелів гена *Vmy1* у вибірках сортів ячменю різних регіонів**

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-азіатська	Західно-Сибірський - вологий, недостатньо і середньо 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

Незважаючи на те, що розміри вибірок сортів у досліджених регіонах варіювали, можна відзначити, що алель *Vmy1*, 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 Євро-азіатській території, що узгоджується з даними про ґрунтово-кліматичні умови Північно-Європейській частини (Європейський, Прибалтійський та Білоруський регіони), як найбільш оптимальні для вирощування пивоварних сортів ячменю. При зміщенні до регіонів, розташованих на південному сході, частота алеля *Vmy1*, асоційованого з ознакою активної β-амілази, зменшується, а асоційованого з ознакою низькоактивної β-амілази – збільшується (рис. 7).

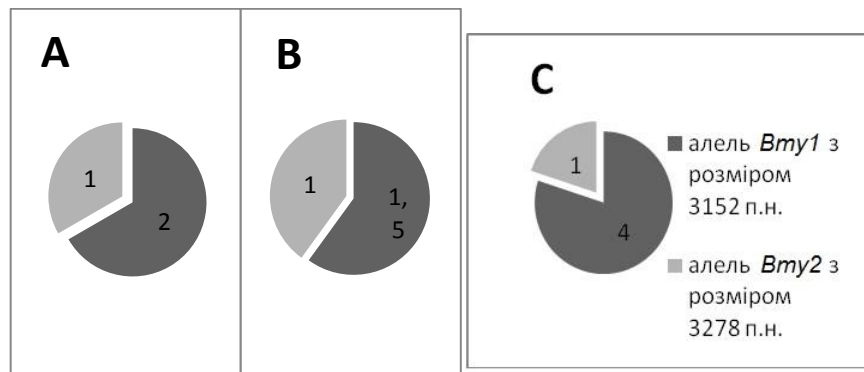


Рис. 7. Співвідношення алелів гена *Vmy1* в колекції сортів ярого ячменю, розповсюджених на Євро-азіатській території: А) сортів всіх географічних зон - 1:2; В) сортів з південних та східних областей – 1:1,5; С) сортів Північно-Європейських регіонів – 1:4

З'ясувалося, що географічний розподіл алелів *Vmy1* 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 *Vmy*, використані в цьому дослідженні, дозволили провести моніторинг сортів різних кліматичних зон, 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 ПЛР з специфічними праймерами Mes16g і r20 (Erkkila, 1999), заснованими на відмінностях в будові ділянки інтрона 3 гена *Vmy1* (126 п.н. МІТЕ-вставка), проведено дослідження 130 сортів ячменю та шести дикорослих різновидів *Hordeum*. Ідентифікували три алеля 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 наявна 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 несли від 50 до 100% алелів неактивної β-амілази (рис. 8А), а сорти зернового напрямку - ПЛР-фрагменти, зв'язані з ознакою високої активності β-амілази (рис. 8Б). 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  $\beta$ -амілази з розміром ПЛР-фрагменту 516 п.н.

Таким чином, у більшості досліджених українських пивоварних сортів ячменю встановили наявність алеля гена активного ферменту.

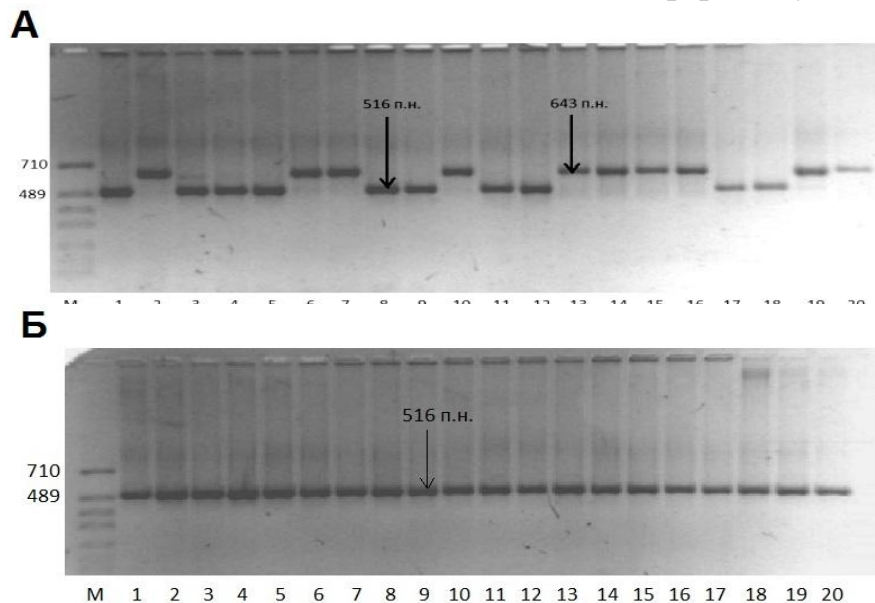


Рис. 8. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК: А) гетерогенного сорту ярого ячменю Олбрам пивоварного напрямку використання (50% алелів низькоактивної  $\beta$ -амілази) (1-20); Б) гомогенного сорту ярого ячменю Оболонь пивоварного напрямку використання (на 100 % складається з алелів активної  $\beta$ -амілази) (1-20); М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*.

Досліджена вибірка сортів озимого ячменю (всі сорти зернового напрямку використання) на 96% складалася з алелів низькоактивної  $\beta$ -амілази (рис. 9).

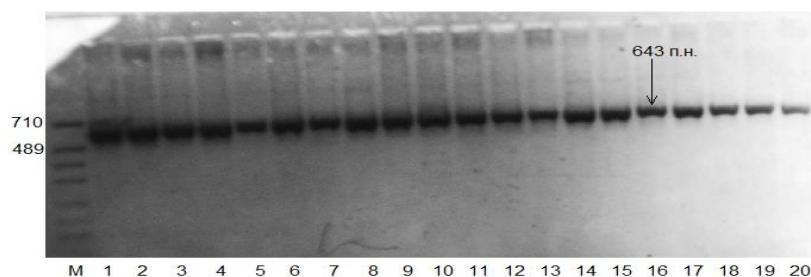


Рис. 9. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК гомогенного сорту озимого ячменю Одеський 170 зернового напрямку використання (на 100 % складається з алелів низькоактивної  $\beta$ -амілази) (1-20); М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*

ПЛР-аналіз локусу *Bmy1* дикорослих видів *Hordeum* показав у них наявність алелів активної та низькоактивної  $\beta$ -амілази (516 п.н. та 643 п.н.), але різновид *H. spontaneum* PI 296897 (Ізраїль, Іудея) на 100% складався з алелів високоактивної  $\beta$ -амілази з відповідним ПЛР-фрагментом довжиною 477 п.н. (рис. 10).



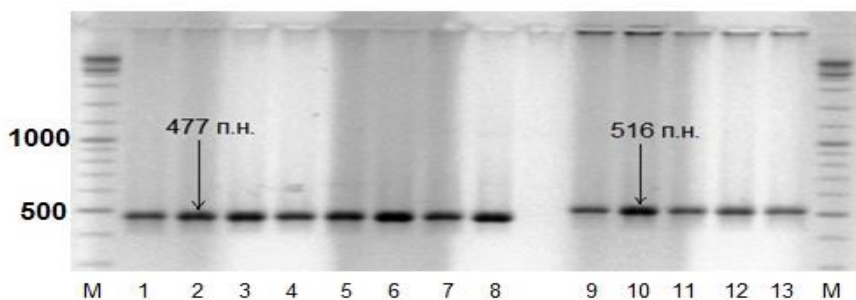


Рис. 10. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК дикорослих різновидів ячменю *H. spontaneum* (Ізраїль) (1-8) та *H. bulbosum* (Україна) (9-13); М – маркер молекулярної маси *pBlue Script/Msp I*

Таким чином, за допомогою даних молекулярних маркерів легко ідентифікувати варіанти активної / низькоактивної  $\beta$ -амілази в зерні ячменю, і вони можуть бути використані для MAS.

## ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень істотно доповнено інформацію про нуклеотидні та амінокислотні послідовності  $\beta$ -амілаз представників родини *Poaceae*, показано їх філогенетичні відносини, проведено молекулярно-генетичне дослідження генів *Vmy* у представників родини *Poaceae*, досліджений географічний розподіл алелів гена *Vmy1* у вибірках сортів ячменю різного походження, ідентифіковано алелі *Vmy1* 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 *Vmy1* і *Vmy2*  $\beta$ -амілаз у 21 виду злаків. При аналізі нуклеотидних послідовностей генів *Vmy* встановлено зв'язок поліморфізму інтронів з алельним станом генів  $\beta$ -амілази.

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

3. Встановлено філогенетичні взаємини видів рослин різних родів, родин, порядків і класів, на основі порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей  $\beta$ -амілаз. Кластеризація досліджених видів узгоджується з сучасними ботанічними класифікаціями. Підтверджено відокремлення ендоспермальної  $\beta$ -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* (двuzернянка, егілопс, тритикале, жито) за допомогою розроблених EPIC-маркерів, що дозволило отримати інформацію про алельний склад генів *Vmy*.

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. МІТЕ-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  $\beta$ -амілази: 516 п.н. алель (асоційований з активною  $\beta$ -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  $\beta$ -амілази. Система ідентифікації сортів ячменю за геном *Bmy1* дає можливість оцінки вихідного селекційного матеріалу на наявність певного алеля гена  $\beta$ -амілази.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Визначені та депоновані в GenBank NCBI 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  $\beta$ -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*  $\beta$ -амілази при створенні сортів ячменю з ферментом певної активності.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Стратула О.Р. Аллельные характеристики гена  $\beta$ -амилазы сортов ячменя Украины / О.Р. Стратула, Ю.М. Сиволап // Цитология и генетика. - 2007. - № 4. - С. 20-25. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

2. Stratula O. Molecular genetic analysis of cereal  $\beta$ -amylase genes using exon-primed intron-crossing (EPIC) PCR / O. Stratula, J. Cockram, R. Kalendar // Ratar. Povrt. – 2014. – Vol. 51(3). – С. 175-189. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

3. Стратула О.Р. Применение генов  $\beta$ -амилазы в качестве филогенетических маркеров / О.Р. Стратула, В.В. Коцеруба, Р.Н. Календарь // Биотехнология. Теория

и практика. – 2014. - № 4. – С. 10-21. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

4. 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. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

5. **Stratula O.** Comparative analysis of  $\beta$ -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. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

6. Стратула О.Р. Распределение аллелей  $\beta$ -амилазы в сортах культурного ячменя / О.Р. Стратула, Ю.М. Сиволап // Збірник наукових праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”. – 2006. – Т. 3. – С. 307-310. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

7. Создание ДНК-маркеров хозяйственно-ценных генов ячменя на основе ПЦР-анализа / М.С. Бальвинская, И.В. Ланцман, **О.Р. Стратула**, Ю.М. Сиволап // Збірник наукових статей «Геном рослин». – 2008. – С. 48-51. (Частка участі здобувача – 25%, особистий внесок – експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

8. Детекція господарсько-цінних ознак насіння ячменю за ДНК-маркерами / М.С. Бальвинская, Р.Н. Календарь, **О.Р. Стратула** [та ін.] // Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний Університет» НАУ. – 2008. – Вип. 107. - С. 123-126. (Частка участі здобувача – 20%, особистий внесок – експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

9. 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. (Частка участі здобувача – 25%, особистий внесок – експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті).

10. Стратула О.Р. Исследование молекулярно-генетических особенностей гена  $\beta$ -амилазы ( *$\beta$ -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. (Частка участі здобувача – 60%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту тез доповіді).

11. 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 // Abstr. Intern. Sci. Conf. “Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety”. – 07-10.09.2010, Odessa. – С. 37. (Частка участі здобувача – 25%, особистий внесок – експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту тез доповіді).

12. Применение генов  $\beta$ -амилазы в качестве филогенетических маркеров / **О.Р. Стратула**, Ю.М. Сиволап, В.В. Коцеруба, Р.Н. Календарь // VII Конференция

по кариології, кариосистематикі і молекулярній філогенії і II Школи-Симпозіума пам'яті Г.А. Левитського «Хромосоми і еволюція». – Санкт-Петербург, РФ. - 28-30.10.2013 г. - С. 102-104. (Частка участі здобувача – 60%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту тез доповіді).

13. Стратула О.Р. Применение генов  $\beta$ -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. (Частка участі здобувача – 70%, особистий внесок – планування роботи, експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту тез доповіді).

14. 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 // Одеса: «Астропринт», 2014. – 88 с. (Частка участі здобувача – 20%, особистий внесок – експериментальні дослідження, аналіз результатів, написання тексту посібника).

## АНОТАЦІЯ

### **Стратула О.Р. Молекулярно-генетичні особливості генів $\beta$ -амілази злаків.**

- Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 - молекулярна генетика. - ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ, 2015.

У дисертації визначено нуклеотидні послідовності генів *Vmy* для злакових видів, а також відповідні їм амінокислотні послідовності  $\beta$ -амілаз. Вивчено можливість використання генів *Vmy* в якості маркера для молекулярної ідентифікації на різних таксономічних рівнях.

У роботі представлені дані з вивчення внутрішньо- і міжвидового поліморфізму генів  $\beta$ -амілази *Vmy1* і *Vmy2* злаків. Для даного дослідження застосовували метод ЕРС-ПЛР, при якому використовували праймери, комплементарні кінцевим ділянкам екзонів для детекції поліморфізму в інтронних ділянках генів *Vmy*.

За допомогою сконструйованих праймерів вивчили колекцію сортів ярого ячменю, районованих на території східноєвропейської та центральноазіатської зон, що дозволило диференціювати даний матеріал за наявністю 126 п.н. вставки інтрона 3 *Vmy1*, яку пов'язують з низькоактивною  $\beta$ -амілазою. Отримані дані свідчать про низький рівень варіювання гена *Vmy1* культурного ячменю, а також показують географічний розподіл алелів.

Вперше одержано алельні характеристики сортів ячменю за геном *Vmy1*. Виявлено низький рівень поліморфізму ячменю за даним геном - два алелі гена ендоспермальної  $\beta$ -амілази: 516 та 643 п.н. алель. Система ідентифікації сортів ячменю за геном *Vmy1* дає можливість оцінки вихідного селекційного матеріалу на наявність найбільш ефективного алеля  $\beta$ -амілази.

**Ключові слова:**  $\beta$ -амілаза, гени *Vmy1* і *Vmy2*, поліморфізм.

## SUMMARY

**Stratula O.R. Molecular genetic characteristics of cereals  $\beta$ -amylase genes. - Manuscript.**

Thesis for scientific degree of Candidate of Biological Sciences in specialty 03.00.22 - Molecular Genetics. – Institute for Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis determined the nucleotide sequences of the *Bmy* genes for cereal species and their corresponding amino acid sequences of  $\beta$ -amylase. The possibility of using *Bmy* gene as a marker for molecular identification at various taxonomic levels, studied.

The dissertation presents the data for the study of intra- and interspecific polymorphism *Bmy1* and *Bmy2* genes of some species, varieties and cultivars of grasses. For this study used EPIC-PCR method in which used primers complementary end parts of exons to detect polymorphisms in intron sites *Bmy* genes.

The collections of spring barley cultivars from the Eastern European and Central Asian areas were analysed by exon-specific PCR for  $\beta$ -amylase genes. The endospermal  $\beta$ -amylase gene (*Bmy1*) was differentiated by the presence of 126 bp MITE insertion into intron 3, that is associated with low activity  $\beta$ -amylase. The findings suggest that a low level of the genetic variation for gene *Bmy1* within climatic zones is associated with individual breeding program for each ones.

For the first time the characteristics of barley varieties allelic *Bmy1* gene of endospermal  $\beta$ -amylase, received. It revealed a low level of polymorphism of barley for this gene - only two alleles of the *Bmy1* gene: 516 bp and 643 bp allele. The system of identification of barley varieties in *Bmy1* gene allows evaluation of initial breeding material in the presence of the most effective allele of the enzyme  $\beta$ -amylase.

**Keywords:**  $\beta$ -amylase, *Bmy1* and *Bmy2* genes, polymorphism.

## АННОТАЦИЯ

**Стратула О.Р. Молекулярно-генетические особенности генов  $\beta$ -амилазы злаков. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. - ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, 2015.

В диссертации определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов *Bmy1* и *Bmy2* для злаковых видов, а также соответствующие им аминокислотные последовательности  $\beta$ -амилаз. Охарактеризованы особенности экзон-интронной организации генов *Bmy1* и *Bmy2* у исследованных видов злаков: выявлены различия в длине и нуклеотидном составе интронных участков, при этом экзоны генов *Bmy* высококонсервативны. Таким образом, установлена связь между полиморфизмом интронов и аллельным состоянием генов *Bmy1* и *Bmy2*. Показана возможность использования ядерных генов *Bmy* в качестве молекулярного филогенетического маркера как на низких, так и на более высоких таксономических уровнях. На основе полученных данных установлены филогенетические взаимоотношения между родами, семействами, порядками и классами растений.

В работе представлены данные по изучению внутри- и межвидового полиморфизма генов  $\beta$ -амилазы *Bmy1* и *Bmy2* видов, разновидностей и сортов злаков. Для данного исследования применяли метод ЕРІС-ПЦР, при котором использовали сконструированные (на основе имеющихся в базе данных NCBI нуклеотидных последовательностей  $\beta$ -амилаз) праймеры, комплементарные концевым участкам экзонов для детекции полиморфизма в интронных областях исследуемых генов. В ходе проведенного исследования показано, что спектры, полученные при использовании ЕРІС-метода, информативны и подходят для оценки межвидовых различий и установления внутривидовой вариабельности представителей такой обширной таксономической группы, как злаки.

С помощью сконструированных ЕРІС-праймеров изучили материал коллекции сортов ярового ячменя, районированных на территории восточноевропейской и центральноазиатской зон, что позволило дифференцировать данный материал по наличию 126 п.н. вставки интрона 3 *Bmy1*, которую связывают с низкоактивной  $\beta$ -амилазой. Полученные данные свидетельствуют о низком уровне варьирования гена *Bmy1* культурного ячменя, а также демонстрируют географическое распределение аллелей. Установлена взаимосвязь генетического разнообразия с адаптивностью.

Впервые получены аллельные характеристики сортов ячменя по гену эндоспермальной  $\beta$ -амилазы *Bmy1*. Выявлен низкий уровень полиморфизма культурного ячменя по данному гену - только два аллеля гена эндоспермальной  $\beta$ -амилазы: 516 п.н. аллель (ассоциированный с наличием активной  $\beta$ -амилазы в зерне ячменя) и 643 п.н. аллель (ассоциированный с низкоактивным ферментом). ПЦР-анализ гена *Bmy1* дикорастущих видов *Hordeum* также показал у них наличие аллелей 516 п.н. и 643 п.н., однако у вида *H. spontaneum* (Израиль) выявлен аллель 477 п.н., ассоциированный с высокоактивной  $\beta$ -амилазой. Система идентификации сортов ячменя по гену *Bmy1* дает возможность оценки исходного селекционного материала на наличие наиболее эффективного аллеля гена  $\beta$ -амилазы.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -амилаза, гены *Bmy1* и *Bmy2*, полиморфизм.

Підписано до друку 18.09.2015  
Обсяг 0,9 авт. арк..Формат 60x84/16.  
Тираж 100 прим. Папір офсетний. Зам. № .

Надруковано у друкарні видавництва «Астропринт»  
(Свідоцтво ДК № 1373 від 28.05.2003 р.)  
м. Одеса, вул. Разумовська, 21.  
Тел. / факс: (0482) 37-14-25, 37-24-26, 33-07-17.  
***www.astroprint.odessa.ua***