

Національна академія аграрних наук України  
Селекційно-генетичний інститут —  
Національний центр насіннезнавства та сортовивчення

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛІВ ГЕНІВ  
ДЕГІДРИНІВ *DHN1* ТА *ZMDHN13*  
У СОРТІВ, ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ  
КУКУРУДЗИ**

Методичні рекомендації

Одеса  
«Екологія»  
2021

УДК 575.22:631.523.11:633.111.1  
I-291

Розглянуто і затверджено до друку вченою радою Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (*протокол № 8 від 6 листопада 2020 р.*)

Автори:

**Галаєва М. В.**, старший науковий співробітник відділу загальної та молекулярної генетики СГІ—НЦНС, кандидат біол. наук;

**Файт В. І.**, заступник директора СГІ—НЦНС з наукової роботи, доктор біол. наук, с. н. с., член-кор. НААН

Рецензенти:

**Вареник Б. Ф.**, завідувач відділу селекції та насінництва соняшнику СГІ—НЦНС, кандидат с.-г. наук, доцент;

**Січняк О. Л.**, доцент кафедри генетики та молекулярної біології ОНУ ім. І. І. Мечникова, кандидат біол. наук, с.н.с., доцент

Відповідальний за випуск: директор СГІ—НЦНС, член-кор. НААН **Соколов В. М.**

**Ідентифікація** алелів генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13* у сортів, ліній та гібридів кукурудзи: методичні рекомендації / авт.: М. В. Галаєва, В. І. Файт ; СГІ —НЦНС. — Одеса : Екологія, 2021. — 12 с.

Розроблено ДНК-технологію ідентифікації алелів генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13* у сортів, ліній та гібридів кукурудзи. Із застосуванням запропонованої технології можна ефективно здійснювати добір генотипів-носіїв окремих алелів генів *Dhn1* та *ZmDHN13* із селекційного матеріалу та створювати лінії з певними комбінаціями алелів зазначених генів, що дозволить збільшити ефективність селекційних програм, спрямованих на підвищення стійкості рослин кукурудзи до абіотичних стресових чинників

УДК 575.22:631.523.11:633.111.1

© Селекційно-генетичний інститут —  
Національний центр насіннезнавства  
та сортовивчення (СГІ—НЦНС), 2021

## ЗМІСТ

<i>Вступ</i> .....	4
1. ОПИС МЕТОДУ .....	5
2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ .....	5
2.1. Виділення ДНК з індивідуальних рослин (проростків, листіків) .....	5
2.2. Спектрометричне визначення концентрації ДНК .....	6
2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) .....	6
2.4. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації .....	7
2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації .....	7
2.6. Документування результатів .....	8
3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....	8
<i>Висновки</i> .....	11
<i>Список бібліографічних посилань</i> .....	11

## ВСТУП

Щоб реагувати на зміни навколишнього середовища, рослини виробили складні механізми, які дозволяють швидко сприймати абіотичні стреси та реагувати на них. Білки пізнього ембріогенезу (LEA — Late Embryogenesis Abundant) — це велика і різноманітна родина білків, яка відіграє важливу роль у стійкості рослин до стресу навколишнього середовища [1]. Дегідрини належать до білків LEA II групи, які вважаються білками стресу, що беруть участь у формуванні захисних реакцій рослин на зневоднення [2]. На даний момент дегідрини виявлено та досліджено у значній кількості як покрито- так і голонасінних рослин [3]. Амінокислотний склад дегідринів характеризується високим вмістом заряджених і полярних залишків, що сприяє виконанню дегідринами специфічних функцій, зокрема попередженню ними коагуляції макромолекул за умов зневоднення клітини. Різницею в накопиченні дегідринів часто пояснюється різна стійкість рослин до низької температури і посухи [4]. Ці білки накопичуються також у відповідь на сольовий і осмотичний стрес [5].

Важливу роль відіграють білки-дегідрини і у рослинах кукурудзи (*Zea mays* L.) здійснюються чисельні дослідження функціонування цих генів за дії стресових чинників. Експресія гена *Dhn1* кукурудзи, що кодує відповідний білок-дегідрин, значно зростає під час дії посухи. Дослідженнями Vadicean et al. [6] показано, що у посухотолерантних генотипів рівень експресії цього гена під час дії зневоднення значно вищий у порівнянні з посухочутливими генотипами.

Нещодавно дослідженнями було ідентифіковано і згодом охарактеризовано ген дегідрину кукурудзи *ZmDHN13* [7]. Показано, що *ZmDHN13* експресується конститутивно, але його експресія значно змінюється за осмотичного стресу, низьких температур, окислювального стресу та обробки абсцизовою кислотою (АБК). Відмінності (або мутації) в послідовностях ДНК таких генів, як *Dhn1* та *ZmDHN13* можуть значною мірою зумовлювати збільшення або зменшення експресії генів дегідринів та функціональну активність відповідних білків.

Наявність молекулярних маркерів та їхнє використання протягом останніх кількох десятиліть відіграє важливу роль у розвитку сільськогосподарства. Маркер-опосередкований добір MAS (marker assisted selection) значно сприяє продуктивності посівів кукурудзи завдяки стійкості та якості її рослин у багатьох країнах світу і є зна-

чним потенціалом підвищення ефективності звичайних методів селекції [8; 9]. Таке використання молекулярних маркерів до генів *Dhn1* та *ZmDHN13* в селекційних програмах сприятиме створенню більш стійких до абіотичних стресових чинників генотипів кукурудзи.

## 1. ОПИС МЕТОДУ

Основне завдання методу полягає у розробці технології ідентифікації алелів генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13* у сортів, ліній та гібридів кукурудзи за молекулярно-генетичними маркерами. Ідентифікація алелів цих генів проводиться шляхом аналізу спектрів ампліфікації ДНК за результатами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням спрямованих пар праймерів до певних ділянок генів *Dhn1* та *ZmDHN13* (табл. 1). Пара праймерів DHN1F та DHN1R використовується для ідентифікації алелів гена *Dhn1*, а пари праймерів ZmDHN13F та ZmDHN13R — алелів гена *ZmDHN13*.

Отримані продукти ампліфікації ДНК фракціонують електрофорезом у 10 % неденатуруючому поліакриламідному гелі. Визначають розмір продуктів ампліфікації ДНК та їхню відповідність певним алелям генів дегідринів. Для зручності ідентифікації алелів генів *Dhn1* та *ZmDHN13* слід застосовувати в якості позитивного контролю лінії, гібриди, сорти-носії відповідних алелів зазначених генів. У додатку 1 наведено ряд зразків кукурудзи (сортів, ліній та гібридів) різного географічного походження з ідентифікованими алелями генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13*.

## 2. ЕТАПИ АНАЛІЗУ

### 2.1. Виділення ДНК з індивідуальних рослин (проростків, листків)

Сегмент паростка, листка (чи будь-якого органу рослини) розміром 1 см гомогенізувати в 1,5 мл-пробірці типу «епендорф» (далі — епендорф) скляним товкачем до повної мацерації тканин та залити 0,5 мл лізуючого буфера такого складу: 0,02 М Na<sub>3</sub>EDTA, 0,1 М Трис-НСІ рН 8,0, 1,4 М NaCl, 2,0 % СТАВ, 100 мкг/мл протеїнази К. Лізат інкубувати 20 хв при 60 °С. Лізат обробити рівною кількіс-

тю суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), перемішати до утворення білої емульсії. Отриману суміш центрифугувати 5 хв при 14000 об./хв на мікрофузі «Eppendorf 5415», водну фазу перенести в інший епендорф. До водної фази додати 0,6 об'єму ізопропилового спирту і витримувати протягом 10 хв за кімнатної температури. Нуклеїнові кислоти (НК) осадити центрифугуванням при 14 000 об./хв протягом 1 хв на мікрофузі «Eppendorf 5415». Осад промити двічі 70 %-м етанолом, підсушити за кімнатної температури 15–20 хв і розчинити в 120 мкл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСІ рН 8,0, 1 мМ EDTA). Після повного розчинення НК провести РНКазну обробку: до розчину НК додати РНКазу А до кінцевої концентрації 1 мкг/мл і інкубувати 30 хв при 37 °С.

## 2.2. Спектрометричне визначення концентрації ДНК

Концентрацію виділеної ДНК визначити на спектрофотометрі NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer («Thermo scientific», США) згідно з інструкцією користувача обладнання.

## 2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

ПЛР проводять із використанням спрямованих праймерів до локусів *Dhn1* та *ZmDHN13* (табл. 1) у 0,6 мл- чи 0,2 мл-мікропробірці з застосуванням ампліфікаторів T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США) або PqStar 96x Universal Gradient («PEQLab», Великобританія). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містить: 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ Трис-НСІ, рН 8,4 (25 °С), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,03 % Tween-20, 0,2 мМ кожного dNTP, 0,25 мкМ праймера. Суміш об'ємом 25 мкл вміщувала 40–50 нг ДНК і 1 од. Таq-полімерази. У кожену пробірку, якщо потрібно, нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Температурний режим ампліфікації такий: початкова денатурація — 5 хв при 95 °С; 40 циклів: денатурація — 20 с при 95 °С; відпалювання праймерів — 30 с при 58 °С; елонгація — 30 с при 72 °С, фінальна елонгація — 2 хв при 72 °С.

Для уникнення псевдопозитивних чи псевдонегативних результатів при застосуванні кожного праймера використовувати негативний контроль (замість ДНК у пробірку внести 5 мкл стерильної дистильованої води (К-)).

Таблиця 1

ПЛР-праймери для ідентифікації алелів генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13* у сортів, ліній та гібридів кукурудзи

Ген	Праймер	Послідовність праймера	Продукт ампліфікації, п. н.	Алель
<i>Dhn1</i>	DHN1F DHN1R	gcgagaagaaggcattatg ggaaactgtccctgtccctg	186	1
			190	2
			194	3
			196	4
			200	5
<i>ZmDhn13</i>	ZmDHN13F ZmDHN13R	cgcatagcattctctcc cgctcctggatctgtgc	82	1
			86	2

## 2.4. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації

Продукти ПЛР-ампліфікації фракціонувати в 10 % неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1xTBE-буфері (89,0 мМ Трис, 89,0 мМ борна кислота, 2,0 мМ Na<sub>3</sub>EDTA) за постійної напруги 450 В 1,5–2 години залежно від довжини фрагментів ампліфікації.

Для приготування одного гелю розміром 20x20 см завтовшки 0,75 мм слід змішати 12,5 мл розчину, що містить 29 % акриламід та 1 % метиленбісакриламід, 2,5 мл 10xTBE буфера, 20 мкл TEMED, 250 мкл 10 % розчину амонію персульфату.

Гель залити у форми згідно з інструкцією устаткування. Перед нанесенням на електрофорез 10–12 мкл реакційної суміші змішати з 6 мкл буфера для нанесення (0,25 % (w/v) ксиленцианола, 98 % (w/v) формаміду, 150 мМ трис-НСІ рН 7,6, 60 % гліцерину). Потім проби нанести у лунки поліакриламідного гелю. Провести електрофорез. Для визначення молекулярної маси використовувати стандарт 10 bp ladder («Dongsheng Biotech», Китай).

## 2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації

Поліакриламідні гелі пофарбувати сріблом відповідно до методики «Silver sequence TM DNA Sequencing System Technical Manual» («Promega», США): гель покласти на 5 хв у 10 % розчин етанолу, потім перенести у 1 % розчин HNO<sub>3</sub> на 3 хв, після чого кілька разів промити дистильованою водою. Витримати протягом 20 хв у 0,012 М AgNO<sub>3</sub> у темряві. Двічі промити дистильованою водою. Залити гелівідновлюючим розчином (0,28 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (безводний), 0,019 % формалін),

інкубувати, перемішуючи до появи забарвлення фрагментів ампліфікації. Двічі промити дистильованою водою і покласти у 10 % розчин оцтової кислоти на 2 хв. На завершення добре промити дистильованою водою до усунення запаху оцтової кислоти. Гель зберігати між двома прозорими поліетиленовими плівками.

## 2.6. Документування результатів

Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК та оцінки довжини продуктів ампліфікації одержувати за допомогою системи гель-документації і аналізу гелів згідно з інструкцією користувача обладнання.

## 3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Ідентифікацію алелів гену *Dhn1* виконують за результатами ПЛР-аналізу з застосуванням спрямованих праймерів DHN1F і DHN1R (табл. 1).

Використання цих праймерів дозволяє виявити п'ять різних алелів локусу *Dhn1*, що відрізняються за розміром ампліфікованого продукту: 186, 190, 194, 196 та 200 п.н. (рис. 1; табл. 2). Для більшої частини досліджених зразків (46,2 %) властива присутність алелю 196 п.н. Алель 190 п.н. виявлений у значно меншій кількості генотипів (20,5 %). Досить низкою була частота алелів 194 п.н. і 200 п.н. (12,9 і 10,6 % відповідно). Алель 186 п.н. є найрідкіснішим (6,8 %).

Ідентифікацію алелів гену *ZmDHN13* здійснюють з використанням праймерів *ZmDHN13F* і *ZmDHN13R* (табл. 1). Для точної ідентифікації алелів зазначеного гену слід використовувати дані з додатку 1 щодо характеристик сортів і ліній за локусом *ZmDHN13*. В результаті дослідження з використанням спрямованих праймерів можна виявити два алелі локусу *ZmDHN13* розміром 86 п.н. і 82 п.н. (рис. 2; табл. 2). Обидва алелі широко розповсюджені серед зразків кукурудзи різного географічного походження. Разом з тим в дослідженому наборі зразків частота алелю 86 п.н. становила 61,5 %, а алелю 82 п.н. — 38,5 %.

Використання молекулярно-генетичних маркерів до генів дегідринів у MAS, добір генотипів кукурудзи за певними алелями генів *Dhn1* та *ZmDHN13* сприятиме поліпшенню селекційних програм,

спрямованих на підвищення стійкості рослин кукурудзи до абіотичних стресових факторів, таких як посухостійкість, холодостійкість, а також сольовий та осмотичний стрес.

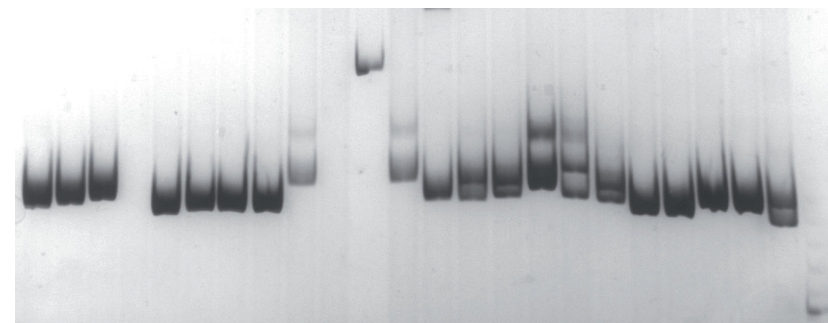


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК індивідуальних рослин зразків кукурудзи з використанням пари праймерів до гену *Dhn1*: TZEI 1 (1–3), TZEI 12 (4–7), Hays golden (8, 9), Golden Republic (10–12), Bowmans Cole Creek (13, 14), Chikaranga (15–17), Guerero 200 (18–20), M1 — маркер молекулярної маси 1 kb ladder, M2 — маркер молекулярної маси 10 bp ladder

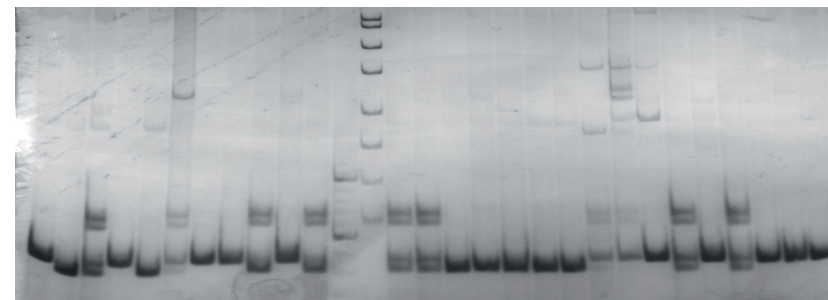


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК індивідуальних рослин зразків кукурудзи з використанням пари праймерів до гену *ZmDHN13*: Sgime Pulf Corn (1–6), Stewells Evergrin Corn (7–11), Kosara 191 (12, 13), Butter and Sugar Corn (14–18), Китай 1–13 (19–22), Guerero 200 (23, 24), Blue Corn (25–27); M1 — маркер молекулярної маси 10 bp DNA Ladder; M2 — маркер молекулярної маси pUC19/MspI

Таблиця 2

Результати ідентифікації зразків кукурудзи за алелями генів дегідринів *Dhn1* та *ZmDHN13*, п.н.

№	Зразок	Країна	<i>Dhn1</i>	<i>ZmDHN13</i>
1	Hays golden	США, Канзас	200	82
2	Pride of Saline	США, Канзас	196, 194+190	86, 82
3	Golden Republic	США, Канзас	196, 194, 190	86, 82
4	Bowmans Cole Creek	США, Канзас	200, 196, 194	82
5	Red Cob	Зімбабве	196	86
6	Chikaranga	Зімбабве	196, 194, 190	86, 82
7	Guegero 200	Мексика	196, 194	86, 82
8	TZEI 1	Нігерія	196	86
9	TZEI 12	Нігерія	190	86
10	TZEI 11	Нігерія	–	86
11	TZEI 8	Нігерія	–	86
12	W 83	США, Вісконсін	190	82
13	W 703	США, Вісконсін	196, 194	86
14	ПСТ 159/13	Україна (СГІ)	196	86
15	ПСТ 166/13	Україна (СГІ)	196	86, 82
16	ПСТ 169/13	Україна (СГІ)	186	86, 82
17	ПСТ 170/13	Україна (СГІ)	196	86
18	Kosara 191	Болгарія	–	86, 82
19	Rubrat 175	Болгарія	–	86, 82
20	Китай 1–13	Китай	–	86, 82
21	H Poll 34 CO 23	Мексика	–	86
22	Blue Corn	США	–	86
23	Butter and Sugar Corn	США	–	82
24	Сгїме Pulf Corn	США	–	86, 82
25	Stewells Evergrin Corn	США	–	86, 82
26	Rainbow Ornamental Corn	США	–	86, 82
27	TZEI 3	Нігерія	196	–
28	136	Буркіна Фасо	196+190	–
29	TZEI 13	Нігерія	190	–
30	ВК 64	Україна	196	–
31	Tcherni vrah 202	Болгарія	196, 194	–

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено систему ПЛР-тестування *Dhn1* та *ZmDHN13* алелів у генотипів кукурудзи.
2. Проведено ДНК-аналіз ліній, гібридів, сортів кукурудзи за локусами *Dhn1* та *ZmDHN13*.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Liu Y., Liang J. N., Sun L. P., Yang X. H., Li D. Q. Group 3 LEA protein, ZmLEA3, is involved in protection from low temperature stress. *Front. Plant Sci.* 2016. 7: 1011. doi:10.3389/fpls.2016.01011.
2. Close T. J., Kortt A. A., Chandler P. M. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol Biol.* 1989. 13. P. 95–108. doi:10.1007/BF00027338 PMID: 2562763
3. Riley A. C., Ashlock D. A., Graether S. P. Evolution of the modular, disordered stress proteins known as dehydrins. *PLoS ONE.* 2019. 14(2): e0211813. doi:10.1371/journal.pone.0211813.
4. Bao F., Du D., An Y., Yang W., Wang J., Cheng T., Zhang Q. Overexpression of Prunus mume dehydrin genes in tobacco enhances tolerance to cold and drought. *Front. Plant Sci.* 2017. 8: 151 doi: 10.3389/fpls.2017.00151
5. Liu H., Yu C., Li H., Ouyang B., Wang T., Zhang J., et al. Overexpression of ShDHN, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. *Plant Sci.* 2015. 231. P. 198–211. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.12.006.
6. Badicean D., Scholten S., Jacota A. Transcriptional profiling of *Zea mays* genotypes with different drought tolerances — new perspectives for gene expression markers selection. *Maydica.* 2011. Vol. 56. P. 61–69.
7. Liu Y., Wang L., Zhang T., Yang X., Li D. Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. *Scientific Reports.* 2017. Vol. 7. P. 1–10.
8. Prasanna B. M., Kevin Pixley, Marilyn L. Warburton, Chuan-Xiao Xie. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Mol Breeding.* 2010. Vol. 26. P. 339–356.
9. Ahmad F., Akram A., Farman K., Abbas T., Bibi A., Khalid S. and Waseem M. Molecular Markers and Marker Assisted Plant Breeding: Current Status and their Applications in Agricultural Development. *Journal of Environmental and Agricultural Sciences.* 2017. 11. P. 35–50.

*Науково-методичне видання*

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛІВ ГЕНІВ  
ДЕГІДРИНІВ *DHN1* ТА *ZMDHN13*  
У СОРТІВ, ЛІНІЙ ТА ГІБРИДІВ  
КУКУРУДЗИ**

Методичні рекомендації

Автори:

**Галасва М. В., Файт В. І.**

Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*

Редактор *В. Я. Крижанівський*

---

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 0,70.

Тираж 100 прим. Зам. № 106.

Видавництво і друкарня «Екологія»

65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 23/1

Тел.: (0482) 33-07-18, 37-14-25, 7-855-855

**e-mail: [astro\\_print@ukr.net](mailto:astro_print@ukr.net); [www.astroprint.ua](http://www.astroprint.ua); [www.stranichka.in.ua](http://www.stranichka.in.ua)**

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК No1873 від 20.07.2004 р.