

Національна академія аграрних наук України
Інститут зернових культур

Методичні рекомендації з молекулярно-генетичного
тестування селекційного матеріалу кукурудзи на
стійкість до біотичних факторів

Дніпро, 2024

Методичні рекомендації з молекулярно-генетичного тестування селекційного матеріалу кукурудзи на стійкість до біотичних факторів: 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, етапом 2024 року «Розробити теоретичні та методологічні підходи до молекулярно-генетичного маркування стійкості кукурудзи до біотичних факторів»

Автори:

ДЕНИСЮК Катерина, кандидат біологічних наук

Друкується за рішенням Вченої ради ДУ ІЗК НААН (протокол №13 від 22.10.2024 р.)

Представлено методичні рекомендації щодо молекулярно-генетичного підходу до тестування селекційного матеріалу кукурудзи на стійкість до летючої сажки, збудником якої є гриб *Sporisorium reilianum*.

Рекомендації можуть бути використані в біотехнологічних і селекційних дослідженнях генотипів кукурудзи при скринінгу наявного селекційного матеріалу та при створенні нового з метою підвищення ефективності добору генотипів за стійкістю до летючої сажки *S. reilianum*.

ВСТУП

Одним з пріоритетних напрямів сучасних біотехнологічних і селекційних досліджень є створення генотипів кукурудзи, стійких до біотичних факторів. Стійкість рослин кукурудзи до хвороб і шкідників є важливою для отримання високого врожаю з належною якістю зерна. Летюча сажка кукурудзи, поряд з такими хворобами як пухирчаста сажка, фузаріоз, нігроспорооз, сіра гниль та інші є однією з найбільш поширених в Україні (Чернобай, 2020). Недобір урожаю через ураження рослин патогенами може сягати значних цифр. Так, за сильного ураження рослин летючою сажкою, збудником якої є гриб *Sporisorium reilianum*, недобір урожаю зерна кукурудзи може становити 15–20% і більше (Марков, 2020).

Фенотиповий прояв чутливості генотипів кукурудзи до летючої сажки, як і до інших біотичних факторів, залежить від зовнішніх чинників. В залежності від агрокліматичних умов вирощування ступінь ураження рослин патогеном може коливатися, тому актуальним при відборі стійких генотипів є застосування ДНК-технологій, зокрема молекулярно-генетичного тестування.

Стійкість до *S. reilianum* є полігенною ознакою. З літературних джерел відомі певні гени та локуси кукурудзи, пов'язані зі стійкістю до патогену. Це, зокрема, 18 генів-кандидатів, ідентифікованих M. Wang et al. (2012). Гени-кандидати авторами були розподілені на три групи. До першої групи увійшли гени стійкості до ураження *S. reilianum*, так звані R-гени (resistance genes), до другої групи – гени відгуку на ушкодження, до третьої – гени, що кодують білки, домени яких є гомологічними до доменів інших білків резистентності. Серед генів-кандидатів було виявлено кілька генів, кодуючих серин/треонін-протеїнкінази, які беруть участь у відповіді рослин на ушкодження. Також було ідентифіковано ген, що кодує багатий на лейцин білок, який приймає участь у шляхах захисту рослин від патогенів. Гени-кандидати були визначені з використанням панелі SNP-маркерів Illumina MaizeSNP50.

N. Zhang et al. (2017) ідентифікували ген рецепторної кінази *ZmWAK* (*Zea mays* WAK), який також займає важливе місце у стійкості до *S. reilianum* у

кукурудзи. Ген надає кількісну стійкість до летючої сажки. Рецепторна кіназа пов'язана з клітинною стінкою, активно експресується у мезокотиліях. Фермент має цитоплазматичний серин/треонін-кіназний домен, домен епідермального фактору росту, який зв'язує кальцій, і позаклітинний домен, що зв'язує галактуронан. Експресія гена *ZmWAK* залежить від наявності/відсутності інфікування летючою сажкою. Завдяки активній експресії гена *ZmWAK* при інфікуванні *S. reilianum* у стійких генотипів кукурудзи в їхніх уражених клітинах спостерігається апоптоз (стиснення цитоплазми, конденсація хроматину, фрагментація ядра і відбруньковування від клітинної мембрани везикул), що дозволяє ізолювати гіфи в мертвих клітинах. У нестійких генотипів із відсутнім функціональним фрагментом гена при інфікуванні спостерігається аутофагія, яка не може запобігти поширенню гіф збудника по рослині кукурудзи (Zhang et al., 2017). Ген *ZmWAK* знаходиться у локусі *qHSR1* на довгому плечі хромосоми 2 у біні 2.09. Наявність локусу знижує захворюваність летючою сажкою приблизно на 25% (Zuo et al., 2015).

Ще два гени-кандидати стійкості кукурудзи до летючої сажки були ідентифіковані Y. Zhou et al. (2022). Це гени *ZmABP2* і *Zm00001D006403*, які знаходяться у біні 7 хромосоми 2. Перший ген контролює полімеризацію та деполімеризацію актину у відповідь на внутрішньоклітинні та позаклітинні сигнали, при ураженні летючою сажкою контролює детермінацію розвитку меристеми волоті. Другий ген за інфікування *S. reilianum* впливає на фотосинтез і призводить до дисорганоплазії волоті.

Молекулярно-генетичні маркери, пов'язані з локусами стійкості до летючої сажки у кукурудзи, представлені у таблиці 1. Одним з найбільш досліджених локусів стійкості до *S. reilianum* є локус *qHSR1* (*q2.09HR*). Локус розташований на довгому плечі хромосоми 2 у біні 2.09. Розмір *qHSR1* стійких до летючої сажки ліній кукурудзи складає 152 kb у Mo17 та 5 kb у HZ4. Локус *qHSR1* у Mo17 містить гени *ZmWAK*, *ZmHCH*, *ZmTIF*, *ZmXa21-1* та *ZmXa21-2*. Лише ген *ZmWAK* є інтактним у інших стійких до сажки ліній (Zuo et al., 2015, Zhou et al., 2022).

Таблиця 1 – Молекулярно-генетичні маркери, пов'язані з локусами стійкості до летючої сажки у кукурудзи

№ з/п	Положення (хромосома. бін)	Локус стійкості до летючої сажки	Молекулярно-генетичні маркери, пов'язані з локусами стійкості	Літературне джерело
1	2	3	4	5
1	1.02	-	SSR: bnlg1429	Li et al., 2008
2	1.03	<i>qHS1.03</i>	SNP ¹ : PZE-101045549 – A/Г	Weng et al., 2012
3	1.06	-	SSR: umc1590, bnlg1598	Zhou et al., 2022
4	1.09	-	SNP: GRMZM2G015933	Wang et al., 2012
5	1.	<i>qHS1</i>	SSR: bnlg1014 – umc2224	Qiu et al., 2021
6	2.04	-	SNP: GRMZM2G166566	Wang et al., 2012
7	2.07	-	SSR: umc1042, bnlg1335	Zhou et al., 2022
8	2.08-2.09	-	AFLP: P3946135	Li et al., 2008
9	2.09	<i>qHSR1</i>	SSR ² : umc2214, umc2077, umc2184, phi427434, umc1207, bnlg1893, umc1736, bnlg1520 SSR: SSR148152 CAPS: CAPS25082 STS: STS171, STS1944 SNP: SNP661	Chen et al., 2008
10	2.09	-	AFLP: P5138120	Li et al., 2008
11	2.09	<i>qHS2.09</i>	SNP ¹ : PZE-102187486 – II/A, PZE-102187611 – A/Г, PZE-102187687 – A/II, PZA00672.8 – Г/A, PZE-102188421 – A/Г SSR ³ : umc1422, bnlg125, bnlg1064, bnlg1621, bnlg1175, nc131, phi127, bnlg1045, umc2085, bnlg1141, umc1525, SSR148152, STS661, umc1736	Weng et al., 2012
12	2.09	<i>qHSR1</i>	SSR ⁴ : umc1947, umc2202, umc1516, umc1551, umc1525, 2S8, STS661, STS1944, phi101049, umc2214	Zhao et al., 2012
13	2.09	<i>qHSR1</i>	STS: STS1M3, STS3M1	Zuo et al., 2015
14	2.09	<i>q2.09HR (qHSR1)</i>	SNP ¹ : PZA00672.8 - Г/A, PZE-102187385 - II/A, PZE-102187403 - Г/A, PZE-102188421 - A/Г	Li et al., 2015
15	2.09	<i>qHS2.09</i>	dCAPS: LSdSCAP1 – 99/81 п.н., LSdSCAP2 – 93/73 п.н., LSdSCAP3 – 136/122 п.н., LSdSCAP4 – 100/119 п.н., PZE-102188421 (LSdSCAP7-1) – 111/89 п.н., PZE-102188421 (LSdSCAP7-2) – 99/130 п.н. SSR: umc1525, bnlg1893, umc2077	Di et al., 2015
16	3.02	-	SSR: phi029	Li et al., 2008
17	3.05	-	SNP: GRMZM2G094955	Wang et al., 2012
18	4.03	<i>qHS4.03</i>	SNP ¹ : SYNGENTA6546 – A/Г	Weng et al., 2012
19	4.08	-	SNP: GRMZM2G094978	Wang et al., 2012
20	5.03	<i>q5.03HR</i>	SNP ¹ : PZE-105072717 – A/Г	Li et al., 2015

1	2	3	4	5
21	5.05	-	SNP: GRMZM2G410975	Wang et al., 2012
22	6.06	-	SNP: GRMZM2G110894	Wang et al., 2012
23	6.	<i>qHS6</i>	SSR: umc1006, umc1857	Qiu et al., 2021
24	8.02	-	AFLP: P5055140	Li et al., 2008
25	8.05	-	SNP: GRMZM2G172101	Wang et al., 2012
26	9.03	-	SNP: GRMZM2G052507	Wang et al., 2012

¹ – маркери панелі MaizeSNP50 BeadChip;

² – умови проведення ампліфікації з даними праймерами: початкова денатурація – 94°C, 2 хв; наступні 35 циклів: денатурація – 94°C, 30 с, відпал праймеру – 58°C, 30 с, елонгація – 72°C, 30 с; заключна елонгація – 72°C, 10 хв. Розділення продуктів ампліфікації: електрофорез у 6% поліакриламідному гелі, з подальшим фарбуванням сріблом;

³ – умови проведення ампліфікації з даними праймерами: початкова денатурація – 94°C, 4 хв; наступні 35 циклів: денатурація – 94°C, 1 хв, відпал праймеру – 55 або 58°C, 30 с, елонгація – 72°C, 1 хв; остаточна елонгація – 72°C, 7 хв. Розділення продуктів ампліфікації: електрофорез у 10% поліакриламідному гелі за 150 В протягом 2 годин, з подальшим фарбуванням сріблом;

⁴ – умови проведення ампліфікації з даними праймерами: початкова денатурація – 94°C, 3 хв; наступні 35 циклів: денатурація – 94°C, 30 с, відпал праймеру – 60-66°C, 30 с, елонгація – 72°C, 60 с; фінальна елонгація – 72°C, 10 хв. Розділення продуктів ампліфікації: електрофорез у 6% поліакриламідному гелі, з подальшим фарбуванням сріблом;

⁵ – маркери панелі MaizeSNP50 BeadChip.

Похилим шрифтом виділено молекулярно-генетичні маркери, найтісніше пов'язані зі стійкістю до летючої сажки серед інших маркерів, вивчених одними і тими ж дослідниками. Для деяких SNP-маркерів зазначено тип нуклеотиду: А – аденін, Г – гуанін, Ц – цитозин, Т – тимін; сприятливий для стійкості до летючої сажки тип нуклеотиду виділено жирним. Для деяких dCAPS-маркерів наведено розмір продуктів ампліфікації; сприятливий для стійкості до летючої сажки розмір продуктів ампліфікації виділено жирним.

В методичних рекомендаціях представлено інформацію щодо молекулярно-генетичного тестування селекційного матеріалу кукурудзи на стійкість до летючої сажки, збудником якої є гриб *Sporisorium reilianum*. Розробка ґрунтується на використанні специфічних маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК, характерних для стійких до летючої сажки генотипів кукурудзи.

Рекомендації можуть бути використані в біотехнологічних і селекційних дослідженнях генотипів кукурудзи при скринінгу селекційного матеріалу з метою підвищення ефективності добору генотипів за стійкістю до летючої сажки *S. reilianum*.

1. ОПИС МЕТОДУ

В основі розробки лежить задача визначення стійкості генотипів кукурудзи до ураження летючою сажкою *S. reilianum* з використанням аналізу однонуклеотидного поліморфізму ДНК. Існує статистичний асоціативний зв'язок між алельним станом двох SNP-маркерів панелі BDI-III та фенотиповим проявом стійкості до патогену.

Для визначення SNP-маркерів, які статистично пов'язанні зі стійкістю до летючої сажки, лінії кукурудзи були розділені на дві групи за ознакою стійкості до патогену. Вихідною групою вважалася група чутливих до ураження *S. reilianum* ліній, а похідною групою – група стійких до ураження цим патогеном ліній. В таблиці 2 представлені частоти SNP-алелів у груп ліній кукурудзи із різною чутливістю до сажки. Маркери в таблиці ранжовані за величиною D – різницею між частотою мажорного алеля для кожного SNP-маркера у вихідній групі ліній та частотою однойменного алеля того самого маркера у похідній групі – від більшого до меншого значення. Наведені дані для перших дев'ятнадцяти значень D (від 0,8 до 1,0). Для оцінки вірогідності даних був використаний метод Fisher's Exact Probability Test (Ewens, Brumberg, 2023).

Значення Fisher's Exact Probability Test на рівні менше 0,05 задовольняли два з наведених у таблиці SNP-маркери зі значенням D=1. Це SNP-маркери BDI-III-270 і BDI-III-292. Тобто для цих маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК існує статистично значущий асоціативний зв'язок між типом нуклеотиду, характерного для даних маркерів, і фенотиповим проявом стійкості до летючої сажки кукурудзи *S. reilianum*.

Таким чином, для ліній кукурудзи, стійких до летючої сажки *S. reilianum*, характерний наступний алельний стан маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК панелі BDI-III: **BDI-III-270Ц, BDI-III-292А**. Для ліній, схильних до ураження летючою сажкою, властивий такий алельний стан SNP-маркерів панелі BDI-III: BDI-III-270А, BDI-III-292Г.

Таблиця 2 – Частоти SNP-алелів у груп ліній кукурудзи із різною чутливістю до сажки

SNP-маркер*	Положення SNP-маркера (Хромосома. Бін)	Частота мажорного алеля у групі ліній InbS	Частота алеля, який є мажорним у групі InbS, у групі InbR	D	P
270АЦ	7.03	A=1,0±0,0	A=0,0±0,0	1,0	0,047619
292АГ	8.02	Г=1,0±0,0	Г=0,0±0,0	1,0	0,047619
65АТ	2.03	T=1,0±0,0	T=0,0±0,0	1,0	0,066667
51АЦ	2.01	Ц=1,0±0,0	Ц=0,2±0,4	0,8	0,142857
81АГ	2.06	Г=1,0±0,0	Г=0,2±0,4	0,8	0,142857
82АГ	2.06	Г=1,0±0,0	Г=0,2±0,4	0,8	0,142857
86АГ	2.07	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
169АГ	4.09	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
202АЦ	5.03	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
203АЦ	5.03	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
210АГ	5.04	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
370ГЦ	7.09	Г=1,0±0,0	Г=0,2±0,4	0,8	0,142857
291АЦ	8.02	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
299АЦ	8.04	Ц=1,0±0,0	Ц=0,2±0,4	0,8	0,142857
300АГ	8.04	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
313АГ	8.08	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
315АГ	8.08	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
319АГ	9.01	A=1,0±0,0	A=0,2±0,4	0,8	0,142857
320ГЦ	9.01	Ц=1,0±0,0	Ц=0,2±0,4	0,8	0,142857

*Представлено номер SNP-маркера панелі BDI-III та його альтернативні алелі; назви дезоксирибонуклеотидів подано за скороченими назвами азотистих основ: А – аденін, Т – тимін, Г – гуанін, Ц – цитозин. InbS – група чутливих до летючої сажки ліній кукурудзи, кількість досліджених ліній – 2; InbR – група стійких до летючої сажки ліній кукурудзи, кількість досліджених ліній – 5. D – різниця між частотою мажорного алеля для кожного SNP маркера у вихідній групі ліній та частотою однойменного алеля того самого маркера у похідній групі. P – вірогідність за Fisher's Exact Probability Test

2. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Виділення ДНК з рослинного матеріалу. Для кожної досліджуваної лінії за методом середньої проби відбирають по 10 насінин. Для гібридів і популяцій виділення ДНК проводять з індивідуальних рослин. Насінини пророщують на фільтрувальному папері при температурі 26°C у темряві. З отриманих семи-добових пагонів виділяють ДНК за ЦТАБ-методом (Murray, Thompson, 1980). Концентрацію виділеної ДНК доводять до 50 нг/мкл.

SNP-генотипування. Для визначення алельного стану SNP-маркерів проводять аналіз одонуклеотидного поліморфізму ДНК у генотипів кукурудзи з використанням панелі BDI-III. Дана панель розроблена фірмою BioDiagnostics, Inc. (США) на основі Illumina VeraCode Bead Plate (Biodiagnostics, Inc. www.biodiagnostics.net), містить 384 SNP-маркери. Маркери даної панелі були обрані *in silico* за результатами аналізу 95 комерційних інбредних ліній селекції США, є біалельними, розташовуються на всіх 10 хромосомах і мають ранг конструктивності (designability rank score) >0,6 при можливому діапазоні 0–1 (Venkatramana et al., 2012). Ранг конструктивності >0,6 забезпечує ефективне використання SNP-маркерів в GoldenGate тестуванні. SNP-маркери панелі BDI-III позначаються як BDI-III-1, BDI-III-10, BDI-III-100, BDI-III-101, BDI-III-102, ... BDI-III-99.

Аналіз одонуклеотидного поліморфізму ДНК за SNP-маркерами проводиться з використанням GoldenGate тесту та системи зчитування результатів Illumina VeraCode (Fan et al., 2006, illumina GolGate® Genotyping Assay for VeraCode® Manual Protocol, illumina®: <http://www.illumina.com>, Venkatramana et al., 2012) на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (США).

Виділену ДНК (5 мкл) наносять на матрицю Sentrix array matrice (SAM) ємністю у 96 зразків, з яких 94 представляють собою ДНК досліджуваних генотипів, 2 – негативний контроль (вода). SNP-генотипування зразків ДНК, закріплених на матриці SAM, з використанням GoldenGate тесту проводять в повністю автоматизованому режимі на обладнанні Illumina BeadStation 500 G (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), укомплектованому пристроєм BeadReader

для зчитування результатів детекції однонуклеотидного поліморфізму з використанням флуоресцентних міток. Аналіз результатів флюоресценції ведуть за допомогою Illumina BeadStation Genome Studio Software. SNP-генотипування та визначення сигналу флюоресценції для кожного генотипу проводять у 30-разовій повторності по кожному маркеру. Детекція флюоресценції нижче 0,25 не враховується і розглядається як відсутність сигналу.

3. ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дані SNP-генотипування для кожного генотипу по кожному маркеру представляються як запис двох дезоксирибонуклеотидів, тобто вказується тип дезоксирибонуклеотиду в кожному з двох гомологічних сайтів гомологічних хромосом, де розташований SNP-маркер. У проаналізованих зразках кукурудзи необхідно визначити тип дезоксирибонуклеотиду за маркерами BDI-III-270 і BDI-III-292, для яких встановлено асоціативний зв'язок зі стійкістю до летючої сажки у зразках кукурудзи. Якщо алельний стан маркерів BDI-III-270Ц і BDI-III-292А, то з високою вірогідністю даний генотип кукурудзи буде стійким до *S. reilianum*, а якщо А і Г, відповідно, то з високою вірогідністю даний генотип буде схильний до ураження летючою сажкою.

Представлений молекулярно-генетичний підхід до тестування селекційного матеріалу кукурудзи на стійкість до летючої сажки рекомендовано використовувати в біотехнологічних і селекційних дослідженнях генотипів кукурудзи при скринінгу наявного селекційного матеріалу та при створенні нового з метою підвищення ефективності добору генотипів за стійкістю до летючої сажки *S. reilianum*.

Список використаних джерел

1. Марков І. Сажкові хвороби кукурудзи. Агробізнес сьогодні. 05.05.2020. URL: <https://agro-business.com.ua/agro/ahronomiia-sohodni/item/17407-sazhkovi-khvoroby-kukurudzy.html>.
2. Чернобай Л. М. Хвороби кукурудзи та причини їх виникнення. Агробізнес сьогодні.. 25.08.2020. URL: <https://agro-business.com.ua/agro/ahronomiia-sohodni/item/18554-khvoroby-kukurudzy-ta-prychyny-ikh-vynyknennia.html>.
3. Biodiagnostics, Inc. URL: www.biodiagnostics.net.
4. Chen, Y., Chao, Q., Tan, G. et al. Identification and fine-mapping of a major QTL conferring resistance against head smut in maize. Theor Appl Genet. 2008. 117. 1241–1252. doi: 10.1007/s00122-008-0858-4.
5. Di H., Liu X., Wang Q. et al. Development of SNP-based dCAPS markers linked to major head smut resistance quantitative trait locus qHS2.09 in maize. Euphytica. 2015. 202. 69–79. doi: 10.1007/s10681-014-1219-9.
6. Ewens W. J., Brumberg K. Introductory Statistics for Data Analysis. Springer Cham. 2023. 273. doi:10.1007/978-3-031-28189-1
7. Fan J. B., Gunderson K. L., Bibikova M. et al. Illumina universal bead arrays. Methods Enzymol. 2006. 410. 57–73. doi: 10.1016/S0076-6879(06)10003-8.
8. illumina GolGate® Genotyping Assay for VeraCode® Manual Protocol. URL: http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/5cdc02d3-024d-43b5-b1aa8e22390fa5a/goldengate_gt_for_veracode_man_euc_11312755_reva.pdf.
9. illumina®. URL: <http://www.illumina.com>.
10. Li X. H., Wang Z. H., Gao S. R. et al. Analysis of QTL for resistance to head smut (*Sporisorium reilianum*) in maize. Field Crops Research. 2008. 106 (2). 148–155. doi: 10.1016/j.fcr.2007.11.008.
11. Li Y. X., Wu X., Jaqueth J. et al. The identification of two head smut resistance-related QTL in maize by the joint approach of linkage mapping and association analysis. PLoS One. 2015. 10(12). e0145549. doi: 10.1371/journal.pone.0145549.

12. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980. 8(19). 4321–4326. doi: 10.1093/nar/8.19.4321.
13. Qiu H., Tan K., Li C. et al. Identification of QTL for resistance to head smut in maize (*Zea mays* L). *Euphytica*. 2021. 217. 185. doi: 10.1007/s10681-021-02916-7.
14. Venkatramana P., Carlson C., Blackstad M. et al. Development and characterization of single nucleotide polymorphism (SNP) panel for marker assisted backcrossing in corn. *Seed Technology*. 2010. 32(2). 153–154.
15. Wang M., Yan J., Zhao J. et al. Genome-wide association study (GWAS) of resistance to head smut in maize. *Plant Sci*. 2012. 196. 125–31. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.08.004.
16. Weng J., Liu X., Wang Z. et al. Molecular mapping of the major resistance quantitative trait locus *qHS2.09* with simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism markers in maize. *Phytopathology*. 2012. 102(7). 692–699. doi: 10.1094/PHYTO-12-11-0330.
17. Zhang N., Zhang B., Zuo W. et al. Cytological and molecular characterization of *ZmWAK*-mediated head-smut resistance in maize. *IS-MPMI*. 2017. 30(6). 455–465. doi: 10.1094/MPMI-11-16-0238-R.
18. Zhao X., Tan G., Xing Y. et al. Marker-assisted introgression of *qHSR1* to improve maize resistance to head smut. *Mol Breeding*. 2012. 30. 1077–1088. doi: 10.1007/s11032-011-9694-3.
19. Zhou Y., Yao M., Wang Q. et al. Analysis of QTLs and candidate genes for tassel symptoms in maize infected with *Sporisorium reilianum*. *Int J Mol Sci*. 2022. 23(22). 14416. doi: 10.3390/ijms232214416.
20. Zuo W., Chao Q., Zhang N. et al. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. *Nat Genet*. 2015. 47. 151–157. doi: 10.1038/ng.3170.