

# SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы

С.И. Вакула<sup>1</sup>✉, О.А. Орловская<sup>1</sup>, Л.В. Хотылева<sup>1</sup>, А.В. Кильчевский<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Национальная академия наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Зерно кукурузы (*Zea mays* L.) – наиболее широко используемый в мире источник натурального крахмала, что обусловлено как возможностью получения крахмала с различным соотношением амилоза/амилопектин, так и высокой продуктивностью культуры. В качестве компонента функционального питания перспективна кукуруза с «нетрадиционным» составом зерна (восковидная, маслянистая, сахарная, opak и другие фенотипические варианты). К формированию восковидного эндосперма с высоким содержанием амилопектина приводят мутации гена *waxy*, нарушающие структуру и функцию фермента биосинтеза амилозы. Рецессивная природа мутаций гена *waxy* не позволяет проводить фенотипический отбор гетерозиготных носителей в гибридной популяции. Высокая частота и гетерогенная природа мутаций, нарушающих биосинтез амилозы, затрудняют однозначную идентификацию молекулярной природы возникших генетических изменений. Известно, что внутри нетранслируемых участков гена *waxy* присутствуют микросателлитные повторы. Задача настоящего исследования – оценить эффективность использования микросателлитных последовательностей локуса *waxy* для идентификации и маркирования генотипов восковидной кукурузы. Для ее решения было проанализировано содержание крахмала, короткоцепочечных растворимых углеводов, амилозы, амилопектина в зерне 33 образцов кукурузы. Идентифицированы группы образцов со сходным углеводным составом эндосперма, в том числе 13 высокоамилопектиновых образцов, носителей мутаций гена *waxy* (*wx*), и 20 образцов с фенотипической нормой признака (*Wx*). Молекулярно-генетический скрининг образцов коллекции включал анализ полиморфизма микросателлитных локусов *phi022*, *phi027*, *phi061*, ассоциированных с последовательностью гена *waxy*. Аллельный состав отдельных локусов и их сочетаний соотнесен с накоплением запасных углеводов в эндосперме зерна. Дифференцировать группы образцов кукурузы с диким *Wx* и мутантным фенотипом *wx* позволил только анализ сочетания аллелей локусов *phi022* и *phi027* либо комплекса всех трех маркеров. Таким образом, для маркер-ассоциированного отбора образцов кукурузы с высоким накоплением амилопектина в эндосперме могут представлять интерес не отдельные аллели локусов *phi022*, *phi027*, *phi061*, а их уникальные сочетания.

Ключевые слова: кукуруза; запасные углеводы; крахмал; амилопектин; амилоза; ген *waxy*; микросателлитные маркеры.

## SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm

S.I. Vakula<sup>1</sup>✉, O.A. Orlovskaya<sup>1</sup>, L.V. Khotyleva<sup>1</sup>, A.V. Kilchevsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Genetics and Cytology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> The National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

As a component of functional nutrition, maize cultivars with “non-traditional” kernel composition (waxy, oil-bearing, sugar, opaque, etc. phenotypic variants) are promising. Mutations in the *waxy* gene, which break down the structure and function of the enzyme for amylose biosynthesis, lead to a waxy (with a high content of amylopectin) endosperm formation. High variability of the *waxy* gene limits the use of microsatellite loci in marker associated selection of waxy maize genotypes. The increased frequency of gene rearrangements within the *waxy* locus facilitated the origination of many high-amylopectin corn lines carrying different SSR allelic variants. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of using *waxy* locus microsatellite sequences for identification and labeling of waxy maize genotypes. To this end, a complex of biochemical (calorimetry, bichromate method), molecular-genetic (SSR-PCR, capillary gel electrophoresis with fluorescent detection of fragments) and statistical (descriptive statistics, cluster analysis,  $\chi^2$ ) analysis methods was used. Plant material used were 33 samples of corn kernels including mutant forms with a high content of amylose, amylopectin, short-chain starches, were kindly provided by VIR genetic collection (Russian Federation) and Maize Genetics Cooperation Stock Center (USA). The contents of starch, short-chain soluble carbohydrates, amylose, amylopectin in the grain of 33 maize samples were evaluated. Compositionally similar (to endosperm carbohydrates content) groups of samples were identified. They include 13 high-amylopectin samples carriers of *waxy* (*wx*) gene mutations and 20 samples with wild-type character (*Wx*). Molecular genetic screening of the collection included an analysis of the polymorphism of the microsatellite loci *phi022*, *phi027*, *phi061* associated with the *waxy* gene sequence. Allelic composition of individual loci and their combinations were analyzed in relation to the accumulation of reserve carbohydrates in the kernel endosperm. Only the analysis of the *phi022/phi027* combination or all three

markers in the complex allows differentiating the wild *Wx* and mutant *wx* phenotypes of maize. It was shown that not the individual allelic polymorphisms of the *phi022*, *phi027*, *phi061* loci are efficient for the marker-associated selection of high-amylopectin maize, but their unique combinations.

Key words: maize; reserve carbohydrates; starch; amylopectin; amylose; *waxy* gene; microsatellite markers.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Вакула С.И., Орловская О.А., Хотылева Л.В., Кильчевский А.В. SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(6):640-647. DOI 10.18699/VJ18.405

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Vakula S.I., Orlovskaya O.A., Khotyleva L.V., Kilchevsky A.V. SSR loci potentially associated with high amylopectine content in maize kernel endosperm. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(6):640-647. DOI 10.18699/VJ18.405 (in Russian)

Крахмал является одним из основных компонентов рациона человека и кормов сельскохозяйственных животных (Pan, 2000). Важный источник пищевого крахмала – зерно кукурузы (*Zea mays* L.), что обусловлено высокими мировыми сборами культуры (<http://apps.fao.org>) и широким генетическим разнообразием процессов биосинтеза углеводов в эндосперме (Wilson et al., 2004).

В состав природного крахмала входят две структурные фракции: линейная амилоза ( $\alpha$ -(1→4)-глюкан) и разветвленный амилопектин ( $\alpha$ -(1→4; 1→6) глюкан) (Tan et al., 2009). Соотношение амилозы и амилопектина определяет химические свойства и востребованность вариантов крахмала для различных отраслей промышленности. В среднем крахмал кукурузы содержит 15–25 % амилозы и 75–86 % амилопектина. Высокоамилозный крахмал, получаемый из мутантных по гену *amylose extender* кукурузных зерен, устойчив к воздействию пищеварительных ферментов и служит перспективным источником диетических волокон (Nugent, 2005). Особая структура эндосперма, высокая пищевая ценность, низкие температуры желатинизации и клейстеризации запасного крахмала способствовали росту спроса на восковидную кукурузу (Lambert, 2001; Jobling, 2004). «Восковидный эндосperm» зерна кукурузы – моногенный признак, обусловленный рецессивной мутацией гена *waxy* (*wxwx*), кодирующего фермент гранул-связующую гликозил-трансферазу (ГСГТ) (Alexander, Creech, 1977; Li, 2003). Лocus *Wx* экспрессируется в эндосперме развивающихся зерен и пыльцевом зерне. Мутации, нарушающие функции ГСГТ, резко подавляют синтез амилозы и способствуют увеличению содержания амилопектина в крахмале до 99 %.

Помимо высокой хозяйственной ценности, растения, мутантные по локусу *wx*, – прекрасная модельная система для изучения механизмов генетической изменчивости, в частности перемещения мобильных элементов, генетического дрейфа, молекулярной эволюции и стабильности генома. Последовательность дикого варианта гена *waxy* расшифрована (Klosgen et al., 1986). Недавно опубликованы результаты секвенирования локуса у ряда местных сортов и культурных линий кукурузы (Tian et al., 2008; Fan et al., 2009; Bao et al., 2012). Последовательность гена (3718 п. н.) представлена 13 интронами (81–139 п. н.) и 14 экзонами (64–392 п. н.), размер транскрибируемого белка составляет 605 аминокислотных остатков (Klosgen et al., 1986). На молекулярном уровне описано более 50 мута-

ций *waxy* (Huang et al., 2010). Структурный анализ этих аллелей показал, что в возникновении спонтанных мутаций локуса большую роль играют инсерции и делеции, вызванные перемещениями мобильных элементов генома (Wessler, Vagaron, 1985).

Рецессивная природа мутации гена *waxy* не позволяет проводить фенотипический отбор гетерозиготных носителей в гибридной популяции. Высокая частота и гетерогенная природа мутаций, нарушающих биосинтез амилозы, затрудняет однозначную идентификацию молекулярной природы возникших генетических изменений. Согласно базе данных Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence et al., 2008), с геном *waxy* ассоциированы короткие tandemные повторы *phi022*, *phi027* и *phi061*. Эти внутригенные SSR-маркеры могут быть использованы для проведения маркер-ассоциированного отбора носителей мутаций *wx* (Yang, 2013). Однако в литературе мало данных о соответствии между размерными вариантами локусов *phi022*, *phi027*, *phi061* и ферментативной активностью ГСГТ (Dang, 2010). Таким образом, целью исследования являлась оценка эффективности использования микросателлитных последовательностей *waxy*-локуса для идентификации и маркирования генотипов восковидной кукурузы.

## Материалы и методы

Растительный материал – зерно 33 образцов кукурузы различного генетического и экологического происхождения. Из фондов ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), (г. Санкт-Петербург, Россия) были любезно предоставлены одиннадцать самоопыленных линий восковидной кукурузы российской селекции (АД42, АД174, АД37, АД187-8-1, АД25, АД27, АД96, АД117, АД17, АД1-4480, АД48-40); четыре североамериканских образца кукурузы с повышенным содержанием амилозы в эндосперме (Высокоамилозная (K-15542), Bear High amylose, With Carotin, Mo31ae). Десять образцов сахарной кукурузы (Country Gentlemen, 5010, Golden Bantam, Black Mexican, Golden Bantam-2, Early June, Burbank Early, Black Mexican-2, Howling Mob, Golden Evergreen) относятся к уникальной части коллекции ВИР, собранной экспедицией Н.И. Вавилова в 1921–1922 гг. (США и Канада). Восемь образцов кукурузы (517B *ae1*<sup>oh43</sup>, 517B *ae1*<sup>w64A</sup>, 909D *clsh1wx1*, 510B *Ae1*-5180:Mu1,

M541 aelwx1, 915A wx1^w64A, 915A wx1^oh43, 912A sh1^oh43), несущих мутации в генах биосинтеза запасных углеводов зерна, любезно предоставлены фондовым центром семян Maize Genetics Cooperation Stock Center (Иллинойс, США).

Концентрацию растворимых редуцирующих сахаров и гидролизного крахмала в эндосперме зерна кукурузы оценивали с использованием бихроматного метода по ГОСТ 5903-89 п.6.2. (2004). Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре в кюветах с толщиной слоя 1 см при пяти длинах волн: 630, 640, 650, 660 и 670 нм. Для каждой пробы (три биологические и три химические повторности на образец) измерения повторяли три раза. Экстракцию и гидролиз кукурузного крахмала проводили согласно методам, описанным в ГОСТ 10845-98 (2001). Содержание амилопектина в обезжиренной муке эндосперма зерна кукурузы измеряли калориметрически по реакции с йодом. Для извлечения крахмала из муки использовали метод, предложенный С.А. Knutson (1986). Для каждого образца муки анализ проводили в трехкратной биологической и четырехкратной химической повторностях. Содержание фракции амилопектина оценивали относительно стандарта (Amylopectin from maize, 10120-SIGMA) при длине световой волны 620 и 535 нм, что соответствует максимуму поглощения комплексов амилоза- $I_2$  и амилопектин- $I_2$  (Hovorkamp-Hermelink et al., 1988). Содержание амилозы в образце рассчитывали как 100 % (общее содержание двух фракций крахмала) минус содержание амилопектина.

Информация об использованных в работе микросателлитных маркерах *phi022*, *phi027* и *phi061* получена из базы данных Maize Genetics and Genomics Database (Lawrence et al., 2008). Состав реакционной смеси и условия проведения полимеразной цепной реакции описаны в статье (Yu et al., 2012). Продукты амплификации разделяли с использованием капиллярного гель-электрофореза на анализаторе ABI PRISM 3500. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения GeneMapper Software 5.

Статистическую обработку данных проводили в программах MS Excel, Statistica 10.0. В работе применены алгоритмы кластерного анализа по методу *k*-средних, непараметрического корреляционного анализа, описательной статистики количественных признаков, таблицы сопряженности с оценкой достоверности распределения по критерию  $\chi^2$ . Для оценки генетического разнообразия коллекции кукурузы использовали программное обеспечение GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006), реализующее следующие алгоритмы расчета:

$$F_x = (2N_{xx} + N_{xy}) / 2N, \quad (1)$$

где  $F_x$  – частота встречаемости аллеля  $x$  кодоминантного локуса;  $N_{xx}$  – количество гомозигот по аллелю  $x$ ,  $N_{xy}$  – количество гетерозигот, содержащих аллель  $x$ ;  $N$  – число образцов;

$$N_e = 1 / \sum F_i^2, \quad (2)$$

где  $N_e$  – эффективное число аллелей локуса;  $F_i$  – частота  $i$ -го аллеля локуса;

$$H_o = N_{xy} / N, \quad (3)$$

где  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность локуса;  $N_{xy}$  – количество гетерозигот,  $N$  – число образцов;

$$PIC = 1 - \sum (F_i)^2, \quad (4)$$

где  $PIC$  – индекс полиморфизма локуса;  $F_i$  – частота  $i$ -го аллеля локуса.

## Результаты и обсуждение

Комплекс калориметрических методов анализа позволил оценить содержание в эндосперме зерна кукурузы короткоцепочечных растворимых углеводов (КРУ), крахмала и его фракций (амилопектин и амилоза). Из 33 проанализированных генотипов минимальное накопление крахмала (39.60 %) отмечено в эндосперме сахарной кукурузы Howling Mob, максимальное (94.58 %) – в зернах АД27. Сахаристость эндосперма варьировала от 0.1 % (517B ael^w64A) до 30 % у образца Burbank Early. У некоторых образцов коллекции (АД17, АД1-4480, 915A wx1^w64A, 909) доля амилопектина в крахмале превышала 99 %. Наиболее высокая концентрация амилозы (более 25 %) установлена в эндосперме сортов Bear High amilose и With Carotin. Высокие коэффициенты вариации отмечены для признаков «содержание КРУ» ( $\bar{X} = 9.39$  %;  $V = 82.75$  %), «доля амилозы в крахмале» ( $\bar{X} = 12.62$  %;  $V = 74.01$  %). Общее содержание крахмала в эндосперме ( $\bar{X} = 67.55$  %;  $V = 22.84$  %) и концентрация в нем амилопектина ( $\bar{X} = 87.38$  %;  $V = 10.69$  %) характеризуются более узким диапазоном изменчивости в изученной коллекции кукурузы.

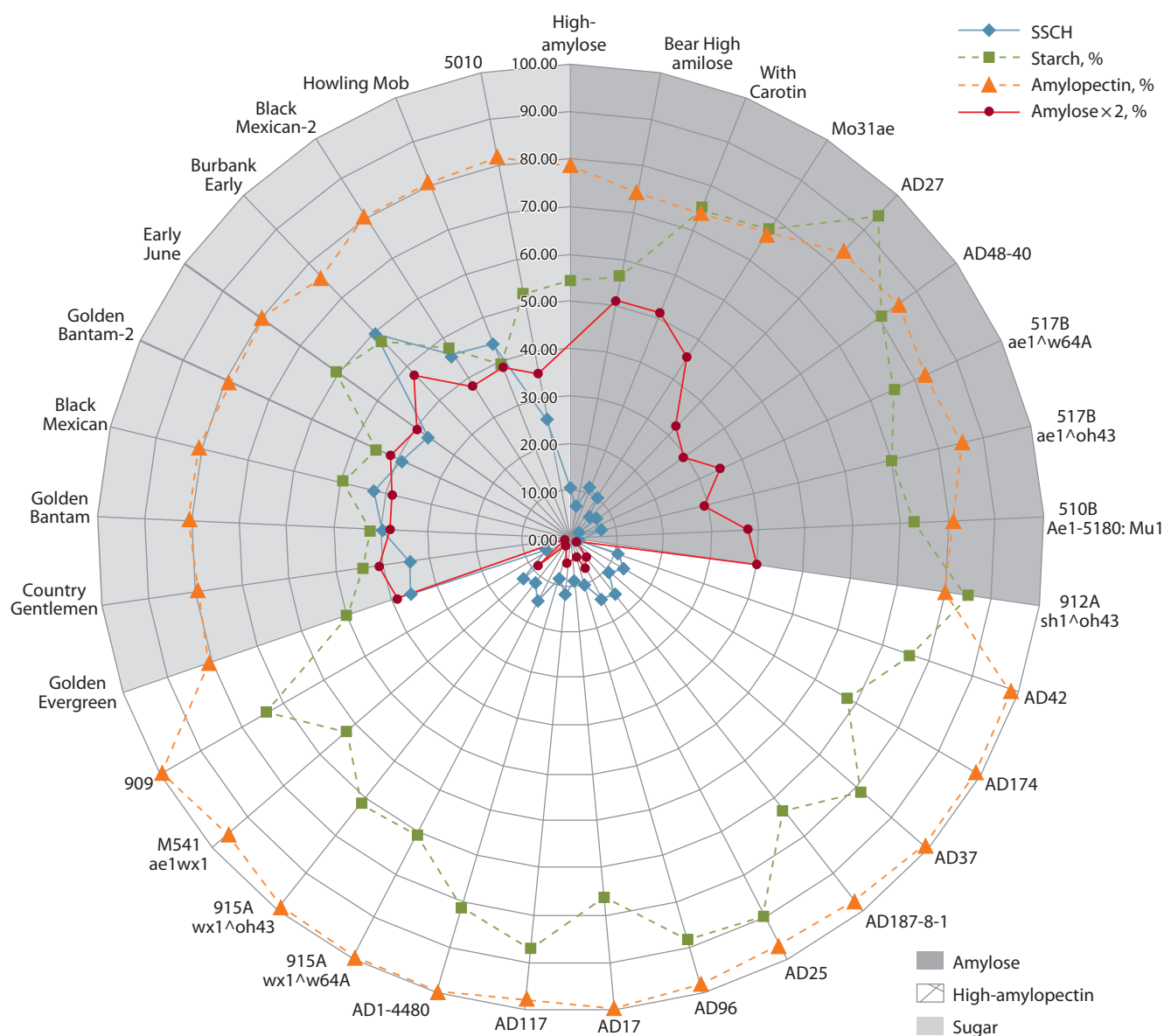
Для оценки связи между накоплением различных классов запасных углеводов в эндосперме кукурузы использовали непараметрический корреляционный анализ Спирмена. Обратная зависимость ( $r^s = -0.66$ ) между уровнем короткоцепочечных растворимых углеводов и накоплением крахмала в эндосперме зерна, вероятно, обусловлена перераспределением метаболитов (УДФ-глюкозы) в сторону синтеза фитогиликогена и декстранов у растений, мутантных по генам сахаросинтаз (образцы сахарной кукурузы). Концентрация амилопектина в эндосперме кукурузы положительно коррелирует с общим содержанием крахмала ( $r^s = 0.45$ ). Таким образом, нон-сенс/миссенс мутации гена *waxy*, приводящие к изменению размера и структуры зерен крахмала, не оказывают негативного влияния на уровень накопления запасных полисахаридов в зерне. Так, в работе (Cui et al., 2014) в эндосперме мутантов *waxy* средний диаметр гранул крахмала превышал показатели образцов попкорна, зубовидной и сладкой кукурузы. По данным X. Yu с коллегами (2015), мучнистая фракция эндосперма традиционных и восковидных образцов кукурузы содержит более крупные, сферические по форме гранулы крахмала, окруженные большим количеством алейроновых зерен; в стекловидных участках эндосперма таких сортов зерна крахмала приобретают полигональную форму. Сорта сахарной кукурузы, изученные авторами, отличались более низким средним содержанием крахмала, округлыми, небольшими крахмальными зернами, высокой долей амилозы и растворимых сахаров в составе эндосперма.

Образцы коллекции классифицированы согласно уровню накопления запасных углеводов в эндосперме семян с использованием кластерного анализа по методу *k*-средних. Выделено три *k*-кластера образцов, достоверно различающихся по среднему значению содержания КРУ, крахмала, амилозы и амилопектина в семенах (табл. 1).

**Table 1.** *k*-Means clustering of maize accessions varying in the accumulation of storage carbohydrates in seed endosperm (two iterations with maximization of distances between cluster centers)

Character, %	Mean in the <i>k</i> -cluster			Fisher's F-test	<i>p</i>
	1	2	3		
Short-chain soluble carbohydrates	3.37	5.71	20.19	112.38	$1.2 \cdot 10^{-14}$
Starch	74.23	76.77	48.86	29.42	$8.5 \cdot 10^{-8}$
Amylopectin	80.32	98.39	80.13	203.37	$3.6 \cdot 10^{-18}$
Amylose	19.68	1.61	19.87	203.37	$3.6 \cdot 10^{-18}$

*k*-Clusters: 1, amylose; 2, high-amylopectin; 3, sugar.

**Fig. 1.** Storage protein contents in maize endosperm. SSCH, short-chain soluble carbohydrates.

Первый *k*-кластер (на рис. 1 – сектор между образцами высокоамилозная – 912A *sh1*<sup>oh43</sup>, далее – Амилозный) объединяет 10 образцов, накапливающих низкие уровни КРУ, более 55 % запасного крахмала, с концентрацией в нем амилозы не менее 14.5 %. Согласно данным, представ-

ленным ВИР и Maize Genetics Cooperation Stock Center, образцы этого кластера несут мутации в генах семейства *amylose extender* (*ae*). Известно, что содержание амилозы у линий кукурузы с мутантным аллелем *ae* может достигать 50 % и более (Bear et al., 1958). Однако, по нашим данным,



**Table 2.** Polymorphism indices in SSR loci of the *Waxy* gene

Locus	$N_a$	$F$	$N_e$	$H_o$	$PIC$
<i>phi022</i>	<i>phi022</i> <sub>134</sub>	0.91	1.2	0.06	0.17
	<i>phi022</i> <sub>140</sub>	0.09			
<i>phi027</i>	<i>phi027</i> <sub>148</sub>	0.27	2.95	0.27	0.66
	<i>phi027</i> <sub>153</sub>	0.38			
	<i>phi027</i> <sub>163</sub>	0.35			
<i>phi061</i>	<i>phi061</i> <sub>86</sub>	0.27	1.66	0.24	0.40
	<i>phi061</i> <sub>94</sub>	0.73			

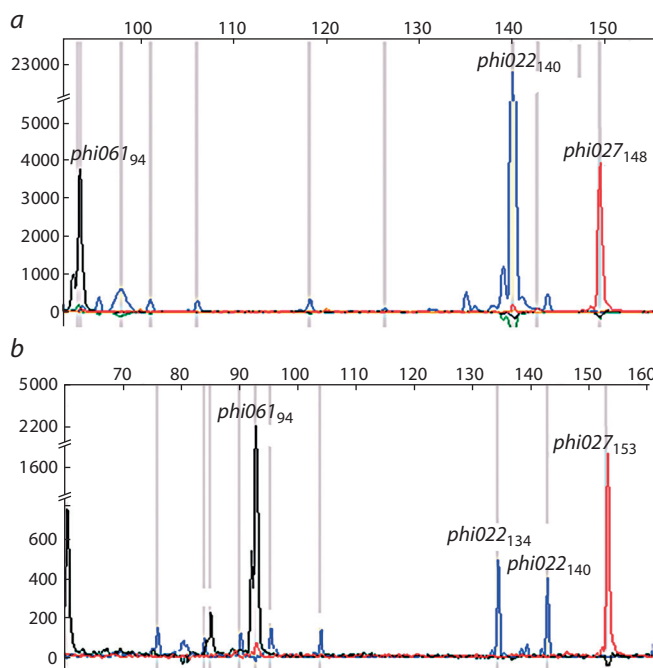
Notes.  $N_a$ , detected alleles;  $F$ , allele frequency;  $N_e$ , effective number of alleles in the locus,  $H_o$ , observed heterozygosity;  $PIC$ , polymorphic information content.

содержание амилозы в образцах кукурузы этого кластера не превышает 25.6 %. Вероятно, оценка содержания амилозы на основании калориметрии продуктов аффинного связывания компонентов крахмала с йодом, использованная нами, дает заниженные результаты, что показано в работе (Wang et al., 1993). Кроме того, эти генотипы могут содержать мутации и других генов биосинтеза крахмала, что также оказывает влияние на эффект гена *ae*.

Тринадцать образцов второго кластера (на рис. 1 – сектор АД-42 – 909, далее – Высокоамилопектиновый) относятся к высококрахмалистым, высокоамилопектиновым образцам с низким накоплением КРУ в эндосперме. В состав этого кластера вошли образцы с нарушением функций гена *waxy* (участвующего в синтезе амилозы фермента ГСГТ). Образец M541 *aelwx1*, отнесенный алгоритмом *k*-средних к образцам с высоким содержанием амилопектина, несет мутации двух ключевых генов биосинтеза крахмала (*waxy* и *amylose extender*, данные приведены, согласно Maize Genetics and Genomics Database). Известно, что эффекты генов *waxy* и *amylose extender* комплементарны. По сравнению с восковидной кукурузой, крахмал *aelwx* содержит более длинные полигликановые цепи и по физическим свойствам близок к фракции амилопектина растений, мутантных по гену *ae*.

Третий кластер – десять образцов сахарной кукурузы с высоким содержанием КРУ, с долей крахмала в эндосперме менее 55 % (на рис. 1 – сектор Golden Evergreen – 5010, далее – Сахарный). Кластер сахарной кукурузы, вероятно, сформирован образцами, несущими дефектные варианты генов, кодирующих ферменты биосинтеза амилопектина – изоамилазу (гены *sugary kernel*, *su* и *sugary-enhancer1*, *se1*), сахаросинтазу (*shrunk1*, *sh1*) или ADP-ATP (*brittle endosperm1*, *bt1*).

Расстояние между центрами конечных *k*-кластеров составило 1.85 евклидовых единиц (ЕЕ) для пары Амилозный – Сахарный, 1.90 ЕЕ – для пары Высокоамилопектиновый – Сахарный и 3.60 ЕЕ – для пары Амилозный – Высокоамилопектиновый. При этом среднее расстояние между образцами, принадлежащими одному кластеру, составило 0.26–0.44 ЕЕ, а максимальное не превышало 0.73 ЕЕ (между образцом Bear High amylose и конечным центром кластера Амилозный). Таким образом, получен-

**Fig. 2.** Electrophoretic analysis of samples: (a) AD96 (high-amylopectin *k*-cluster), (b) 517B *ae1*<sup>oh43</sup> (amylose *k*-cluster).

ное решение для классификации образцов кукурузы по уровню накопления запасных полисахаридов в зерне является оптимальным. Образцы кукурузы, отнесенные к Высокоамилопектиновому кластеру, были использованы как экспериментальная выборка для анализа частот встречаемости SSR-маркеров гена *waxy*. В качестве контроля были использованы образцы кластеров Амилозный и Сахарный.

В настоящее время известно более 40–50 мутантных вариантов локуса *waxy*, часть из которых фенотипически нестабильна и обусловлена встраиванием в последовательность гена мобильных элементов (например, система *Activator-Dissociation* и др.) (Huang et al., 2010). Исходный аллельный вариант гена до сих пор не известен. Наиболее вероятное место происхождения восковидной кукурузы (данные морфологии, кариотипа, анализа изоферментов и ДНК-маркеров) – китайский регион Yunnan-Guangxi (Fan et al., 2009), а предковая форма – неглютинозные сорта интродуцированной в Китае около 500 лет назад американской кукурузы (Liu et al., 2005; Hao et al., 2015). На основании данных RAPD-, SSR- и SNP-анализа генетическое разнообразие местных сортов и инбредных линий восковидной кукурузы оценивается как существенное, подтверждены генетические различия восковидных и традиционных сортов кукурузы (Zheng et al., 2013; Hao et al., 2015).

По данным Maize Genetics and Genomics Database, в промоторной и кодирующей областях гена *waxy* (Klosgen et al., 1986) расположены три микросателлитных повтора: *phi022*, *phi027*, *phi061*. Проведена оценка генетического разнообразия 33 образцов кукурузы, выявляемого с использованием данных трех SSR-маркеров (табл. 2, рис. 2). В исследуемой коллекции локусы *phi022* и *phi061*

представлены в двух аллельных вариантах: *phi022*<sub>134</sub> и *phi022*<sub>140</sub> (ампликоны длиной 134 и 140 п. н.), *phi061*<sub>86</sub> и *phi061*<sub>94</sub> (ампликоны длиной 86 и 94 п. н.). Для маркера *phi027* отмечено три аллеля: *phi027*<sub>148</sub>, *phi027*<sub>153</sub>, *phi027*<sub>163</sub> (ампликоны длиной 148, 153, 163 п. н. соответственно). Для локуса *phi027* отмечены самые высокие значения показателей «эффективное число аллелей» ( $N_e$ ), «наблюдаемая гетерозиготность» ( $H_o$ ), «индекс полиморфизма» ( $PIC$ ) (см. табл. 2). В локусе *phi022* ген *waxy* наименее изменчив, частота минорного аллеля *phi022*<sub>140</sub> составила всего 9 %, а наблюдаемая гетерозиготность маркера – 0.06. В среднем по трем SSR-маркерам эффективное число аллелей составило  $1.94 \pm 0.47$ , наблюдаемая гетерозиготность –  $0.19 \pm 0.01$ , индекс полиморфизма –  $0.41 \pm 0.04$ . Согласно (Botstein et al., 1980), такие показатели соответствуют среднему уровню генетического разнообразия выборки.

Для оценки ассоциации аллельных вариантов маркеров *phi022*, *phi027*, *phi061* с показателями биохимического состава зерна использовали двухходовые таблицы сопряженности с оценкой достоверности различия распределения аллелей в группах образцов по критерию  $\chi^2$  Пирсона. В анализ включили: частоты встречаемости индивидуальных аллелей SSR-локусов, сочетания двух аллелей одного локуса, сочетания аллелей двух-трех SSR-локусов.

Однозначно дифференцировать носителей мутантного варианта гена *waxy* на основании анализа частот встречаемости отдельных аллелей *phi022* и *phi061*, *phi027*, а также их гомо/гетерозиготного состояния в локусе не представляется возможным (табл. 3). Высокие значения вероятности формирования фенотипа *waxy* (*wx* – восковая кукуруза) при наличии определенного SSR-аллеля получены для локуса *phi061* ( $\chi^2 = 5.39$ ;  $p = 0.02$ ). Для локусов *phi022* и *phi027* статистическая достоверность рассматриваемой гипотезы (ассоциация признак-маркер) низка. Рассмотрение частот аллелей в экспериментальной и контрольной группе показало, что у образцов восковидной кукурузы чаще встречаются варианты *phi022*<sub>140</sub>, *phi061*<sub>94</sub>, реже – *phi022*<sub>134</sub>, *phi061*<sub>86</sub> (см. табл. 3). Не отмечено также значимых ассоциаций между гомо/гетерозиготным состоянием локуса и формированием восковидного эндосперма. У *wx*-мутантов относительно чаще встречались носители аллельных сочетаний *phi022*<sub>140</sub>*phi022*<sub>140</sub> и *phi061*<sub>94</sub>*phi061*<sub>94</sub> (см. табл. 3), реже гомозиготы – *phi061*<sub>86</sub>*phi061*<sub>86</sub>.

Проведен анализ встречаемости сочетаний аллельных вариантов двух (рис. 3, а–в) и трех SSR-локусов (см. рис. 3, г) у форм восковидной кукурузы и образцов с диким вариантом гена. Согласно критерию  $\chi^2$ , распределение анализируемых комбинаций аллелей в двух фенотипических группах значимо различается ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ). Из трех генотипических вариантов по локусам *phi022* и *phi061* сочетание аллелей *phi022*<sub>134</sub>*phi061*<sub>94</sub> наиболее широко распространенное. Образцы с более редкими сочетаниями аллелей в группах восковидной и невосковидной кукурузы распределены неравномерно, так, вариант *phi022*<sub>140</sub>*phi061*<sub>94</sub> чаще отмечался у форм с восковидным фенотипом зерна, комбинация *phi022*<sub>134</sub>*phi061*<sub>86</sub> – у *Wx*-образцов. В группе образцов восковидной куку-

**Table 3.** Frequencies (%) of allelic variants of SSR loci in groups of maize accessions with different levels of amylopectin accumulation in the endosperm

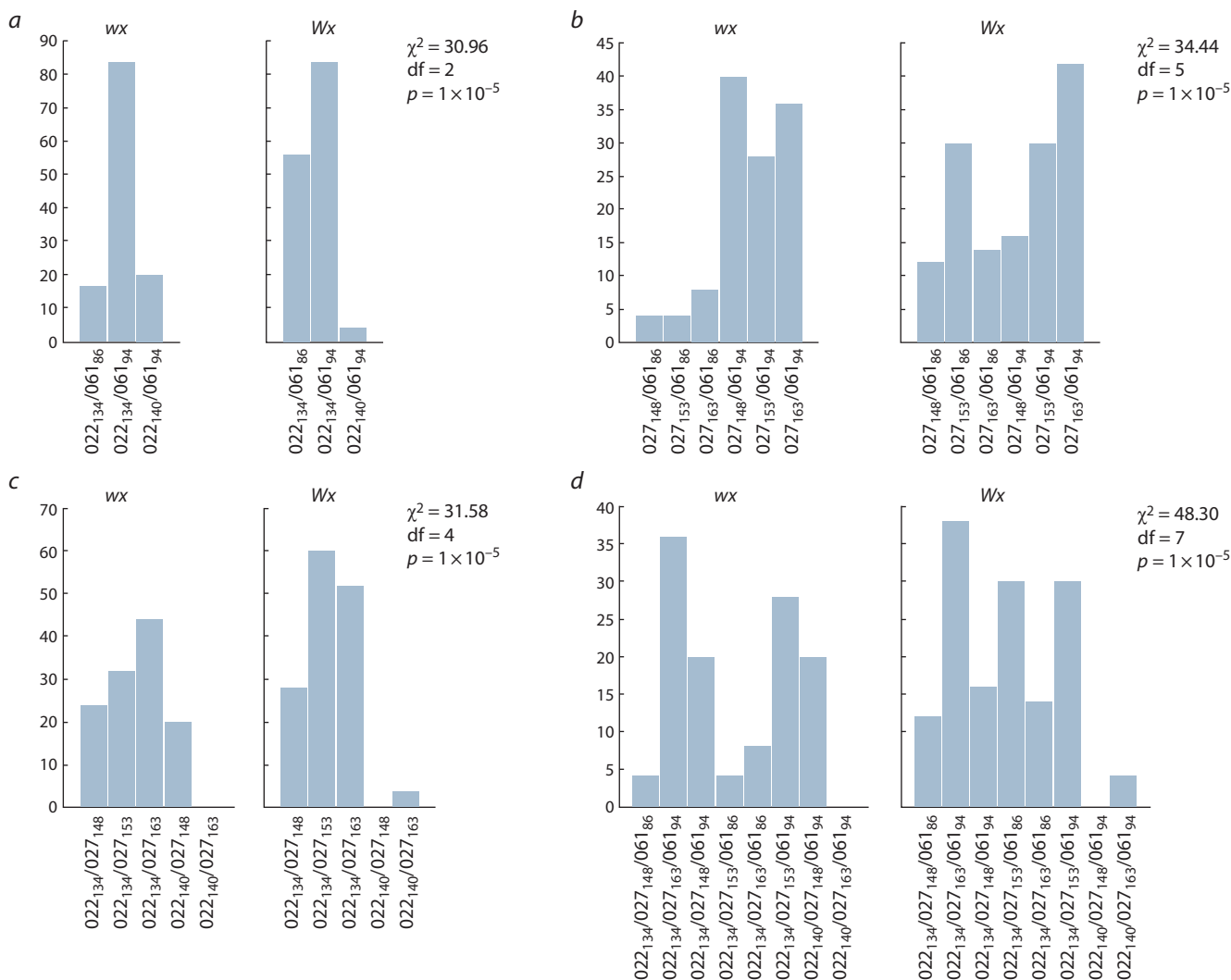
Allele	Phenotypic variant		$\chi^2$	$p$
	<i>Wx</i>	<i>wx</i>		
<i>phi022</i> <sub>134</sub>	53.0	37.9	3.82	0.05
<i>phi022</i> <sub>140</sub>	1.5	7.6		
<i>phi027</i> <sub>148</sub>	10.6	16.7	2.86	0.24
<i>phi027</i> <sub>153</sub>	21.2	16.7		
<i>phi027</i> <sub>163</sub>	22.7	12.1		
<i>phi061</i> <sub>86</sub>	21.21	6.06	5.39	0.02
<i>phi061</i> <sub>94</sub>	33.3	39.4		
<i>phi022</i> <sub>134</sub> <i>phi022</i> <sub>134</sub>	51.52	36.36	2.61	0.27
<i>phi022</i> <sub>140</sub> <i>phi022</i> <sub>140</sub>	0.00	6.06		
<i>phi022</i> <sub>134</sub> <i>phi022</i> <sub>140</sub>	3.03	3.03		
<i>phi027</i> <sub>148</sub> <i>phi027</i> <sub>152</sub>	3.03	3.03	4.09	0.39
<i>phi027</i> <sub>153</sub> <i>phi027</i> <sub>153</sub>	12.12	15.15		
<i>phi027</i> <sub>148</sub> <i>phi027</i> <sub>148</sub>	9.09	15.15		
<i>phi027</i> <sub>163</sub> <i>phi027</i> <sub>163</sub>	12.12	9.09		
<i>phi027</i> <sub>153</sub> <i>phi027</i> <sub>163</sub>	18.18	3.03		
<i>phi061</i> <sub>86</sub> <i>phi061</i> <sub>86</sub>	12.12	3.03	4.36	0.11
<i>phi061</i> <sub>94</sub> <i>phi061</i> <sub>94</sub>	24.24	36.36		
<i>phi061</i> <sub>86</sub> <i>phi061</i> <sub>94</sub>	18.18	6.06		

Designations: *Wx*, samples of the amylose and sugar clusters; *wx*, samples of the high-amylopectin cluster.

рузы отмечено также накопление сочетания аллелей *phi027*<sub>148</sub>*phi061*<sub>94</sub> и относительное снижение частоты встречаемости варианта *phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>86</sub>.

Наиболее интересные результаты получены при анализе комбинаций аллелей локусов *phi022* и *phi027* и комплекса всех трех SSR-маркеров. Комбинация *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>163</sub> характерна только для образца амилозной кукурузы 517B ae1<sup>oh43</sup>. Сочетание аллелей *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>148</sub> отмечено только у образцов восковидной кукурузы (в гомозиготе у номеров 909D c1sh1wx1, АД96; в гетерозиготе – у АД117).

Самое распространенное в коллекции сочетание трех SSR-локусов – вариант *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>94</sub>. Однако существенных различий частот встречаемости этой комбинации аллелей в группах с контрастным содержанием амилопектина в крахмале не выявлено. Например, этот генотип отмечен у образцов восковидной кукурузы 915A wx1<sup>oh43</sup>, АД174, АД37, в гетерозиготе у образца АД42. Выявлены и уникальные для групп сочетания аллелей: *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>163</sub>*phi061*<sub>94</sub> (образец амилозной кукурузы 517B ae1<sup>oh43</sup>) и *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>148</sub>*phi061*<sub>94</sub> (образцы восковидной кукурузы 909D c1sh1wx1, АД96 и АД117). Кроме того, отмечены сочетания аллелей, с разной вероятностью встречающиеся в группах с диким и мутантным вариантами гена *waxy*. Так, варианты *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>86</sub> и *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>163</sub>*phi061*<sub>86</sub>



**Fig. 3.** Categorized graphs of the prevalence of alleles *phi022*, *phi027*, and *phi061* in groups of samples differing in amylopectin content: (a) *phi022* and *phi061*; (b) *phi027* and *phi061*; (c) *phi022* and *phi027*; (d) *phi022*, *phi027*, and *phi061*.

широко распространены среди образцов сахарной кукурузы, однако были отмечены только у двух образцов восковидной кукурузы (АД42 и АД17).

### Закключение

Отсутствие информации о характере и причине мутации гена *waxy* использование внутригенных микросателлитных локусов – ценный инструмент для маркер-ассоциированной селекции восковидной кукурузы. В частности, L. Yang с коллегами (2013) использовали маркер *phi027* для пирамидирования генов *waxy* и *opaque-16*. По нашим данным, для маркер-ассоциированного отбора образцов восковидной кукурузы больший интерес представляют не отдельные аллели анализируемых SSR-локусов, а ассоциированные с целевым признаком комбинации аллелей.

На основании биохимического анализа в коллекции 33 образцов кукурузы были выделены две экспериментальные группы, контрастные по уровню накопления амило-

пектина в эндосперме: *Wx* – дикий тип, соответствующий менее 85 % амилопектина от общего содержания крахмала в эндосперме, и мутантные по гену *wx* высокоамилопектиновые формы. Для ассоциированных с последовательностью гена *waxy* локусов *phi022*, *phi027*, *phi061* проведен анализ частот встречаемости аллельных вариантов маркера, их гомо/гетерозиготного состояния, а также комбинаций аллелей в двух-трех локусах. Вероятность соответствия комбинации трех локусов фенотипу «восковидная кукуруза» составила от 5 % (у носителей сочетания *phi022*<sub>134</sub>*phi027*<sub>153</sub>*phi061*<sub>94</sub>) до 100 % (у носителей уникального для восковидной кукурузы сочетания аллелей *phi022*<sub>140</sub>*phi027*<sub>148</sub>*phi061*<sub>94</sub>).

### Acknowledgements

We are grateful to the staff of the Vavilov All-Russia Institute of Plant Genetic Resources (St.-Petersburg, Russia) and the Maize Genetics Cooperation Stock Center (Illinois, United States) for the kindly provided plant material.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Alexander D.E., Creech R.G. Breeding special and nutritional types. Corn and Corn Improvement. Ed. G.F. Sprague. Am. Soc. Agron, Madison, WI, 1977;363-390.
- Bao J.-D., Yao J.-Q., Zhu J.-Q., Hu W.-M., Cai D.-G., Li Y., Shu Q.-Y., Fan L.-J. Identification of glutinous maize landraces and inbred lines with altered transcription of *waxy* gene. Mol. Breed. 2012;30(4): 1707. DOI 10.1007/s11032-012-9754-3.
- Bear R.P., Vineyard M.L., MacMasters M.M., Deatherage W.L. Development of "amylomaize" – corn hybrids with high amylose starch: II. Results of breeding efforts. Agron. J. 1958;50(10):598-602. DOI 10.2134/agronj1958.00021962005000100010x.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 1980;32(3):314-331.
- Cui L., Dong Sh., Zhang J., Liu P. Starch granule size distribution and morphogenesis in maize (*Zea mays* L.) grains with different endosperm types. Aust. J. Crop Sci. 2014;8(11):1560-1565.
- Dang N.-Ch. Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by doubled haploid and marker assisted selection techniques, doctoral thesis. Zurich. 2010. DOI org10.3929/ethz-a-006192803.
- Fan L.J., Bao J.D., Wang Y., Yao J.Q., Gui Y., Hu W., Zhu J., Zeng M., Li Y., Xu Y. Post-domestication selection in the maize starch pathway. PLoS One. 2009;4(10):e7612. DOI 10.1371/journal.pone.0007612.
- Hao D., Zhang Z., Cheng Y., Chen G., Lu H., Mao Y., Shi M., Huang X., Zhou G., Xue L. Identification of genetic differentiation between *waxy* and common maize by SNP genotyping. PLoS One. 2015;10(11):e0142585. DOI 10.1371/journal.pone.0142585.
- Hoeverkamp-Hermelink J., Devries J., Adamse P., Jacobsen E., Witholt B., Feenstra W. Rapid estimation of the amylase amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. Potato Res. 1988;31:241-246.
- Huang B.-Q., Tian M.-L., Zhang J.-J., Huang Y.-B. *waxy* locus and its mutant types in maize *Zea mays* L. Agr. Sci. China. 2010;9(1):1-10. DOI 10.1016/S1671-2927(09)60061-4.
- Jobling S. Improving starch for food and industrial applications. Curr. Opin. Plant Biol. 2004;7(2):210-218. DOI 10.1016/j.pbi.2003.12.001.
- Klosgen R.B., Gierl A., Schwarz-Sommer Z., Saedler H. Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*. Mol. Gen. Genet. 1986; 203(2):237-244.
- Knutson C.A. A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. Cereal Chem. 1986;63:89-92.
- Lambert R.J. High-oil corn hybrids. Specialty Corns. Ed. A.R. Hallauer. FL: CRC Press, 2001;131-154.
- Lawrence C.J., Harper L.C., Schaeffer M.L., Sen T.Z., Seigfried T.E., Campbell D.A. MaizeGDB: the maize model organism database for basic, translational, and applied research. Int. J. Plant Genomics. 2008;496957. DOI 10.1155/2008/496957.
- Li W.C. Quality breeding. Maize Breeding in Southwestern Ecological Region. Eds. T.Z. Rong, W.C. Li, K.C. Yang, B. Zhang, S.K. Zhang, H.J. Tang, X.M. Fan. Beijing: China Agric. Press, 2003.
- Liu Y.-J., Huang Y.-B., Rong T.-Z., Tian M.-L., Yang J.-P. Comparative analysis of genetic diversity in landraces of waxy maize from Yunnan and Guizhou using SSR markers. Agr. Sci. China. 2005;4(9): 648-653.
- Nugent A.P. Health properties of resistant starch. Nutr. Bull. 2005; 30(1):27-54. DOI 10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x.
- Pan D. Starch synthesis in maize. Carbohydrate Reserves in Plants: Synthesis and Regulation. Eds. A.K. Gupta, N. Kaur. Amsterdam: Elsevier, 2000;26:125-146.
- Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol. Ecol. Notes. 2006;6(1):288-295. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- State Standard 10845-98. Interstate standard. Grain and Products of its Processing. Method for the Starch Determination. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov, 2001. (in Russian)
- State Standard 5903-89. Interstate standard. Methods for the Sugar Determination. Moscow: IPK Izdatel'stvo standartov, 2004. (in Russian)
- Tan H.-Z., Li Z.-G., Tan B. Starch noodles: history, classification, materials, processing, structure, nutrition, quality evaluating and improving. Food Res. Int. 2009;42(5):551-576. DOI 10.1016/j.foodres.2009.02.015.
- Tian M.L., Huang Y.B., Tan G.X., Liu Y.J., Rong T.Z. Sequence polymorphism of *waxy* genes in landraces of waxy maize from southwest China. Acta Agron. Sin. 2008;34(5):729-736. DOI 10.3724/SP.J.1006.2008.00729.
- Wang Y.-J., White P., Pollak L., Jane J. Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with *oh43* inbred line background. Cereal Chem. 1993;70(2):171-179.
- Wessler S., Vagarona R. Molecular basis of mutations at the *waxy* locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985;82(12):4177-4181.
- Wilson L.M., Whitt Sh.R., Ibáñez A.M., Rocheford T.R., Goodman M.M., Buckler E.S. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. Plant Cell. 2004;16(10):2719-2733. DOI 10.1105/tpc.104.025700.
- Yang L., Wang W., Yang W., Wang M. Marker-assisted selection for pyramiding the *waxy* and opaque-16 genes in maize using cross and backcross schemes. Mol. Breed. 2013;31(4):767-775. DOI 10.1007/s11032-012-9830-8.
- Yu R.H., Wang Y.L., Sun Y., Liu B. Analysis of genetic distance by SSR in waxy maize. Genet. Mol. Res. 2012;11(1):254-260. DOI http://dx.doi.org/10.4238/2012.February.3.5.
- Yu X., Yu H., Zhang J., Shao Sh., Xiong F., Wang Z. Endosperm structure and physicochemical properties of starches from normal, waxy, and super-sweet Maize. Int. J. Food Prop. 2015;18(12):2825-2839. DOI 10.1080/10942912.2015.1015732.
- Zheng H., Wang H., Yang H., Wu J., Shi B., Cai R. Genetic diversity and molecular evolution of Chinese waxy maize germplasm. PLoS One. 2013;8(6):e66606. pmid:23818949. DOI 10.1371/journal.pone.0066606.

## ORCID ID

S.I. Vakula orcid.org/0000-0002-2242-7107  
O.A. Orlovskaya orcid.org/0000-0002-1187-1317  
L.V. Khotyleva orcid.org/0000-0003-0295-5022  
A.V. Kilchevsky orcid.org/0000-0002-0175-9786