

Національна академія аграрних наук України
Державна установа Інститут зернових культур

Комплексна система біотехнологічної оцінки вихідного
селекційного матеріалу кукурудзи на основі використання
функціональних молекулярно-генетичних маркерів

ДНІПРО, 2025

УДК 633.15:631.527

*Рекомендовано до друку Вченою радою ДУ Інститут зернових культур НААН
від 11 вересня 2025 року (протокол №12)*

Рецензенти:

Т.М. Сатарова, доктор біол. наук, професор, дослідник лабораторії біотехнології рослин Інституту експериментальної ботаніки Чеської академії наук

К.М. Власенко, доктор філософії зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, доцент кафедри біотехнології та безпеки життєдіяльності Українського державного університету науки і технологій

Комплексна система біотехнологічної оцінки вихідного селекційного матеріалу кукурудзи на основі використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів. Дніпро: ДУ Інститут зернових культур НААН, 2025. 16 с. Виконавці: Денисюк К.В. doi: 10.31867/2025.11.09.1-16/06

Розроблено комплексну систему біотехнологічної оцінки вихідного селекційного матеріалу кукурудзи, що базується на дослідженні алельного стану функціональних молекулярно-генетичних маркерів каротиногенезу, пов'язаних із генами β -каротингідроксилази I та лікопін- ϵ -циклази.

Наведений підхід до біотехнологічної оцінки вихідного селекційного матеріалу кукурудзи може бути використаний при створенні генотипів кукурудзи з підвищеним вмістом β -каротину в зрілому зерні.

©Державна установа Інститут зернових культур

Національної академії аграрних наук України, 2025

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП.....	4
Опис методу.....	5
Проведення аналізу.....	8
Опрацювання результатів.....	10
Список використаних джерел.....	13

ВСТУП

Біотехнологічна оцінка вихідного селекційного матеріалу кукурудзи на основі використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів потребує комплексного підходу. Це пов'язано з тим, що більшість господарсько-цінних ознак рослин зазвичай є полігенними та мають складні механізми регуляції, що слід враховувати при веденні селекційного процесу.

Зокрема, під час створення генотипів кукурудзи з підвищеним вмістом β -каротину в зрілому зерні важливо не лише забезпечити його інтенсивне накопичення в процесі каротиногенезу, а й зберегти стабільний рівень до моменту споживання зерна людиною чи тваринами. Ключову роль у цьому відіграють гени, що кодують ферменти лікопін- ϵ -циклазу і β -каротингідроксилазу 1.

«Комплексна система біотехнологічної оцінки вихідного селекційного матеріалу кукурудзи на основі використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів» базується на дослідженні алельного стану генів, задіяних у процесі каротиногенезу, зокрема лікопін- ϵ -циклази і β -каротингідроксилази 1, із використанням маркерів *lcy ϵ -3'INDL*, *lcy ϵ -SNP216* і *crtRB1-3'TE*. Такий підхід дозволяє ефективно відбирати генотипи кукурудзи з підвищеним вмістом β -каротину в зерні, що значно підвищує результативність селекційного процесу та сприяє створенню генотипів кукурудзи з покращеними харчовими властивостями.

ОПИС МЕТОДУ

У біосинтетичному шляху каротиноїдів у кукурудзи вихідною сполукою є геранілгеранілпірофосфат (ГГПФ, C₂₀-сполука) (рис. 1). На першій стадії під дією ферменту фітоїнсинтази дві молекули ГГПФ конденсуються з утворенням фітоїну (C₄₀-сполука). Подальші перетворення відбуваються через чотири стадії десатурації з утворенням фітофлуїну, ζ -каротину, нейроспорину та, врешті, лікопіну – першого забарвленого проміжного продукту (Aluru et al., 2008; Fu et al., 2012; Thanh, 2019).

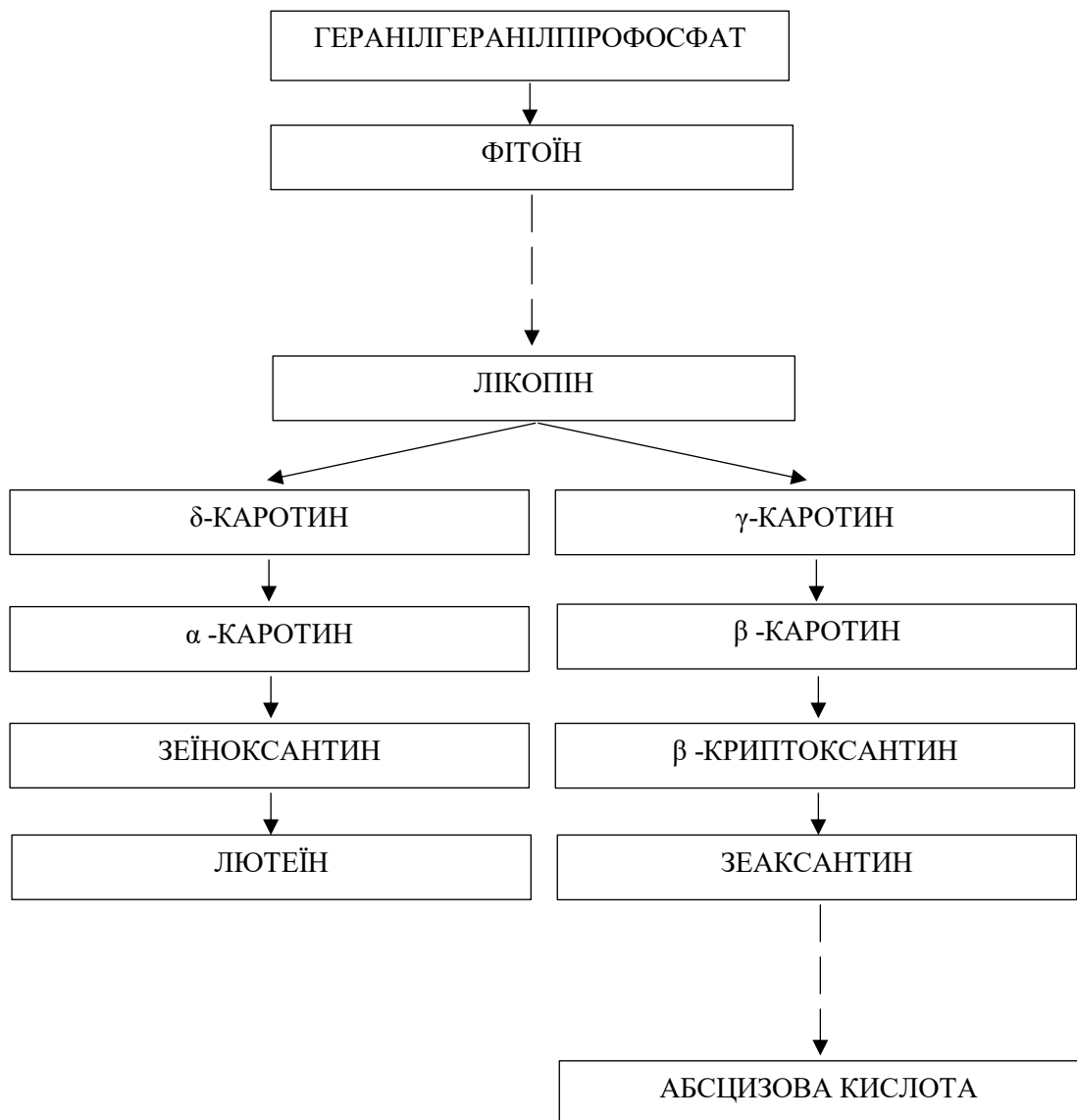


Рис. 1. Спрощений шлях біосинтезу каротиноїдів у рослинах

Наступним етапом є циклізація лікопіну. У разі асиметричної циклізації за участі ферменту лікопін-ε-циклази (*lcyε*) утворюється δ-каротин — попередник α-каротину, зеїноксантину та лютеїну. Симетрична циклізація за участі ферменту лікопін-β-циклази (*lcyβ*) призводить до утворення γ-каротину, який далі перетворюється на β-каротин, β-криптоксантин і зеаксантин. Молекула β-каротину має два β-кільця, що робить її найефективнішим попередником вітаміну А (Azmach et al., 2013; Muthusamy et al., 2015a, 2015b).

Аналіз метаболічного шляху біосинтезу каротиноїдів у кукурудзи свідчить, що підвищення їх вмісту можна очікувати при активізації експресії генів каротиногенезу на стадії перетворення ГППФ у лікопін. Для підвищення вмісту саме β-каротину необхідно сприяти симетричній циклізації лікопіну та пригнічувати асиметричну, а також запобігати перетворенню утвореного β-каротину в β-криптоксантин і зеаксантин. Таким чином, ключовими є дослідження поліморфізму двох генів: *lcyε* (хромосома 8) і *crtRB1* (хромосома 10), що регулюють ці процеси.

Ген *lcyε* є одним із ключових регуляторів потоку метаболітів у бічній гілці β-каротиноїдного шляху біосинтезу. У межах цього гена відомо кілька поліморфних сайтів, пов'язаних з варіаціями накопичення β-каротину в зерні. Найбільш інформативними є такі маркерні сайти (Harjes et al., 2008):

1) Індел на 3'-кінці (маркер *lcyε*-3'INDL): сприятливий алель фіксується за появою на електрофореграмах смуг 144+502 п.н., а несприятливий – смуг 399+502 п.н.

2) одонуклеотидна заміна всередині гена (маркер *lcyε*-SNP216): несприятливий алель реєструється за наявністю на електрофореграмах смуги 395 п.н., що відповідає наявності в маркерному сайті нуклеотиду з азотистою основою тимін (Т), сприятливий алель – за відсутністю смуги (нуль-алель), що відповідає наявності в маркерному сайті нуклеотиду з азотистою основою гуанін (G).

3) транспозоновий елемент на 5'-кінці (маркер *lcyε*-5'TE): відомо про чотири алелі, два з яких є сприятливими (відображаються на

електрофореграмах у вигляді смуг 150+280 п.н. та 650 п.н.), а два – несприятливі (250 п.н. та 250+380 п.н.).

Також відомо про наявність одонуклеотидної заміни в межах інтрону 4 гена, яка визначається за допомогою маркера *lcyε*-SNP2238. Однак цей маркер не застосовується у рутинній селекційній практиці. Для селекційного добору переважно використовують маркери *lcyε*-3'INDL та *lcyε*-SNP216, що дозволяє ефективно оцінювати алельний стан гена *lcyε* у вихідному матеріалі кукурудзи.

Ген *crtRB1* також є одним із ключових генів біосинтезу каротиноїдів та пов'язаний з їхнім накопиченням у ендоспермі кукурудзи (Yan et al., 2010, Sagare et al., 2015a, Hwang et al., 2016, Garoma et al., 2024). Він кодує фермент β-каротингідроксилазу 1, яка викликає гідроксилування α- та β-каротинів, що призводить до їх розпаду з утворенням лютеїну і зеаксантину, відповідно. Ген *crtRB1* містить три основні поліморфні ділянки, які можуть впливати на концентрацію каротиноїдів, зокрема β-каротину, у зерні кукурудзи (Yan et al., 2010):

- 1) ділянка на 3'-кінці, поліморфізм якої обумовлений дією транспозонового елемента (маркер *crtRB1*-3'TE),
- 2) ділянка всередині гена (маркер *crtRB1*-INDL4),
- 3) ділянка на 5'-кінці, поліморфізм якої також зумовлений дією транспозонового елемента (маркер *crtRB1*-5'TE).

Для аналізу алельного стану гена *crtRB1* найчастіше використовують маркер *crtRB1*-3'TE, який демонструє три алелі. Алель 1 (фіксується на електрофореграмах у вигляді смуги розміром у 543 п.н.) – є сприятливим для підвищеного вмісту β-каротину (Yan et al., 2010). Алель 2 (розмір смуги у 296 п.н.) і алель 3 (розмір смуг у 296+875 п.н.) мають несприятливий вплив на рівень β-каротину (Sagare et al., 2015a, Vignesh et al., 2012, Muthusamy et al., 2013). Відомо, що алель 1 за маркером *crtRB1*-3'TE здатен самотійно подвоїти вміст β-каротину у зерні кукурудзи незалежно від стану інших генетичних маркерів (Sagare et al., 2015a, Sagare et al., 2015b).

В основу розробки поставлено задачу ідентифікації генотипів кукурудзи, які містять одночасно сприятливі алелі двох ключових генів каротиногенезу – β -каротингідроксилази 1 і лікопін- ϵ -циклази. Дослідження проводиться шляхом аналізу фрагментів ампліфікації ДНК за результатами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з праймерами до маркерів *lcy ϵ -3'INDL* і *lcy ϵ -SNP216* (для гена лікопін- ϵ -циклази) і *crtRB1-3'TE* (для гена β -каротингідроксилази 1).

Використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів, таких як *lcy ϵ -3'INDL*, *lcy ϵ -SNP216* та *crtRB1-3'TE*, дозволяє ефективно здійснювати комплексну оцінку вихідного селекційного матеріалу кукурудзи, що є важливим для розробки нових збагачених β -каротином генотипів.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Комплексна біотехнологічна оцінка вихідного селекційного матеріалу кукурудзи з використанням функціональних маркерів каротиногенезу включає: виділення ДНК зі зразків, проведення ПЛР, електрофоретичне розділення продуктів ПЛР, візуалізацію продуктів ампліфікації, документування результатів аналізу.

ДНК виділяють з 7-добових проростків кукурудзи, отриманих у лабораторних умовах, або з фрагментів листя рослин, вирощуваних у польових умовах, за модифікованим СТАВ-методом (Murray, Thompson, 1980). Для аналізу інбредних ліній зразки формують із суміші фрагментів п'яти-семи рослин, що представляють один генотип, тоді як для гетерозиготного матеріалу пробу готують окремо для кожної рослини.

Реакційна суміш для ПЛР одного зразка об'ємом 20 мкл має містити:

- DreamTaqTMGreen буфер, (6x) – 2 мкл;
- DreamTaqTMполімераза (ThermoScientific), (5 од./мкл) – 0,2 мкл;

- суміш дезоксирибонуклеотидів – по 200 мкМ кожного dNTP;
- прямий праймер – 0,2 мкМ;
- зворотній праймер – 0,2 мкМ;
- зразок ДНК – 30 нг.

ПЛР проводять за таких умов:

- початкова денатурація – за температури 94°C протягом 5 хв.;
- 40 циклів, які включають такі стадії:
 - денатурація (за температури 94°C протягом 1 хв.),
 - відпал праймерів (за температури 60°C протягом 1 хв.)
 - елонгація (за температури 72°C протягом 1 хв.).
- заключна елонгація – за температури 72°C протягом 5 хв.

Фаза охолодження – за температури +10°C.

Нуклеотидна послідовність прямих (F) та зворотних (R) праймерів для молекулярно-генетичних маркерів каротиногенезу наступна за (Harjes et al., 2008, Yan et al., 2010):

- *lcyε*-3'INDL: F1: GTACGTCGTTTCATCTCCGTACCC;

R1: CTTGGTGAACGCATTTCTGTTGG;

F2: GGACCGGAACAGCCAACTG;

R2: GGCGAAATGGGTACGGCC;

- *lcyε*-SNP216: F: GCGGCAGTGGGCGTGGAT;

R: TGAAGTACGGCTGCAGGACAACG;

- *crtRB1*-3'TE: F: ACACCACATGGACAAGTTTCG;

R1: ACACTCTGGCCCATGAACAC;

R2: ACAGCAATACAGGGGACCAG.

Оскільки для маркера *lcyε*-SNP216 алель G реєструється як нуль-алель з відсутністю будь-якої смуги на електрофоретичній доріжці, для підтвердження наявності ДНК зразка проводять дуплексну ПЛР з додаванням в реакційну суміш, окрім праймерів до маркера *lcyε*-SNP216, праймерів до гена

алкогольдегідрогенази кукурудзи *adh1* (внутрішній контроль): Adh-F3: CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC, Adh-R1: GACAGAGGAGAAACAAGGCG.

Продукти ампліфікації фракціонують у 2%-му агарозному гелі в TBE-буфері. Електрофоретичне розділення проводять впродовж 80 хв за напруги 100Вт.

Візуалізацію продуктів ампліфікації проводять за допомогою приладу GelDoc™ (BioRad). Отримані електрофореграми підлягають подальшому аналізу.

ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Після електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації на доріжках гелю мають бути видні чіткі фрагменти ампліфікації ДНК, які можуть різнитися за молекулярною масою.

За даними електрофореграм визначають алельний стан досліджуваних маркерів каротиногенезу. Для маркера *lcyε-3'INDL* очікують появу смуг 144+502 п.н. (сприятливий алель) та 399+502 п.н. (несприятливий алель). Для маркера *lcyε-SNP216* очікують появу смуги 395 п.н., що відповідає наявності в даному маркерному SNP-сайті тиміну (несприятливий алель) та відсутність смуги, що вказує на присутність в цьому SNP-сайті гуаніну (сприятливий алель). В дуплексній ПЛР для гена *adh1* кукурудзи очікують появу смуги розміром 234 п.н., що свідчить про наявність ДНК в реакційній суміші. Для маркера *crtRB1-3'TE* очікують появу смуг 543 п.н. (сприятливий алель), 296 п.н. та 296+875 п.н. (несприятливі алелі).

Приклад електрофореограми розподілу продуктів ампліфікації ДНК з праймером *crtRB1-3'TE* представлено на рисунку 2.

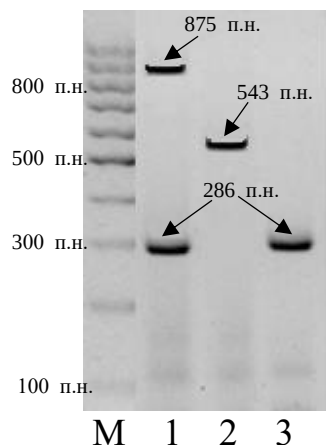


Рис. 2. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації ДНК з праймером *crtRB1-3'*TE: М – маркер молекулярної маси, 1 – Крос160С (286+875 п.н.), 2 – ДК206А (543 п.н.), 3 – Крос 268С (286 п.н.)

За отриманими результатами визначають генотипи, для яких характерні сприятливі / несприятливих алелі генів каротиногенезу. На основі отриманих даних проводиться цілеспрямований відбір генотипів, які несуть сприятливі алелі, асоційовані з високим рівнем вмісту β -каротину у зерні кукурудзи.

При аналізі вихідного селекційного матеріалу кукурудзи, наприклад, популяції, серед досліджених зразків можуть бути присутні як гомозиготні, так і гетерозиготні рослини за сприятливими алелями генів каротиногенезу. Гомозиготні генотипи мають однакові алелі в обох гомологічних хромосомах, що забезпечує надійне та стабільне успадкування сприятливих ознак у наступних поколіннях. Використання самих гомозиготних за сприятливими алелями генів каротиногенезу рослин у селекційній практиці створення ліній дозволяє обходитися без обов'язкових перевірок на кожному етапі їхніх схрещувань між собою і відбору. Необхідною є оцінка генотипів кукурудзи, створених на основі гомозиготного матеріалу, на завершальному етапі з метою підтвердження присутності сприятливих алелів генів каротиногенезу у гомозиготному стані.

Гетерозиготні рослини мають різні алелі одного і того самого гена в гомологічних хромосомах, внаслідок чого в процесі мейозу утворюються гамети з різними алелями. Це призводить до генетичного розщеплення в потомстві за цільовими генами і потребує ретельного молекулярно-генетичного

контролю кожної окремої рослини перед включенням її у подальший селекційний процес. Такий підхід дещо ускладнює та уповільнює селекційний процес, проте є цілком успішним.

Тому у селекційному процесі у кукурудзи перевага надається використанню саме гомозиготних за сприятливими алелями генотипів. Такий підхід дозволяє підвищити ефективність селекції, забезпечити генетичну стабільність ознак, зменшити трудомісткість та скоротити часові затрати на отримання нових ліній кукурудзи з покращеним складом зерна.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aluru M., Xu Y., Guo R. et al. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J.Exp.Bot.* 2008. 59 (13). 3551–3562.
2. Azmach G., Gedil M., Menkir A. et al. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A level across diverse tropical yellow maize inbred lines. *BMC Plant Biology.* 2013. 13. 227. doi: 10.1186/1471-2229-13-227.
3. Fu Z., Chai Y., Zhou Y. et al. Natural variation in the sequence of *PSY* and frequency of favorable polymorphism among tropical and temperate maize germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2012. doi: 10.1007/s00122-012-2026-0.
4. Garoma B., Azimach G., Bante K., Menkir A. Assessing the carotenoid profiles and allelic diversity of yellow maize inbred lines adapted to mid-altitude subhumid maize agroecology in Ethiopia. *Front Plant Sci.* 2024. 15. 1406550. doi: 10.3389/fpls.2024.1406550.
5. Harjes C. E., Rocheford T. R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science.* 2008. 319. 330-333. doi: 10.1126/science.1150255.
6. Hwang T., Ndolo V.U., Katundu M. et al. Provitamin A potential of landrace orange maize variety (*Zea mays* L.) grown in different geographical location of central Malawi. *Food Chemistry.* 2016. 196. 1315-1324. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.10.067.
7. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research.* 1980. 8 (19). 4321-4326. doi: 10.1093/nar/8.19.4321.
8. Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N. et al. Allelic variations for *lycopene-ε-cyclase* and *β-carotene hydroxylase* genes in maize inbreds and their

utilization in β -carotene enrichment programme. *Cogent Food and Agriculture*. 2015a. 1 (1). doi:10.1080/23311932.2015.1033141.

9. Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N. et al. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele. *PLoS ONE*. 2015b. 9 (12). doi:10.1371/journal.pone.0113583.

10. Muthusamy V., Nepolean T., Hossain F. et al. Sequence variation in 3'UTR region of *crtRB1* gene and its effect on β -carotene accumulation in maize kernel. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2013. 22. 401-408.

11. Sagare D.B., Shetti P., Reddy S.S. et al. Screening of maize (*Zea mays* L.) germplasm for *crtRB1-3'TE* allele enhancing provitamin A concentration in endosperm. *Res. Environ. Life Sci*. 2015a. 8 (4). 673-674.

12. Sagare D.B., Shetti P., Reddy S.S. et al. Identification of β -carotene rich maize inbreds using PCR-based assay for *crtRB1-3'TE* allele. *I. J. S. N*. 2015b. 6 (3). 441-443.

13. Thanh N.D. Provitamin a biofortification in maize through genetic engineering and marker-assisted selection. *Academia Journal of Biology*. 2019. 41(4). doi: 10.15625/0866-7160/v41n4.13804.

14. Vignesh M., Hossain F., Nepolean T. et al. Genetic variability for kernel β -carotene and utilization of *crtRB13'TE* gene for biofortification in maize (*Zea mays* L.). *Indian J. Genet*. 2012. 72 (2). 189-194.

15. Yan J., Kandianis C.B., Harjes C.E. et al. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases beta-carotene in maize grain. *Nat. Genet*. 2010. 42. 322-327. doi: 10.1038/ng.551.

Для нотаток

Для нотаток