Доклады Национальной академии наук Беларуси

2016 **май–июнь** **Том 60 № 3**

БИОЛОГИЯ

УДК 577.21:633.15

О. А. ОРЛОВСКАЯ, С. И. ВАКУЛА, С. В. КУБРАК, академик Л. В. ХОТЫЛЕВА, член-корреспондент А. В. КИЛЬЧЕВСКИЙ

ОЦЕНКА ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ *LcyE* И *CrtRB1*, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ПРОВИТАМИНА А В ЗЕРНЕ КУКУРУЗЫ *(ZEA MAYS L.),* В КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ РАЗЛИЧНОГО ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
O.Orlovskaya@igc.by; s.vacula@igc.by; S.Kubrak@igc.by; L.Khotyleva@igc.by; Kilchev@presidium.bas-net.by

Проведена оценка ключевых полиморфизмов генов *LcyE* и *CrtRB1*, ассоциированных с повышенным уровнем провитамина А в зерне кукурузы (*LcyE* 5′TE, *LcyE* 3′Indel и *CrtRB1* 3′TE), в коллекции из 54 образцов различного эколого-географического происхождения. В изученном материале не выявлено присутствия благоприятных аллелей гена *LcyE.* Выделены генотипы (35 % образцов), несущие благоприятный аллель 1 функционального маркера C*rtRB1* 3′TE, которые представляют интерес для селекционных программ кукурузы, направленных на повышение качества зерна.

Ключевые слова: кукуруза, каротиноиды, ДНК маркеры.

O. A. ORLOVSKAYA, S. I. VAKULA, S. V. KUBRAK, L. V. KHOTYLEVA, A. V. KILCHEVSKY

EVALUATION OF *LcyE* AND *CrtRB1* GENE POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH AN INCREASED CONTENT OF PROVITAMIN A IN MAIZE GRAIN (*ZEA MAYS* L.) IN THE COLLECTION OF SAMPLES OF DIFFERENT ECO-GEOGRAPHICAL ORIGIN

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
O.Orlovskaya@igc.by; s.vacula@igc.by; S.Kubrak@igc.by; L.Khotyleva@igc.by; Kilchev@presidium.bas-net.by

The collection of 54 maize samples of different eco-geographical origin was evaluated for the key polymorphisms of the *LcyE* and *CrtRB1* genes (*LcyE* 5′TE, *LcyE* 3′Indel and *CrtRB1* 3′TE) associated with the provitamin A content in maize grain. Favorable alleles of *LcyE* were not detected in the studied material. Selected genotypes with favorable allele 1 of *CrtRB1* 3′TE functional marker (35 % of the samples) are of interest for maize breeding programs aimed at improving the grain quality.

Keywords: maize, carotenoids, DNA markers.

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения, витамин А является одним из наиболее дефицитных витаминов, необходимых для жизнедеятельности человека [1]. Однако в организме человека и животных он не синтезируется и, следовательно, должен поступать с пищей. Кукуруза – единственная из основных зерновых культур, способная накапливать значительное количество каротиноидов, которые являются главным источником провитамина А (про-А) [2]. Тем не менее, содержание про-А (β- и α-каротин, β-криптоксантин) обычно составляет только 10–20 % от общего объема каротиноидов зерна кукурузы, в то время как содержание лютеина и зеаксантина достигает 45 и 35 % соответственно [3]. Концентрацию данного провитамина можно повысить селекционным путем, используя природную генетическую изменчивость уровня каротиноидов в зерне кукурузы [4; 5]. Одной из основных проблем селекции кукурузы с высоким содержанием про-А является значительная стоимость анализа содержания компонентов каротиноидов в зерне методом высокоэффективной жидкостной хромотографии (ВЭЖХ). Маркер-сопутствующая селекция, используя недорогие ДНК маркеры, тесно сцепленные с целевыми локусами, может помочь в ее решении. Последние достижения в области молекулярной биологии позволили выявить ключевые гены, участвующие в биосинтезе каротиноидов. Установле-

но, что у кукурузы решающую роль в данном процессе играют три гена – *Psy1*, *LcyE* и C*rtRB1*, которые кодируют основные ферменты биосинтетического цикла каротиноидов [6]. Фермент фитоенсинтаза (кодируется геном *Psy1*) катализирует первый этап биосинтеза, ведущий к образованию фитоена из геранилгеранилпирофосфата [7]. Следующим ключевым этапом является циклизация ликопина. Ликопин-ε-циклаза (LCYE) и/или ликопин-β-циклаза (LCYB*)* замыкают молекулу ликопина в кольцо, формируя молекулы α- и β-каротина. β-каротингидроксилаза (CRTRB) катализирует превращение α- и β-каротина в зеаксантин/лютеин и β-криптоксантин/зеаксантин соответственно [8]. Увеличение содержания компонентов про-А связывают со снижением экспрессии генов *LcyE* и *CrtRB1*. Например, выявлены природные варианты мутантных аллелей *LcyE* с ограниченной функциональностью, связанные с перераспределением биосинтеза ликопина в сторону семейства β-каротинов, и как следствие с увеличением синтеза соединений про-А [9]. В гене *CrtRB1* с использованием ассоциативного картирования идентифицировано три полиморфных сайта, достоверно связанных с изменчивостью концентрации β-каротина в зерне кукурузы: 5′TE, InDel4 и 3′TE [10].

Целью нашего исследования было выявить генотипы с благоприятными аллелями генов *LcyE* и *CrtRB1*, ассоциированными с высоким уровнем про-А в зерне кукурузы, в коллекции образцов различного эколого-географического происхождения.

Материалы и методы исследования. В исследовании использовалась коллекция из 54 генотипов кукурузы различного эколого-географического происхождения, включающая 20 самоопыленных линий селекции РНДУП «Полесский институт растениеводства» (Гомельская обл., Беларусь), 10 самоопыленных линий из ГНУ «Всероссийский НИИ кукурузы» (г. Пятигорск, Россия), 22 образца селекции России, Молдовы, Украины, Италии, Венгрии, США и других стран из коллекции ГНУ «Всероссийский институт растениеводства» (г. Санкт-Петербург, Россия), 2 образца из Maize Genetics Cooperation Stock Center (USA). Выделение ДНК осуществляли из зерна при помощи набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Последовательности праймеров, специфичных к анализируемым аллелям генов *LcyE* и *CrtRB1*, представлены в табл. 1 [9; 10].

Таблица 1. **Последовательности олигонуклеотидов, использованные в исследовании**

Праймер	Последовательность праймеров 5′–3′
LcyE 5′TE	F: AAGCAGGGAAGACATTCCAG R: GAGAGGGAGACGACGAGACAC
LcyE 3′Indel	F: ACCCGTACGTCGTTCATCTC R: ACCCTGCGTGGTCTCAAC
CrtRB1 3′TE	F: ACACCACATGGACAAGTTCG R1: ACACTCTGGCCCATGAACAC R2: ACAGCAATACAGGGGACCAG

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе Biometra Professional в условиях, оптимальных для каждого из праймеров (табл. 2).

Таблица 2. **Условия проведения ПЦР реакции**

Этап	*LcyE* 5’TE		*LcyE* 3’Indel		C*rtRB1* 3’TE	
	T, °C	Время	*T*, °C	Время	*T*, °C	Время
Предварительная денатурация	94	5 мин	94	5 мин	94	5 мин
Денатурация	94	30 сек	94	60 сек	94	30 сек
Отжиг	60 – Δ0,5 цикл	30сек	59,9	60 сек	63 – Δ0,5 цикл	30сек
Элонгация	72	60 сек	72	60 сек	72	60 сек
Количество циклов	12		40		12	
Денатурация	94	30 сек			94	30 сек
Отжиг	58	30 сек			58	30 сек
Элонгация	72	60 сек			72	60 сек
Количество циклов	30				30	
Финальная элонгация	72	7 мин	72	5 мин	72	7 мин

Амплифицированные фрагменты разделяли в 1,5 %-ном агарозном геле в 1×TAE буфере и документировали в системе GelDoc (BioRad). Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно маркера GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific).

Результаты и их обсуждение. Согласно литературным данным, оценка эффектов 3 полиморфизмов (*LcyE* 5′TE, *LcyE* 3′Indel и *CrtRB1* 3′TE) в 26 различных популяциях кукурузы показала, что благоприятные полиморфизмы *LcyE*, связанные со снижением функции этого гена, приводят к уменьшению соотношения каротиноидов α/β семейств на 0–30 % и увеличению содержания про-А. Также установлен статистически достоверный эффект *CrtRB1* 3′TE на повышение содержания β-каротина и общего содержания про-А вне зависимости от генетического состояния *LcyE*. Наличие благоприятного аллеля *CrtRB1* 3′TE в 2–10 раз увеличивало концентрацию β-каротина и общего про-А в зерне кукурузы [11].

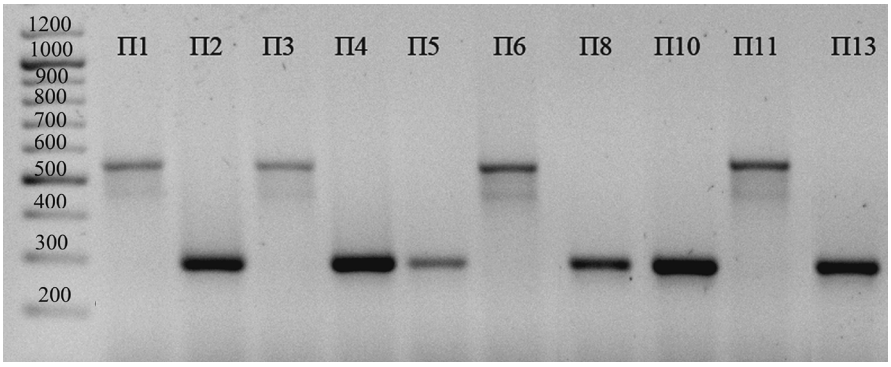
Нами изучено три ключевых полиморфизма генов *LcyE* и *CrtRB1*, ассоциированных с повышенным уровнем про-А в эндосперме зерна кукурузы (*LcyE* 5′TE, *LcyE* 3′Indel и *CrtRB1* 3′TE), в коллекции образцов кукурузы различного эколого-географического происхождения. *LcyE* 5′TE – инсерция мобильного элемента в 5′-нетранслируемый участок гена, затрагивающая промотор. В 5′TE регионе обнаружено присутствие четырех аллелей гена *LcyE*: аллель 1 (150 + 280 bp), 2 (250 bp), 3 (250 bp + 380 bp) и 4 (650 bp), первый и четвертый из которых ассоциированы с увеличением содержания каротиноидов β-семейства. *LcyE* 3′Indel – делеция в 3′-нетранслируемый участок гена. В 3′ регионе выявлено два аллеля гена *LcyE*: 0 bp референсный аллель (399 + 502 bp); делеция 8 bp (144 + 502 bp), связанная с увеличением содержания β-каротиноидов [9].

Изучение 5′TE полиморфизма гена *LcyE* в коллекции из 54 генотипов кукурузы не выявило наличия благоприятных аллелей в гомозиготном состоянии у исследованных нами генотипов, и только один образец из коллекции ВИРа был гетерозиготой по благоприятному аллелю 4. При анализе полиморфизма *LcyE*-3′Indel у изученных нами образцов был выявлен продукт с электрофоретической подвижностью в диапазоне 115–130 bp, что указывает на отсутствие в 3′ регионе благоприятного аллеля гена *LcyE* у данных генотипов.

В эндосперме кукурузы ген C*rtRB1* контролирует гидроксилирование β-каротина в β-криптоксантин, а его аллели с пониженной активностью гидроксилирования ассоциированы с повышенным содержанием β-каротина. В работе Azmach и соавт. показано высокое неравновесное сцепление ($R^2 = 0{,}76$) между полиморфизмами 3′TE и 5′TE гена C*rtRB1*, что позволяет использовать один маркер для снижения стоимости ПЦР-типирования [3]. Мы в своем исследовании изучали 3′TE полиморфизм гена C*rtRB1*, который охватывает 6-й экзон и 3′-UTR область и включает три аллеля: аллель 1 (543 bp, без инсерции), аллель 2 (296 + 875 bp, с инсерцией 325 bp), аллель 3 (296 + 1221 + 1880 bp, с инсерцией 1250 bp) [12]. В результате сравнения эффектов различных аллелей *CrtRB1* в работе Babu и соавт. установлено, что аллель 1 благоприятно влияет на повышение концентрации β-каротина за счет снижения уровня транскрипционной экспрессии гена C*rtRB1*, тогда как аллели 2 и 3 вызывают неблагоприятные эффекты [11].

Изучение 3′TE полиморфизма гена CrtRB1 в 54 образцах кукурузы нашей коллекции выявило наличие как благоприятного аллеля 1 (543 bp), так и неблагоприятного аллеля 2 (296 bp). Присутствия неблагоприятного аллеля 3 в исследованном нами материале не обнаружено (рисунок).

Анализ данных табл. 3 показывает, что большинство генотипов были гомозиготами по неблагоприятному аллелю 2 (64,9 %). Это не противоречит литературным данным, согласно которым частота встречаемости благоприятного аллеля C*rtRB1* в генофонде кукурузы незначительна. Следует отметить, что благоприятный аллель в генофонде кукурузы умеренного климата встречается значительно реже, чем у тропических линий [10]. В проанализированной коллекции благоприятный аллель 1 выявлен у 35 % образцов, из них гомозиготами были 18,4 %. Согласно результатам зарубежных ученых, гомозиготы по благоприятному аллелю накапливают в 4,6 раза больше β-каротина и в 2,3 раза больше про-А по сравнению с гомозиготами по неблагоприятному аллелю [11]. Больше всего таких генотипов нами обнаружено среди линий селекции Полесского института растениеводства (табл. 3, рисунок), что позволит использовать их в селекции, направленной на повышение качества зерна, в регионах умеренного климата.



Аллели гена c*rtRB1* 3′TE в линиях кукурузы селекции Полесского института растениеводства: линии П1, П3, П6, П11 имеют благоприятный аллель 1: 543 bp; линии П2, П4, П5, П8, П10, П13 – неблагоприятный аллель 2: 296 bp

Таблица 3. **Результаты типирования образцов кукурузы различного эколого-географического происхождения по 3′TE полиморфизму гена *CrtRB1***

Происхождение образца	Количество генотипов, %		
	гомозигота по аллелю 1	гомозигота по аллелю 2	гетерозигота
Всероссийский институт растениеводства, Россия	1,8	26,0	13,0
Всероссийский НИИ кукурузы, Россия	1,8	13,0	3,7
Полесский институт растениеводства, Беларусь	13,0	24,1	0
Maize Genetics Cooperation Stock Center, США	1,8	1,8	0
Всего	18,4	64,9	16,7

У 16,7 % образцов благоприятный аллель 1 находился в гетерозиготном состоянии. Как правило, это генотипы коллекции ВИРа селекции ряда европейских стран (Венгрия, Италия, Россия, Украина, Молдова). Известно, что гетерозиготные генотипы содержат в 1,9 раза больше β-каротина и в 1,5 раза больше провитамина А по сравнению с гомозиготами по неблагоприятному аллелю 2. Содержание зеаксантина и β-криптоксантина у гетерозиготных генотипов и гомозигот по аллелю 2 было приблизительно на одном уровне [11].

Заключение. В результате изучения трех полиморфизмов (*LcyE* 5′TE, *LcyE* 3′Indel и *CrtRB1* 3′TE) у 54 образцов кукурузы различного эколого-географического происхождения выделены генотипы (35 % образцов), несущие благоприятный аллель 1 функционального маркера C*rtRB1* 3′TE, который ассоциирован с высоким уровнем содержания про-А в зерне кукурузы. Проведенное исследование не выявило наличия благоприятных аллелей гена *LcyE* в данной коллекции. Изучение зарубежными учеными совместных эффектов двух генов *LcyE* и *CrtRB1* на содержание каротиноидов в эндосперме кукурузы показало, что *CrtRB1* оказывает гораздо больший эффект на концентрацию про-А, чем ген *LcyE*. Маркер-ассоциированный отбор по благоприятному аллелю *CrtRB1* может привести к быстрому увеличению общей концентрации про-А (в два и более раз), в то время как по благоприятному аллелю *LcyE* – только к 20–30 %-ному увеличению [11]. Таким образом, отобранные нами генотипы с благоприятным аллелем *CrtRB1*, представляют интерес для селекционных программ кукурузы, направленных на повышение качества зерна. Использование молекулярно-генетических маркеров для выявления генотипов кукурузы с высоким уровнем про-А позволяет исключить использование дорогостоящего ВЭЖХ анализа и тем самым значительно уменьшить трудоемкость и финансовые затраты на создание качественно новых гибридов кукурузы.

Список использованной литературы

1. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition / H. E. Bouis [et al.] // Food Nutr. Bull. – 2011. – Vol. 32, N 1. – P. 31–40.

2. *Wurtzel, E. T.* Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis / E. T. Wurtzel // Recent Adv. Phytochem. – 2004. – Vol. 38. – P. 85–110.

3. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A levels across diverse tropical yellow maize inbred lines / G. Azmach [et al.] // BMC Plant Biology. – 2013. – Vol. 13. – P. 227–243.

4. *Bouis, H. E.* Biofortification – a sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global South / H. E. Bouis, R. M. Welch // Crop. Sci. – 2010. – Vol. 50. – P. 20–32.

5. *Pfeiffer, W. H.* HarvestPlus: breeding crops for better nutrition / W. H. Pfeiffer, B. McClafferty // Crop. Sci. – 2007. – Vol. 47. – P. 88–105.

6. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants / G. Giuliano [et al.] // Trends Biotechnol. – 2008. – Vol. 26. – P. 139–145.

7. Cloning and functional characterization of the maize carotenoid isomerase and b-carotene hydroxylase genes and their regulation during endosperm maturation / Q. Li [et al.] // Transgenic Res. – 2010. – Vol. 19. – P. 1053–1068.

8. Natural variation in the sequence of *PSY1* and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm / Z. Fu [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2013. – Vol. 126. – P. 923–935.

9. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification / E. C. Harjes [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 319. – P. 330–333.

10. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases β-carotene in maize grain / J. Yan [et al.] // Nature Genetics. – 2010. – Vol. 42. – P. 322–327.

11. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations / R. Babu [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2013. – Vol. 126. – P. 389–399.

12. Assessment of *crtRB1* polymorphism associated with increased β-carotene content in maize (*Zea mays* L.) seeds / D. T. Selvi [et al.] // Food Biotechnology. – 2014. – Vol. 28. – P. 41–49.

Поступило в редакцию 23.11.2015