

УДК 577.21

СТЕПАНЕНКО А.І.<sup>1</sup>, МОРГУН Б.В.<sup>1</sup>, ТРОЯНОВСЬКА А.В.<sup>2</sup>, РИБАЛКА О.І.<sup>2</sup>,  
ВЕЛИКОЖОН Л.Г.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

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

<sup>2</sup> Селекційно-генетичний інститут НААН України,

Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: alex.rybalka@mail.ru

<sup>3</sup> Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17

## АЛЕЛЬНІ ВАРІАНТИ ГЕНІВ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ *PPO-A1* ТА *PPO-D1* У СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Поліфенолоксидаза (ПФО) – це рослинний фермент, який каталізує окислення фенолів шляхом гідроксилювання і дегідрування з утворенням орто-хінонних сполук, які призводять до небажаного потемніння та знебарвлення макаронних виробів [1], подового хліба [2], парових хлібобулочних виробів [3]. Окрім того висока ПФО активність є також небажаною для більшості класів локшини та продуктів із замороженого тіста, особливо з борошна білозерних сортів пшениці [4].

Отримання сортів пшениці з низькою активністю поліфенолоксидази є важливим завданням селекційних програм пшениці. Складність оцінки селекційного матеріалу на низьку активність ПФО полягає у існуванні значної кількості генетичних локусів, які обумовлюють активність ПФО. Вид м'яка пшениця (*Triticum aestivum* L.) є аллогексаплоїдним, що має три гомеологічні геноми, кожен з яких містить копію будь-якого гена. Також було виявлено, що пшениця містить багато паралогічних *PPO* генів, які виникли шляхом дуплікації і подальших мутацій [5–7].

Активність ПФО зерна пшениці в основному обумовлена генами, розташованими на хромосомах гомологічної групи 2. Виявлено, що гени *PPO-A1* та *PPO-D1*, які локалізовані на плечах хромосом 2AL і 2DL, впливають на ПФО активність і відповідно на стабільність кольору локшини та тіста [8–10].

Крім того була ідентифікована інша паралогічна родина генів, яка складається з генів *PPO-A2*, *PPO-B2* та *PPO-D2*, які також мають значний вплив на рівень активності ПФО [11].

Виявлення алейного поліморфізму генів *PPO-A1*, *PPO-D1*, *PPO-A2*, *PPO-B2* та *PPO-D2* можна здійснювати за допомогою систем молекулярних маркерів, заснованих на полімеразних ланцюгових реакціях (ПЛР) [9, 12].

Про алейний склад генів ПФО у сортів української селекції до цього часу нічого не

відомо. Селекційні програми зі створення білозерних сортів пшениці, які щойно ініційовані в Україні, потребують чіткої характеристики генотипів цінних ліній для ефективної роботи зі створення сортів з низькою активністю ферментів. Отже, метою нашої роботи було впровадження систем молекулярних маркерів для виявлення алейного поліморфізму генів *PPO-A1* та *PPO-D1* в сортах озимої м'якої пшениці української селекції.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 82 сорти пшениці вітчизняної селекції наданих Селекційно-генетичним інститутом НААН України і Інститутом фізіології рослин та генетики НАН України.

Загальна ДНК виділялася за допомогою модифікованого ЦТАБ методу [13]. Ідентифікація алелей високої та низької активності ферменту ПФО проводилася за допомогою двох STS маркерів *PPO33* та *PPO29* методом ПЛР з використанням специфічних праймерів [9]. Для мультиплексної ПЛР використовували праймери до референтного гену *TaTM20*, які були обрані згідно [14].

Програма мультиплексної ПЛР для маркеру *PPO33*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 34 цикли – 30 с. при 94 °С, 30 с. при 59 °С, 1 хв. при 72 °С та 5 хв. фінальна елонгація. Кінцева концентрація праймерів для гену *PPO-A1* у реакції – 0,5 мкМ, для референтного гену *TaTM20* – 0,25 мкМ.

Програма мультиплексної низхідної (Touchdown) ПЛР для маркеру *PPO29*: початкова денатурація 3 хв при 94 °С, 8 циклів – 30 с. при 94 °С, 30 с. при 68 °С (з кожним циклом температура зменшується на 1 °С), 1 хв. при 72 °С та 24 циклів – 30 с. при 94 °С, 30 с. при 61 °С, 1 хв. при 72 °С та 5 хв. фінальна елонгація. Кінцева концентрація праймерів для гену *PPO-D1* у реакції – 0,5 мкМ, для

референтного гену *TaTM20* – 0,3 мкМ.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 1,2 % агарозному гелі [15].

#### Результати та обговорення

Скринінг вибірки сортів пшениці вітчизняної селекції здійснювали за допомогою маркерних систем запропонованих *He зі співав.* (2007). Для отримання більш надійних і інформативних результатів тестування нами були розроблені дуплексні ПЛР, в яких у якості референтного виступав ген *TaTM20*.

Результати типової ПЛР з маркером PPO33 наведені на рисунку 1.

Згідно з [9], очікували амплікони розміром 290 та 481 п.н. для алелів *PPO-A1a* та *PPO-A1b* відповідно. Однак, ми спостерігали амплікони

391 та 582 п.н., які підтверджуються аналізом відповідної послідовності гену *PPO-A1* з Генетичного банку (National Center for Biotechnology Information). Однак для деяких сортів (зокрема Гурт, Заграва, Гілея) спостерігали наявність 3-х ампліконів (обидва очікувані та амплікон розміром близько 500 п.н.), що може свідчити про наявність у даних сортах нового функціонального алелю гену *PPO-A1*.

Результати типової ПЛР з маркером PPO29 наведені на рисунку 2.

Для маркеру PPO-29 спостерігали очікуваний амплікон 490 п.н., який свідчить про наявність алелю *b* гену *PPO-D1*. Результати аналізу вибірки сортів та ліній пшениці наведені в таблиці.

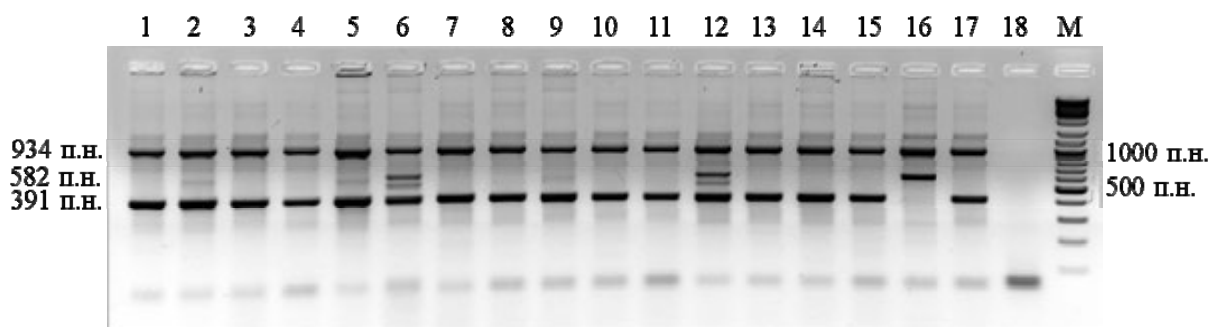


Рис. 1. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на маркер PPO33 для виявлення алелів *PPO-A1a* та *PPO-A1b*. Доріжки 1-15 – досліджувані зразки; 16 – позитивний контроль, лінія 3162 КР (*PPO-A1b*); 17 – позитивний контроль, лінія 3118 КР (*PPO-A1a*); 18 – негативний контроль (ТЕ буфер); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix

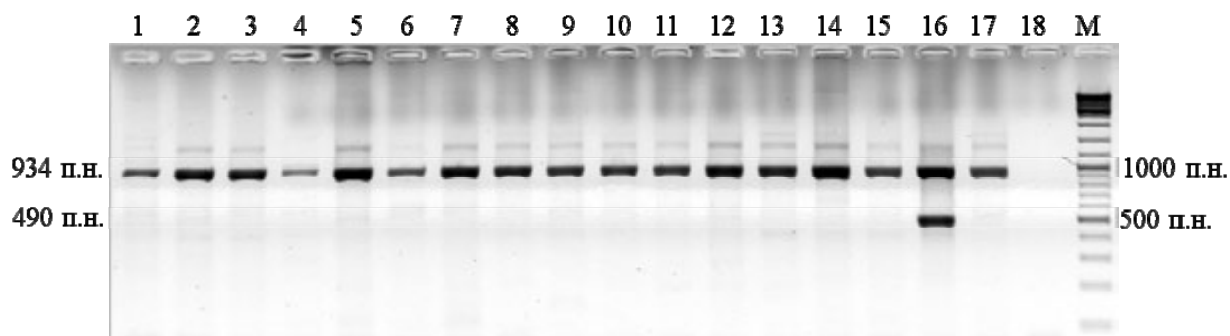


Рис. 2. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР на маркер PPO29 для виявлення алелю *PPO-D1b*. Доріжки 1-15 – досліджувані зразки; 16 – позитивний контроль, сорт Антонівка (*PPO-D1b*); 17 – позитивний контроль, лінія 311/081 (*PPO-D1a*); 18 – негативний контроль (ТЕ буфер); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Таблиця. Результати аналізу 82 сортів пшениці за генами *PPO-A1* та *PPO-D1*

Сорт	<i>PPO-A1</i>	<i>PPO-D1</i>	Сорт	<i>PPO-A1</i>	<i>PPO-D1</i>
Антонівка	a	b	Золотоколоса	a	b
Благодарка	a	b	Солоха	a	b
Борвій	a	b	Смуглянка	a	a
Бунчук	a	b	Славна	a	b
Ватажок	a	b	Чорнява	a	b
Вихованка	a	b	Спасівка	a	a
Вікторія	a	b	Сотниця	a	a
Гармонія	a	b	Полянка	a	b
Господиня	a	a	Борія	a	a
Гурт	a*	b	Гілея	a*	b
Дальницька	a	a	Крижинка	a*	b
Доброчин	a	b	Миронівська 61	a	b
Доброчинна	a*	b	Новокиївська	a	b
Дюк	a	b	Трипільська	a	b
Епоха	a	b	Миронівська 65	a	b
Єдність	b	a	Щедрівка Київська	a	a
Жайвір	a	b	Білява	b	a
Журавка	a	b	Українська 246	a	a/b
Заграва	a*	b	Безоста 1	a	a
Задумка	a	b	Хист	a	b
Заможність	a	b	Поліська 90	a	a
Запорука	a	b	Донецька 48	a	a
Звитяга	a	a	Ліра	a	a
Землячка	a	b	Місія	a	a
Зиск	a	b	Небокрай	a	b
Зміна	a	b	Нива Одеська	a	b
Знахідка	a	b	Ніконія	a	b
Зорепад	a	b	Одеська 265	a	a
Істина	a	a	Одеська 267	a	a
Кірія	a	b	Одеська 51	a	a
Княгиня Ольга	a	b	Отаман	a	a
Косовиця	a	b	Пилипівка	a	a
Красень	a	b	Повага	a	b
Куяльник	a	b	Подяка	a	b
Лад	a	b	Польовик	a	b
Лановий	a	b	Пошана	a	b
Лебідка	a	b	Селянка	a	b
Литанівка	a	b	Скарбниця	a	a
Люна	a	a	Соната	a	a
Соната	a	a	Ужинок	a	a
Турунчук	a	b	Українка	a	b

Примітка: a – алелі *PPO-A1a* та *PPO-D1a*; b – *PPO-A1b* та *PPO-D1b*; a\* – новий функціональний алель, для якого спостерігали наявність 3-х ампліконів.

З джерела [9] відомо, що за низьку ПФО активність відповідають алелі *PPO-A1b* та *PPO-D1a*. В результаті дослідження вибірки 82 сортів було виявлено алель *PPO-A1b* лише у сортах Єдність та Білява (український районований сорт білозерної пшениці), що складає 2,4 % загальної вибірки. У сортах Гурт, Доброчинна, Заграва, Гілея та Крижинка (6 % разом) спостерігали появу нетипового алелю *PPO-Aa\**. В інших сортах наявний алель *PPO-A1a*, який визначає високий рівень активності ПФО.

У 26 сортах вибірки (31,7 %) був визначений алель *PPO-D1a*, який обумовлює високоактивну ПФО, у решти – алель *PPO-D1b*. У сорті Українська 246 спостерігали наявність алелів обох типів.

#### Висновки

За допомогою розроблених мультиплексних ПЛР на основі STS маркерів PPO33

PPO29 була проаналізована вибірка сортів озимої м'якої пшениці української селекції на розповсюдження алельних варіантів генів *PPO-A1* та *PPO-D1*, які обумовлюють активність поліфенолоксидази. Виявлено, що алелі *PPO-A1b* та *PPO-D1a*, які визначають низькоактивну ПФО, наявні у 2,4 та 31,7 % перевірених сортів відповідно. Це свідчить про невисоку частоту поширення алелів низької активності ПФО зерна серед вітчизняних сортів. Так лише сорти Білява та Єдність несуть обидва низькоактивні алелі. Був виявлений новий можливий алель гену *PPO-A1*, визначення фізіологічної ролі якого потребує подальших досліджень шляхом секвенування та біохімічних тестів. Отримана в даній роботі інформація про алельний стан генів *PPO* дозволить посилити ефективність селекції м'якої озимої пшениці в напрямку отримання сортів з низьким рівнем ПФО зерна.

#### Література

1. Simeone R., Pasqualone A., Clodoveo M.L., Blanco A. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat // *Cell Mol Biol Lett.* – 2002. – 7. – P. 763–769.
2. McCallum J.A., Walker J.R.L. O-diphenol oxidase activity, phenolic content and colour of New Zealand wheats, flours and milling streams // *J Cereal Sci.* – 1990. – 12. – P. 83–96.
3. Dexter J.E., Preston K.R., Matsuo R.R., Tiples K.H. Development of a high extraction flour for the GRL Pilot Mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market // *Can Inst Food Sci Technol.* – 1984. – 14. – P. 253–259.
4. Feillet P., Autran J.C., Icard-Verniere C. Pasta brownness: an assessment // *J Cereal Sci.* – 2000. – 32. – P. 215–233.
5. Fuerst E.P., Xu S.S., Beecher B. Genetic characterization of kernel polyphenol oxidase in wheat and related species // *J Cereal Sci.* – 2008. – 48. – P. 359–368.
6. Jukanti A.K., Bruckner P.L., Fischer A.M. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes // *Cereal Chem.* – 2004. – 81. – P. 481–485.
7. Massa A.N., Beecher B., Morris C.F. Polyphenol oxidase (P.O) in wheat and wild relatives: molecular evidence for a multigene family // *Theor Appl Genet.* – 2007. – 114. – P. 1239–1247.
8. Chang C., Zhang H.P., Xu J., You M.S., Li B.Y., Liu G.T. Variation in two P.O genes associated with polyphenol oxidase activity in seeds of common wheat // *Euphytica.* – 2007. – 154. – P. 181–193.
9. He X.Y., He Z.H., Zhang L.P., Sun D.J., Morris C.F., Fuerst E.P. Allelic variation of polyphenol oxidase (P.O) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the P.O genes in common wheat // *Theor Appl Genet.* – 2007. – 115. – P. 47–58.
10. Sun D.J., He Z.H., Xia X.C., Zhang L.P., Morris C.F., Appels R., Ma W.J., Wang H. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat // *Mol Breed.* – 2005. – 16. – P. 209–218.
11. Beecher B.S., Skinner D.Z. Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels // *J. Cereal Sci.* – 2011. – 53. – P. 371–378.
12. Beecher B.S., Carter A.H., See D.R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *TAG.* – 2012. – 124. – P. 1463–1473.
13. Stewart C.N., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // *BioTechniques.* – 1993. – 14 (5). – P. 748–749.
14. Kim Y.-Y., Kim D.-Y., Shim D. et al. Expression of the novel wheat gene TM20 confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // *J. of Biol. Chem.* – 2008. – 283 (23). – P. 15893–15902.

STEPANENKO A.I.<sup>1</sup>, MORGUN B.V.<sup>1</sup>, TROYANOVSKA A.V.<sup>2</sup>, RYBALKA O.I.<sup>2</sup>, VELYKOZHON L.G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

<sup>2</sup> The Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation of the Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska road, 3, e-mail: alex.rybalka@mail.ru

<sup>3</sup> Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17

## POLYPHENOL OXIDASE GENES *P.O-A1* AND *P.O-D1* VARIATION AMONG UKRAINIAN WINTER WHEAT (*T. AESTIVUM* L.) CULTIVARS

**Aims.** Polyphenol oxidase (P.O), a ubiquitous enzyme in plants, is associated with browning and discoloration of breeding products such as pan bread, steamed bread, pasta, foodstuff of freezing dough. There are five genes that control the P.O activity: *P.O-A1*, *P.O-D1*, *P.O-A2*, *P.O-B2* and *P.O-D2*. Genes *P.O-A1*, *P.O-D1* can occur in several allelic variants: alleles of high activity (*P.O-A1a* and *P.O-D1b*), alleles of low activity (*P.O-A1b* and *P.O-D1a*) which encode different types of P.O enzymes. **Methods.** The most reliable way to assess the allelic state of P.O gene is molecular identification STS markers P.O33 and P.O29.

**Results.** Among the studied wheat by codominant and dominant molecular markers two varieties (Bilyava and Ednist) carrying low activity *P.O-A1*, *P.O-D1* alleles and 26 varieties containing one low activity allele *P.O-D1a* were identified. **Conclusions.** The results of the study can be used efficiently to identify genotypes with low P.O activity in wheat breeding.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., *P.O* genes, molecular markers, marker-assisted selection.

УДК 579:577.6

СУПРУН С.М.<sup>1</sup>, ДОНЧЕНКО Г.В.<sup>1</sup>, ПАРХОМЕНКО Ю.М.<sup>1</sup>, ХАРКЕВИЧ Е.С.<sup>2</sup>, КУРЧЕНКО И.Н.<sup>2</sup>, АРЕТИНСКАЯ Т.Б.<sup>3</sup>, СТЕПАНЕНКО С.П.<sup>1</sup>, КРАВЧЕНКО О.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины,

Украина, 01601, г. Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

<sup>2</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, ГСП Д 0368, г. Киев, ул. Заболотного, 154

<sup>3</sup> Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Украина, 03041, г. Киев, ул. Героев обороны, 15

## ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЦИНКСОДЕРЖАЩЕЙ ВИТАМИННО-ПРОТЕИНОВОЙ ДОБАВКИ

Микромицеты благодаря уникальным физиолого-биохимическим свойствам являются основными продуцентами в биотехнологии – используются для получения лекарственных препаратов в медицине, в сельском хозяйстве, рациональном природопользовании. На их основе была создана новая область медицины – фармацевтическая микология. Грибы содержат белок, сходный по аминокислотному составу с животным, богаты витаминами, коферментами, а также синтезируют биологически активные вещества, перспективные для профилактики и лечения целого ряда патологических состояний. На основе грибов различных таксонов могут быть получены ферменты, витамины, антибиотики, полисахариды и лекарственные

средства, обладающие иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. От других богатых белком продуктов питания грибы выгодно отличаются низкой калорийностью и наличием пищевых волокон, что является одним из оснований их использования в качестве кормовых добавок. Грибы технологичны: нетребовательны к субстрату, обладают довольно высокой скоростью роста. Однако они требуют для своего роста и накопления биомассы внесения в среду ряда микроэлементов, в частности цинка [1–4]. Испытание наномерных биогеенных металлов в сельском хозяйстве дало положительный результат. Благодаря использованию достижений современных технологий удалось