

ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІЛКОВИХ СПЕКТРІВ ПИВОВАРНИХ СОРТІВ ЯЧМНЮ

Пивоварний ринок країни динамічно розвивається. В Україні зерно з високими пивоварними якостями може формуватися лише в певних областях, де кліматичні умови і ґрунти більш повно відповідають вимогам його вирощування. Це Вінницька, Волинська, Житомирська, Івано-Франківська, Київська, Львівська, Ровенська, Сумська, Тернопільська, Черкаська, Чернівецька і Чернігівська області. Для пивоварного солоду потрібне здорове, однорідне, вирівняне зерно з вмістом білку 9 – 11,5% і здатністю до пророщування 90-95% [8]. Важливими є показники сортової відповідності і чистоти яч-

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були сорти ярого ячменю, отримані від солодових та пивоварних підприємств, сільськогосподарських господарств та приватних підприємців різних областей України. Дані сорти занесені до Державного реєстру. Нами було опрацьовано ряд методів електрофорезу.

Найбільш ефективним підходом виявилась методика Бжезинського [1] – електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності сечовини.

Для електрофоретичного аналізу використовували гордеїни 100 довільно вибраних зерен ячменю. Неочищені зернівки подрібнювали, шрот заливали 0,2 мл 70% етанолу. Перемішували металеву паличкою. Через деякий час (2 – 12 годин) центрифугували 4 хвилини при 4000об/хв. Відбирали екстракт білку і ставили на випаровування у термостат, при температурі 30-40° С. Потім заливали розчином 5,5М сечовини пропорційно до об'єму відібраного спиртового екстракту білку (1:1). Пластини заливали поліакриламідними гелями (розділяючим та концентруючим). Компонентний склад поліакриламідних гелів: акриламід, метиленбісакриламід, розчин сірчанокислого заліза, аскорбінова кислота, сечовина, льодяна оцтова кислота. До складу концентруючого гелю, крім вищезазначених речовин, входив гістидин. Каталізаторами виступали ТЕМЕД та 10% розчин персульфату

Результати та обговорення

За допомогою електрофорезу досліджені наступні сорти ячменю, різні за популярністю для виробництва солоду (рис. 1).

меню. Встановлена пряма залежність між сортовою чистотою зерна ячменю і якістю отриманого солоду. Для отримання якісного солоду необхідно використовувати ячмінь із сортовою чистотою не менше 90%. А згідно з вимогами європейських стандартів чистота зерна має бути не нижче 95% [7].

Одним із найпростіших, швидких і відносно дешевих методів контролю сортової чистоти і відповідності зерна ячменю є електрофорез білків. Для проведення електрофоретичного аналізу гордеїнів застосовують більше 20 різних методів електрофорезу і їх модифікацій [2].

Для вирівнювання границі між гелями, на розділяючий гель наносили дистильовану воду. Тривалість електрофоретичного фракціонування гордеїнів була 4 години. Після розділення гелі протягом 10-15 годин фарбували. Склад фарби: Кумасі R – 250-300 мг, етиловий спирт – 70 мл, ацетон – 100 мл, льодяна оцтова кислота – 60 мл, трихлороцтова кислота – 60 г, дистильована вода – до 1 літра. Після фарбування гелі відмивали у воді протягом дня.

Електрофорез водорозчинних білків проводили за методикою ВІР Санкт-Петербург [5] і Поперелі [6].

Для фракціонування альбумінів використовували гель такого складу: акриламід, метиленбісакриламід, ТЕМЕД, гліцин, аскорбінова кислота, розчин семиводного закисного сірчанокислого заліза. Каталізатором був 10% розчин персульфату амонію. Електродний буфер містив на 1 літр 4 мл оцтової кислоти і 0,4 г гліцину. Тривалість електрофоретичного фракціонування альбумінів була від 2 до 2,5 годин. Фіксацію і фарбування білків здійснювали у тому ж розчині, що й гордеїнів. Нами був проведений також електрофорез водорозчинних білків зерна ячменю із використанням модифікованої методики Лемлі [3] з додаванням до розчину досліджуванних білків 1М сахарози.

Електрофорез гордеїнів як основний метод лабораторного сортового контролю і відповідності ячменю має певні обмеження. В останній

час на аналіз надходить все більше сортів ячменю, які за електрофоретичними спектрами гордеїнів не відрізняються. Схожі між собою за спектрами гордеїнів такі сорти: Скарлет і Ксанаду;

Джерзей і Беатріс; Шармай, Толар, Ебсон і Барке; Алісіана і Бамбіна; Квенч і Аннабель (рис. 2).

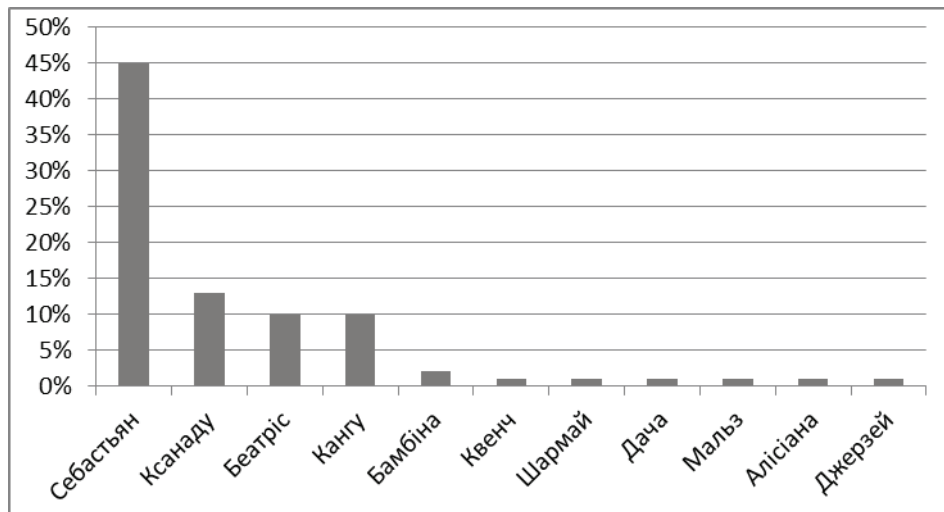


Рис. 1. Використання сортів ячменю при виробництві солоду

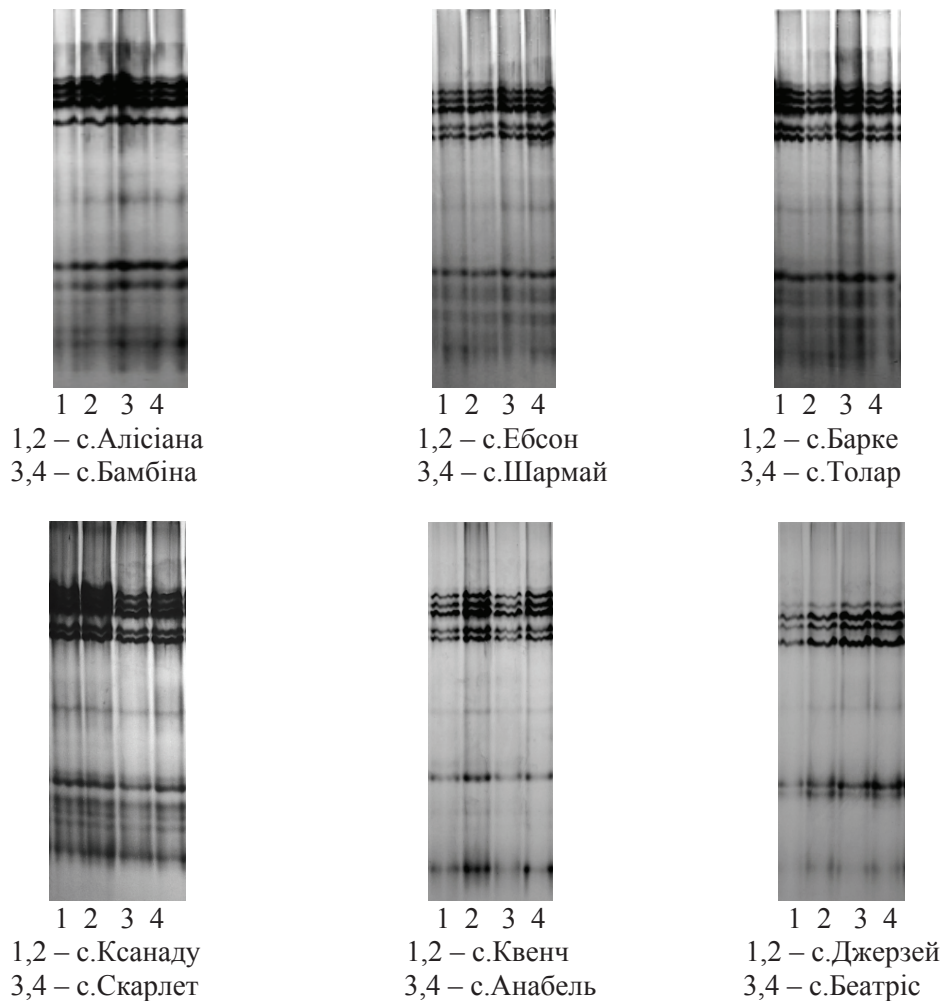


Рис. 2. Електрофореграми гордеїнів ячменю

Це є наслідком об'єктивного процесу звуження генетичної різноманітності в результаті селекційної діяльності людини [4]. Для ідентифікації цих сортів треба використовувати додаткові маркери. Сорти схожі за спектрами гордеїнів, легко можна розрізнити провівши електрофорез альбумінів, легкорозчинних білків ендосперму. Електрофоретичні спектри альбумінів представлені на рис.3.

Отримані дані свідчать про ефективність використання електрофорезу білків у якості методу лабораторного контролю у пивоварній промисловості. Цей метод може бути

використаний в аналізах при оцінці сортової чистоти і відповідності зерна ячменю. Модифікована нами методика Бжежинського для визначення спектрів гордеїнів була найбільш ефективною. Для диференціації сортів ячменю з однаковими спектрами гордеїнів потрібно проводити додатковий електрофорез водорозчинних білків. Для цього ми використовували модифіковану методику Поперелі, ВІР та Лемлі. Вказані методики виявились кращими для проведення електрофорезу альбумінів зерна ячменю.

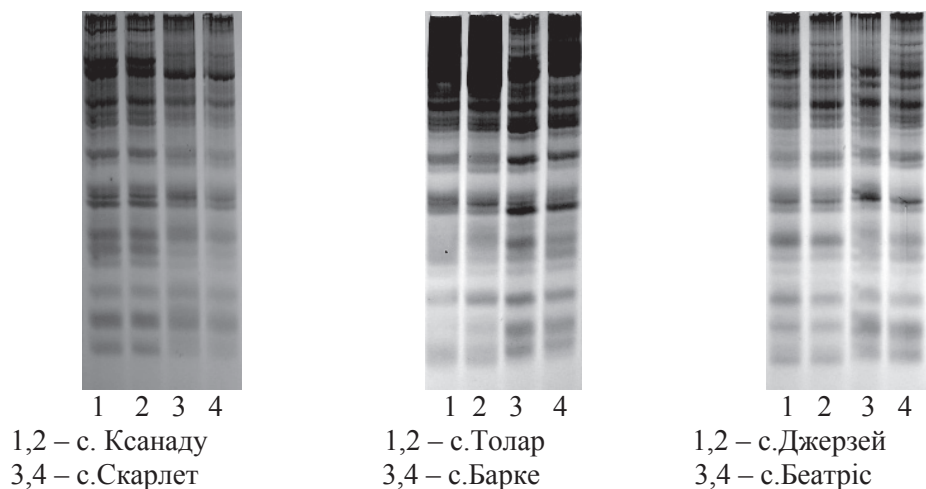


Рис.3. Електрофореграми альбумінів ячменю

Література

1. Brzezinski W., Mendelenski P., Improved PAGA procedure for identification of wheat, triticale, barley and cultivar // XII Eucarpia Congress. – 1989, Gottingen. – P. 28.
2. Cook R.J. Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook; variety identification ISTA. – 1992. – P. 25.
3. Laemmli V.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Natura*. – 1970. – Vol. 227, №52-59. – P. 680.
4. Алтухов Ю.П., Пухальский В.А., Политов Д.В., Калабушкин Б.А., Упелниек В.П. Динамика популяционных генофондов растений // В кн. Динамика популяций генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука. – 2004. – С. 295-413.
5. Идентификация, анализ и регистрация сортов, линий и гибридов подсолнечника методом электрофореза гелиантина. Метод. указания / под ред. И.П. Гаврилюк. – Л.: ВИР. – 1988. – 23 с.
6. Попереля Ф.О. Генетична інтерпритація електрофореграм геліантину насіння F₁ соняшника // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34, №2. – С. 84-90.
7. Тарзанов В.А. Качественные аспекты получения пивоваренного ячменя // Мат. III Международ. Конгресса «Зерно и хлеб России». – С.-Петербург, 3–15 ноября, 2007 г. – 2007. – С. 93.
8. Шубенко Н.П. Пиво начинается с солода // *Зерно*. – 2008. – №1. – С. 32-34.

SIRANT L.V., DYKUN M.O., POCHINOK V.M., ZAVALNA G.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska st., 31/17, e-mail: luba_va@ukr.net

IDENTIFICATION SPECTRA OF PROTEINS BREWING BARELY VARIETIES

Aim. Diversify barely varieties with similar spectra of hordein. **Methods.** Electrophoresis of storage proteins hordein and electrophoresis of water-soluble proteins albumin. **Results.** Selected modified albumin electro-

phoresis method for the determination of varietal conformity and purity of barely varieties. **Conclusion.** Electrophoresis of proteins is an effective method of laboratory quality control of barely grain.
Key words: barely, hordein, albumin, varietal conformity and purity, electrophoresis.

СТЕПАНЕНКО О.В.^{1,2}, СТЕПАНЕНКО А.І.¹, МОРГУН Б.В.¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *Wx* У ЛІНІЯХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ КОДОМІНАНТНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Крохмаль є основною поживною речовиною м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) і міститься він у запасуючих органах зернівки (ендоспермі), де накопичується у вигляді гранул, які складаються з полісахаридів двох типів – розгалуженого амілопектину (70-75%) і лінійної амілози (20-25%) [1].

Головний ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтаза крохмалю (GBSSI) з молекулярною масою біля 60 кДа, яка має назву *Wx*-протеїн. У геномі м'якої пшениці три гомеологічних гени кодують ізоформи GBSSI ферменту: *Wx-A1*, *Wx-B1* і *Wx-D1*, які розташовані у плечах хромосомах 7AS, 4AL і 7DS відповідно [2].

У кукурудзи, ячменю, рису, вівса, а потім і у пшениці були виявлені мутанти по генах *Wx*, у яких спостерігалось зниження вмісту або повна відсутність амілози [3]. У пшениці кожен з генів *Wx* має кілька алелів: активний алель (а), який кодує синтез білка *Wx*, нуль-алель (в), при якому синтез функціонального білка *Wx* відсутній та функціональні алелі з різною ферментативною активністю білка *Wx*. Пшеницею ваксі *Wx* називають сорти з поєднанням трьох нуль-алелів і відповідно відсутністю амілози у структурі молекули крохмалю. Також існують сорти з кількома нуль-алелями, які мають дещо знижений синтез амілози і називаються частковим ваксі [4].

Таблиця 1. Класифікація ваксі пшениці в залежності від наявності (+) чи відсутності (–) кожного з *Wx*-білків та вмісту амілози в кожному типі [5]

Типи	<i>Wx</i> -протеїни			Вміст амілози (%)
	<i>Wx-A1</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>	
Тип 1	+	+	+	28,7
Тип 2	–	+	+	28,5
Тип 3	+	–	+	27,1
Тип 4	+	+	–	28,0
Тип 5	+	–	–	20,3
Тип 6	–	+	–	25,8
Тип 7	–	–	+	22,9
Тип 8	–	–	–	0,9

Для оцінки алельного стану генів *Wx* найбільш надійним способом є молекулярне маркування з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [6-8].

Українськими [9] та російськими [10, 11] вченими в колекціях сортів озимої та ярої пшениці з відповідних країн були знайдені різні

комбінації активних і неактивних алелей *Wx*.

Метою нашої роботи було підібрати молекулярно-генетичні методики виявлення кодомінантних молекулярних маркерів та охарактеризувати алельний стан генів *Wx* селекційних ліній м'якої озимої пшениці *Wx-1* та *Wx-6*.