

Міністерство розвитку економіки, торгівлі
та сільського господарства України
УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ЕКСПЕРТИЗИ СОРТІВ РОСЛИН
ТОВ «НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ АГРАРНОГО БІЗНЕСУ»

**Присяжнюк Л. М., Гончаров Ю. О., Максимова Л. Г.,
Шитікова Ю. В., Ткачик С. О.**

ДОБІР ГЕНОТИПІВ ДЛЯ МАС-СЕЛЕКЦІЇ КУКУРУДЗИ НА ПІДВИЩЕНИЙ ВМІСТ КАРОТИНОЇДІВ

Науково-методичні рекомендації
Видання 2-ге

Вінниця
ТОВ «ТВОРИ»
2020

Присяжнюк Л. М., Гончаров Ю. О., Максимова Л. Г., Шитікова Ю. В., Ткачик С. О.

Добір генотипів для мас-селекції кукурудзи на підвищений вміст каротиноїдів. Науково-методичні рекомендації. Видання 2-ге. Вінниця: ТОВ «ТВОРИ», 2020. 19 с.

Рецензенти:

Сторожик Л. І., доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, член-кореспондент НААН України, головний науковий співробітник лабораторії насіннізнавства та насінництва буряків і біоенергетичних культур Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

Карпук Л. М., доктор сільськогосподарських наук, професор, професор кафедри землеробства, агрохімії та ґрунтознавства Білоцерківського національного аграрного університету

Методичні рекомендації розроблено в Українському інституті експертизи сортів рослин та ТОВ «Науково-дослідний інститут аграрного бізнесу».

В методичних рекомендаціях представлено результати досліджень, проведених в Українському інституті експертизи сортів рослин спільно з ТОВ «Науково-дослідний інститут аграрного бізнесу». Авторами запропоновано функціональні маркери для визначення алельного стану ключових генів каротиногенезу у кукурудзи з метою їхньої ідентифікації та добору вихідного селекційного матеріалу для МАС-селекції на підвищений вміст каротиноїдів у зерні кукурудзи.

Рекомендації призначені для селекціонерів, спеціалістів наукових установ, викладачів університетів та аспірантів, які вивчають теоретичні та методологічні основи сучасної селекції, експертизи сортів рослин та проводять роботу по застосуванню МАС-селекції.

Методичні рекомендації розглянуті, схвалені та рекомендовані до видання Вченою радою Українського інституту експертизи сортів рослин, протокол № 12 від «24» грудня 2020 року.

Зміст

Список умовних позначень та скорочень	4
Вступ	5
1. Екстракція ДНК з рослинного матеріалу	7
2. Визначення концентрації та чистоти ДНК	9
3. Проведення ПЛР ДНК кукурудзи	11
4. Електрофорез продуктів ампліфікації	13
5. Визначення розміру ампліконів та ідентифікація сприятливих алелів	15
Список використаних літературних джерел	17

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

СТАВ – cetyltrimethylammonium bromide (цетилтриметиламоній бромід)

dNTP – deoxynucleotide Solution Mix (дезоксинуклеотидтрифосфати)

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (етилендіамінтетраоцтова кислота)

Тaq-полімераза – термостабільна ДНК-полімераза, виділена з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*

Tris-HCl – tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (трис(гідроксиметил)амінометану гідрохлорид)

МАС-селекція – маркер асоційована селекція

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

нм – нанометр

п.н. – пари нуклеотидів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

ТВЕ-буфер – буфер для електрофорезу, що містить Tris, борну кислоту та EDTA

ТЕ-буфер – буфер для розчинення ДНК, що містить Tris та EDTA

Вступ

Каротиноїди відіграють важливу роль у підтриманні здоров'я людини, за рахунок антиоксидантної активності та як попередники вітаміну А [23]. Вони широко використовуються у медицині і харчовій промисловості. Відомо, що харчова промисловість споживає близько 30%, фармакологія і косметологія – 10%, а на виробництво кормових добавок припадає до 60% каротину. З усіх представлених на ринку каротиноїдів, у об'ємному виразі, на долю β -каротину припадає близько третини. Каротиноїди синтезуються рослинами та є важливими гідрофобними і гідрофільними з'єднаннями переважно жовтого, помаранчевого, або червоного кольору. Вони відіграють значну роль у фотосинтезі та фотозахисті, а також в утворенні фітогормонів [22].

Каротиноїди є обов'язковим компонентом пігментних систем всіх фотосинтезуючих організмів. Встановлено, що мутантні рослини, які позбавлені каротиноїдів, швидко гинуть. У процесі фотосинтезу виділяють чотири основні функції, які виконують каротиноїди: антенна, антиоксидантна, фотопротекторна і структурна [7; 12]. Кукурудза характеризується значним природним різноманіттям складу каротиноїдів, у тому числі попередників вітаміну А – а-, b-каротину та b-криптоксантину. Кількість загальних каротиноїдів у кукурудзи знаходиться у межах від 0,15 мкг/г до 51,4 мкг/г у перерахунку на суху речовину. Вміст окремих каротиноїдних сполук у зерні коливається наступним чином: β -каротин – 0,07–7,64 мкг/г, β -криптоксантин – 0,07–4,9 мкг/г, лютеїн – 0,00–27,59 мкг/г, зеаксантин – 0,01–30,7 мкг/г [12; 16].

Накопичення каротиноїдів у зерні кукурудзи відбувається під час розвитку ендосперму [9], починається на 10–15-ту добу після запилення та залежно від сорту досягає максимуму на 20–25-ту добу після запилення [24]. Біосинтез каротиноїдів закінчується до настання фізіологічної стиглості зерна, після чого концентрація каротиноїдів змінюється за рахунок втрати зерном води [10].

Синтез каротиноїдів в клітині – це складний багатоступеневий процес, який відбувається під контролем декількох генетичних систем геному рослин. Дослідження вчених дозволили встановити основні ферменти, які беруть участь у каротиногенезі кукурудзи, ідентифікувати їхні генетичні детермінанти, а також визначити їхню локалізацію на хромосомах [8; 15; 26]. До ключових ферментів, які беруть участь у біосинтезі каротиноїдів відносять [21]: лікопін- ϵ -циклазу (*lcy β*) [14] та β -каротингідроксилазу1(*crtRBI*) [25]. Ген лікопін- ϵ -циклаза локалізований на хромосомі 8 бін 5, має довжину 3631 п.н. та складається з 10 екзонів. У цьому гені ідентифіковано три поліморфні сайти [13; 14; 18; 28]: індел на 3'-кінці (маркер lcy ϵ -3'INDL); одонуклеотидна заміна всередині цього гена (маркер lcy ϵ -SNP216) та індел на 5'-кінці (маркер lcy ϵ -5'TE).

Ген β -каротингідроксилази1 локалізований на хромосомі 10 бін 5, має довжину 3007 п.н. та складається з 8 екзонів. Поліморфізм

гена crtRB1 визначається за маркером crtRB1-3'TE. За маркером crtRB1-3'TE ідентифіковано три алеля: 543 п.н. (алель 1), 296+875 п.н. (алель 2) та 296 п.н. (алель 3) [5; 20; 21]. Генотипи, які мають алель розміром 543 п.н. (алель 1) характеризують як перспективні до підвищеного синтезу каротиноїдів [17; 19; 27].

У представлених рекомендаціях описано умови та особливості визначення алельного стану ключових генів каротиногенезу за функціональними маркерами до цих генів.

1. ЕКСТРАКЦІЯ ДНК З РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ

Для виділення ДНК з рослинного матеріалу застосовують метод екстракції на основі СТАВ. При певній концентрації солі (NaCl) СТАВ утворює нерозчинний комплекс з нуклеїновими кислотами. Білки, полісахариди та фенольні сполуки, які знаходяться у водному розчині, відділяють від комплексу нуклеїнових кислот із СТАВ осадженням хлороформом [1; 6].

Реактиви для виділення ДНК

- ізопропіловий спирт;
- EDTA;
- етиловий спирт;
- протейназа-K (20 мг/мл);
- Tris-HCl;
- NaCl;
- хлороформ;
- СТАВ;
- NaOH

Приготування розчинів

Лізуючий СТАВ-буфер. Зважують наступні компоненти: СТАВ – 4 г; NaCl – 16,4 г; Tris – 3,15 г; EDTA – 1,5 г. Додають до суміші 100 мл деіонізованої води. рН розчину 8,0 отримують, додаючи 1 М NaOH. Фінальний об'єм розчину – 200 мл. Кінцеві концентрації компонентів: 20 мМ EDTA; 100мМ Tris-HCl; 1,4 М NaCl; 2% СТАВ. Зберігають за температури 4°C до 4 місяців.

СТАВ-буфер для преципітації рН 8,0. Зважують наступні компоненти: СТАВ – 1 г; NaCl – 0,5 г. Додають до суміш реактивів 100 мл деіонізованої води. рН розчину регулюють за допомогою 1 М NaOH. Фінальний об'єм – 200 мл. Кінцеві концентрації компонентів: 0,5% СТАВ; 0,04 М NaCl. Зберігають розчин при 4°C до 4 місяців.

Розчин 1,2 М NaCl. Зважують NaCl – 7 г та розчиняють в 80 мл деіонізованої води. Фінальний об'єм – 100 мл. Зберігають при кімнатній температурі до 6 місяців.

ТЕ-буфер. Концентровані розчини компонентів додають у такій кількості: 0,5 М EDTA рН 8,0 – 400 мкл; 1 М Tris-HCl рН 8,0 – 1 мл. До кінцевого об'єму – 200 мл доводять деіонізованою водою. Кінцеві концентрації ТЕ розчину: 1мМ EDTA рН 8,0; 10 мМ Tris-HCl рН 8,0. Зберігають розчин при 4°C до 6 місяців.

Розчин 70% етилового спирту. В мірний циліндр вносять 70 мл 95% етилового спирту та доводять об'єм до 95 мл деіонізованою водою. Зберігають розчин при 4°C до 6 місяців [6].

Проведення екстракції ДНК

1. Для виділення ДНК взяти наважку 50–100 мг зразка (подрібнена насінина або рослинний матеріал – проросток, фрагмент листової пластинки).

2. В ступку або мікроцентрифужну пробірку додати 500 мкл лізуючого **СТАВ-буферу**, перенести рослинний матеріал та гомогенізувати зразок.

3. У разі виділення ДНК з насіння, подрібнену насінину перенести в мікроцентрифужну пробірку та додати 500 мкл **лізуючого СТАВ-буферу**.

4. У суміш зразок-лізуючий **СТАВ-буфер** додати 300 мкл стерильної деіонізованої води, провортексувати 30 с.

5. Додати 1 мкл **Протеїнази-К**, перемішати та інкубувати за температури 65°C 45 хв.

6. Центрифугувати за 13000g протягом 10 хв.

7. Перенести ~300 мкл супернатанту в нову мікроцентрифужну пробірку та додати **хлороформ** у співвідношенні 1:1 до відібраного супернатанту, обережно перемішувати протягом 30 с.

8. Центрифугувати за 13000g протягом 10 хв.

9. Перенести верхній шар (~250 мкл) в нову мікроцентрифужну пробірку та додати **хлороформ** у співвідношенні 1:1 до відібраного супернатанту, обережно перемішувати протягом 30 с.

10. Центрифугувати за 13000g протягом 5 хв.

11. Додати 2 об'єми **СТАВ-буферу** для **преципітації**, обережно перемішати.

12. Інкубувати 60 хв. за кімнатної температури.

13. Центрифугувати за 13000g протягом 5 хв.

14. Супернатант видалити, не зачіпаючи осад (преципітат).

15. Розчинити преципітат в 350 мкл **1,2 М NaCl**.

16. Додати 0,6 об'єму (210 мкл) охолодженого **ізопропілового спирту**, обережно перемішати.

17. Центрифугувати за 13000 g протягом 10 хв.

18. Супернатант видалити, не зачіпаючи осад.

19. Додати 500 мкл **70% етилового спирту** і обережно перемішати.

20. Центрифугувати за 13000 g протягом 10 хв.

21. Супернатант видалити, осад підсушити за 60°C протягом 1 год.

22. Сухий осад отриманої ДНК розчинити в 50 мкл **ТЕ-буферу**.

Отриману ДНК одразу використати для проведення ПЛР або зберігати за температури +4°C не більше одного місяця.

2. ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТА ЧИСТОТИ ДНК

Нуклеїнові кислоти поглинають ультрафіолетове випромінювання в області спектру 240–290 нм. Концентрація ДНК зазвичай визначається при довжині хвилі 260 нм. Для оцінки чистоти препарату ДНК проводять вимірювання оптичної щільності розчину при довжинах хвиль 260, 280 і 235 нм, тобто на максимумах поглинання розчинів ДНК, білків і полісахаридів, відповідно. Значення співвідношення A260/280 для чистої ДНК становить більше 1,8, значення A260/235 – більше за 2,2 [1; 2].

Визначення концентрації ДНК, окрім спектрофотометра, проводять із застосуванням мультимодального планшетного рідера CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Німеччина), який дозволяє проводити вимірювання в мікрооб'ємах розчинів нуклеїнових кислот та одночасно на трьох довжинах хвиль.

Визначення концентрації ДНК за допомогою мультифункціонального мікропланшетного рідера CLARIOstar

1. Запустити прилад та програмне забезпечення «CLARIOstar» на комп'ютері, вибрати користувача «User» та натиснути «Run».

2. Підготувати планшет для вимірювання. Промити дистильованою водою та промокнути фільтрувальним папером. Нанести на стільнички планшета (права частина – треки 10 та 11) зразки – розчин ДНК і контроль – dH_2O по 2 мкл.

3. Закрити відкидну кришку планшета, кнопкою на передній панелі приладу «in/out» викликати каретку та поставити планшет на каретку приладу. Впевнитися, що в активному вікні обрана вкладка LVis Plate та натиснути «Start measurement».

4. У наступному вікні вибрати вид аналізу «dsDNA Adsorbance Spectra» та натиснути «Ok».

5. Для позначення зразків у діалоговому вікні «Start Measurement-dsDNA» натиснути «Change Layout». У вкладці, яка відкриється будуть відображені позначення попереднього аналізу. Щоб змінити розташування зразків та контролю, потрібно видалити попередні позначення – натиснути кнопку «Empty» та двічі натиснути на відповідних комірках лівою кнопкою миші. Для позначення контролю натиснути кнопку «Blank» та позначити розташування контролю у комірці відповідно до його нанесення на планшеті. Для позначення зразків натиснути «Sample» та позначити зразки у комірках відповідно до їхнього нанесення на планшеті. Після позначення натиснути «Start measurement».

6. Для позначення зразків вибрати вкладку «Sample ID/Dilution Factors» та ввести у відповідні рядки назви зразків.

7. Щоб розпочати аналіз – натиснути «Start measurement». Аналіз триває 15 с, про що сповіщається у рядку завантаження діалогового вікна. Про завершення аналізу сповіщає звуковий сигнал та активуються кнопки в діалоговому меню. Для відображення результатів аналізу натиснути «Open Last Test Run».

8. Ліворуч у діалоговому вікні, яке відкриється, для коректного відображення результатів правою кнопкою миші натиснути «**dsDNA concentration**», вибрати із контекстного меню «**Change calculation**». У вікні, яке відкриється у меню, вибрати пункт «**Blank corrected based on Row Data**» з метою відображення результатів відносно контролю. Після чого натиснути «**Ok**».

9. Для відображення чистоти ДНК відносно контролю за відношення довжини хвиль 260/280 нм ліворуч у вікні результатів правою кнопкою миші натиснути на параметрі у «**Calculation→Ratio 260/280**», вибрати у контекстному меню «**Change calculation**». У вікні, яке відкриється, у верхньому рядку меню «**First input data**» вибрати пункт «**Blank corrected based on Row Data**» та навпроти нього встановити довжину хвилі 260 нм. У нижньому рядку меню «**Second input data**», яке розкривається, цього ж вікна також вибрати пункт «**Blank corrected based on Row Data**» та навпроти нього встановити довжину хвилі 280 нм для відображення результатів відносно контролю. Після чого натиснути «**Ok**».

10. Зліва встановити кольорові прапорці для відображення чистоти ДНК «**Ratio 260/280**» та концентрації – «**User defined formula 260 nm**».

11. У таблиці праворуч будуть відображені результати аналізу чистоти та концентрації ДНК. Для того, щоб продивитись графічне зображення результатів аналізу необхідно вибрати один зразок або їхній діапазон в таблиці та натиснути «**Spectrum**».

12. Для передачі результатів аналізу в MS Excel натиснути на «**Excel Export**».

13. Для перегляду результатів попереднього аналізу натиснути «**Open**» вибрати результати аналізу за датою. Для коректного відображення результатів аналізу необхідно повторити пп. 12–15.

3. Проведення ПЛР ДНК кукурудзи

З метою ідентифікації алельного стану генів каротиногенезу кукурудзи за функціональними маркерами проводять ПЛР із подальшим розділенням продуктів ампліфікації в агарозному гелі [4]. Відповідно до аналізу літературних джерел функціональні маркери, які рекомендовано для дослідження, дозволяють виявити алельний стан генів *lcyε* та *crtRB1*, що мають прямий зв'язок із вмістом каротиноїдів у зерні кукурудзи [14; 25].

Характеристика праймерів. Послідовності праймерів та очікуваний розмір ампліконів наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Характеристика праймерів ідентифікації алельного стану функціональних маркерів каротиногенезу

Назва	Послідовність нуклеотидів праймерів 5'...3'	Очікуваний розмір ампліконів, п.н.	Літературні джерела
<i>lcyε</i> -5'TE	F* aag cat ccg acc aaa ata aca g R* gag agg gag acg acg aga cac	650 250	Muthusamy et al. (2015)
<i>lcyε</i> -SNP216	F1 gcg gca gtg gcc gtg gat F2 cgt cgt ttc cca tct ctt cct cc R1 tga agt acg gct gca gga caa cg R2 gac aga gga gaa aca agg cg	231+395 231	Harjes et al. (2008)
<i>lcyε</i> -3'INDL	F1 gta cgt cgt tca tct ccg tac cc R1 ctt ggt gaa cgc att tct gtt gg F2 gga ccg gaa cag cca act g R2 gcc gaa atg ggt acg gcc	144+502 399+502	Harjes et al. (2008)
<i>crtRB1</i> -3'TE	F aca cca cat gga caa gtt cg R1 aca ctc tgg ccc atg aac ac R2 aca gca ata cag ggg acc ag	543 296+875 296	Muthusamy et al. (2015)
Adh	F cgt cgt ttc cca tct ctt cct cc R gac aga gga gaa aca agg cg	231	Марковский та ін., 2014

*F – прямий праймер.

**R – зворотний праймер.

Для ідентифікації одонуклеотидного поліморфізму за маркером *lcyε*-SNP216 використовують внутрішній контроль реакції – праймери до гену алкоголь дегідрогенази (*adh1*), які дозволяють отримати амплікон розміром 231 п.н.

Таким чином, у разі виявлення сприятливого алеля, що відповідає наявності на сайті маркера нуклеотиду G, на електрофореграмі буде представлено лише один алель 231 п.н. (внутрішній контроль реакції).

Підготовка та проведення ПЛР

1. Розрахувати кількість компонентів реакційної суміші для проведення ПЛР ДНК кукурудзи (табл. 3.2).

2. У пробірці 1,5 мл приготувати реакційну суміш. При розрахунку кількості компонентів ПЛР до фактичної кількості зразків додати ще один зразок для урахування можливих втрат (фактична кількість зразків + 1 зразок).

Таблиця 3.2. Склад реакційної суміші для проведення ПЛР ДНК кукурудзи

Компоненти ПЛР	Кінцева концентрація
10×ПЛР буфер*	1×
dNTP	250 мкМ
MgCl ₂	2,5 мМ
Taq-полімераза	1 од.
Праймер F	0,6 мкМ
Праймер R	0,6 мкМ
dH ₂ O	
Загальний об'єм реакції	20 мкл

*10 мМ Tris-HCl, pH 9,0; 50 мМ KCl; 0,01% Тритон X-100

3. Додати в кожную 0,2 мл пробірку по 17 мкл приготованої реакційної суміші відповідно до кількості зразків.

4. Додати в кожную пробірку по 3 мкл ДНК (концентрація не менше 20 нг/мкл).

5. Центрифугувати для осадження крапель та бульбашок протягом 15 с за 7000 g. Помістити пробірки з реакційною сумішню в ампліфікатор та задати параметри ампліфікації ДНК (табл. 3.3).

Таблиця 3.3. Параметри проведення ампліфікації ДНК кукурудзи

Етап	Температура, °C	Час
Початкова денатурація	94	5 хв
Денатурація	94	1 хв
Гібридизація праймерів	60	1 хв
Елонгація	72	1 хв
Кінцева елонгація	72	5 хв
Кількість циклів – 40		

4. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ ПРОДУКТІВ АМПЛІФІКАЦІЇ

Реактиви для електрофорезу

- EDTA;
- Tris;
- легкоплавка агароза для електрофорезу;
- борна кислота;
- бромід етидію розчин 10 мг/мл [17].

Приготування розчинів

10×ТВЕ-буфер. На 1 л розчину зважують 108 г Tris та 55 г борної кислоти та розчиняють в 800 мл дистильованої води. Після чого додають 40 мл 0,5 М ЕДТА (рН 8,0) та доводять дистильованою водою об'єм до 1 л.

Зберігають у холодильнику при 4°C до 6 місяців.

0,5×ТВЕ-буфер. Для приготування 1 л розчину в мірний циліндр вносять 50 мл 10×ТВЕ-буфер (десятикратний ТВЕ-буфер) та доводять дистильованою водою об'єм до 1 л, перемішують і переносять в колбу для зберігання. Зберігають при кімнатній температурі не більше 1 місяця.

Агарозний гель. Для приготування 100 мл 2% гелю зважують 2 г агарози або 4 г – для 4% гелю. Розчиняють агарозу у 70 мл 0,5×ТВЕ-буферу шляхом нагрівання у мікрохвильовій печі або киплячій водяній бані та доводять об'єм до 100 мл. Після повного розчинення агарози охолоджують при кімнатній температурі до 60°C. Додають розчин етидію броміду до кінцевої концентрації 1 мкг/мл. Встановлюють гребінку в камеру для заливки гелів та заливають гель товщиною близько 4 мм. Після полімеризації гелю гребінку видаляють попередньо заливши поверх гелю розчин 0,5×ТВЕ-буферу шаром 1 мм.

Проведення горизонтального електрофорезу продуктів ПЛР

1. Пластину гелю помістити в електрофорезну камеру приладу для горизонтального електрофорезу, заповнену 0,5×ТВЕ-буфером.

2. Приготувати розчин 1×буферу для нанесення (однократний буфер): для нанесення одного зразка продуктів ампліфікації змішати 1,66 мкл шестикратного буферу для нанесення (6×буфер) (0,25% бромфенолового синього, 0,25% ксиленціанолу, 30% гліцерину) та 3,34 деіонізованої води.

3. З кожної мікроцентрифужної пробірки відібрати по 5 мкл продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та змішати з 5 мкл 1×буферу для нанесення, уникаючи утворення бульбашок. Отриманий розчин (10 мкл) та маркер молекулярної маси ДНК внести в лунки гелю.

4. Провести електрофорез продуктів ампліфікації в 2% агарозному гелі у 0,5×ТВЕ-буфері протягом 1,5 год за напруженості електричного поля 5 В/см у напрямку від катода до анода.

5. Після закінчення електрофорезу гель помістити на фільтр транслюмінатора з лампою ультрафіолетового світла (254–310 нм).

При опроміненні гелю ультрафіолетовим світлом продукти ПЛР проявляються у вигляді смуг на відповідних доріжках.

6. Результати візуалізації задокументувати за допомогою цифрової камери або інших систем документування гелю [4].

5. Визначення розміру ампліконів та ідентифікація сприятливих алелів

1. На основі отриманих електрофореграм визначити розмір ампліконів за допомогою комп'ютерної програми TotalLab або іншого аналогічного програмного забезпечення (рис. 5.1).

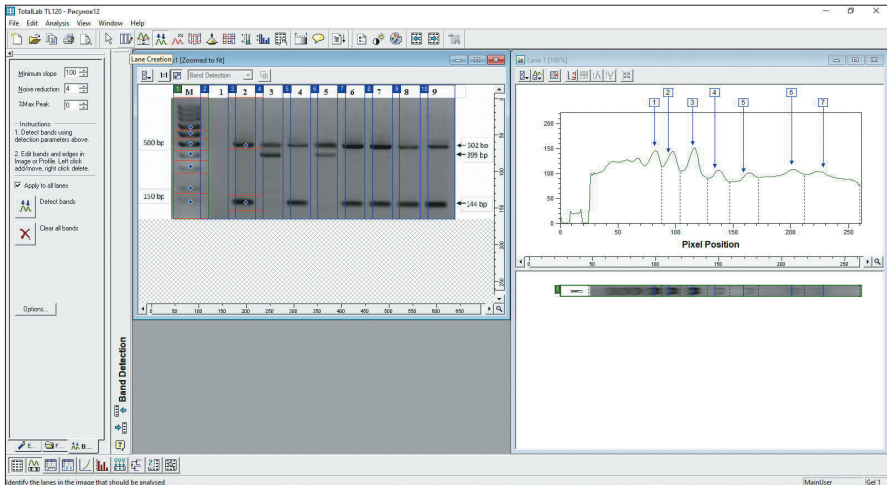


Рис. 5.1. Робоче вікно програми TotalLab TL120 (тестова версія)

2. Результати аналізу в програмі TotalLab зберегти в програмі Excel, розміри ампліконів записати в п.н. (рис. 5.2).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
1		Band No		Base Pairs(bp)																				
2	Lane 1	1	1 000 000																					
3	Lane 1	2	900 000																					
4	Lane 1	3	800 000																					
5	Lane 1	4	700 000																					
6	Lane 1	5	600 000																					
7	Lane 1	6	500 000																					
8	Lane 1	7	400 000																					
9	Lane 1	8	300 000																					
10	Lane 1	9	200 000																					
11	Lane 1	10	100 000																					
12	Lane 2	1	188 412 Na5	Генотип 1																				
13	Lane 2	2	154 197																					
14	Lane 3	1	188 435 Na5	Генотип 2																				
15	Lane 3	2	154 175																					
16	Lane 4	1	188 435 Na5	Генотип 3																				
17	Lane 4	2	154 244																					
18	Lane 5	1	178 952 Na6	Генотип 1																				
19	Lane 5	2	157 868																					
20	Lane 6	1	177 417 Na6	Генотип 2																				
21	Lane 6	2	158 859																					
22	Lane 7	1	178 305 Na6	Генотип 3																				
23	Lane 7	2	158 488																					
24	Lane 8																							
25	Lane 9	1	1 000 000																					

Рис. 5.2. Форма документування розмірів ампліконів у програмі Excel

3. Для ідентифікації сприятливих алелів, отримані результати співвідносять з таблицею очікуваних розмірів ампліконів (таб. 5.1).

Таблиця 5.1. Характеристика розміру сприятливого алелю за функціональними маркерами

Назва	Очікуваний розмір сприятливого алелю, п.н.	Літературні джерела
<i>lcyε</i> -5'TE	650	Muthusamy et al. (2015)
<i>lcyε</i> -SNP216	231	Harjes et al. (2008)
<i>lcyε</i> -3'INDL	144+502	Harjes et al. (2008)
<i>crtRB1</i> -3'TE	543	Muthusamy et al. (2015)

За маркером *lcyε*-5'TE потенційно можливо отримати два алельних варіанти, один із яких сприятливий – 650 п.н. та несприятливий – 250 п.н.

За маркером *lcyε*-SNP216 та праймерами до внутрішнього контролю реакції – гену *adh1* для досліджуваних ліній кукурудзи, ідентифікуються алелі розмірами 231 та 395 п.н. Відсутність алеля розміром 395 п.н. вказує на наявність сприятливої алелі.

Маркер *lcyε*-3'INDL представлений алелями, який ідентифікується продуктами ПЛР розмірами 144+502 п.н. та 399+502 п.н. Наявність ампліконів розміром 144+502 п.н. вказує на наявність сприятливої алелі.

За маркером *crtRB1*-3' TE є три можливих алельних варіанти. За рахунок специфічного дизайну праймерів досліджуваного маркера (один прямий і два зворотні), у результаті полімеразної ланцюгової реакції можуть утворюватися продукти довжиною 543 п.н., 296 п.н. та 296+875 п.н. Наявність ампліконів розміром 543 п.н. свідчить про наявність в генотипів сприятливого алелю.

Список використаних літературних джерел

1. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991. 408 с.
2. Епринцев А. П. Идентификация и исследование экспрессии генов / Епринцев А. П., Попов В. Н., Федорин Д. Н. Воронеж, 2008. 64 с.
3. Марковский О. В., Банникова М. О., Борисова В. В. та ін. Виявлення генів, які детермінують якісні характеристики зерна та стійкість до стресових факторів у кукурудзи. *Наука та інновації*. 2014. Т. 10, № 1. С. 43–55.
4. Методика проведення кваліфікаційної експертизи сортів рослин на придатність до поширення в Україні. Методи визначення показників якості продукції рослинництва / за ред. С. О. Ткачик. Київ, 2016. 158 с.
5. Орловская О. А., Вакула С. И., Хотылева Л. В., Кильчевский А. В. Ассоциация уровня общего содержания каротиноидов в зерне кукурузы (*Zea mays* L.) с аллельным полиморфизмом сайта InDel1 гена PSY1. *Экологическая генетика*. 2016. Т. 14, № 3. С. 28–34. doi: 10.17816/ecogen14328-34
6. Роїк М. В., Сиволап Ю. М., Петюх Г. П. та ін. Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду *BETA* L. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Київ, 2007. 27 с.
7. Смоликова Г. Н., Медведев С. С. Каротиноиды семян: синтез, разнообразие и функции. *Физиология растений*. 2015. Т. 62, № 1. С. 3–16.
8. Bai L., Kim E., DellaPenna D., Brutnell T. P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J*. 2009. Vol. 59. P. 588–599. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03899.x.
9. Bartley G. E., Scolnik P. A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*. 1995. Vol. 7, No. 7. P. 1027–1038.
10. Cardoso W. S., Borem A., Karam D. et al. Influence of the moisture at harvest and drying process of grains on the level of carotenoids in maize (*Zea mays*). *Food Science and Technology*. 2015. Vol. 35, No. 3. P. 481–486.
11. Cazzonelli C. I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol*. 2011. Vol. 38. P. 833–847.
12. Egesel C. O., Wong J. C., Lambert R. J., Rochford T. R. Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Science*. 2003. Vol. 43, No. 3. P. 818.
13. Fu Z., Chai Y., Zhou Y. et al. Natural variation in the sequence of PSY1 and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm. *Theoretical and applied genetics*. 2013. Vol. 126, No. 4. P. 923–935. doi: 10.1007/s00122-012-2026-0.
14. Harjes C. E., Rocheford T. R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*. 2008. Vol. 319. doi: 10.1126/science.1150255.
15. Kreuz K., Beyer P., Kleinig H. The site of carotenogenic enzymes in chromoplasts from *Narcissus pseudonarcissus*. *L. Planta*. 1982. Vol. 154. P. 66–69.
16. Kurilich A. C., Juvik J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999. Vol. 47, N 5. P. 1948–1955.
17. Liu L., Jeffers D., Zhang Y. et al. Introgression of the crtRB1 gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers. *Molecular breeding*. 2015. Vol. 35, No. 8. P. 154. doi: 10.1007/s11032-015-0349-7.
18. 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 & Agriculture*. 2015. Vol. 1, Iss. 1. P. 103–141. doi:10.1080/23311932.2015.1033141
19. Robert B. The Electronic Structure, Stereochemistry and Resonance Raman Spectroscopy of Carotenoids. *The Photochemistry of Carotenoids*. 1999. P. 189–201. doi: 10.1007/0-306-48209-6_10

20. Sagare D. B., Shetti P., Surender M. *et al.* Maize: potential crop for provitamin A bio-fortification. *Maydica*. 2018. Vol. 63, No. 2. P. 11.
21. Sagare D. B., Reddy S. S., Shetti P., Surender M. Enhancing provitamin A of maize using functional gene markers. *IJBR*. 2015. Vol. 6. P. 86–95.
22. Shumskaya M., Bradbury L. M. T., Monaco R. R., Wurtzel E. T. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *Plant Cell*. 2012. Vol. 24. P. 3725–3741.
23. Vallabhaneni R., Wurtzel E. T. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. *Plant Physiol*. 2009. Vol. 150. P. 562–572.
24. Wurtzel E. T. Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis. *Recent Advances in Phytochemistry*. 2004. Vol. 38. P. 85–110.
25. Yan J. B., Kandianis C. B., Harjes C. E. *et al.* Rare genetic variation at *Zea mays* crtRB1 increases β -carotene in maize grain. *Nat. Genet*. 2010. Vol. 42. P. 322–327.
26. Ytterberg A. J., Peltier J.-B., van Wijk K. J. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic. *Plant Physiol*. 2006. Vol. 140. P. 984–997.
27. Zhou, Y., Han, Y., Li, Z., Fu, Y., Fu, Z., Xu, S., & Yang, X. ZmcrtRB3 Encodes a Carotenoid Hydroxylase that Affects the Accumulation of α -carotene in Maize Kernel. *Journal of integrative plant biology*. 2012. Vol. 54, No. 4. P. 260–269. doi: 10.1111/j.1744-7909.2012.01106.x
28. Zunjare R. U., Hossain F., Muthusamy V. *et al.* Development of Biofortified Maize Hybrids through Marker-Assisted Stacking of β -Carotene Hydroxylase, Lycopene- ϵ -Cyclase and Opaque2 Genes. *Frontiers in plant science*. 2018. No. 9. P. 178. doi: 10.3389/fpls.2018.00178

Добір генотипів для мас-селекції кукурудзи на підвищений вміст каротиноїдів
Науково-методичні рекомендації

Рекомендовано до друку Вченою радою
Українського інституту експертизи сортів рослин,
протокол № 12 від «24» грудня 2020 року.

Науково-методичні рекомендації підготували:
Присяжнюк Л. М., Шитікова Ю. В., Ткачик С. О., Гончаров Ю. О., Максимова Л. Г.
Український інститут експертизи сортів рослин;
ТОВ «Науково-дослідний інститут аграрного бізнесу», 2020.

Комп'ютерна верстка Бойко А. І.

Формат 64×84 1/16. Папір крейдовий.
Друк цифровий. Гарнітура Schoolbook
Друк. арк. Умов. друк. арк.
Наклад 50 прим. Зам.

Віддруковано з оригіналів замовника ТОВ «ТВОРИ»
Видавець ТОВ «ТВОРИ»

Свідectво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавців, виготовлювачів і розповсюджувачів видавничої продукції серія ДК № 6188 від
18.05.2018 р.

21027, м. Вінниця, вул. Келецька, 51а, прим. 143.
Тел.: (0432) 603-000, 69-67-69
e-mail: info@tvoru.com.ua
<http://www.tvoru.com.ua>