

Національна академія аграрних наук України
Державна установа Інститут зернових культур

Фундаментальні основи біотехнологічного
забезпечення селекційного процесу у
кукурудзи на основі використання
функціональних молекулярно-генетичних
маркерів
(науково-методичні рекомендації)

Дніпро
2025

Продукція за ПНД 14 «Біотехнологічні та молекулярно-генетичні методи поліпшення кількісних і якісних ознак рослин» («Біотехнологія і генетика в рослинництві»), завданням 14.00.01.02.Ф «Фундаментальні основи біотехнологічного забезпечення селекційного процесу у кукурудзи на основі використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів», № держреєстрації 0121U107829.

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

Рецензенти:

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

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

Фундаментальні основи біотехнологічного забезпечення селекційного процесу у кукурудзи на основі використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів (науково-методичні рекомендації). Дніпро: ДУ Інститут зернових культур НААН, 2025. 40 с. Виконавці: Денисюк К.В., Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Боденко Н.А. doi: 10.31867/2025.11.09.1-40/07.

Представлено фундаментальні аспекти застосування функціональних молекулярно-генетичних маркерів у селекції кукурудзи, зокрема при створенні вихідного матеріалу з підвищеним вмістом каротиноїдів, антоціанів, цукрів. Наведено специфіку молекулярно-генетичного аналізу рослинного матеріалу.

ЗМІСТ

	Стор.
ВСТУП	4
1. Функціональні молекулярно-генетичні маркери в селекції кукурудзи ...	5
2. Проведення ДНК-аналізу	14
2.1. Матеріал для виділення ДНК у кукурудзи	14
2.2. Процедура виділення ДНК у кукурудзи	16
2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції	17
2.4. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР	19
2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації	19
2.6. Документування результатів аналізу	20
2.7. Опрацювання результатів	20
3. Біотехнологічне забезпечення селекційного процесу у кукурудзи	21
3.1. Принцип маркер-асоційованої селекції у кукурудзи	21
3.2. Створення гомозиготних ліній кукурудзи з цінними ознаками з використанням ДНК-аналізу рослин вихідних популяцій	24
3.3. Детекція генотипів-носіїв сприятливих алелів цінних генів у кукурудзи	25
3.4. Створення подвоєно-гаплоїдних ліній у кукурудзи з використанням ДНК-аналізу	28
3.5. Інтрогресія сприятливих алелів цінних генів у кукурудзи	29
3.6. Пірамідкування генів у кукурудзи	31
ЗАКЛЮЧЕННЯ	33
Список використаних джерел	34
Додаток 1. Приготування реактивів для проведення ДНК-аналізу у кукурудзи	39

ВСТУП

Сучасна селекція кукурудзи дедалі активніше інтегрує досягнення молекулярної біотехнології для підвищення ефективності створення нових генотипів із заданими господарсько цінними ознаками. Одним із ключових інструментів у цьому напрямі є функціональні молекулярно-генетичні маркери – маркери, що базуються на знанні структури, локалізації та алельного поліморфізму генів, які безпосередньо контролюють цільові ознаки. Їх використання дозволяє значно прискорити селекційний процес завдяки ранній і точній ідентифікації бажаних алелів незалежно від умов навколишнього середовища чи стадії розвитку рослини.

Функціональні молекулярно-генетичні маркери дають змогу прогнозувати і контролювати прояв конкретних фенотипових характеристик шляхом прямого аналізу генетичних варіантів. Це особливо важливо для ознак, які є складними у фенотиповому оцінюванні, а також нестабільними у різних агроєкологічних умовах.

У селекції кукурудзи функціональні маркери вже знаходять практичне застосування у підвищенні вмісту β -каротину, антоціанів, цукрів тощо. Їхнє використання дозволяє здійснювати ефективний добір ліній, гібридів і популяцій, формувати вихідний матеріал з оптимальними генетичними характеристиками, а також супроводжувати селекційний процес на рівні геному. У науково-методичних рекомендаціях представлено фундаментальні аспекти застосування функціональних молекулярно-генетичних маркерів у селекції кукурудзи, зокрема при створенні вихідного матеріалу з підвищеним вмістом каротиноїдів, антоціанів, цукрів, а також специфіку молекулярно-генетичного аналізу рослинного матеріалу.

1. ФУНКЦІОНАЛЬНІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ В СЕЛЕКЦІЇ КУКУРУДЗИ

Функціональні молекулярно-генетичні маркери – це специфічні ділянки ДНК з відомою локалізацією в геномі, які безпосередньо пов'язані з генами, що контролюють господарсько- і селекційно цінні ознаки. Вони або є частиною самого функціонального гена, або знаходяться дуже близько до нього. На відміну від звичайних молекулярно-генетичних маркерів, які лише вказують на певне місце в геномі, функціональні маркери базуються на знанні структури та послідовності конкретного гена. За допомогою функціональних молекулярно-генетичних маркерів можна встановити наявність або відсутність певних алельних варіантів гена, які прямо впливають на ознаку. Такі маркери дозволяють швидко й ефективно відбирати генотипи з певними властивостями на будь-якому етапі розвитку рослини.

Функціональні молекулярно-генетичні маркери, які забезпечують біотехнологічний супровід селекційного процесу у кукурудзи, використовують як для аналізу вже наявного селекційного матеріалу кукурудзи, так і при створенні нового. Використання таких маркерів забезпечує проведення добору з урахуванням генотипових особливостей замість мінливих фенотипових, що дозволяє економити час і ресурси, оскільки відкриває можливість прогнозувати прояв цільової ознаки на будь-якому етапі розвитку рослини без очікування її фенотипового вираження.

Найбільш поширеними серед функціональних є SSR-маркери, проте у сучасній селекційній практиці застосовуються й інші типи молекулярно-генетичних маркерів, зокрема SNP-маркери. Як в Україні, так і у світі активно інтегруються в селекційний процес уже відомі маркери та ведеться систематичний пошук нових.

Прикладами відомих функціональних SSR-маркерів у кукурудзи є такі, що асоційовані з генами, які визначають вміст цінних для людини мікронутрієнтів у зерні: каротиноїдів, зокрема β -каротину, антоціанів, цукрів. Так, каротиноїди, приймаючи участь у забезпеченні важливих для рослин кукурудзи функцій

(фотосинтезі, фотозахисті, пігментації, синтезі фітогормонів, сигналізації), є також необхідними для людини як попередники вітаміну А та як харчові антиоксиданти (Sun et al., 2022). Особливу цінність має присутність β -каротину у зерні, оскільки з однієї його молекули в організмі людини і тварин утворюється дві молекули вітаміну А, тоді як з α -каротину – лише одна (LaPorte et al., 2024). Антоціани, захищаючи рослину від дії ультрафіолетового випромінювання, вільних радикалів та інших абіотичних і біотичних чинників, є важливими для людини і тварин через їхні антиоксидантні, протизапальні, противірусні, протипухлинні та нейропротекторні властивості (Mattioli et al., 2020). Цукрова кукурудза, на відміну від кормової, безпосередньо споживається людиною завдяки її приємному смаку через високий вміст природних цукрів. Вона також виступає джерелом вітамінів, антиоксидантів і харчових волокон, що сприяють енергозабезпеченню, зміцненню імунітету та покращенню травлення у людини (Mousavi et al., 2025).

На початковому етапі розробки нових функціональних молекулярно-генетичних маркерів у кукурудзи, як і у інших рослин, проводять ідентифікацію генів-кандидатів, потенційно залучених до контролю формування господарсько цінних ознак. Для цього використовуються результати широкогеномного асоціативного дослідження (GWAS, **G**enome-**W**ide **A**ssociation **S**tudy), картування локусів кількісних ознак (QTL, **Q**uantitative **T**rait **L**oci), мета-аналіз локусів кількісних ознак (meta-QTL) (Yang et al., 2025, Dong et al., 2025). Наступним кроком є детальне вивчення поліморфізму генів-кандидатів, зокрема аналіз варіацій нуклеотидних послідовностей і структурних перебудов. Отримані дані перевіряють шляхом встановлення асоціацій між виявленими алельними варіантами генів та цільовими фенотиповими проявами у контрольованих популяціях за стандартизованих умов вирощування. Такий підхід дозволяє не лише підтвердити зв'язок між поліморфізмом гена та проявом ознаки, а й створити надійні функціональні маркери для подальшого використання у маркер-асоційованій селекції (MAS).

Функціональні SSR-маркери каротиногенезу у кукурудзи. Функціональними маркерами каротиногенезу, найбільш використовуваними у селекційних

програмах з підвищення вмісту β -каротину у зерні кукурудзи, зокрема і лабораторією методів селекції та первинного насінництва Державної установи Інститут зернових культур Національної академії аграрних наук України (ДУ ІЗК НААН), є маркери генів ферментів лікопін- ϵ -циклази (*lcy ϵ*) та β -каротингідроксилази 1 (*crtRB1*) (Pora et al., 2025). Для накопичення високого рівня β -каротину у зерні кукурудзи важливою є присутність сприятливих алелів обох функціональних генів – *lcyE* і *crtRB1* (Babu et al., 2013, Zunjare et al., 2018).

Ген лікопін- ϵ -циклази знаходиться на хромосомі 8 у біні 8.05 (<https://www.maizegdb.org>). Фермент лікопін- ϵ -циклаза при біосинтезі каротиноїдів у рослин, зокрема кукурудзи, забезпечує асиметричну циклізацію лікопіну, що полягає в його перетворення на δ -каротин (ϵ -іонне кільце), який є попередником синтезу α -каротину, зеаксантину та лютеїну (α -гілка). Пригнічення цього ферменту сприяє симетричній циклізації лікопіну, тобто проходженню біосинтезу каротиноїдів за β -гілкою. За симетричної циклізації за дії ферменту лікопін- β -циклази (кодується геном *lcy β*) лікопін перетворюється на γ -каротин (β -іонне кільце), який здатен поетапно переходити у β -каротин, β -криптоксантин та зеаксантин (Stra et al., 2023, Chen et al., 2024). Тож, для підвищення вмісту саме β -каротину важливо, щоб лікопін здебільшого приймав участь у симетричній, а не асиметричній циклізації. Тобто перспективним є інгібування експресії гену ферменту лікопін- ϵ -циклази, який забезпечує перетворення лікопіну на α -каротин. При дослідженні гена лікопін- ϵ -циклази виявлено три поліморфізми, пов'язані з варіюванням вмісту β -каротину, які розглядаються як молекулярні маркери ефективності каротиногенезу: індел на 3'-кінці (маркер *lcy ϵ -3'INDL*), однонуклеотидна заміна всередині гена в екзоні 1 (маркер *lcy ϵ -SNP216*) та транспозоновий елемент на 5'-кінці (маркер *lcy ϵ -5'TE*). Також відомо про наявність однонуклеотидної заміни в межах цього гена в інтроні 4, яка визначається за допомогою маркера *lcy ϵ -SNP2238*, проте суттєво не впливає на накопичення β -каротину у зерні (Muthusamy et al., 2015a, Singh et al., 2021).

За маркером *lcy ϵ -3'INDL* ген *lcy ϵ* має два алеля, які на електрофореграмах реєструються як смуги 144+502 п.н. (сприятливий алель) та 399+502 п.н.

(несприятливий алель). За маркером *lcyε*-SNP216 також описано два можливих алельних стани: поява на електрофореграмах смуги розміром 395 п.н., що відповідає наявності в даному маркерному сайті нуклеотиду з азотистою основою тимін (Т, несприятливий алель); відсутність смуг на електрофореграмах, тобто, нуль-алель, що відповідає наявності в маркерному сайті нуклеотиду з азотистою основою гуанін (G, сприятливий алель). За маркером *lcyε*-5'TE ген *lcyε* може мати чотири алелі, які реєструються на електрофореграмах у вигляді смуг 250 п.н. (несприятливий алель), 250+380 п.н. (несприятливий алель), 650 п.н. (сприятливий алель) і 150+280 п.н. (сприятливий алель) (Harjes et al., 2008, Muthusamy et al., 2015a).

Утворений β-каротин у подальшому за дії ферменту β-каротингідроксилази 1, яка викликає його гідроксилювання, переходить у β-криптоксантин і зеаксантин, таким чином зменшуючи кількість β-каротину у зерні кукурудзи.

Ген β-каротингідроксилази 1 розташований на хромосомі 10 у біні 10.05 (<https://www.maizegdb.org>). Ген *crtRB1* кодує фермент β-каротингідроксилазу 1, яка каталізує перетворення β-каротину на β-криптоксантин. Мутації цього гена призводять до уповільнення розпаду β-каротину (Duo et al., 2021). Відомо про три поліморфні ділянки цього гена, які впливають на варіювання концентрації каротиноїдів і, зокрема, β-каротину у зерні і розглядаються як маркери каротиногенезу: ділянка на 3'-кінці, поліморфізм якої зумовлений дією транспозонового елемента (маркер *crtRB1*-3'TE), ділянка всередині гена (маркер *crtRB1*-InDel4) та ділянка на 5'-кінці, поліморфізм якої також зумовлений дією транспозонового елемента (маркер *crtRB1*-5'TE) (Yan et al., 2010, Muthusamy et al., 2015a). Поліморфізм гена *crtRB1* за маркером *crtRB1*-3'TE проявляється в появі трьох алелей, які на електрофореграмах формують смуги розміром у 543 п.н. (алель 1), 296 п.н. (алель 2) та 296+875 п.н. (алель 3). Алель 1 відомий як сприятливий для підвищеного вмісту β-каротину (Muthusamy et al., 2015, Sagare et al., 2015), у той час, як алелі 2 та 3 мають несприятливий ефект (Yan et al., 2010). Зазначається, що алель 1 за маркером *crtRB1*-3'TE здатен самостійно подвоїти вміст β-каротину у зерні кукурудзи незалежно від алельного стану маркерів гена *lcyε* та маркера *crtRB1*-5'TE (Babu et al., 2013, Sagare et al., 2015).

Роботи лабораторії методів селекції та первинного насінництва ДУ ІЗК НААН, спрямовані на створення висококаротинових генотипів кукурудзи, ґрунтуються на використанні поліморфізму генів *lcyε* і *crtRB1*. Для оцінки гена *lcyε* переважно застосовують маркери *lcyε*-3'INDL і *lcyε*-SNP216, а для гена *crtRB1* – *crtRB1*-3'TE. За маркером *lcyε*-3'INDL серед досліджених зразків селекційного матеріалу кукурудзи ДУ ІЗК НААН ідентифіковано два алельні варіанти гена *lcyε*: 144+502 п.н. (сприятливий алель) та 399+502 п.н. (несприятливий алель). За маркером *lcyε*-SNP216 також виявлено два алелі: 395 п.н., що відповідає наявності в SNP-сайті тиміну (несприятливий алель) та нуль-алель, що свідчить про присутність у даному сайті гуаніну (сприятливий алель). За маркером *crtRB1*-3'TE визначено три алельні варіанти: 543 п.н. (сприятливий алель), а також 296 п.н. та 296+875 п.н. (несприятливі алелі).

Функціональні SSR-маркери антоціаногенезу у кукурудзи. Біосинтез антоціанів у кукурудзи є складним процесом, в якому задіяно щонайменше 20 структурних (*Anthocyanin1* (*A1*), *Purple/red aleurone1* (*Pr1*), *Bronze1* (*Bz1*), *Bronze2* (*Bz2*), *Pericarp colour1* (*P1*) тощо) і понад 12 регуляторних (*Colour1* (*C1*), *Red1* (*R1*), *Purple plant1* (*Pl1*), *Booster1* (*B1*) тощо) генів (Hossain et al., 2019, Chatham, Juvik, 2021).

Основні регуляторні гени належать до двох родин транскрипційних факторів – bHLH та MYB, які взаємодіють між собою та регулюють синтез і накопичення антоціанів. Зокрема, *R1* та *B1* кодують білки родини bHLH, гомологічні білкам родини Мус, тоді як *C1* та *Pl1* належать до типу R2R3-MYB-транскрипційних факторів (Yonemaru et al., 2018, Pihu et al., 2025).

Антоціани можуть акумулюватися у різних вегетативних та генеративних органах кукурудзи: стеблі, корені, листках, обгортках качанів, качанах, волоті, пиляках, зерні. Найбільше значення для селекції харчового і кормового напрямів має накопичення антоціанів в зерні, що обумовлює його фіолетове, червоне або синє забарвлення. У зерні кукурудзи антоціани накопичуються в перикарпії, алеїроновому шарі або в обох структурах одночасно (Salinas-Moreno et al., 2025). Незважаючи на можливість візуального визначення забарвлення зерна, застосування функціональних молекулярно-генетичних маркерів забезпечує

точну ідентифікацію високоантоціанових генотипів на будь-якому етапі розвитку рослини, а також добір гомозиготних форм із бажаними алелями. У якості функціональних використовують маркери, асоційовані як зі структурними, так і з регуляторними генами.

Одним з ключових структурних генів, що бере участь у біосинтезі антоціанів в зерні кукурудзи, є *Anthocyanin1* (*A1*), який кодує фермент дигідрофлавонол-4-редуктазу (ДФР). Цей фермент каталізує перетворення дигідрокверцетину та дигідрокемпферолу у лейкоціанідин і лейкопеларгонідин – попередники основних антоціанів, ціанідину та пеларгонідину, відповідно (Chatham, Juvik, 2021, Sharma et al., 2024). Мутантний рецесивний алель *a1* (*anthocyaninless1*) призводить до втрати функції ферменту ДФР, що блокує біосинтез антоціанів (Sharma et al., 2025). Унаслідок цього ендосперм набуває жовтого або білого забарвлення, залежно від алельного стану гена *Yellow1* (*Y1*) (Yan et al., 2010, Sharma et al., 2024; Chhabra et al., 2019). Диференціювання алелів *A1* (дикого типу) та *a1* (мутантного типу) можливе за однонуклеотидним поліморфізмом у промотерній ділянці (G – дикий тип, T – мутантний тип) та за інделом у 4-му екзоні (7 п.н. / 712 п.н.). Для цього розроблено два CAPS-маркери: MGU-A1-1053 та MGU-A1-2840 (Sharma et al., 2024). Ген *A1* знаходиться на хромосомі 3 у біні 3.08 (<https://www.maizegdb.org>).

Ген *Pr1* кодує фермент флавоноїд-3'-гідроксилазу, що визначає співвідношення синтезованих антоціанів – ціанідину та пеларгонідину в алеїроні зерна. Функціональний алель *Pr1* забезпечує утворення ціанідину, що формує фіолетове або синє забарвлення зерна, тоді як нефункціональні рецесивні алелі *pr1/pr1* призводять до переважного синтезу пеларгонідину, що зумовлює червоне або рожеве забарвлення (Sharma et al., 2011, Chatham, Juvik, 2021). Ідентифіковано три нефункціональні алелі *pr1*: вставка ТА-повтору (24 нуклеотиди) у 5'-кінці, делеція 17 нуклеотидів поблизу ТАТА-боксу та вставка транспозона *Ds* у першому екзоні (Sharma et al. 2011, Chatham, Juvik, 2021). *Pr1* знаходиться на хромосомі 5 у біні 5.05 (<https://www.maizegdb.org>).

Ген *Bz2* кодує фермент глутатіон-S-трансферазу, яка транспортує антоціани у вакуолі та запобігає їх окисненню. Мутації в цьому гені

зумовлюють бронзове забарвлення зерна (Marrs et al., 1995). *Bz2* знаходиться на хромосомі 1 у біні 1.08 (<https://www.maizegdb.org>).

Гени *C1* і *R1* – ключові регуляторні гени антоціаногенезу, необхідні для активації біосинтетичного каскаду в алеїроновому шарі зерна у кукурудзи (Cone et al., 1986, Selinger, Chandler, 2001, Sharma et al., 2011). *C1* знаходиться на хромосомі 9 у біні 9.01, *R1* – на хромосомі 10 у біні 10.06 (<https://www.maizegdb.org>)

Ген *Pl1* – регуляторний ген, відповідальний за накопичення антоціанів у волоті, качанах та зерні (Yonemaru et al., 2018, Pilu et al., 2025). Відомі його домінантний та рецесивний алелі, які відрізняються за кодуючими ділянками (Anirban et al., 2023) і промотором (Cone et al., 1993). Ген *Pl1* локалізований на хромосомі 6 у біні 6.04 (<https://www.maizegdb.org>). Алельні варіанти *Pl1* успішно розрізняють з використанням SSR-маркера *pc009* (Lago et al., 2013).

B1 є регуляторним геном, який у поєднанні з *Pl1* визначає забарвлення надземних органів кукурудзи, зокрема алеїрону зерна. Залежно від комбінації з іншими генами (*A1*, *A2*, *Bz1*, *Bz2*, *C2*), можливі варіанти забарвлення зерна – від фіолетового до червоно-жовтого або бронзового (https://www.maizegdb.org/gene_center/gene/12065). Ідентифікацію алелів *B1* здійснюють з використанням SSR-маркерів *umc1776* (Lago et al., 2013) і *bnlg1064* (Lago et al., 2014). *B1* знаходиться на хромосомі 2 у біні 2.03 (<https://www.maizegdb.org>).

У лабораторії методів селекції та первинного насінництва ДУ ІЗК НААН селекція на високий вміст антоціанів у зерні кукурудзи здійснюється з урахуванням поліморфізму генів *Pl1* та *B1*. Поєднання домінантних гомозигот за цими генами визначає інтенсивне забарвлення зерна й рослини (Lago et al., 2014). Поліморфізм *Pl1* ідентифікують за SSR-маркером *pc009* (Nagy et al., 2009), а *B1* – за маркером *bnlg1064* (Lago et al., 2014).

Для *Pl1* за маркером *pc009* серед селекційного матеріалу ДУ ІЗК НААН виявлено такі алелі: 127 п.н. (у лінії з білим зерном і низьким вмістом антоціанів (*A188*)), 139 п.н. (у жовтозернової лінії з низьким вмістом антоціанів (*AiД121*)) і 112 п.н. (у генотипах з пурпуровим зерном і високим вмістом антоціанів (популяція Чорностеблова)). Для *B1* за маркером *bnlg1064* визначено три алельні

варіанти: 182 п.н. (у лінії з білим зерном і низьким вмістом антоціанів (A188)), 193 п.н. (у жовтозернової лінії з низьким вмістом антоціанів (AiД121)) і 185 п.н. (у генотипах з пурпуровим зерном і високим вмістом антоціанів (популяція Чорностеблова)).

Функціональні SSR-маркери цукристості у кукурудзи. У кукурудзи тип зерна з підвищеним вмістом цукрів (цукрова кукурудза) формується внаслідок одиничних або комбінованих мутацій у ключових генах, що беруть участь у метаболізмі вуглеводів, зокрема біосинтезі та накопиченні крохмалю і розчинних цукрів у зерні. Основними генами, які контролюють ознаку цукристості, є *Sugary1 (Su1)*, *Sugary2 (Su2)*, *Shrunken1 (Sh1)*, *Shrunken2 (Sh2)*, *Sugary enhancer1 (Se1)* (Zhang et al., 2020, Finegan et al., 2022, Wang et al., 2025).

Ген *Su1* кодує ізоамілазу 1 – дерозгалужувальний фермент, який бере участь у ремоделюванні структури амілопектину шляхом розщеплення надмірних розгалужень у його молекулі, забезпечуючи нормальне формування крохмальних гранул (Finegan et al., 2022). У разі втрати функції цього ферменту амілопектин стає аномально розгалуженим і водорозчинним. Мутації в *Su1* призводять до порушення співвідношення амілози та амілопектину, зменшення вмісту останнього, накопичення розчинного фітоглікогену замість крохмалю та підвищення рівня розчинних цукрів у зерні (James et al., 1995, Blennow et al., 2025). На сьогодні ідентифіковано 44 гаплотипи *Su1* (Chhabra et al., 2021). Вміст цукрів у зерні корелює з алельним станом *Su1*, який визначають за допомогою молекулярних маркерів *umc2061* та *bnlg1937* (Usman et al., 2024). *Su1* знаходиться на хромосомі 4 у біні 4.05 (<https://www.maizegdb.org>).

Ген *Su2* кодує фермент крохмальсинтазу II, яка бере участь у подовженні глюканових ланцюгів амілопектину. Мутанти *su2* демонструють підвищену частку коротких ланцюгів, зменшену середню довжину глюканів (Blennow et al., 2025), знижену в'язкість крохмалю, а також підвищений вміст редукуючих та розчинних цукрів (Wang et al., 2025). Відомі дві незалежні мутації *Su2* – *su2-2279* (транспозонна вставка в екзоні 3) і *su2-5178* (ретротранспозоноподібна вставка в екзоні 10) (Zhang et al., 2004). *Su2* знаходиться на хромосомі 6 у біні 6.04 (<https://www.maizegdb.org>).

Ген *Sh1* кодує фермент сахарозосинтазу, яка здійснює перетворення сахарози на глюкозу та фруктозу – основні субстрати для синтезу крохмалю в ендоспермі зерна. Мутації в *Sh1* призводять до зниження активності ферменту, що спричиняє зменшення синтезу крохмалю та підвищення рівня розчинних цукрів у зерні (Zhang et al., 2020). *Sh1* знаходиться на хромосомі 9 у біні 9.01 (<https://www.maizegdb.org>).

Ген *Sh2* кодує велику субодиницю АДФ-глюкозопірофосфорилази ендосперму – ферменту, що каталізує утворення АДФ-глюкози з глюкозо-1-фосфату та АТФ, яка в подальшому використовується для біосинтезу крохмалю. Мутація в *Sh2* призводить до втрати активності ферменту, що зумовлює значне зниження вмісту крохмалю в зерні та підвищення концентрації розчинних цукрів (Finegan et al., 2022). Виявлено 47 гаплотипів *Sh2*, а також три SNP-маркери, які дозволяють диференціювати дикий (*Sh2*) та мутантний (*sh2*) алелі (Chhabra et al., 2022). *Sh2* знаходиться на хромосомі 3 у біні 3.08 (<https://www.maizegdb.org>).

Функціональна роль гена *Se1* у метаболізмі крохмалю в ендоспермі кукурудзи остаточно не з'ясована, хоча він має високу цінність для комерційного вирощування цукрової кукурудзи. Ген *Se1* є рецесивним модифікатором *Su1*. Алель дикого типу локалізований у гені Zm00001d007657 на 2-й хромосомі. Видалення цього гена зумовлює виникнення мутантного фенотипу *se1*, що має плеiotропну регуляторну дію: одночасно впливає як на біосинтез, так і на деградацію крохмалю (Zhang et al., 2019). Комбінована дія мутацій *su1* і *se1* призводить до істотного підвищення вмісту розчинних цукрів, зокрема мальтози, та зниження крохмалю в зерні (Finegan et al., 2022). *Se1* знаходиться на хромосомі 2 у біні 2.09 (<https://www.maizegdb.org>).

У лабораторії методів селекції та первинного насінництва ДУ ІЗК НААН проводяться дослідження з вивчення поліморфізму гена *Sh1* у зразках кукурудзи з використанням SSR-маркера phi033. За цим маркером серед селекційного матеріалу кукурудзи ідентифіковано три алельні варіанти: 236 п.н., 236+310 п.н. та 264 п.н. Перші два алелі зустрічаються в генотипах цукрової кукурудзи з підвищеним вмістом цукрів, тоді як алель 264 п.н. є характерним для нецукрових (зернових) форм.

SNP-маркери, асоційовані з господарсько- і селекційно цінними ознаками у кукурудзи. У лабораторії методів селекції та первинного насінництва ДУ ІЗК НААН було проведено аналіз асоціацій між алельним станом SNP-маркерів панелі BDI-III та алельним станом гена *crtRB1* за молекулярним маркером *crtRB1-3'TE*. Встановлено алельний стан SNP-маркерів, який корелює зі сприятливим алельним варіантом гена *crtRB1* за молекулярним маркером *crtRB1-3'TE*. Алелі BDI-III-130A, BDI-III-15A, BDI-III-60C, BDI-III-61C, BDI-III-116G, BDI-III-128A, BDI-III-129A визначені як ті, що найчастіше зустрічаються у ліній-носіїв сприятливого алеля 543 п.н. гена *crtRB1* за маркером *crtRB1-3'TE*. Крім того, виявлено статистично значущі асоціації між SNP-маркерами панелі BDI-III та фенотиповим проявом стійкості до летючої сажки *Sporisorium reilianum* у генотипів кукурудзи. Алельні стани BDI-III-270C і BDI-III-292A ідентифіковані як характерні для стійких до ураження летючою сажкою генотипів, тоді як BDI-III-270A і BDI-III-292G – для нестійких. Виявлені поліморфізми SNP-маркерів у подальшому будуть верифіковані на ширшому наборі генотипів кукурудзи різного походження для підтвердження їхньої практичної придатності та застосування у маркер-асоційованій селекції.

2. ПРОВЕДЕННЯ ДНК-АНАЛІЗУ

2.1. Матеріал для виділення ДНК у кукурудзи

Підхід до вибору вихідного матеріалу для ДНК-аналізу у кукурудзи має бути раціональним і обґрунтованим. Він повинен забезпечувати мінімальні витрати часу й ресурсів, враховувати кількість та якість насіння, а також перспективи подальшого використання як насіння, так і проростків і рослин у селекційному процесі. У випадках, коли обмежена кількість насіння не дозволяє знищувати проростки, для аналізу використовують невеликі листкові фрагменти, що беруться без суттєвого пошкодження рослин, забезпечуючи їх подальший ріст і розвиток. Життєздатність матеріалу необхідно зберігати і у

випадках, коли планується його залучення до гібридизаційних програм або подальшої оцінки за комплексом господарсько цінних ознак. Найчастіше джерелом для виділення ДНК у кукурудзи слугують молоді органи рослини, які характеризуються високим вмістом інтактної ДНК, відсутністю значних домішок вторинних метаболітів. Матеріалом для ДНК-аналізу є:

А) *проростки*. Проростки отримують зі зрілих зерен кукурудзи, використовуючи чашки Петрі або рулонну культуру, в лабораторних умовах. Для отримання проростків у чашках Петрі зрілі зерна поміщають між двома шарами змоченого водою фільтрувального паперу. За потреби проводять додаткове змочування паперу. Важливо уникати надмірного зволоження і замокання зерен, оскільки це може призвести до припинення їх розвитку і загибелі проростків.

Для отримання проростків у рулонній культурі зрілі зерна кукурудзи викладають у ряд зародками вниз посередині змоченого фільтрувального паперу шириною 20 см. Зверху на зерна для їх фіксації кладуть смужку змоченого фільтрувального паперу шириною 4-5 см, після чого папір скручують у рулон. Рулон поміщають у склянку з водою так, щоб зерна не торкалися води. За потреби воду у склянку підливають.

Пророщування у чашках Петрі та в рулонній культурі проводять у термостаті за температури 26-28 °C у темряві. Зазвичай використовують дистильовану воду. На 5-7 добу отримані проростки можна використовувати для виділення ДНК.

Перевагами таких способів є можливість отримувати матеріал для ДНК-аналізу протягом всього року, без необхідності вирощування рослин у полі чи теплиці. Недоліком є те, що після взяття фрагменту проростка для виділення ДНК не можна отримати повноцінну дорослу рослину, оскільки при цьому пошкоджується пагін. Зазвичай пророщування у чашках Петрі і рулонній культурі використовують для ДНК-аналізу вже створеного селекційного матеріалу кукурудзи (наприклад, ліній), щоб встановити алельний стан генів, характерний для нього.

Б) *листя з рослин, вирощених у польових умовах*. В цьому випадку з рослини, що росте у полі, беруть листок, з якого у лабораторних умовах вилучають фрагмент для ДНК-аналізу. Зразок беруть з рослин, які мають 6-7 і більше листків. Взяття зразка не впливає на життєздатність рослини. Рослина-донор маркується, що дозволяє ідентифікувати її після проведення ДНК-дослідження.

Перевагами такого способу є збереження рослини з можливістю її подальшого запилення та отримання насіння. Недоліком є обмеженість часу вирощування рослин кукурудзи у полі впродовж року. Такий метод зазвичай застосовують для аналізу вихідних популяцій, коли необхідно обрати рослини одночасно з певними фенотиповими і фенологічними ознаками (наприклад, стійкість до хвороб і шкідників, ранній час цвітіння), а також зі сприятливими алельними варіантами генів (наприклад, гена каротиногенезу *crtRB1*).

В) *листя з рослин, вирощених у малому об'ємі ґрунту у лабораторних умовах (листя «розсади»)*. Насіння висівають у невеликі об'єми ґрунту (0,5 л) і вирощують у лабораторних умовах. Сівбу зазвичай проводять навесні (у березні-квітні). З отриманих рослин у фазі розвитку 4-6 листків беруть фрагмент листка для аналізу ДНК. Якщо рослинка містить сприятливий алельний стан цільового гена, її згодом висаджують у польові умови для подальшої селекційної роботи.

Перевагами цього методу є можливість висаджувати у польові умови лише ті рослини, які мають бажані алелі цільового гена, що економить ресурси (посівні площі, частку ручної праці, зменшує навантаження на довкілля). Недоліками є можливий ризик неприживаності рослин у польових умовах та необхідність додаткового догляду за рослинами під час адаптації після висадки у ґрунт (наприклад, полив). Такий спосіб зазвичай використовують для відстеження успадкованості цільових генів або окремих алельних станів при проведенні MAS.

2.2. Процедура виділення ДНК у кукурудзи

ДНК у кукурудзи виділяють за модифікованим ЦТАБ-методом (Murrey, Tomson, 1980). Приготування реактивів для проведення ДНК-аналізу

здійснюють за (Сиволов та ін., 2011). Підходи до приготування реактивів представлено у Додатку 1.

70-100 мг рослинного матеріалу кукурудзи розтирають у стерильній ступці за допомогою маточки до гомогенного стану. У ступку додають 700 мкл лізуючого ЦТАБ-буферу (2%), нагрітого до 70 °С. Знову розтирають за допомогою маточки. Лізат переливають у мікропробірку на 1,5 мл. Інкують за 70 °С протягом 60 хв, перемішуючи кожні 20 хв. До мікропробірки додають 500 мкл суміші хлороформ : ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом), злегка перемішують з використанням струшувача пробірок. Центрифугують 5 хв за 13000 об/хв. Переносять 200 мкл надосадкової рідини в окрему мікропробірку на 1,5 мл. Додають 140 мкл (0,7 від об'єму відібраної водяної фази ДНК) ізопропанолу. Перемішують шляхом перевертання пробірки, залишають на 5 хв за кімнатної температури. Далі центрифугують 20 хв за 13000 об./хв, після чого ДНК має випасти в осад у вигляді білої крапки. Далі обережно зливають супернатант. До мікропробірки додають 800 мкл 70%-го етанолу, злегка стукають по мікропробірці, щоб ДНК відокремилося від дна. Центрифугують 5 хв за 14000 об./хв. Обережно зливають супернатант (або відбирають піпеткою), оскільки осад-ДНК легко переміщується по мікропробірці. Мікропробірки центрифугують ще раз протягом 2 хв за 14000 об./хв і обережно піпеткою з тонким носиком відбирають залишки супернатанта. Висушують осад за 55 °С протягом 5 хв в термостаті. Додають 75 мкл ТЕ-буферу (рН 8,0), інтенсивно перемішують. Мікропробірки з виділеним ДНК зберігають у морозильній камері.

2.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції

Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) передбачає використання ампліфікатора – приладу, що забезпечує періодичне швидке охолодження і нагрівання мікропробірок, зазвичай з точністю не менше 0,1 °С.

Реакційна суміш для ПЛР одного зразка об'ємом 20 мкл має містити: 2 мкл DreamTaq™ Green буфера, (6х); 0,2 мкл Taq-полімерази (Thermo Scientific), (5

од./мкл); по 200 мкМ кожного з дезоксирибонуклеотидів (dATP, dCTP, dTTP, dGTP); по 0,2 мкМ кожного праймера (прямого і зворотного); 30-100 нг ДНК. При проведенні ПЛР використовують деіонізовану воду.

Умови проведення ПЛР з використанням праймерів до маркерів генів каротиногенезу (*lcyε*-3'INDL, *lcyε*-SNP216 та *crtRB1*-3'TE) наступні: початкова денатурація – при температурі 94°C протягом 5 хв; далі 40 циклів, які включають такі стадії, як денатурація (при 94°C протягом 1 хв), відпал праймерів (при 60°C протягом 1 хв) та елонгація (при 72°C протягом 1 хв). Заключна елонгація – при 72°C протягом 5 хв, фаза охолодження – при +5°C.

Умови проведення ПЛР з використанням праймерів *ps009* і *bnlg1064* до генів антоціаногенезу *P11* і *B1* наступні: початкова денатурація – при температурі 94°C протягом 5 хв; далі 40 циклів, які включають такі стадії, як денатурація (при 94°C протягом 15 с), відпал праймерів (при 54°C протягом 30 с) та елонгація (при 72°C протягом 1 хв). Заключна елонгація – при 72°C протягом 5 хв, фаза охолодження – при +5°C.

Умови проведення ПЛР з використанням маркеру *phi033* до гену цукристості *Sh1* наступні: початкова денатурація – при температурі 94°C протягом 5 хв; далі 40 циклів, які включають такі стадії, як денатурація (при 94°C протягом 15 с), відпал праймерів (при 54°C протягом 30 с) та елонгація (при 72°C протягом 1 хв). Заключна елонгація – при 72°C протягом 5 хв, фаза охолодження – при +5°C.

Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації відповідних ділянок ДНК-маркерів для генів каротиногенезу наступні:

• для *lcyε* за маркером *lcyε*-3'INDL: F1: GTACGTCGTTTCATCTCCGTACCC, R1: CTTGGTGAACGCATTTCTGTTGG, F2: GGACCGGAACAGCCAACTG, R2: GGCGAAATGGGTACGGCC;

• для *lcyε* за маркером *lcyε*-SNP216: F: GCGGCAGTGGGCGTGGAT, R: TGAAGTACGGCTGCAGGACAACG;

• для *crtRB1* за маркером *crtRB1*-3'TE: F: ACACCACATGGACAAGTTCG, R1: ACACTCTGGCCCATGAAC AC, R2: ACAGCAATACAGGGGACCAG.

Оскільки для маркера *lcyε*-SNP216 алель G реєструється як нуль-алель з відсутністю будь-якої смуги на електрофоретичній доріжці, для підтвердження наявності ДНК зразка проводиться дуплексна ПЛР з додаванням в реакційну суміш, окрім праймерів до маркера *lcyε*-SNP216, праймерів до гена алкогольдегідрогенази кукурудзи *adh1* (внутрішній контроль): Adh-F3: CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC, Adh-R1: GACAGAGGAGAAACAAGGCG.

Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації відповідних ділянок ДНК-маркерів для генів антоціаногенезу наступні:

- для *Pl1* за маркером ps009: F: CGAAAGTCGATCGAGAGACC, R: CCTCTCTTCACCCCTTCCTT
- для *B1* за маркером bnlg1064: F: CTGGTCCGAGATGATGGC, R: TCCATTTCTGCATCTGCAAC

Нуклеотидні послідовності праймерів для ампліфікації відповідних ділянок ДНК-маркерів для гену цукристості наступні:

- для *sh1* за маркером phi033: F: ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC, R: ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT

2.4. Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР

Продукти ампліфікації фракціонують у агарозному гелі у 1xTBE-буфері.

За використання 1%-го агарозного гелю електрофорез проводять протягом 60 хв за постійної напруги 120 Вт, за використання 2%-го гелю – 80 хв за 100 Вт, за використання 3%-го гелю – 150 хв за 80 Вт. Як маркер молекулярної маси використовують стандарт 100 bp DNA Ladder (0,1 µg/µl) фірми Solis BioDyne (Естонія) або 20 bp DNA Ladder (100 ng/ µl) фірми Carl Roth (Німеччина).

2.5. Візуалізація продуктів ампліфікації

Для візуалізації продуктів ампліфікації використовують пофарбування гелю бромистим етидієм (EtBr). Цей флуоресцентний барвник інтеркалює між

сусідніми парами азотистих основ і світиться в ультрафіолетовому світлі. Бромистий етидій можна додавати безпосередньо у камеру для електрофорезу у 1хTBE-буфер з розрахунку 100 мкл EtBr (5 мг/мл) на 2 л буферу, а можна проводити пофарбування гелю після електрофорезу. Для цього гель поміщують у розчин, що містить 200 мл 1хTBE-буферу і 100 мкл EtBr (5 мг/мл), на 10 хв, після чого гель промивають 5 хв у дистильованій воді.

Для пофарбування гелю також можна використовувати нітрат срібла.

2.6. Документування результатів аналізу

Для документування результатів електрофорезу використовують прилад для візуалізації GelDoc, за допомогою якого отримують цифрове зображення забарвлених гелів. Визначення молекулярної маси продуктів ампліфікації, що були розділені за допомогою електрофорезу, проводять з урахуванням стандарту – маркера молекулярної маси (наприклад, 100 bp DNA Ladder, 0,1 µg/µl фірми Solis BioDyne, Estonia або 20 bp DNA Ladder, 100 ng/µl фірми Carl Roth, Germany).

2.7. Опрацювання результатів

Після електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації на доріжках гелю видно чіткі фрагменти ампліфікації ДНК, які різняться за молекулярною масою.

За даними електрофореграм визначають алельний стан досліджуваних маркерів. Один алель на електрофореграмі свідчить про гомозиготний генотип, два алеля – про гетерозиготний.

Маркери каротиногенезу. За маркером *lcyε-3'INDL* фіксують появу смуг 144+502 п.н. (сприятливий алель) та 399+502 п.н. (несприятливий алель). За маркером *lcyε-SNP216* спостерігають появу смуги 395 п.н., що відповідає наявності в даному маркерному SNP-сайті тиміну (несприятливий алель) та відсутності смуги, що вказує на присутність в цьому SNP-сайті гуаніну

(сприятливий алель). В дуплексній ПЛР для гена *adh1* кукурудзи відзначають появу смуги розміром 234 п.н., що свідчить про наявність ДНК в реакційній суміші. За маркером *crtRB1-3'*TE ідентифікують смуги 543 п.н. (сприятливий алель), 296 п.н. та 296+875 п.н. (несприятливі алелі).

Маркери антоціаногенезу. Для гена *P1* за маркером *ps009* у генотипів кукурудзи з низьким вмістом антоціанів фіксують появу смуг 127 п.н. (у білозерних генотипів) і 139 п.н. (у жовтозернових генотипів), тоді як у генотипів з пурпуровим зерном і високим вмістом антоціанів ідентифікують смугу 112 п.н.

Для гена *B1* за маркером *bnlg1064* у генотипів з низьким вмістом антоціанів детектують алельні варіанти 182 п.н. (у білозерних генотипів) і 193 п.н. (у жовтозерних генотипів), а у генотипів з пурпуровим зерном і високим вмістом антоціанів відзначають смугу 185 п.н.

Маркери цукристості. Для гена *sh1* за маркером *phi033* у генотипів кукурудзи фіксують три алельні варіанти: 236 п.н., 236+310 п.н. та 264 п.н. Перші два алелі властиві для генотипів цукрової кукурудзи з підвищеним вмістом цукрів, тоді як алель 264 п.н. є характерним для нецукрових (зернових) форм.

3. БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ У КУКУРУДЗИ

3.1. Принцип маркер-асоційованої селекції у кукурудзи

Біотехнологічне забезпечення селекційного процесу у кукурудзи ґрунтується на використанні функціональних молекулярно-генетичних маркерів. Методи біотехнології сприяють прискоренню селекційного процесу, зменшенню обсягів ручної праці, зниженню навантаження на навколишнє середовище шляхом скорочення кількості польових досліджень та перенесення частини роботи в лабораторні умови.

Принцип маркер-асоційованої селекції у кукурудзи полягає у здійсненні добору за генотипом замість фенотипу шляхом використання функціональних ДНК-маркерів. Такий підхід забезпечує ідентифікацію ознак, що мають господарське або селекційне значення, на будь-якому етапі створення селекційного матеріалу.

Наприклад, схрещуються дві рослини кукурудзи різних генотипів: перша є стійкою до ураження хворобою 1, але сприйнятливою до хвороби 2 ($R1R1S2S2$), тоді як друга, навпаки, уражується хворобою 1 і є стійкою до хвороби 2 ($S1S1R2R2$), з метою отримання рослин кукурудзи, які будуть гомозиготно стійкими до обох хвороб одночасно (рис.1). У поколінні F_1 формується генетично одноманітний матеріал із генотипом $R1S1R2S2$. На наступному етапі проводять самозапилення рослин F_1 між собою з одержанням покоління S_1 , у якому спостерігається розщеплення за ознакою стійкості до обох хвороб. У результаті фенотипової оцінки встановлено, що стійкість одночасно до хвороби 1 і хвороби 2 проявляють 10 із 20 досліджених рослин S_1 . Молекулярно-генетичний аналіз з використанням функціонального маркера 1, асоційованого зі стійкістю до хвороби 1, дає змогу відібрати рослини, що є гомозиготними стійкими до цієї хвороби. Такими у нашому випадку виявилися рослини кукурудзи № 1, 7, 9, 12, 15 і 20. ДНК-аналіз за маркером 2, пов'язаним зі стійкістю до хвороби 2, показав, що серед цих шести рослин лише одна – №15 – є гомозиготною стійкою також і до хвороби 2. Таким чином, саме цю рослину №15 доцільно залучати до подальшої селекційної роботи, оскільки вона є носієм гомозиготної стійкості одразу до обох хвороб, що відповідає поставленій меті маркер-асоційованого добору.

MAS можлива за умови ідентифікації гена, відповідального за бажану ознаку, та його локалізації. У такому випадку контроль ознаки здійснюється не за її фенотиповим проявом, а через відстеження наявності відповідного алеля. Обов'язковою умовою ефективної MAS є наявність молекулярних маркерів, локалізованих у цільовому гені або тісно з ним асоційованих, що дозволяє встановити зв'язок між алельним станом маркера та фенотипом. Особливої уваги потребують полігенні ознаки, зокрема посухостійкість, жаростійкість, стійкість до патогенів.

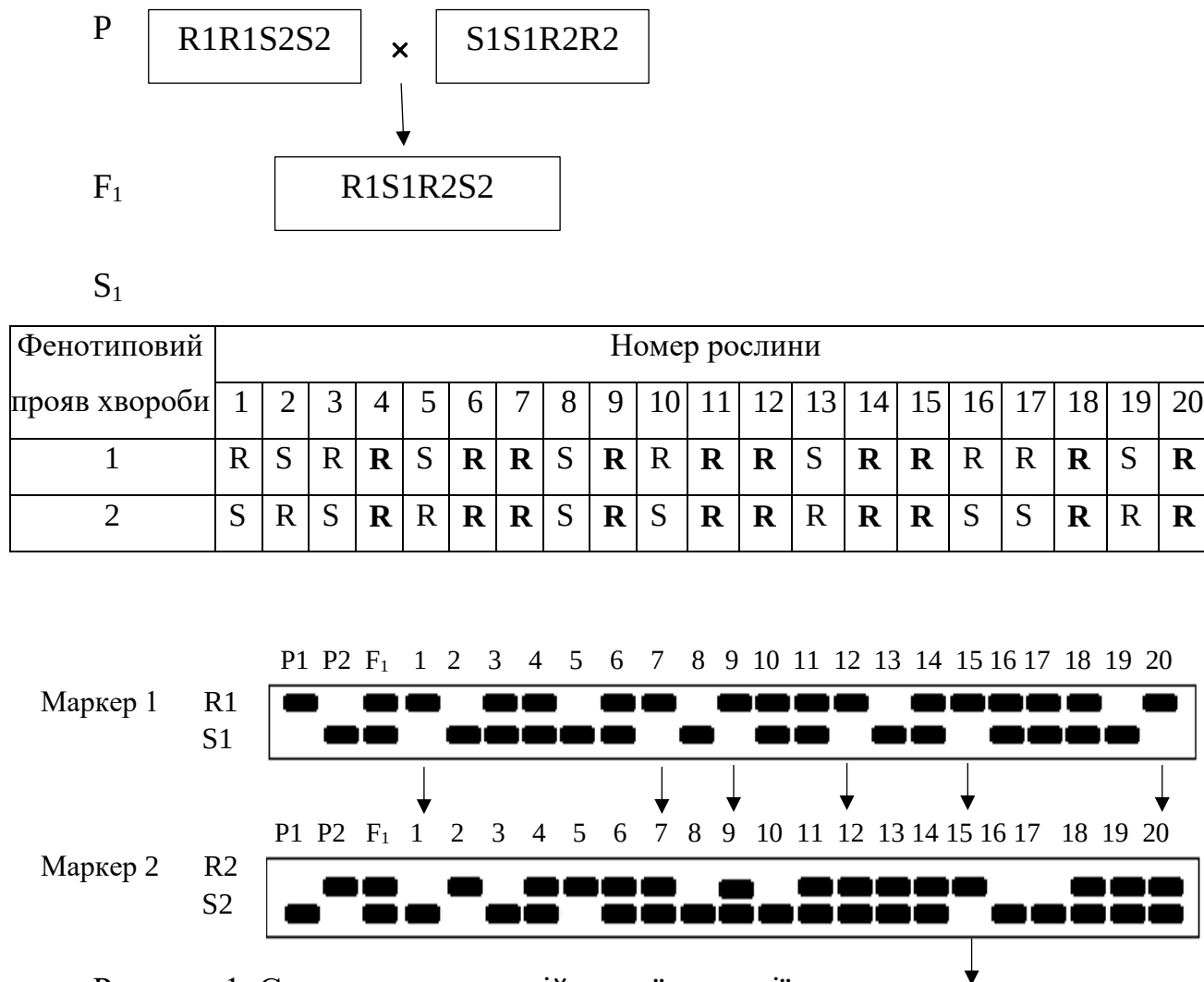


Рисунок 1. Схема маркер-асоційованої селекції

На першому етапі MAS визначається цільова ознака, ідентифікуються відповідні гени та молекулярно-генетичні маркери, асоційовані з ними. Проводиться аналіз поліморфізму маркерів і встановлюються сприятливі та несприятливі алельні варіанти цільових генів. На наступному етапі, на основі ДНК-аналізу, оцінюється алельний стан генів у різних генотипів. Генотипи-носії сприятливих алелів відбираються для подальшого включення у селекційний процес. Прикладом ефективного застосування маркер-асоційованого відбору є селекція кукурудзи на підвищений вміст β -каротину у зерні, коли серед вихідної популяції відбираються генотипи зі сприятливим алелем гена каротиногенезу, наприклад, *crtRB1* за маркером *crtRB1-3' TE*, що значно прискорює процес створення висококаротинових ліній.

3.2. Створення гомозиготних ліній кукурудзи з цінними ознаками з використанням ДНК-аналізу рослин вихідних популяцій

Процес створення гомозиготних ліній кукурудзи, що несуть цінні селекційні ознаки, ефективно поєднує традиційні підходи з сучасними молекулярно-генетичними методами. На початковому етапі селекціонери висівають насіння, отримане в результаті вільного запилення, що формує вихідну популяцію з переважно гетерозиготних рослин. Відбір перспективних зразків здійснюється у другому-третьому поколінні самозапилення за фенотиповими ознаками безпосередньо у польових умовах.

Паралельно з фенотиповим доббором виконується молекулярно-генетичний аналіз відібраних рослин кукурудзи. Із фрагментів листя відібраних рослин здійснюють виділення ДНК, після чого за допомогою функціональних молекулярно-генетичних маркерів ідентифікують алельний стан цільових генів, пов'язаних із цінними селекційними ознаками. Отримані результати молекулярного аналізу дозволяють оперативно визначити наявність сприятливих алелів цільового гена, що значно підвищує ефективність селекційного процесу.

Особливої актуальності цей підхід набуває у селекційних програмах, спрямованих на підвищення харчової цінності кукурудзи, зокрема вмісту β -каротину в зерні. Застосування функціонального маркера *crtRB1-3'TE*, який асоційований з геном *crtRB1*, дає змогу ідентифікувати алельні варіанти гена (543 п.н., 296 п.н., 296+875 п.н.) навіть до фази цвітіння рослин. Завдяки цьому можливо визначити генотипну цінність кожної рослини без потреби чекати на досягання насіння чи проводити трудомісткі біохімічні аналізи вмісту каротиноїдів у зерні. Серед рослин, що вирощуються у відкритому ґрунті або тепличних умовах, до початку репродуктивної фази здійснюється відбір фрагментів листя для ДНК-аналізу без шкоди для рослини. Після встановлення рослин зі сприятливим алельним станом гена *crtRB1* (543 п.н.) проводять самозапилення таких зразків із наступним отриманням насіння.

Використання молекулярно-генетичної інформації дозволяє селекціонерам приймати обґрунтовані рішення щодо подальшого самозапилення або вибраковування рослин. Оптимальною є ідентифікація гомозигот за сприятливим алелем (543 п.н.), що забезпечує стабільну передачу цієї ознаки у наступні покоління. У разі відсутності гомозиготних форм допускається використання гетерозигот за умови подальшого обов'язкового контролю успадкування алелів, націлене на виявлення гомозигот. На завершальному етапі створення лінії проводиться повторний ДНК-аналіз для підтвердження стабільної присутності цільових алелів.

Таким чином, застосування молекулярно-генетичних маркерів дозволяє суттєво скоротити тривалість селекційного циклу, знизити витрати на польові випробування та зменшити обсяги нецільового селекційного матеріалу.

3.3. Детекція генотипів-носіїв сприятливих алелів цінних генів у кукурудзи

Одним із напрямів біотехнологічного супроводу селекційного процесу у кукурудзи є детекція генотипів-носіїв сприятливих алелів цінних генів серед вже створеного селекційного матеріалу, зокрема ліній та гібридів кукурудзи, для цілеспрямованого залучення їх у селекційний процес. Створення нового вихідного матеріалу на основі генотипів з відомими алелями генів передбачає подальшу наявність таких алелів у зразках популяції.

Як вихідний матеріал для ДНК-аналізу можуть бути використані як фрагменти листя рослин (зокрема, на ранніх етапах вегетації), так і насіння кукурудзи (переважно зріле зерно). Отримані дані щодо алельного стану генів слугують основою для подальшого аналізу і добору генотипів та оптимізації схрещувань у селекційних програмах.

Нижче (табл. 1-2) наведено результати аналізу алельного стану функціональних молекулярно-генетичних маркерів, асоційованих із проявом господарсько-цінних ознак у кукурудзи. Зокрема, представлено варіанти алельного стану функціональних маркерів генів *crtRB1* та *lcyε*, що беруть

участь у біосинтезі β -каротину у зерні. Також подано розподіл генотипів кукурудзи за алелями гена *Sh1*, що визначає цукристість зерна – важливу ознаку у створенні цукрових форм кукурудзи.

Таблиця 1 – Генотипи кукурудзи з альтернативним станом маркерів генів каротиногенезу

Ознака	Ген	Молекулярний маркер	Алель, п.н. (сприятливий / несприятливий)	Генотипи кукурудзи, які несуть відповідний алель
1	2	3	4	5
Накопичення β -каротину в зрілому зерні (інгібування переходу β -каротину в β -криптоксантин)	Ген β -каротингідоксилази 1 (<i>crtRB1</i>)	<i>crtRB1</i> -3' TE	543 (сприятливий)	ДК129-4, ДК200, ДК204/273, ДК206А, ДК253зСЗМ, ДК253/129-4, ДК267, ДК267/168, ДК273, ДК273/232, ДК366, ДК714/195, ДК1855, ДК2073, ДК2275, ДК2668, ДК7064, ДК7337, ДК7575, ДК77174, ДКД9066, ДКЕ-1, ІСК3, ІСК9, ІСК12, ІСК21, ІСК23, ІСК24, ІСК25, ІСК30, ІСК36, ІСК37, Oh43, A619, F2, Cm7, НКІ161-PV, НКІ163-PV, НКІ193-1-PV, НКІ193-2-PV, DMRIL47, MGU-PV-123/C6, НР704-22, НР704-23
			296 (несприятливий)	ВР73-1, ДК2, ДК23, ДК44, ДК232, ДК267/959, ДК272С, ДК272/273МВ, ДК2831, ДК357/273, ДК367, ДК517МВ, ДК673, ДК742, ДК744, ДК7400СВзМ, ДК7723МСВ, ДК777, ДК951, ДК2442, ДК2732, ДК3008, ДК3023, ДК3060, ДК3070, ДК3172зМ, ДК4173СВзМ, ДК4445, ДК5170, ДК5510, ДК5534, ДК6356, ДКВ3151, ДКВ3262, ДКК18743МСВ-3, ДН Галатея, ДН Кияхи, ДН Легенда, ДН Меотида, ДКСРФ-15, ІСК4, ІСК7, ІСК8, ІСК13, ІСК14, ІСК17, ІСК26, ІСК27, ІСК29, ІСК31, ІСК32, ІСК33, ІСК35, ІСК38, ІСК39, ІСК40, ІСК41, ІСК42, Крос201С, Крос268С, МС252ВМЗ, МС381МВ, РНТ60, А632, В73, W64А, Р354, Со255, VQL1, НКІ161, НКІ163, НКІ193-1, НКІ193-2
			296+875 (несприятливий)	ДБ Тирас, ДК5, ДК50-7, ДК205/265-5, ДК216, ДК216/237-10, ДК231, ДК233/209, ДК236/680, ДК247МВ, ДК247/959МВ, ДК275/777, ДК276, ДК296, ДК301, ДК305, ДК325, ДК365, ДК377, ДК420-1/6080, ДК541, ДК5002М, ДК633, ДК680МВ, ДК680/168, ДК633/325, ДК814/370, ДК959, ДК2285, ДК2323, ДК2332, ДК2459, ДК2613, ДК2637, ДК2659, ДК2965, ДК3044, ДК3070/44, ДК3527, ДК3902, ДК4538, ДК5510, ДК5568, ДК6080, ДК6335, ДК6381, ДК7408, ДКВ3451, ДКДЗ, ДН Сармат, ІСК5, ІСК6,

1	2	3	4	5
				ICK10, ICK11, ICK15, ICK16, ICK18, ICK19, ICK20, ICK22, ICK28, ICK34, ICK43, ICK44, ICKCE396, ICKCE401, Крос160С, МС555, Мо17, F7, P165, A641, EP1
Накопичення β-каротину в зрілому зерні (блокування переходу лікопіну в α-каротин)	Ген лікопін-ε-циклази (lcyε)	lcyε-3 ^{TNDL}	144+502 (сприятливий)	ДКФ2, ДК2, ДК5, ДК23, ДК50-7, ДК129-4, ДК200, ДК206А, ДК212, ДК216, ДК231С, ДК247, ДК253зСЗМ, ДК257, ДК267, ДК272, ДК272С, ДК273, ДК276, ДК296, ДК296С, ДК305, ДК325, ДК366, ДК366зСЗМ, ДК367, ДК377, ДК411, ДК541, ДК633, ДК633/266, ДК633/266зСЗМ, ДК673, ДК680МВ, ДК714/195, ДК742, ДК744, ДК772, ДК959, ДК1855, ДК2073, ДК2275, ДК2285, ДК2323, ДК2332, ДК2459, ДК2533СЗМ, ДК2613, ДК2637, ДК2659, ДК2668, ДК2732, ДК3527, ДК3902, ДК4172, ДК4173СВЗМ, ДК4538, ДК5510, ДК5534, ДК5568, ДК6356, ДК6381, ДК77174, КГ232, ДКВ3262, ДКДЗ, ДКД9066, ICK2, ICK3, ICK4, ICK5, ICK6, ICK7, ICK8, ICK9, ICK10, ICK11, ICK12, ICK13, ICK14, ICK15, ICK16, ICK17, ICK18, ICK19, ICK20, ICK21, ICK25, ICK26, ICK27, ICK34, ICK38, ICK39, ICK40, ICK41, ICK42, ICK43, ICK44, МС252ВМ3со, МС381МВ, МС555, РНТ60, СПФ-15
			399+502 (несприятливий)	ДБ Тирас, ДК239М, ДК2831СВ, ДК315М, ДК3172зМ, ДК5002М, ДК633/325, ДК7400СВзМ, ДН Галатея, ДН Кияхи, ДН Легенда, ДН Меотида, ДН Сармат, ICK22, ICK23, ICK24, ICK28, ICK30, ICK31, ICK32, ICK33, ICK35, ICK36, ICK37, Крос160С, Крос201С, Крос256С, Крос268С
		lcyε-SNP216	395, що відповідає тиміну (несприятливий)	ДБ Тирас, ДК2, ДК50-7, ДК129-4, ДК200, ДК272С, ДК216, ДК231С, ДК296С, ДК366зСЗМ, ДК367, ДК377, ДК411, ДК541, ДК673, ДК633/266, ДК633/266зСЗМ, ДК2533СЗМ, ДК2613, ДК2637, ДК2659, ДК2668, ДК3527, ДК3902, ДК7400СВзМ, ДКВ3262, ДН Кияхи, ICK8, ICK9, ICK10, ICK11, ICK13, ICK26, ICK27, ICK28, ICK29, ICK33, Крос160С, Крос 201С, РНТ60
			Нуль-алель, що відповідає гуаніну (сприятливий)	ДК5, ДК23, ДК206А, ДК212, ДК239МВ, ДК276, ДК315М, ДК325, ДК633, ДК680МВ, ДК633/325МВ, ДК1855, ДК2323, ДК2732, ДК2831СВ, ДК3172зМ, ДК4538, ДК5002М, ДК6381, ДН Галатея, ДН Легенда, ДН Меотида, ДН Сармат, КГ232, Крос268С, ДКД9066, ICK2, ICK3, ICK4, ICK5, ICK7, ICK12, ICK21, ICK30, ICK31, ICK32, ICK35, ICK39, ICK40, ICK41, МС381МВ

Таблиця 2 – Генотипи кукурудзи з альтернативним станом гену цукристості

Ознака	Ген	Молекулярний маркер	Алель, п.н. (сприятливий / несприятливий)	Генотипи кукурудзи
Цукристість (пригнічення синтезу крохмалю та різке підвищення рівня вільних цукрів і водорозчинних сахаридів)	<i>Shrunken1</i> (<i>Sh1</i>)	phi033	236 або 236+310 (сприятливий)	СЕ401
			264 (несприятливий)	Популяція Чорностеблова

Така інформація має практичне значення для селекціонерів під час підбору батьківських компонентів високогетерозисних і сестринських гібридів, закладання синтетичних популяцій нових циклів із заданим поєднанням ознак для створення гомозиготних ліній, створення гібридів із поліпшеними якісними показниками зерна.

Застосування функціональних маркерів у таких дослідженнях дозволяє скоротити часові й матеріальні витрати, а також підвищити ефективність селекційного процесу за рахунок використання інформації про наявність або відсутність сприятливих алелів. Це особливо важливо в умовах обмежених ресурсів або при роботі з великою кількістю вихідного матеріалу.

3.4. Створення подвоєно-гаплоїдних ліній у кукурудзи з використанням ДНК-аналізу

Створення подвоєно-гаплоїдних ліній є однією з найефективніших технологій прискореної селекції гомозиготного матеріалу у кукурудзи. Використання цієї технології значно скорочує тривалість створення ліній – з п'яти-семи поколінь самозапилення до одного циклу генерації гаплоїдів і подвоєння їхнього хромосомного набору. Ключовим етапом цього процесу є відбір цінних гаплоїдних рослин до стадії хімічного подвоєння їхнього геному.

Для підвищення ефективності відбору на цьому етапі доцільно застосовувати ДНК-аналіз із використанням функціональних молекулярно-генетичних маркерів, які дозволяють визначити алельний стан цільових генів ще до проведення процедури колхіцинування. На стадії до 4-5 листків з

окремих рослин гаплоїдів відбирають невеликий фрагмент листочка для молекулярно-генетичного аналізу. Такий відбір є нетравматичним для рослин і не впливає на їх подальший розвиток. Діагностика на цьому етапі дає змогу виявити гаплоїдні рослини, що несуть сприятливі алелі цінних генів (наприклад, генів, пов'язаних із якістю зерна, стійкістю до хвороб чи абіотичних чинників), відсіяти гаплоїдні рослини із несприятливим алельним набором, що дозволяє уникнути витрат на подвоєння їхнього хромосомного набору, оптимізувати використання колхіцину, обмеживши його застосування лише до цільових зразків, та інших ресурсів у наступних етапах селекційного процесу.

Застосування функціональних молекулярних маркерів у програмі створення подвоєно-гаплоїдних ліній кукурудзи забезпечує цілеспрямовану селекцію та підвищує точність відбору за бажаними ознаками на ранніх етапах розвитку рослин. Це сприяє ефективному формуванню гомозиготних ліній, які є перспективними компонентами гібридів.

3.5. Інтрогресія сприятливих алелів цінних генів у кукурудзи

Інтрогресія, тобто привнесення, сприятливого алеля цінного гена з одного генотипу до іншого, є важливою складовою сучасного селекційного процесу у кукурудзи, що спрямований на цілеспрямоване покращення агрономічних і селекційно важливих ознак. Такий підхід дозволяє зберегти цінні адаптивні та продуктивні властивості елітного генотипу-реципієнта, одночасно доповнюючи його новими алелями, що відповідають за, наприклад, підвищення харчової цінності зерна.

Наприклад, нехай генотип А містить сприятливий для накопичення β -каротину алель гена *crtRB1*, виявлений за функціональним маркером *crtRB1-3'TE* (543 п.н.), а інший – генотип Б – характеризується високою селекційною цінністю (стійкістю до абіотичних або біотичних стресів, високою врожайністю, адаптованістю до умов вирощування тощо), але має

несприятливий алель цього гена (296 п.н.), і завданням є перенесення алеля 543 п.н. з генотипу А у генотип Б.

Процес інтрогресії починається зі схрещування генотипів А та Б, у результаті чого отримують покоління F_1 , гетерозиготне за досліджуваним алелем (296/543 п.н.). Далі відбувається самозапилення або парне схрещування рослин F_1 , формується покоління S_1 , у якому спостерігається розщеплення алелів.

Серед рослин S_1 здійснюють відбір за алельним станом гена *crtRB1* шляхом ПЛР-аналізу з використанням функціонального маркера *crtRB1*-3'ТЕ, який дозволяє точно визначити присутність сприятливого алеля. Для молекулярно-генетичного аналізу використовують фрагменти листя молодих рослин, вирощених у лабораторних умовах у контрольованому ґрунтовому середовищі. Рослини, що містять гомозиготний сприятливий алель (543/543 п.н.), висаджуються у відкритий ґрунт для подальшої оцінки агрономічних і селекційних властивостей. Рослини з несприятливим алелем (296/296 п.н.) відбраковуються.

Якщо серед рослин покоління S_1 не виявлено гомозигот за сприятливим алелем, допускається використання гетерозиготних форм (296/543 п.н.) у подальшому селекційному процесі. У такому випадку потрібно проводити повторні цикли самозапилення з подальшим ПЛР-аналізом, спрямованим на ідентифікацію гомозиготних (543/543 п.н.) рослин у наступних поколіннях. Використання функціонального маркера дозволяє точно й на ранніх етапах ідентифікувати носіїв цільового алеля.

Біотехнологічний супровід інтрогресії сприятливих алелів дозволяє значно підвищити ефективність селекції, зменшити тривалість циклів добору, уникнути помилок фенотипового відбору. Подібні підходи можуть бути інтегровані не лише у селекції на підвищення вмісту β -каротину, а й для інтрогресії алелів, пов'язаних із стійкістю до хвороб, покращеним складом крохмалю, амінокислот, білків або адаптивними властивостями.

3.6. Пірамідування генів у кукурудзи

Пірамідування генів – це цілеспрямована стратегія поєднання кількох цільових генів або алельних варіантів, які контролюють одну або кілька ознак, в одному генотипі (наприклад, лінії або гібриді). Такий підхід широко використовується у сучасній селекції кукурудзи для підвищення ефективності створення генотипів із комплексом господарсько-цінних ознак.

Основними напрямками застосування пірамідування генів у селекції кукурудзи є: підвищення стійкості до хвороб і шкідників шляхом поєднання кількох генів резистентності (R-генів), формування толерантності до абіотичних стресів (посухи, спеки, засолення ґрунтів), поліпшення якості продукції (підвищення вмісту білків, каротиноїдів, антоціанів тощо).

Реалізація пірамідування генів на практиці у кукурудзи здійснюється шляхом схрещування генотипів-носіїв цільових алелів та відбору потомства з використанням маркер-асоційованої селекції. Використання молекулярно-генетичних маркерів дозволяє ідентифікувати бажані алелі ще до початку фенотипового прояву ознаки, що суттєво скорочує селекційний цикл і знижує витрати на польові дослідження.

Одним із прикладів практичного застосування пірамідування генів є створення ліній цукрової кукурудзи з високим вмістом антоціанів у зерні. У цьому випадку поєднуються алелі генів цукристості (наприклад, *sh1*) і антоціанового забарвлення (наприклад, *Pl1* і *B1*), що забезпечує як солодкий смак, так і фіолетово-червоне забарвлення зерна завдяки накопиченню антоціанів.

При створенні ліній цукрової кукурудзи з високим вмістом антоціанів у зерні спочатку проводять схрещування батьківських форм – одного генотипу з антоціановим забарвленням зерна (носія сприятливих алелів *Pl1* і *B1*) та іншого – із цукровою текстурою зерна (носія рецесивного алеля *sh1sh1*). Потім проводять самозапилення гібридного покоління F_1 для отримання покоління S_1 з розщепленням за трьома цільовими генами. У S_1 здійснюють ДНК-аналіз для ідентифікації алельного стану кожного з трьох генів (*Pl1*, *B1*, *sh1*), на основі

чого відбираються рослини з потрібною комбінацією алелів. Далі рослини з бажаними алельними комбінаціями проходять цикли самозапилення (зазвичай 5–7 поколінь) з паралельним маркерним контролем у кожному циклі для фіксації алелів у гомозиготному стані.

Застосування біотехнологічного супроводу, заснованого на використанні функціональних молекулярно-генетичних маркерів, не лише прискорює селекційний процес, але й значною мірою підвищує його точність і ефективність. Крім того, використання MAS дозволяє скоротити потребу в трудомістких польових оцінках на ранніх етапах селекції, що особливо важливо за умов обмежених ресурсів.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Використання функціональних молекулярно-генетичних маркерів у селекції кукурудзи відкриває нові можливості для цілеспрямованого формування генотипів з господарсько цінними ознаками, такими як покращений склад зерна, стійкість до біотичних і абіотичних факторів тощо. Завдяки здатності точно виявляти алельний стан генів, що безпосередньо контролюють відповідні метаболічні шляхи, ці маркери значно підвищують ефективність добору селекційного матеріалу. Вони забезпечують надійний інструмент для інтрогресії бажаних ознак, контролю гетерозиготності, пірамідкування генів і побудови генетично збалансованих популяцій.

Інтеграція функціональних маркерів у селекційні програми сприяє створенню нових ліній і гібридів кукурудзи, адаптованих до умов мультистресового середовища, з покращеними показниками якості зерна. Такий підхід поєднує фундаментальні знання про структуру й експресію генів із прикладними аспектами генотипування та селекційної аналітики, формуючи науково обґрунтовану платформу для сталого розвитку сучасної селекції кукурудзи.

Список використаних джерел

1. Anirban A., Masouleh A.K., Henry R.J. et al. Sequence variations associated with novel purple-pericarp super-sweetcorn compared to its purple-pericarp maize and white super-sweetcorn parents. *Mol Genet Genomics*. 2023. 298:1395-1405. doi: 10.1007/s00438-023-02060-y.
2. Babu R., Rojas N.P., Gao S. et al. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRB1* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations. *Theor Appl Genet*. 2013. 126:389-399. doi: 10.1007/s00122-012-1987-3.
3. Blennow A., Hebelstun K. H., Petersen B. L. Starch biosynthesis and crop bioengineering. *Grain & Oil Science and Technology*. 2025. doi: 10.1016/j.gaost.2025.04.003.
4. Chatham L. A., Juvik J.A. Linking anthocyanin diversity, hue, and genetics in purple corn, *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2021. 11(2): jkaa062. doi: 10.1093/g3journal/jkaa062.
5. Chen W., Zhang X., Lu C. et al. Genome-wide association study of carotenoids in maize kernel. *The Plant Genome*. 2024. 17(3): e20495. doi: 10.1002/tpg2.20495.
6. Chhabra R., Hossain F., Muthusamy V. et al. Mapping and validation of Anthocyanin1 pigmentation gene for its effectiveness in early selection of *shrunk2* gene governing kernel sweetness in maize. *Journal of Cereal Science*. 2019. 87:258-265. doi: 10.1016/j.jcs.2019.04.012.
7. Chhabra R., Muthusamy V., Baveja A. et al. Allelic variation in *shrunk2* gene affecting kernel sweetness in exotic-and indigenous-maize inbreds. *PLoS One*. 2022. 17(9):e0274732. doi: 10.1371/journal.pone.0274732.
8. Chhabra R., Muthusamy V., Gain N. et al. Allelic variation in *sugary1* gene affecting kernel sweetness among diverse-mutant and wild-type maize inbreds. *Mol Genet Genomics*. 2021. 296:1085-1102. doi: 10.1007/s00438-021-01807-9.
9. Cone K.C., Burr F.A., Burr B. Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986. 83(24):9631-5. doi: 10.1073/pnas.83.24.9631.

10. Cone K.C., Cocciolone S.M.M., Weber T. et al. Role of the regulatory gene *pl* in the photocontrol of maize anthocyanin pigmentation. *Plant Cell*. 1993. 5:1807-1816. doi: 10.1105/tpc.5.12.1807
11. Dong H., Zhuang Z., Bian J. et al. Candidate gene for kernel-related traits in maize revealed by a combination of GWAS and meta-QTL analyses. *Plants*. 2025. 14(6):959. doi: 10.3390/plants14060959.
12. Duo H., Hossain F., Muthusamy V. et al. Development of sub-tropically adapted diverse provitamin-A rich maize inbreds through marker-assisted pedigree selection, their characterization and utilization in hybrid breeding. *PLoS One*. 2021. 16(2):e0245497. doi: 10.1371/journal.pone.0245497.
13. Finegan C., Boehlein S.K., Leach K.A. et al. Genetic perturbation of the starch biosynthesis in maize endosperm reveals sugar-responsive gene networks. *Front. Plant Sci*. 2022. 12:800326. doi: 10.3389/fpls.2021.800326
14. Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*. 2008. 319(5861):330-3. doi: 10.1126/science.1150255.
15. Hossain F., Bhat S., Mohapatra T., Singh A.K. Genetics on a maize cob: A teaching tool for schools. *Indian J. Genet*. 2019. 79(1):340-366. doi: 10.31742/IJGPB.79S.1.27. 2019.
16. <https://www.maizegdb.org>
17. James M.G., Robertson D.S., Myers A.M. Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *The Plant Cell*. 1995. 7(4):417-429. doi:10.1105/tpc.7.4.417.
18. Lago C., Landoni M., Cassani E. et al. Development and characterization of a coloured sweet corn line as a new functional food. *Maydica*. 2014. 59:191-200.
19. Lago C., Landoni M., Cassani E. et al. Study and characterization of a novel functional food: purple popcorn. *Mol Breeding*. 2013. 31(3):575-585. doi: 10.1007/s11032-012-9816-6.
20. LaPorte M.-F., Suwarno W.B., Hannok P. et al. Investigating genomic prediction strategies for grain carotenoid traits in a tropical/subtropical maize panel. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2024. 14(5):jkae044. doi: 10.1093/g3journal/jkae044.

21. Marrs K.A., Alfenito M.R., Lloyd A.M., Walbot V. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature*. 1995. 375:397-400. doi: 10.1038/375397a0.
22. Mattioli R., Francioso A., Mosca L., Silva P. Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2020. 25(17):3809. doi: 10.3390/molecules25173809.
23. Mousavi S.M.N., Illes A., Bojtor C. et al. Effect of harvest time on sugar content and carotenoid composition in different sweet maize hybrids. *Sci Rep*. 2025. 15(1):25758. doi: 10.1038/s41598-025-11680-w.
24. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980. 8(19):4321-5. doi: 10.1093/nar/8.19.4321.
25. Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N. et al. (2015a). 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*. 2015a. 1(1). doi: 10.1080/23311932.2015.1033141.
26. Muthusamy V., Hossain F., Thirunavukkarasu N. et al. Development of β -carotene rich maize hybrids through marker-assisted introgression of β -carotene hydroxylase allele. *PLoS One*. 2015. 10(3):e0122130. doi: 10.1371/journal.pone.0122130.
27. Nagy E., Timár I., Hegyi Z. et al. SSR markers as tools in maize breeding for high starch content. *Maydica*. 2009. 54: 253-257.
28. Pilu R., Ghidoli M., Follador A. et al. Preliminary evidence of a horizontal transfer of paramutation phenomenon at the *pl1* gene in maize (*Zea mays* L.). *Plants*. 2025. 14(1):11. doi: 10.3390/plants14010011.
29. Popa C., Călugăr R.E., Varga A. et al. Evaluating maize hybrids for yield, stress tolerance, and carotenoid content: insights into breeding for climate resilience. *Plants*. 2025. 14(1):138. doi: 10.3390/plants14010138.
30. Sagare D. B., Shetti P., Reddy S. S. et al. Identification of β -carotene rich maize inbreds using PCR-based assay for crtRB1-3'TE allele. *IJSN*. 2015. 6(3):441-443.

31. Salinas-Moreno Y., Martínez-Ortiz M.Á., Padilla-Camberos E. et al. Effect of solvent and grain color on the biological activities of maize grain. *Foods*. 2025. 14(7):1163. doi: 10.3390/foods14071163.
32. Selinger D.A., Chandler V.L. B-Bolivia, an allele of the maize *b1* gene with variable expression, contains a high copy retrotransposon-related sequence immediately upstream. *Plant Physiol.* 2001. 125(3):1363-79. doi: 10.1104/pp.125.3.1363.
33. Sharma G., Chhabra R., Muthusamy V. et al. Temporal expression of *Anthocyanin1* gene reveals unique accumulation pattern of anthocyanins during different stages of kernel development in blue maize. *3 Biotech*. 2025. 15(8):254. doi: 10.1007/s13205-025-04420-4.
34. Sharma G., Chhabra R., Muthusamy V. et al. Unraveling molecular architecture, development and validation of *Anthocyanin1* gene-based novel breeder-friendly markers for utilization in genomics-assisted breeding of blue maize. *South African Journal of Botany*. 2024. 172: 267-276. doi: 10.1016/j.sajb.2024.07.007.
35. Sharma M., Cortes-Cruz M., Ahern K.R. et al. Identification of the *pr1* gene product completes the anthocyanin biosynthesis pathway of maize. *Genetics*. 2011. 188(1):69-79. doi: 10.1534/genetics.110.126136.
36. Singh J., Sharma S., Kaur A. et al. Marker-assisted pyramiding of lycopene- ϵ -cyclase, β -carotene hydroxylase1 and opaque2 genes for development of biofortified maize hybrids. *Sci Rep*. 2021. 11:12642. doi: 10.1038/s41598-021-92010-8.
37. Stra A., Almarwaey L.O., Alagoz Y. et al. Carotenoid metabolism: New insights and synthetic approaches. *Front Plant Sci*. 2023. 13:1072061. doi: 10.3389/fpls.2022.1072061.
38. Sun T., Rao S., Zhou X. et al. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Mol Horticulture*. 2022. 2:3. doi: 10.1186/s43897-022-00023-2.
39. Usman S.M., Khan R.S., Shikari A.B. et al. Unveiling the sweetness: evaluating yield and quality attributes of early generation sweet corn (*Zea mays subsp. sachharata*) inbred lines through morphological, biochemical and

marker-based approaches. *Mol Biol Rep.* 2024. 51:307. doi:10.1007/s11033-024-09229-7.

40. Wang Z., Hu S., Zhuang J. et al. Engineering the key domains of starch synthases and branching enzyme to balance the amylose increase and yield loss in maize kernels. *Mol Breeding.* 2025. 45:37. doi:10.1007/s11032-025-01559-z.

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

42. Yang X., Shaw R.K., Li L. et al. Novel candidate genes and genetic basis analysis of kernel starch content in tropical maize. *BMC Plant Biol.* 2025. 25(1):105. doi: 10.1186/s12870-025-06125-5.

43. Yonemaru J.I., Miki K., Choi S. et al. A genomic region harboring the *Pl1* allele from the Peruvian cultivar JC072A confers purple cob on Japanese flint corn (*Zea mays* L.). *Breed Sci.* 2018. 68(5): 582-586. doi: 10.1270/jsbbs.18090.

44. Zhang K., Guo L., Cheng W. et al. *SH1*-dependent maize seed development and starch synthesis via modulating carbohydrate flow and osmotic potential balance. *BMC Plant Biol.* 2020. 20:264. doi: 10.1186/s12870-020-02478-1.

45. Zhang X., Colleoni C., Ratushna V. et al. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol Biol.* 2004. 54(6):865-79. doi: 10.1007/s11103-004-0312-1.

46. Zhang X., Mogel K., Lor V. et al. Maize *sugary enhancer1* (*se1*) is a gene affecting endosperm starch metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. 116: 20776-20785. doi: 10.1073/pnas.1902747116.

47. Zunjare R.U., Chhabra R., Hossain F. et al. Development and validation of multiplex-PCR assay for simultaneous detection of rare alleles of *crtRB1* and *lcyE* governing higher accumulation of provitamin A in maize. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2018. 27:208–214. doi: 10.1007/s13562-017-0432-8.

48. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Календарь Р. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Одесса: Астропринт, 2011. 336 с.

Приготування реактивів для проведення ДНК-аналізу у кукурудзи
(за Сиволап та ін., 2011)

Для приготування лізуючого **ЦТАБ-буферу** (2%) розчиняють 0,5 г гексадецилтриметиламонію броміду (ЦТАБ) у 10 мл дистильованої води. При поганому розчиненні підігрівають на водяній бані. Додають 2,5 мл **1 М Трис-НCl**, 7 мл **5 М NaCl**, 1 мл **0,5 М Na₂ЕДТА**. Об'єм доводять до 25 мл дистильованою водою. Отриманий розчин зберігають при +4 °С не довше 6 місяців. Допустиме утворення осаду. Перед використанням розчин витримують за кімнатної температури або у термостаті за +60 °С до повного розчинення осаду.

Для приготування **1 М Трис-НCl** у мірну колбу на 100 мл вносять 12,11 г трис(оксиметил)амометана ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) (скорочено – трис) та розчиняють у 80 мл дистильованої води. За допомогою соляної кислоти (HCl) рН доводять до 7,5. Далі об'єм доводять до мітки при перемішуванні.

Для приготування **5 М NaCl** у мірну колбу на 100 мл вносять 29,22 г натрію хлориду (NaCl), розчиняють у 70 мл дистильованої води. Об'єм доводять до мітки.

Для приготування **0,5 М Na₂ЕДТА** у мірну колбу на 100 мл вносять 18,61 г динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (скорочено – Na₂ЕДТА) та розчиняють у 80 мл дистильованої води. Доводять рН до 8,0 за допомогою 30%-го гідроксиду натрію (NaOH). Далі доводять до мітки дистильованою водою.

Для приготування **70%-го етанолу** до 70 мл 96%-го етанолу (C₂H₅OH) додають 26 мл дистильованої води.

Для приготування **ТЕ-буферу** (рН8,0) у мірну колбу на 1000 мл вносять 33,3 мл **3 М Трис-НCl** і 20 мл **0,5 М Na₂ЕДТА**. Об'єм доводять до мітки дистильованою водою.

Для приготування **3 М Трис-НСІ** у мірну колбу на 1000 мл вносять 363,42 г триса, розчиняють у 500 мл дистильованої води, додають 140 мл концентрованої соляної кислоти (НСІ). Об'єм доводять до мітки дистильованою водою.

Для приготування **10хТВЕ-буферу** у мірну колбу на 1000 мл вносять попередньо розчинені у дистильованій воді 108 г триса, 55 г борної кислоти (HBO_3), 0,92 г Na_2EDTA .