

Алельний стан ключових генів каротиногенезу за ДНК-маркерами у лінії кукурудзи та їхніх гібридів

Ю. О. Гончаров, Т. М. Сатарова, Б. В. Дзюбецький, В. Ю. Черчель

ДУ Інститут зернових культур НААН України, вул. В. Вернадського, 14, м. Дніпро, 49027, e-mail: wild91@list.ru

Мета. Аналіз алельного стану ключових генів каротиногенезу – гена лікопін-ε-циклази (*lcyε*) та гена β-каротингідроксилази (*crtRB1*) за ДНК-маркерами *lcyε*-3'INDL, *lcyε*-SNP216 та *crtRB1*-3'TE у лінії кукурудзи вітчизняної селекції та їхніх гібридів. **Методи.** Виділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, гель-електрофорез. **Результати.** Досліджено алельний стан ключових генів каротиногенезу за ДНК-маркерами у восьми інбредних ліній кукурудзи та їхніх простих гібридів. Молекулярно-генетичний поліморфізм у дослідженій добірці ліній і гібридів був виявлений за геном β-каротингідроксилази для маркера *crtRB1*-3'TE. Для цього гена підтверджено кодомінантний характер успадкування алелей батьківських ліній у простих гібридах. За маркерами гена лікопін-ε-циклази *lcyε*-3'INDL та *lcyε*-SNP216 серед досліджених ліній і гібридів поліморфізму не виявлено, вивчені генотипи містили лише по одному варіанту алелей кожного маркера. Для ліній 'ДК2533СЗМ', 'ДК633/266зС,зМ', 'ДК366зС,зМ' та гібридів 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' і 'ДК231С×ДК366зС,зМ' слід очікувати зниження активності ферменту β-каротингідроксилази внаслідок мутації гена *crtRB1* у разі впливу транспозонового елемента на 3'-кінці, а також інгібування переходу β-каротину в β-криптоксантин, що дає змогу прогнозувати накопичення β-каротину в зерні. **Висновки.** Внаслідок проведеного дослідження алельного стану генів каротиногенезу в кукурудзи було встановлено відсутність поліморфізму за маркерами *lcyε*-3'INDL та *lcyε*-SNP216 гена лікопін-ε-циклази у восьми інбредних ліній та їхніх простих гібридів, причому за маркером *lcyε*-3'INDL у геномах усіх досліджених зразків міститься сприятливий для накопичення β-каротину алель. За маркером *crtRB1*-3'TE гена β-каротингідроксилази досліджений селекційний матеріал виявився поліморфним. Сприятливий для накопичення β-каротину алель гена *crtRB1* ідентифіковано в лініях 'ДК2533СЗМ', 'ДК633/266зС,зМ', 'ДК366зС,зМ' та гібридах 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' і 'ДК231С×ДК366зС,зМ'. Прості гібриди кодомінантно успадковують алелі гена β-каротингідроксилази материнської та батьківської ліній.

Ключові слова: алель, молекулярно-генетичні маркери, каротиногенез, кукурудза, лінія, гібрид.

Вступ

Кукурудза – важлива кормова, технічна та харчова культура, яка здатна забезпечити кормами тваринництво та сировиною хімічну, біотехнологічну та харчову промисловість. Середня врожайність зерна кукурудзи в сільськогосподарських підприємствах України в 2014 р. становила 6,66 т/га, в 2015 р. – 6,11 т/га, тоді як для найкращих гібридів вітчизняної селекції цей показник

досягає 7,92 та 7,84 т/га відповідно. Останніми роками зерно кукурудзи стало провідною складовою експортного потенціалу України [1, 2]. У зв'язку з цим постає актуальне завдання створення форм кукурудзи з підвищеною харчовою цінністю, новими споживчими якостями, які забезпечать вітчизняним гібридам конкурентоспроможність на світовому ринку.

Кукурудза – одна із зернових культур, яка здатна накопичувати в ендоспермі насіння значну кількість каротиноїдів [3]. Каротиноїди – це клас рослинних пігментів, частина з яких в організмі людини та тварин перетворюється на вітамін А.

Вихідним попередником біосинтезу каротиноїдів у кукурудзи виступає C_{20} -сполука – геранілгеранілпірофосфат (ГПФ). ГПФ через ряд проміжних продуктів перетворюється на першу забарвлену речовину лікопін

Yuriy Goncharov

<http://orcid.org/0000-0001-8128-7098>

Tatiana Satarova

<http://orcid.org/0000-0002-5571-1139>

Boris Dzubetsky

<http://orcid.org/0000-0003-2955-232X>

Vladyslav Cherchel

<http://orcid.org/0000-0002-0429-4961>

[3, 4], який на наступному етапі зазнає реакції циклізації. За асиметричної циклізації лікопін під дією ферменту лікопін-ε-циклази, який кодується геном *lcyε*, перетворюється на δ-каротин – попередник синтезу α-каротину, зеаксантину та лютеїну. За симетричної циклізації лікопіну під дією ферменту лікопін-β-циклази (кодується геном *lcyβ*) утворюється γ-каротин, який здатен поетапно переходити у β-каротин, β-криптоксантин та зеаксантин. Молекула β-каротину, порівняно з іншими каротиноїдами, містить два β-кільця, що забезпечує синтез відразу двох молекул вітаміну А і робить β-каротин найефективнішим попередником синтезу цього цінного вітаміну в організмі людини [5–9].

Для підвищення вмісту саме β-каротину в зерні кукурудзи важливо, щоб утворений лікопін здебільшого брав участь у симетричній, а не асиметричній циклізації. Таким чином, потенційно перспективним шляхом збільшення вмісту β-каротину в зерні кукурудзи є інгібування експресії генів, які забезпечують перетворення лікопіну на α-каротин, та активізація експресії генів, відповідальних за перетворення лікопіну на γ- і β-каротин. Разом з тим, стримування перетворення вже синтезованого β-каротину на β-криптоксантин також сприятиме його накопиченню. З цього погляду визначальними для кукурудзи є дослідження поліморфізму гена лікопін-ε-циклази (*lcyε*) та гена β-каротингідроксилази 1 (*crtRB1*), розміщених відповідно на хромосомах 8 і 10.

С. Е. Narjes et al. [10] дослідили поліморфізм гена *lcyε* та виявили три поліморфні сайти, найбільшою мірою пов'язані з варіюванням вмісту каротиноїдів, які можна розглядати як молекулярні маркери алельного стану цього гена: індел на 5'-кінці (маркер *lcyε*-5'INDL), однонуклеотидна заміна всередині цього гена (маркер *lcyε*-SNP216) та індел на 3'-кінці (маркер *lcyε*-3'INDL).

Ген *crtRB1* є одним із ключових генів біосинтезу каротиноїдів і пов'язаний з їх накопиченням у ендоспермі кукурудзи [11–14]. На цей час виявлено три поліморфні ділянки цього гена, які впливають на варіювання концентрації каротиноїдів у зерні і також розглядаються як маркери алельного стану цього гена: ділянка на 5'-кінці, поліморфізм якої зумовлений дією транспозонованого елемента (маркер *crtRB1*-5'TE), ділянка всередині гена (маркер *crtRB1*-IND14) та ділянка на 3'-кінці, поліморфізм якої також зумовлений дією транспозонованого елемента (маркер *crtRB1*-3'TE) [15]. Варто зазначити,

що сприятливий алель за маркером *crtRB1*-3'TE здатен самостійно подвоїти вміст β-каротину в зерні кукурудзи, незалежно від алельного стану маркера *crtRB1*-5'TE та маркерів гена *lcyε* [14, 16, 17].

У літературі немає інформації щодо поширеності алелей генів лікопін-ε-циклази та β-каротингідроксилази серед вітчизняних селекційних зразків кукурудзи, а також особливостей їх успадкування у самозапилених ліній та їхніх гібридів. У зв'язку з цим метою дослідження був аналіз алельного стану ключових генів каротиногенезу – гена лікопін-ε-циклази та гена β-каротингідроксилази за ДНК-маркерами *lcyε*-3'INDL, *lcyε*-SNP216 та *crtRB1*-3'TE у ліній кукурудзи вітчизняної селекції та їхніх гібридів.

Матеріали та методика досліджень

Досліджено 8 перспективних інбредних ліній кукурудзи (*Zea mays* L.), створених у ДУ Інститут зернових культур НААН (м. Дніпро), та їхніх простих гібридів.

ДНК виділяли з п'яти-семи 7-добових проростків кожного генотипу за модифікованим СТАВ-методом [18]. Алельний стан генів, що беруть участь у детермінації каротиногенезу, визначали за допомогою ДНК-маркерів *lcyε*-3'INDL, *lcyε*-SNP216 та *crtRB1*-3'TE – з використанням методів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та гель-електрофорезу. Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації відповідних ділянок ДНК-маркерів наведено в таблиці 1.

Оскільки для маркера *lcyε*-SNP216 очікується поява нуль-алеля з відсутністю будь-якої смуги на електрофоретичній доріжці, для підтвердження наявності ДНК зразка проводили дуплексну ПЛР з додаванням у реакційну суміш, крім праймерів до маркера *lcyε*-SNP216, праймерів до гена алкогольдегідрогенази кукурудзи *adh1* (внутрішній контроль): Adh-F3: cgtcgtttccatctctctctcc, Adh-R1: gacagaggagaacaaggcg. У дуплексній ПЛР для гена *adh1* очікували появу смуги розміром 234 п.н.

Реакційна суміш для ПЛР одного зразка об'ємом 20 мкл містила: DreamTaq™Green буфер, (6x) – 2 мкл; DreamTaq™ полімеразу (ThermoScientific), (5 од./мкл) – 0,2 мкл; суміш дезоксирибонуклеотидів – по 200 мкМ кожного dNTP; пряий праймер – 0,2 мкМ; зворотний праймер – 0,2 мкМ; зразок ДНК – 30 нг.

ПЛР проводили згідно з методикою Т. Safawo et al. [5] за таких умов: початкова денатурація – при температурі 94 °С протягом 5 хв; далі 40 циклів, які включали такі

Таблиця 1

Характеристика ДНК-маркерів генів каротиногенезу, використаних у дослідженні

Молекулярний маркер		Нуклеотидна послідовність прямого (F) та зворотного (R) праймерів	Посилання
Позначення	Локалізація гена (номер хромосоми, номер біна)		
Ген лікопін-ε-циклази кукурудзи (<i>lcyε</i>)			
<i>lcyε</i> -3'INDL	8.05	F1: gtacgtcgttcattctccgtaccc R1: cttggtgaacgcatttctgttg F2: ggaccggaacagccaactg R2: ggcgaaatgggtacggcc	[10]
<i>lcyε</i> -SNP216	8.05	F: gcgagcgtggcgctggat R: tgaagtacggctgcaggacaacg	[10]
Ген β-каротингідроксилази кукурудзи (<i>crtRB1</i>)			
<i>crtRB1</i> -3'TE	10.05	F: acaccatggacaagtctg R1: acactctggcccatgaacac R2: acagcaatacaggggaccag	[15]

стадії, як денатурація (при 94 °C протягом 1 хв), відпал праймерів (при 60 °C протягом 1 хв) та елонгація (при 72 °C протягом 1 хв). Кінцеву елонгацію здійснювали при 72 °C протягом 5 хв, фаза охолодження проходила при +10 °C.

Візуалізували продукти ампліфікації після електрофоретичного розділення у 2% -му агарозному гелі за допомогою приладу GelDoc™ (BioRad).

Результати досліджень

За маркером *lcyε*-3'INDL ген *lcyε* потенційно може мати два алелі, які на електрофореграмах реєструються як смуги 144+502 п.н. (сприятливий алель) та 399+502 п.н. (несприятливий алель). За маркером *lcyε*-SNP216 також описано два можливі алельні стани: поперше, поява на електрофореграмах смуги розміром 395 п.н., що відповідає наявності в цьому маркерному сайті нуклеотиду з азотистою основою тимін (Т, несприятливий алель); по-друге, відсутність смуг на електрофореграмах, тобто нуль-алель, що відповідає наявності в маркерному сайті нуклеотиду з азотистою основою гуанін (G, сприятливий алель) [10].

Поліморфізм гена *crtRB1* за маркером *crtRB1*-3'TE проявляється в появі трьох алелей, які на електрофореграмах формують смуги розміром 543 п.н. (алель 1), 296+875 п.н. (алель 2) та 296 п.н. (алель 3). Алель 1 відомий як сприятливий для підвищеного вмісту β-каротину [14, 19, 20], тоді як алелі 2 та 3 мають несприятливий ефект [15].

Результати електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації у ліній кукурудзи та їхніх гібридів на прикладі маркера *crtRB1*-3'TE наведено на рисунку 1. У таблиці 2 вміщено узагальнені дані щодо алельного стану генів каротиногенезу за маркера-

ми *lcyε*-3'INDL, *lcyε*-SNP216 та *crtRB1*-3'TE для всіх досліджених ліній і гібридів.

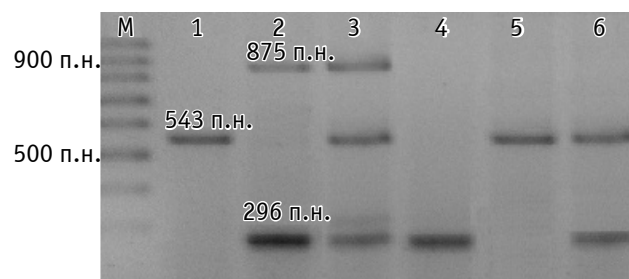


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній і гібридів кукурудзи з маркером *crtRB1*-3'TE: М – маркер молекулярної маси з кроком 100 п.н.; 1 – 'ДК2533СЗМ'; 2 – 'ДК296С'; 3 – 'ДК296СЧДК2533СЗМ'; 4 – 'ДК272С'; 5 – 'ДК633/266зС,ЗМ'; 6 – 'ДК272СЧДК633/266зС,ЗМ'

Усі проаналізовані лінії були гомозиготними за використаними молекулярними маркерами.

За маркером *lcyε*-3'INDL усі проаналізовані лінії та їхні гібриди мали алель 144+502 п.н., що, за літературними даними, свідчить про наявність мутації, сприятливої для підвищення вмісту β-каротину в зерні кукурудзи через блокування переходу лікопину в α-каротин. За даними С. Е. Narjes et al. [10], з 280 ліній кукурудзи селекції CIMMYT алель 144+502 п.н. мали 21,79%, а алель 399+502 п.н. – 78,21%.

У дуплексній ПЛР для маркера *lcyε*-SNP216 та гена *adh1* у всіх зразків було виявлено смугу розміром 234 п.н., що свідчить про наявність ДНК кукурудзи в суміші для ПЛР. За маркером *lcyε*-SNP216 у всіх проаналізованих лініях та гібридах ідентифіковано алель Т (тимін), який є несприятливим для накопичення β-каротину. Альтернативний алельний стан маркера *lcyε*-SNP216 – G (гу-

анін) у дослідженому селекційному матеріалі не був виявлений. У дослідженні С. Е. Нартjes et al. [10] з 277 ліній селекції CIMMYT, проаналізованих за маркером *lcyε*-SNP216, алель Т мали 38,63%, а алель G – 61,37%. Наявність у проаналізованих селекційних зразках лише одного можливого стану гена *lcyε* за маркерами *lcyε*-3'INDL та *lcyε*-SNP216 може бути пов'язана з лімітованою кількістю ліній, залучених до експерименту.

За маркером *crtRB1*-3'TE гена β-каротингідроксилази в добірці досліджених ліній та гібридів були виявлені всі три можливі алелі: алель 1 (смуга у 543 п.н.), алель 2 (смуги розміром у 296 п.н. та 875 п.н. одночасно) та алель 3 (смуга у 296 п.н.). Батьківські лінії гібрида 'ДК296С×ДК2533СЗМ' були контрастними за алельним станом маркера *crtRB1*-3'TE: материнська лінія 'ДК296С' несла алель 2 (296+875 п.н.), батьківська лінія 'ДК2533СЗМ' – сприятливий алель 1 (543 п.н.) У ДНК гібрида F₁ цих двох ліній були наявні обидва алелі: алель 2 (296+875 п.н.) – від матері та алель 1 (543 п.н.) – від батька. Таким чином, гібрид першого покоління 'ДК296С×ДК2533СЗМ' у гетерозиготі ніс сприятливий алель гена β-каротингідроксилази. Наведені закономірності розподілу алелей підтверджувалися і під час аналізу ДНК п'яти окремих рослин лінії 'ДК296С' та п'яти окремих рослин гібрида 'ДК296С×ДК2533СЗМ'.

Батьківські лінії наступного гібрида 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' також були контрастними за алельним станом маркера *crtRB1*-3'TE. Материнська лінія 'ДК272С' несла несприятливий алель 3 у 296 п.н., батьківська лінія 'ДК633/266зС,зМ' – сприятливий алель 1 розміром 543 п.н. Гібрид 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' містив обидва

алелі цього маркера, 296 п.н. та 543 п.н., що є очікуваним для кодомінантного маркера. Аналогічна ситуація за маркером *crtRB1*-3'TE зафіксована і для гібрида 'ДК231С×ДК366зС,зМ' та його батьківських ліній. Лінії 'ДКВ3262', 'РНТ60' та їхній гібрид 'ДКВ3262×РНТ60' за маркером *crtRB1*-3'TE були мономорфними і несли лише несприятливий алель 3 розміром 296 п.н.

Поліморфізм за маркером *crtRB1*-3'TE був виявлений у ряді досліджень. Так, в роботі [14] частота зустрічальності сприятливого алеля 543 п.н. серед 70 ліній кукурудзи, задіяних в селекційних програмах в Індії, становила 5,71%. У дослідженнях [8, 9] за цим же маркером серед 385 ліній сприятливий алель 1 (543 п.н.) мали 3,90%, а несприятливі алелі 2 (296+875 п.н.) та 3 (296 п.н.) – 13,25% та 82,86% ліній відповідно. Серед 15 ліній зі сприятливим алелем п'ять належали до селекційної програми CIMMYT, решта – до індійської селекційної програми.

Таким чином, молекулярно-генетичний поліморфізм у дослідженій добірці ліній і гібридів кукурудзи був виявлений за одним з трьох маркерів – маркером гена β-каротингідроксилази *crtRB1*-3'TE. Для цього маркера підтверджено кодомінантний характер успадкування алелей батьківських ліній у простих гібридах. За маркерами гена лікопін-ε-циклази *lcyε*-3'INDL та *lcyε*-SNP216 серед досліджених ліній і гібридів поліморфізму не було виявлено, вони містили лише по одному варіанту алелей кожного маркера.

У ліній 'ДК2533СЗМ', 'ДК633/266зС,зМ', 'ДК366зС,зМ' і гібридів 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' і 'ДК231С×ДК366зС,зМ' слід очікувати зниження активності ферменту

Таблиця 2

Алельний стан генів каротиногенезу за ДНК-маркерами в лінії кукурудзи та їхніх гібридів

Лінія або гібрид	Алельний стан генів		
	лікопін-ε-циклаза		β-каротингідроксилаза
	<i>lcyε</i> -3'INDL, п.н.	<i>lcyε</i> -SNP216	<i>crtRB1</i> -3'TE, п.н.
'ДК296С'	144+502	Т	296+875
'ДК2533СЗМ'	144+502	Т	543
'ДК296С×ДК2533СЗМ'	144+502	Т	296+543+875
'ДК272С'	144+502	Т	296
'ДК633/266зС,зМ'	144+502	Т	543
'ДК272С×ДК633/266зС,зМ'	144+502	Т	296+543
'ДК231С'	144+502	Т	296
'ДК366зС,зМ'	144+502	Т	543
'ДК231С×ДК366зС,зМ'	144+502	Т	296+543
'ДКВ3262'	144+502	Т	296
'РНТ60'	144+502	Т	296
'ДКВ3261×РНТ60'	144+502	Т	296

Примітка. Т – азотиста основа тимін.

β -каротингідроксилази через мутацію гена *crtRB1* за впливу транспозонового елемента на 3'-кінці, а також інгібування переходу β -каротину в β -криптоксантин та накопичення β -каротину в зерні.

Для гібридів F_1 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' і 'ДК231С×ДК366зС,зМ' у разі використання фертильних форм добір у потомстві від самозапилення на підвищення частоти алеля маркера *crtRB1-3'ТЕ*, сприятливого для каротиногенезу, буде ефективним і дасть можливість у подальших циклах інбридингу та доборів перевести ген β -каротингідроксилази на ділянці *crtRB1-3'ТЕ* в гомозиготний стан у разі поєднання за рахунок рекомбінації з іншими корисними ознаками. В той же час, добір на підвищення частоти алелей генів *lcyε* та *crtRB1* у потомстві гібрида 'ДКВ3262×РНТ60' від самозапилення буде неефективним.

Висновки

Проведене дослідження алельного стану ключових генів каротиногенезу в кукурудзи свідчить про відсутність поліморфізму за маркерами *lcyε-3'INDL* та *lcyε-SNP216* гена лікопін- ϵ -циклази у восьми інбредних лініях та їхніх чотирьох простих гібридах, причому за маркером *lcyε-3'INDL* геноми досліджених зразків містять сприятливий для накопичення β -каротину алель.

За маркером *crtRB1-3'ТЕ* гена β -каротингідроксилази досліджений селекційний матеріал є поліморфним. Сприятливий для накопичення β -каротину алель виявлено в лініях 'ДК2533СЗМ', 'ДК633/266зС,зМ', 'ДК366зС,зМ' і гібридах 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' і 'ДК231С×ДК366зС,зМ'. Прості гібриди кодомінантно успадковують алелі маркера *crtRB1-3'ТЕ* материнської та батьківської ліній.

Використана література

1. Сатарова Т. Н. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии : монография / Т. Н. Сатарова, В. Ю. Черчель, А. В. Черенков. – Днепропетровск : Новая идеология, 2013. – 552 с.
2. Рослинництво України. Статистичний збірник за 2015 рік / Державна служба статистики України. – К., 2016. – 180 с.
3. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content / M. Aluru, Y. Xu, R. Guo [et al.] // J. Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59, Iss. 13. – P. 3551–3562. doi: 10.1093/jxb/ern212
4. Natural variation in the sequence of *PSY* and frequency of favorable polymorphism among tropical and temperate maize germplasm / Z. Fu, Y. Chai, Y. Zhou [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2013. – Vol. 126, Iss. 4. – P. 923–935. doi: 10.1007/s00122-012-2026-0
5. Exploitation of natural variability in maize for β -carotene content using HPLC and gene specific markers / T. Safawo, N. Senthil, M. Raveendran [et al.] // Electron. J. Plant Breed. – 2010. – Vol. 1, Iss. 4. – P. 548–555.

6. *ZmcrtrB3* encodes a carotenoid hydroxylase that affects the accumulation of α -carotene in maize kernel / Y. Zhou, Y. Han, Z. Li [et al.] // J. Integr. Plant Biol. – 2012. – Vol. 54, No. 4. – P. 260–269. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01106.x
7. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A level across diverse tropical yellow maize inbred lines / G. Azmach, M. Gedil, A. Menkir, C. Spillane // BMC Plant Biol. – 2013. – Vol. 13. – P. 227. doi: 10.1186/1471-2229-13-227
8. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of *β -carotene hydroxylase* allele / V. Muthusamy, F. Hossain, N. Thirunavukkarasu [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 9, No. 12. – e113583. doi: 10.1371/journal.pone.0113583
9. Allelic variations for *lycopene- ϵ -cyclase* and *β -carotene hydroxylase* genes in maize inbreds and their utilization in β -carotene enrichment programme / V. Muthusamy, F. Hossain, N. Thirunavukkarasu [et al.] // Cogent Food and Agriculture. – 2015. – Vol. 1, Iss. 1. – 1033141. doi: 10.1080/23311932.2015.1033141
10. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification / C. E. Harjes, T. R. Rocheford, L. Bai [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 319. – P. 330–333. doi: 10.1126/science.1150255
11. Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding / Y. Xu, D. J. Skinner, H. Wu [et al.] // Intl J Plant Genomics. – 2009. – Vol. 2009. – Article ID 957602. doi: 10.1155/2009/957602
12. Yan J. Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement / J. Yan, M. Warburton, J. Crouch // Crop Science. – 2011. – Vol. 51. – P. 433–449.
13. Introgression of the *crtRB1* gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers / L. Liu, D. Jeffers, Y. Zhang [et al.] // Mol. Breeding. – 2015. – Vol. 35, Iss. 8. – P. 154. doi: 10.1007/s11032-015-0349-7
14. Screening of maize (*Zea mays* L.) germplasm for *crtRB1-3'TE* allele enhancing provitamin A concentration in endosperm / D. B. Sagare, P. Shetti, S. S. Reddy [et al.] // Res. Environ. Life Sci. – 2015. – Vol. 8, No. 4. – P. 673–674.
15. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases beta-carotene in maize grain / J. Yan, C. B. Kandianis, C. E. Harjes [et al.] // Nat. Genet. – 2010. – Vol. 42, Iss. 4. – P. 322–327. doi: 10.1038/ng.551.
16. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations / R. Babu, N. P. Rojas, S. Gao [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2013. – Vol. 126, Iss. 2. – P. 389–399. doi: 10.1007/s00122-012-1987-3.
17. Identification of β -carotene rich maize inbreds using PCR-based assay for *crtRB1-3'TE* allele / D. B. Sagare, P. Shetti, S. S. Reddy [et al.] // I. J. S. N. – 2015. – Vol. 6, No. 3. – P. 441–443.
18. Murray M. G. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA / M. G. Murray, W. F. Thompson // Nuc. Acids Res. – 1980. – Vol. 8, No. 19. – P. 4321–4325.
19. Genetic variability for kernel β -carotene and utilization of *crtRB13'TE* gene for biofortification in maize (*Zea mays* L.) / M. Vignesh, F. Hossain, T. Nepolean [et al.] // Indian J Genet Pl Br. – 2012. – Vol. 72, Iss. 2. – P. 189–194.
20. Sequence variation in 3'UTR region of *crtRB1* gene and its effect on β -carotene accumulation in maize kernel / M. Vignesh, T. Nepolean, F. Hossain [et al.] // J. Plant Biochem. Biotechnol. – 2013. – Vol. 22, Iss. 4. – P. 401–408. doi: 10.1007/s13562-012-0168-4

References

1. Satarova, T. N., Cherchel, V. Yu., & Cherenkov, A. V. (2013). *Kukuruza: biotekhnologicheskie i selekcionnye aspekty gaploidii* [Maize: biotechnological and breeding aspects of haploidy]. Dnepropetrovsk: Novaya ideologiya. [in Russian]

2. Roslynnystvo Ukrainy. Statystychnyi zbirnyk za 2015 rik [Crop production of Ukraine. Statistical yearbook 2015]. (2015). Kyiv: N.p. [in Ukrainian]
3. Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W., Wang, K., & Rodermeil, S. (2008). Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Bot.*, 59(13), 3551–3562. doi: 10.1093/jxb/ern212
4. Fu, Z., Chai, Y., Zhou, Y., Yang, X., Warburton, M. L., Xu, S., ... Yan, J. (2012). Natural variation in the sequence of *PSY* and frequency of favorable polymorphism among tropical and temperate maize germplasm. *Theor. Appl. Genet.*, 126(4), 923–935. doi: 10.1007/s00122-012-2026-0
5. Safawo, T., Senthil, N., Raveendran, M., Vellaikumar, S., Ganesan, K. N., Nallathambi, G., ... Gowri, E. V. (2010). Exploitation of natural variability in maize for β -carotene content using HPLC and gene specific markers. *Electron. J. Plant Breed.*, 1(4), 548–555.
6. Zhou, Y., Han, Y., Li, Z., Fu, Z., Xu, S., Li, J., Yan, J., & Yang, X. (2012). *ZmcrRB3* encodes a carotenoid hydroxylase that affects the accumulation of α -carotene in maize kernel. *J. Integr. Plant Biol.*, 54(4), 260–269. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01106.x
7. Azmach, G., Gedil, M., Menkir, A., & Spillane, C. (2013). Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A level across diverse tropical yellow maize inbred lines. *BMC Plant Biol.*, 13, 227. doi: 10.1186/1471-2229-13-227
8. Muthusamy, V., Hossain, F., Thiruvukkarasu, N., Choudhary, M., Saha, S., Bhat, J. S., Prasanna, B. M., & Gupta, H. S. (2015). Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele. *PLoS ONE*, 9(12), e113583. doi: 10.1371/journal.pone.0113583
9. Muthusamy, V., Hossain, F., Thirunavukkarasu, N., Saha, S., & Gupta, H. S. (2015). Allelic variations for *lycopene- ϵ -cyclase* and *β -carotene hydroxylase* genes in maize inbreds and their utilization in β -carotene enrichment programme. *Cogen Food and Agriculture*, 1(1), 1033141. doi: 10.1080/23311932.2015.1033141
10. Harjes, C. E., Rocheford, T. R., Bai, L., Brutnell, T. P., Kandianis, C. B., Sowinski, S. G., ... Buckler, E. S. (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319, 330–333. doi: 10.1126/science.1150255
11. Xu, Y., Skinner, D. J., Wu, H., Palacios-Rojas, N., Araus, J. L., Yan, J., ... Crouch, J. H. (2009). Advances in maize genomics and their value for enhancing genetic gains from breeding. *Intl J Plant Genomics*, 2009, Article ID 957602. doi:10.1155/2009/957602
12. Yan, J., Warburton, M., & Crouch, J. (2011). Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement. *Crop Science*, 51, 433–449.
13. Liu, L., Jeffers, D., Zhang, Y., Ding, M., Chen, W., Kang, M.S., & Fan, X. (2015). Introgression of the *crRB1* gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers. *Mol. Breeding*, 35(8). – P. 154. doi: 10.1007/s11032-015-0349-7.
14. Sagare, D. B., Shetti, P., Reddy, S. S., Surender, M., & Pradeep, T. (2015). Screening of maize (*Zea mays* L.) germplasm for *crRB1-3' TE* allele enhancing provitamin A concentration in endosperm. *Res. Environ. Life Sci.*, 8(4), 673–674.
15. Yan, J., Kondionis, B. C., Harjes, E. C., Boi, L., Kim, H. E., Yang, X., ... Rocheford, T. (2010). Rare genetic variation at *Zea mays crRB1* increases beta-carotene in maize grain. *Nature Genet.*, 42(4), 322–327. doi: 10.1038/ng.551
16. Babu, R., Rojas, N. P., Gao, S., Yan, J., & Pixley, K. (2013). Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor Appl Genet.*, 126(2), 389–399. doi: 10.1007/s00122-012-1987-3
17. Sagare, D. B., Shetti, P., Reddy, S.S., Surender, M., & Pradeep, T. (2015). Identification of β -carotene rich maize inbreds using PCR-based assay for *crRB1-3' TE* allele. *I. J. S. N.*, 6(3), 441–443.
18. Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA. *Nuc. Acid. Res.*, 8(19), 4321–4325.
19. Vignesh, M., Hossain, F., Nepolean, T., Saha, S., Agrawal, P. K., Guleria, S. K., Prasanna, B. M., & Gupta, H. S. (2012). Genetic variability for kernel β -carotene and utilization of *crRB13' TE* gene for biofortification in maize (*Zea mays* L.). *Indian J Genet Pl Br*, 72(2), 189–194.
20. Vignesh, M., Nepolean, T., Hossain, F., Singh A. K., & Gupta, H. S. (2013). Sequence variation in 3'UTR region of *crRB1* gene and its effect on β -carotene accumulation in maize kernel. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 22(4), 401–408. doi: 10.1007/s13562-012-0168-4

УДК 577.2:633.15

Гончаров Ю. А.*, Сатарова Т. Н., Дзюбецкий Б. В., Черчель В. Ю. Аллельное состояние ключевых генов каротиногена по ДНК-маркерам у линий кукурузы и их гибридов // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2016. – № 4. – С. 26–32. [http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4\(33\).2016.88666](http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4(33).2016.88666)

ГУ Інститут зернових культур НААН України, ул. В. Вернадського, 14, г. Дніпр, 49027, Україна, *e-mail: wild91@list.ru

Цель. Анализ аллельного состояния ключевых генов каротиногена – гена ликопин- ϵ -циклазы (*lcy ϵ*) и гена β -каротингидроксилазы (*crRB1*) по ДНК-маркерам у линий кукурузы отечественной селекции и их гибридов. **Методы.** Выделение ДНК, полимеразная цепная реакция, гель-электрофорез. **Результаты.** Исследовано аллельное состояние ключевых генов каротиногена у восьми инбредных линий кукурузы и их простых гибридов. Молекулярно-генетический полиморфизм в исследованной выборке линий и гибридов был выявлен по гену β -каротингидроксилазы для маркера *crRB1-3' TE*. Для этого гена подтвержден кодоминантный характер наследования аллелей родительских линий в простых гибридах. По маркерам гена ликопин- ϵ -циклазы *lcy ϵ -3' INDL* и *lcy ϵ -SNP216* среди исследованных линий и гибридов полиморфизма не было выявлено, изученные генотипы имели по одному варианту аллелей каждого маркера. Для линий 'ДК2533СЗМ', 'ДК633/266зС,зМ', 'ДК366зС,зМ' и гибридов 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' и

'ДК231С×ДК366зС,зМ' следует ожидать снижения активности фермента β -каротингидроксилазы в результате мутации гена *crRB1* под воздействием транспозонового элемента на 3'-конце, ингибирования перехода β -каротина в β -криптоксантин, что позволяет прогнозировать накопление β -каротина в зерне. **Выводы.** В результате проведенного исследования аллельного состояния генов каротиногена у кукурузы было установлено отсутствие полиморфизма по маркерам *lcy ϵ -3' INDL* и *lcy ϵ -SNP216* гена ликопин- ϵ -циклазы у восьми инбредных линий и их простых гибридов, причем по маркеру *lcy ϵ -3' INDL* в геномах всех изученных образцов содержится благоприятный для накопления β -каротина аллель. По маркеру *crRB1-3' TE* гена β -каротингидроксилазы изученный селекционный материал оказался полиморфным. Благоприятный для накопления β -каротина аллель гена *crRB1* идентифицирован у линий 'ДК2533СЗМ', 'ДК633/266зС,зМ', 'ДК366зС,зМ' и гибридов 'ДК296С×ДК2533СЗМ', 'ДК272С×ДК633/266зС,зМ' и 'ДК231С×ДК366зС,зМ'. Простые гибриды кодоминантно

наследуют аллели гена β -каротингидроксилазы материнской и отцовской линий.

Ключевые слова: аллель, молекулярно-генетические маркеры, каротиногенез, кукуруза, линия, гибрид.

UDC 577.2:633.15

Goncharov, Yu. O. *, Satarova, T. M., Dzubetsky, B. V., & Cherchel, V. Yu. (2016). Allelic status of key genes of carotenogenesis on DNA-markers in maize lines and their hybrids. *Sortovivčennâ ohor. prav sorti roslin* [Plant Varieties Studying and Protection], 4, 26–32. [http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4\(33\).2016.88666](http://dx.doi.org/10.21498/2518-1017.4(33).2016.88666)

*Institute of Grain Crops of NAAS of Ukraine, 14 V. Vernadskoho Str., Dnipro, 49027, Ukraine, *e-mail: wild91@list.ru*

Purpose. The analysis of allelic status of such key genes of carotenogenesis as gene of lycopene- ϵ -cyclase (*lcy ϵ*) and gene of β -carotene hydroxylase (*crtRB1*) for DNA-markers in domestic maize lines and their hybrids. **Methods.** DNA isolation, PCR, gel electrophoresis. **Results.** Allelic status of key genes of carotenogenesis was investigated in eight maize inbred lines and their single crosses. Molecular genetic polymorphism in the studied sample of maize lines and hybrids has been detected in gene of β -carotene hydroxylase for marker *crtRB1*-3'TE. For this gene, codominant character of inheritance of alleles of parental lines in single crosses was confirmed. For markers of gene of lycopene- ϵ -cyclase *lcy ϵ* -3'INDL and *lcy ϵ* -SNP216, polymorphism in the group of investigated lines and hybrids has not been identified, genotypes included only one variant of alleles for each marker. For lines 'DK253ZSZM', 'DK633/266zS,zM', 'DK366zS,zM' and hybrids 'DK296S \times DK253ZSZM', 'DK272S \times DK633/266zS,zM' and 'DK231S \times DK366zS,zM', the decrease of the activity of β -carotene hydroxylase owing to the mutation of gene *crtRB1* under the influence of transposone element

at the 3'-end, the inhibition of β -carotene transition into β -cryptoxanthin can be expected, that allows to predict β -carotene accumulation in grain. **Conclusions.** The study of allelic status of carotenogenesis gene of lycopene- ϵ -cyclase in maize showed no polymorphism for markers *lcy ϵ* -3'INDL and *lcy ϵ* -SNP216 in eight inbred lines and their single crosses, along with this, for marker *lcy ϵ* -3'INDL in genomes of all studied samples the allele was identified to be favorable for the accumulation of β -carotene. For marker *crtRB1*-3'TE of gene of β -carotene hydroxylase, the studied breeding material was polymorphic. Allele of *crtRB1* being favorable for the accumulation of β -carotene was identified in lines 'DK253ZSZM', 'DK633/266zS,zM', 'DK366zS,zM' and hybrids 'DK296S \times DK253ZSZM', 'DK272S \times DK633/266zS,zM' and 'DK231S \times DK366zS,zM'. Single crosses inherit maternal and paternal alleles of gene of β -carotene hydroxylase co-dominantly.

Keywords: allele, molecular genetic markers, carotenogenesis, maize, line, hybrid.

Надійшла 17.10.2016