

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ОЦІНКА СЕЛЕКЦІЙНОГО
МАТЕРІАЛУ КУКУРУДЗИ (*ZEA MAYS L.*) ЗА МАРКЕРАМИ
ПОСУХОСТІЙКОСТІ ТА ВМІСТУ КАРОТИНОЇДІВ**

Кваліфікаційна робота бакалавра

денної форми навчання

за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Ілюченко Аліни Олександрівни

Науковий керівник від кафедри

канд. біол. наук, ст. досл. Нужина Н.В.

Робота виконана у лабораторії молекулярно-генетичного аналізу Українського інституту експертизи сортів рослин під керівництвом заступника директора з наукової роботи, старшого дослідника, канд. с.-г. наук, Присяжнюк Лариси Михайлівни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. Молекулярно-генетичні підходи до оцінки селекційного матеріалу кукурудзи	5
1.1. Кукурудза як стратегічна зернова культура та об'єкт сучасної селекції ...	5
1.2. Молекулярні основи добору кукурудзи на посухостійкість	8
1.3. Роль гена crtRB1 у накопиченні β -каротину у зерні кукурудзи.....	13
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	17
2.1. Характеристика рослинного матеріалу.....	17
2.2. Реактиви, витратні матеріали та обладнання	17
2.3. Екстракція ДНК та підготовка зразків до полімеразної ланцюгової реакції	19
2.4. Підбір функціональних ДНК-маркерів.....	20
2.5. Генотипування за функціональними маркерами посухостійкості.....	21
2.6. Генотипування за маркером crtRB1-3'TE	23
2.7. Електрофоретичне розділення ампліконів та цифровий аналіз електрофореграм	24
2.8. Обробка результатів та інтегрована оцінка селекційного матеріалу	26
РОЗДІЛ 3. Результати дослідження та обговорення	28
3.1. Результати скринінгу алелів посухостійкості у селекційному матеріалі.	28
3.2. Генотипування зразків за алелями гена crtRB1	35
3.3. Інтегрована оцінка генотипів та розробка підходу до оцінки селекційного матеріалу кукурудзи	39
ВИСНОВКИ	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	455

ВСТУП

Кукурудза (*Zea mays* L.) є однією з основних продовольчих, кормових і технічних культур у світовому та вітчизняному сільському господарстві. Сучасна селекція цієї культури спрямована не лише на підвищення врожайності, а й на створення генотипів, здатних зберігати продуктивність за дії абіотичних стресів та формувати зерно з покращеними якісними показниками. Особливого значення набуває добір матеріалу, стійкого до посухи, оскільки дефіцит вологи та підвищення температури під час критичних фаз розвитку істотно знижують урожайність кукурудзи. Паралельно зростає інтерес до біофортificaції зерна каротиноїдами, насамперед β -каротином, який є попередником вітаміну А і визначає харчову цінність зерна.

Традиційна оцінка посухостійкості та вмісту каротиноїдів потребує тривалих фенотипових випробувань і спеціалізованих біохімічних аналізів, а її результати можуть залежати від умов середовища, фази розвитку рослин та року вирощування. У зв'язку з цим застосування функціональних ДНК-маркерів є перспективним інструментом попередньої оцінки селекційного матеріалу. У даній роботі для виявлення алелів, асоційованих із посухостійкістю, використано CAPS-маркери *dhnC397* та *rspC1090*, пов'язані відповідно з генами *dhn1* і *rsp41*, а для оцінки потенціалу накопичення β -каротину – маркер *crtRB1-3'TE*, що характеризує алельний стан гена β -каротин гідроксилази 1.

Актуальність роботи зумовлена необхідністю молекулярно-генетичної характеристики нових ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер, отриманих шляхом самозапилення вихідних схрещувань. Ці лінії становлять потенційно цінний матеріал для програм на гетерозис, посухостійкість, жаростійкість, покращення якості білка і підвищення вмісту каротиноїдів у зерні, тому встановлення наявності функціональних алелів, пов'язаних із

посухостійкістю та каротиноїдним складом, є важливим етапом їх попередньої селекційної оцінки.

Метою дослідження було виявити за допомогою функціональних ДНК-маркерів, асоційованих зі стійкістю до посухи та вмістом каротиноїдів у зерні, перспективні генотипи кукурудзи (*Zea mays L.*) для подальшої селекційної роботи.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. визначити алельні стани генів *dhn1*, *rsp41* та *crtRB1* у 30 досліджуваних лініях кукурудзи;
2. проаналізувати досліджувані 30 ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за функціональними маркерами посухостійкості *dhnC397* та *rspC1090*;
3. генотипувати зразки селекційного матеріалу за алелями гена *crtRB1-3'TE*;
4. здійснити узагальнену оцінку отриманих результатів і виділити генотипи, перспективні для використання в селекційних програмах, спрямованих на підвищення адаптивності та каротиноїдної цінності зерна.

Наукова новизна дослідження полягає у застосуванні функціональних ДНК-маркерів для характеристики нових або недостатньо вивчених ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за ознаками, пов'язаними з посухостійкістю та накопиченням β -каротину. Практичне значення полягає у можливості використання отриманих результатів для відбору перспективних ліній кукурудзи як джерел цінних алелів у програмах селекції на адаптивність до посухи та підвищення вмісту каротиноїдів у зерні.

РОЗДІЛ 1

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ПІДХОДИ ДО ОЦІНКИ СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ КУКУРУДЗИ

1.1. Кукурудза як стратегічна зернова культура та об'єкт сучасної селекції

Кукурудза (*Zea mays L.*) – одна з основних продовольчих культур, яку вирощують у більш як 150 країнах світу на загальній площі близько 187 млн гектарів, валовий збір зерна становить 1 млрд 138 тон. Кукурудза має комплексне господарське значення, оскільки використовується не лише як продовольча зернова культура, а й як одна з основних кормових культур для тваринництва та важлива сировина для переробної промисловості. Її зерно застосовують у виробництві крохмалю, патоки, спирту, біоетанолу та інших продуктів, що зумовлює стабільно високий попит на цю культуру. Водночас кукурудза є зручним об'єктом для генетичних і селекційних досліджень, оскільки для неї розроблено значну кількість молекулярних маркерів, геномних ресурсів і методів оцінки спадкової мінливості. Саме тому в сучасному аграрному виробництві кукурудза розглядається як одна з провідних культур, підвищення продуктивності та адаптивності якої має важливе значення для продовольчої безпеки, розвитку тваринництва й переробних галузей [1]. Саме тому оцінка селекційного матеріалу кукурудзи не може зводитися лише до опису окремих морфологічних ознак або до результатів польового випробування в одному середовищі. Для цієї культури особливо важливим стає поєднання продуктивності, адаптивності, генетичної різноманітності та якості зерна, що формує комплексний характер сучасної селекції.

Для України кукурудза має особливе значення як високопродуктивна зернова культура, що займає вагоме місце у структурі експорту й у

внутрішньому забезпеченні кормової бази. Водночас її вирощування стає дедалі більш залежним від кліматичних ризиків. Коливання кількості опадів, нерівномірність їхнього розподілу протягом вегетації, підвищення температури в критичні фази розвитку й частіші періоди ґрунтової та атмосферної посухи призводять до того, що традиційна оцінка генотипів лише за врожайністю в сприятливі роки втрачає достатню прогностичну цінність. Селекційний матеріал, який є перспективним у сучасних умовах, повинен характеризуватися не лише високим потенціалом продуктивності, а й здатністю підтримувати стабільність розвитку за дії водного дефіциту. У цьому контексті особливої ваги набувають молекулярні методи, які дають змогу оцінювати генотип на рівні спадкової інформації ще до завершення повного циклу фенотипового випробування [2, 3].

Біологічні особливості кукурудзи визначають як її селекційні переваги, так і методичні труднощі. Культура є перехреснозапильною, має виражений гетерозисний потенціал і характеризується високою генетичною мінливістю, що забезпечує широку основу для добору батьківських форм. Проте ця сама мінливість ускладнює прогнозування селекційної цінності окремих ліній, особливо коли йдеться про складні кількісні ознаки. Посухостійкість, врожайність, тривалість вегетаційного періоду, вміст біологічно активних речовин у зерні та здатність до формування продуктивного гібрида визначаються взаємодією багатьох генів і середовищних чинників. Тому для сучасної селекції кукурудзи принципово важливо не лише виявити наявність бажаного алеля, а й зрозуміти, у якому генетичному фоні він перебуває, наскільки досліджувані лінії споріднені між собою та чи можуть вони бути використані як контрастні батьківські форми для подальших схрещувань [4].

У класичній селекції оцінка вихідного матеріалу ґрунтується на багаторазових польових випробуваннях, аналізі родоводів, морфологічних спостереженнях, визначенні комбінаційної здатності й доборі за господарсько цінними ознаками. Такий підхід залишається незамінним, оскільки саме фенотип у конкретних умовах вирощування визначає практичну цінність

генотипу. Однак він є тривалим, трудомістким і чутливим до умов року. Крім того, деякі ознаки, зокрема пов'язані з якісним складом зерна або реакцією на стрес, можуть проявлятися нестабільно або вимагати спеціальних лабораторних методів для точного визначення. Застосування ДНК-маркерів не замінює польової селекційної оцінки, але дозволяє сформувати попередню молекулярну характеристику матеріалу, зменшити кількість генотипів для поглибленого випробування, виявити носіїв цінних алелів і уникнути використання надмірно споріднених форм у схрещуваннях [5-7].

Сучасна селекція кукурудзи дедалі частіше орієнтується на одночасне поліпшення кількох груп ознак. З одного боку, пріоритетними залишаються адаптивність, стійкість до абіотичних і біотичних стресів, стабільність урожайності та придатність до інтенсивних технологій вирощування. З іншого боку, зростає інтерес до якості зерна, зокрема до вмісту каротиноїдів, амінокислот, олії, крохмалю та інших компонентів, що визначають харчову й кормову цінність [8]. Для кукурудзи проблема біофортифікації є особливо актуальною, оскільки жовтозерні форми здатні накопичувати каротиноїдні пігменти, серед яких β -каротин має значення як попередник вітаміну А. Отже, селекційний матеріал, який поєднує ознаки адаптивності та підвищеної поживної цінності, становить підвищений інтерес для подальшого створення гібридів нового типу [9, 10].

У межах такої селекційної логіки важливо розрізняти два взаємопов'язані напрями функціональної оцінки матеріалу. Перший напрям стосується виявлення алельних станів генів, пов'язаних із реакцією рослин на водний дефіцит, зокрема *dhn1* і *rsp41*. Другий напрям пов'язаний з оцінкою гена *crtRB1*, що впливає на накопичення β -каротину в зерні. У роботі з кукурудзою ці напрями не є взаємозамінними: лінія може мати бажані алелі посухостійкості, але не нести сприятливого варіанта *crtRB1*, або навпаки. Саме тому інтегрований підхід, який поєднує функціональні маркери посухостійкості та каротиноїдного складу зерна, має чітке методологічне обґрунтування [11].

Кукурудза також є культурою з добре вивченим геномом, розвиненими генетичними ресурсами та значною кількістю доступних ДНК-маркерів. Це створює сприятливі умови для впровадження маркер-асоційованого добору у практику навіть тоді, коли лабораторія не має доступу до високопродуктивного секвенування. ПЛР-орієнтовані маркерні системи, зокрема CAPS- та InDel-маркери, залишаються придатними для прикладних досліджень, оскільки вони відносно дешеві, технологічно зрозумілі, не потребують складної біоінформатичної інфраструктури й можуть бути застосовані до обмеженої панелі селекційних зразків [12].

Таким чином, кукурудза є зручним і водночас складним об'єктом сучасної селекції. Її стратегічне значення зумовлене масштабом виробництва, багатофункціональністю використання та високим потенціалом генетичного поліпшення. Складність полягає в тому, що найважливіші для практики ознаки мають полігенну природу й істотно залежать від умов середовища. Тому теоретичне підґрунтя цієї роботи полягає в переході від ізольованого опису окремих маркерів до системної функціональної оцінки селекційного матеріалу. Така оцінка повинна враховувати наявність цільових алелів посухостійкості, алельний стан гена *crtRB1*, пов'язаного з накопиченням β -каротину, а також можливість подальшого використання одержаної інформації для селекційного ранжування генотипів.

1.2. Молекулярні основи добору кукурудзи на посухостійкість

Посухостійкість кукурудзи є складною інтегральною ознакою, яка формується внаслідок взаємодії морфологічних, фізіологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних механізмів. На відміну від моногенних ознак, стійкість до водного дефіциту не може бути повністю пояснена дією одного гена або одного метаболічного шляху. Вона включає здатність рослини уникати надмірної втрати води, підтримувати клітинний тургор, зберігати

фотосинтетичну активність, захищати білки й мембрани від пошкодження, регулювати розвиток кореневої системи та відновлювати ріст після припинення стресу. У кукурудзи особливо критичними є періоди перед цвітінням, під час цвітіння та на ранніх етапах формування зернівки, оскільки дефіцит вологи у цей час порушує репродуктивні процеси й знижує ефективність запилення [3,13].

Молекулярна відповідь рослин на посуху починається зі сприйняття водного дефіциту і запуску сигнальних каскадів. Одним із центральних регуляторів є абсцизова кислота, рівень якої підвищується за умов дегідратації і впливає на закривання продихів, експресію стрес-індукованих генів та зміну метаболічного стану клітин. Паралельно активуються кальцієві сигнали, фосфорилування білків, регуляція транскрипційними факторами, перебудова антиоксидантної системи та накопичення осмопротекторів. Важливо, що ці реакції не ізольовані: вони формують мережу, у якій одні й ті самі гени можуть брати участь у відповіді на посуху, сольовий стрес, високі температури та окисне пошкодження [3, 14]. Саме тому молекулярна селекція на посухостійкість повинна враховувати не тільки окремі маркери, а й комплексність механізмів адаптації.

Одним із найбільш вивчених класів білків, пов'язаних із відповіддю на дегідратацію, є дегідрини. Вони належать до білків пізнього ембріогенезу, або LEA-білків, і характеризуються високою гідрофільністю, термостабільністю та здатністю захищати макромолекули й клітинні структури за умов втрати води. Дегідрини можуть стабілізувати мембрани, білкові комплекси та цитоскелетні структури, знижувати наслідки окисного стресу й сприяти виживанню клітин при зневодненні [15-17]. У кукурудзи ген *dhn1* кодує дегідрин і розглядається як один із кандидатних генів, асоційованих із відповіддю на посуху. Наявність певних алельних варіантів цього гена може впливати на ефективність захисної реакції рослин і тому становить інтерес для функціонального маркерного аналізу.

Іншим напрямом регуляції стресової відповіді є контроль процесингу пре-мРНК і альтернативного сплайсингу. Білки, багаті на аргінін і серин, відомі як SR-білки, беруть участь у розпізнаванні сайтів сплайсингу та формуванні зрілих транскриптів. За умов стресу альтернативний сплайсинг може швидко змінювати набір ізоформ білків без необхідності повної перебудови геному або тривалих змін транскрипції. Це дає рослині можливість гнучко реагувати на зовнішні чинники. Ген *rsp41*, що кодує фактор сплайсингу, багатий на аргінін/серин, пов'язується із молекулярною відповіддю кукурудзи на посуху; тому поліморфізм у його послідовності також може використовуватися для скринінгу селекційного матеріалу [18, 19].

З практичного погляду використання генів *dhn1* і *rsp41* як об'єктів функціонального маркерного аналізу є обґрунтованим, оскільки вони представляють два різні рівні реакції на водний дефіцит. *Dhn1* пов'язаний переважно із захистом клітинних структур від наслідків дегідратації, тоді як *rsp41* відображає регуляторний рівень, пов'язаний із посттранскрипційною обробкою РНК. Поєднання маркерів, що охоплюють різні механізми стійкості, підвищує інформативність скринінгу порівняно з аналізом лише одного локусу. Водночас слід підкреслити, що жоден із цих маркерів не може повністю характеризувати посухостійкість генотипу, оскільки польова стійкість залежить від великої кількості генів, морфологічних ознак і умов середовища.

Для ідентифікації алельних станів генів *dhn1* та *rsp41* можуть застосовуватися CAPS-маркери. CAPS-підхід ґрунтується на ампліфікації ділянки ДНК, яка містить поліморфний нуклеотид, та подальшому рестрикційному аналізі ПЛР-продукту. Якщо SNP створює або руйнує сайт рестрикції, після обробки відповідним ферментом утворюються фрагменти різної довжини, які можна виявити методом електрофорезу. Перевага CAPS-маркерів полягає у технологічній простоті та можливості використання стандартного лабораторного обладнання, а недоліком є потреба у додатковому етапі рестрикції та залежність від повноти ферментативного розщеплення. Для

прикладних лабораторій CAPS-аналіз є зручним способом переведення SNP-поліморфізму у видимий електрофоретичний профіль.

У випадку гена *dhn1* поліморфізм A/G може бути виявлений за допомогою маркера *dhnC397*. Ампліфікована ділянка містить варіант послідовності, у якому один алель не піддається розщепленню відповідною рестриктазою і проявляється як фрагмент довжиною 164 п.н., тоді як інший алель після рестрикції формує коротші фрагменти. За літературними даними, нерозщеплений варіант, пов'язаний із послідовністю CCAAG, розглядається як сприятливий щодо посухостійкості, тоді як варіант CCAAGG супроводжується появою сайту рестрикції [13]. Для гена *rsp41* аналогічний принцип реалізується через маркер *rspC1090*: наявність сайту рестрикції *HpaII/MspI* призводить до утворення фрагментів 225 і 61 п.н., що пов'язують із бажаним алельним станом, тоді як фрагмент 286 п.н. відповідає нерозщепленому варіанту.

Інтерпретація таких маркерів потребує обережності, оскільки електрофоретичний профіль може бути ускладнений неповною рестрикцією, неспецифічною ампліфікацією або наявністю близьких послідовностей у геномі. Кукурудза має велику частку повторюваних елементів і численні родини генів, тому у деяких випадках ампліфікація може супроводжуватися появою додаткових фрагментів. Це не зменшує цінності маркерів, але вимагає використання контрольних зразків, оптимізації умов ПЛР, коректного вибору маркера молекулярної маси та чітких критеріїв інтерпретації. У селекційному аналізі важливо враховувати не лише факт появи смуг, а й їх відповідність очікуваним розмірам, інтенсивність і відтворюваність у повторних реакціях.

Порівняно з фенотиповою оцінкою посухостійкості молекулярний скринінг має низку переваг. Він може проводитися на ранніх етапах розвитку рослин, не потребує створення контрольованих стресових умов і дозволяє швидко проаналізувати значну кількість ліній. Це особливо важливо для попередньої оцінки нового селекційного матеріалу, коли потрібно визначити, які генотипи доцільно залишити для подальших польових випробувань. Однак

молекулярні маркери не повинні розглядатися як повна заміна фенотипування. Найбільш обґрунтованим є поєднання маркерного скринінгу з польовими та лабораторними показниками стійкості, оскільки тільки така комбінація дозволяє встановити реальну селекційну цінність алельних варіантів у конкретному генетичному фоні.

Для досліджуваних ліній кукурудзи, які створювалися як потенційно цінний матеріал для подальшої селекційної роботи, аналіз маркерів *dhn1* і *rsp41* має подвійне значення. По-перше, він дозволяє встановити, чи присутні у генотипах алелі, які за літературними даними пов'язані з посухостійкістю. По-друге, він створює підґрунтя для інтегрованої оцінки ліній разом із маркером *crtRB1*, що характеризує потенціал накопичення β -каротину. Якщо лінія поєднує сприятливі алелі за двома маркерами посухостійкості, вона може бути виділена як пріоритетна для подальшого тестування в умовах водного дефіциту. Якщо така лінія додатково має сприятливий алель *crtRB1*, її селекційна цінність зростає в контексті поєднання адаптивності та підвищеної каротиноїдної цінності зерна.

Таким чином, молекулярні основи добору кукурудзи на посухостійкість базуються на розумінні багаторівневої відповіді рослин на водний дефіцит. Гени *dhn1* та *rsp41* не вичерпують усієї генетичної природи ознаки, але є зручними кандидатними локусами для функціонального скринінгу, оскільки пов'язані з важливими механізмами клітинного захисту й регуляції експресії генів. Їх використання у поєднанні з іншими маркерами дає змогу не встановити остаточний рівень посухостійкості, а сформуванню науково обґрунтовану попередню характеристику селекційного матеріалу та визначити лінії, перспективні для подальших досліджень.

1.3. Роль гена crtRB1 у накопиченні β -каротину у зерні кукурудзи

Каротиноїди є групою ізопреноїдних пігментів, які виконують важливі функції в рослинах і мають значення для харчової цінності зерна. У фотосинтезуючих тканинах вони беруть участь у поглинанні світла, захисті фотосистем від надлишкової енергії та знешкодженні активних форм кисню. У зерні кукурудзи каротиноїди накопичуються переважно в ендоспермі, визначаючи жовте або помаранчеве забарвлення зернівки. Для людини особливе значення мають провітамін-А каротиноїди, передусім β -каротин, α -каротин і β -криптоксантин, які можуть перетворюватися на ретинол. Оскільки дефіцит вітаміну А залишається актуальною проблемою для населення багатьох країн, створення ліній і гібридів кукурудзи з підвищеним вмістом провітамін-А каротиноїдів набуває важливого селекційного значення. Такий напрям дозволяє поєднати підвищення харчової цінності зерна з практичними завданнями сучасного рослинництва, спрямованими на отримання продуктивних і водночас біологічно цінних генотипів [18, 19].

Біосинтез каротиноїдів у кукурудзі є багатоступеневим процесом, який починається з утворення фітоєну і далі включає десатурацію, ізомеризацію, циклізацію та гідроксилювання. Ключовими ферментами, що впливають на розподіл потоку метаболітів, є фітоенсинтаза, лікопен- ϵ -циклаза, лікопен- β -циклаза та β -каротин-гідроксилази. Ген *lcyE* впливає на баланс між α - і β -гілками каротиноїдного шляху, тоді як *crtRB1* кодує β -каротин-гідроксилазу 1, яка перетворює β -каротин у більш гідроксильовані похідні. Тому зниження активності *crtRB1* може сприяти накопиченню β -каротину, оскільки уповільнює його подальше перетворення [18, 20, 22].

Ген *crtRB1* є одним із найбільш значущих генетичних факторів, пов'язаних із природною варіацією вмісту β -каротину в зерні кукурудзи. Дослідження природного поліморфізму цього гена показали, що певні алельні варіанти асоційовані з підвищеним накопиченням β -каротину. Особливу увагу привернув поліморфізм у 3'-ділянці гена, який може бути виявлений за

допомогою маркера crtRB1-3'TE. За цим маркером описано кілька алельних станів, що відрізняються розмірами ампліфікованих фрагментів: 543 п.н., 296+875 п.н. та 296+1221+1880 п.н. Алель 543 п.н. вважається сприятливим для підвищеного вмісту β -каротину, тоді як інші варіанти пов'язують із нижчим рівнем накопичення цієї сполуки [18, 19].

Молекулярний маркер crtRB1-3'TE широко використовується у програмах маркер-асоційованого добору, спрямованих на біофортificaцію кукурудзи провітаміном А. Його практична цінність полягає у тому, що генотипування можна проводити на ранніх етапах розвитку рослин або навіть на насіннєвому матеріалі, не очікуючи формування зерна і не виконуючи складного хроматографічного аналізу каротиноїдів для кожного зразка. У селекційних схемах цей маркер застосовували для інтрогресії сприятливого алеля у якісні білкові лінії кукурудзи та для відбору генотипів із підвищеним потенціалом накопичення β -каротину [22, 24, 25]. Саме тому аналіз crtRB1 є доцільним компонентом комплексної оцінки ліній, які планується використовувати не лише для підвищення продуктивності, а й для покращення харчової цінності зерна.

Водночас біофортificaція каротиноїдами не може бути зведена до одного маркера. Реальний вміст β -каротину залежить від взаємодії кількох генів каротиноїдного шляху, активності ферментів, стабільності сполук під час досягання і зберігання зерна, а також від генетичного фону. Наприклад, варіації *lcyE* можуть змінювати співвідношення між α - і β -каротиноїдами, а інші ферменти впливають на загальний пул попередників і кінцевих продуктів. Крім того, важливими є механізми депонування каротиноїдів у хромопластах і білково-ліпідному середовищі ендосперму. Тому маркер crtRB1-3'TE слід розглядати як високозначущий, але не єдиний індикатор біофортificaційного потенціалу генотипу [20, 21, 28].

З погляду селекції важливо також враховувати можливий зв'язок між якісними ознаками зерна та іншими селекційними характеристиками. Підвищення вмісту каротиноїдів має бути сумісним із продуктивністю,

адаптивністю, стійкістю до стресів, якістю білку та технологічними властивостями зерна. Якщо лінія має сприятливий алель *crtRB1*, але поступається за агрономічною цінністю або погано комбінується з іншими лініями, її використання може бути обмеженим. Натомість навіть один генотип із бажаним алельним станом може бути важливим донором у селекційній програмі, якщо його алель можна перенести у продуктивніші або адаптивніші генетичні фони шляхом схрещування і маркерного контролю. Саме таку логіку застосовують у маркер-асоційованій інтрогресії цільових алелів [22].

Для досліджуваного селекційного матеріалу аналіз *crtRB1* має особливе значення, оскільки лінії створювалися з перспективою подальшого використання у програмах, спрямованих на підвищення вмісту каротиноїдів у зерні. Скринінг за маркером *crtRB1-3'TE* дозволяє визначити, чи присутні серед них генотипи з алелем 543 п.н., який за літературними даними пов'язаний із підвищеним накопиченням β -каротину. Якщо такий алель трапляється рідко, це свідчить про необхідність цілеспрямованого використання його носіїв як донорів або залучення додаткових джерел провітамін А-активних каротиноїдів. Якщо ж матеріал переважно містить несприятливі алелі, це не означає його повної непридатності, але вказує на потребу подальшого добору і схрещування з лініями-донорами.

Інтеграція маркера *crtRB1* з маркерами посухостійкості відкриває можливість багатокритеріальної оцінки ліній. У сучасній селекції дедалі важливішим стає не ізольоване покращення однієї ознаки, а поєднання кількох цільових характеристик в одному генотипі. Для кукурудзи це може означати створення матеріалу, який одночасно має алелі, пов'язані з адаптивністю до посухи, та підвищений потенціал накопичення β -каротину. Такий підхід відповідає сучасній концепції селекції, орієнтованої на стійкість агроєкосистем і якість продукції, а не лише на максимізацію врожайності.

Узагальнюючи наведені теоретичні положення, можна зазначити, що сучасна оцінка селекційного матеріалу кукурудзи потребує не окремого

застосування молекулярних методів, а їх поєднання в єдину логічну схему. Кукурудза як культура з високою економічною значущістю та складною генетичною природою ознак потребує одночасного аналізу адаптивного потенціалу та якості зерна. Функціональні маркери дозволяють оцінити наявність конкретних алельних варіантів, пов'язаних із посухостійкістю та накопиченням β -каротину. Така інтеграція є особливо актуальною для нових ліній, отриманих шляхом самозапилення вихідних схрещувань, оскільки їхня селекційна цінність ще потребує всебічного підтвердження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика рослинного матеріалу

Матеріалом дослідження були 30 нових ліній кукурудзи (*Zea mays L.*) зародкової плазми Ланкастер, отриманих шляхом самозапилення вихідних схрещувань. Досліджені генотипи розглядали як потенційно цінний вихідний матеріал для подальшої селекційної роботи в програмах на гетерозис, посухостійкість, жаростійкість, покращення якості білка і підвищення вмісту каротиноїдів у зерні.

Зародкова плазма Ланкастер є важливим компонентом гетеротичних схем селекції кукурудзи, тому для такого матеріалу особливо значущими є однорідність, стабільність маркерних профілів і наявність цільових алельних варіантів, пов'язаних із господарсько цінними ознаками. Самозапилення вихідних схрещувань сприяло підвищенню гомозиготності та формуванню лінійного матеріалу, придатного для подальшого функціонального маркерного аналізу і добору перспективних генотипів.

2.2. Реактиви, витратні матеріали та обладнання

Для виконання молекулярно-генетичного аналізу використовували реактиви для рідинно-фазної екстракції ДНК з рослинного матеріалу, постановки полімеразної ланцюгової реакції, рестрикційного аналізу та електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації.

До основних реактивів етапу екстракції ДНК належали СТАВ, NaCl, Tris, EDTA, хлороформ, ізоаміловий спирт, ізопропіловий спирт, 70%-й етиловий

спирт, NaOH, HCl та деіонізована вода. Лізуючий розчин готували на 200 мл: СТАВ – 4 г, NaCl – 16,4 г, Tris – 3,15 г, EDTA – 1,5 г; pH доводили до 8,0. Кінцеві концентрації компонентів становили 2% СТАВ, 1,4 М NaCl, 100 мМ Tris-HCl та 20 мМ EDTA. Розчин для преципітації готували на 200 мл із 1 г СТАВ і 0,5 г NaCl, pH 8,0; кінцеві концентрації становили 0,5% СТАВ і 0,04 М NaCl.

Для розчинення та короткочасного зберігання ДНК використовували TE-буфер з кінцевими концентраціями 1 мМ EDTA та 10 мМ Tris-HCl при pH 8,0. Допоміжно готували 0,5 М EDTA, 1 М Tris-HCl і 1,2 М NaCl; pH регулювали 1 М NaOH або концентрованою HCl.

Компоненти реакційної суміші, використані для проведення ПЛР-аналізу: OneTaq ДНК полімераза, dNTP Solution Mix, OneTaq Standard Reaction Buffer, замовлені в New England BioLabs (США), специфічні праймери, вода для ПЛР. Ферменти, використані для рестрикційного аналізу були отримані від виробника Thermo Fisher Scientific (США).

Для приготування буфера для електрофорезу готували 5× TBE-буфер, який містив Tris, борну кислоту та EDTA. За методикою на 1 л 5× TBE використовують 54,0 г Tris, 27,5 г борної кислоти та 3,722 г EDTA; pH розчину доводили до 8,0. Для проведення електрофорезу та приготування гелю робочий буфер використовували у концентрації 0,5× TBE. Агарозний гель 3%-концентрації готували шляхом розплавлення 3 г агарози на 100 мл 0,5× TBE-буфера з подальшим додаванням 4 мкл етидію броміду після охолодження розчину до температури, придатної для заливання гелю. Барвник для нанесення ДНК, а також молекулярний маркер 100 bp були замовлені в Thermo Fisher Scientific (США).

2.3. Екстракція ДНК та підготовка зразків до полімеразної ланцюгової реакції

Геномну ДНК виділяли з рослинного матеріалу ліній кукурудзи рідинно-фазним методом, що ґрунтується на лізисі рослинної тканини у СТАВ-вмісному буфері, очищенні водної фази органічним розчинником, осадженні ДНК ізопропіловим спиртом, промиванні осаду 70%-м етанолом і подальшому розчиненні ДНК у ТЕ-буфері.

Як джерело ДНК використовували наважку молодих листків кукурудзи близько 50 мг, яку подрібнювали до однорідного стану, додавали 500 мкл лізуючого розчину, ретельно перемішували і переносили у мікроцентрифужну пробірку. Лізис проводили за температури 65°C протягом 45 хв, після чого зразки центрифугували за 13000 g протягом 10 хв. Супернатант об'ємом приблизно 300 мкл переносили у нову пробірку, не захоплюючи осад.

До супернатанта додавали хлороформ у співвідношенні 1:1, обережно перемішували протягом приблизно 30 с і повторно центрифугували за 13000 g протягом 10 хв. Верхню водну фазу об'ємом близько 250 мкл переносили у нову пробірку; за потреби етап органічного очищення повторювали. До очищеної водної фази додавали два об'єми розчину для преципітації, суміш обережно перемішували та інкубували протягом 60 хв за кімнатної температури.

Після преципітації проби центрифугували за 13000 g протягом 5 хв, супернатант видаляли, а осад розчиняли у 350 мкл 1,2 М NaCl. Далі додавали 0,6 об'єму охолодженого ізопропілового спирту, що відповідало приблизно 210 мкл, перемішували і центрифугували за 13000 g протягом 10 хв. Отриманий осад ДНК промивали 500 мкл 70%-го етилового спирту, повторно центрифугували за 13000 g протягом 10 хв і підсушували за температури 60°C протягом 30 хв.

Сухий осад, що містив ДНК, розчиняли у 50 мкл ТЕ-буфера. Отримані препарати використовували для постановки ПЛР одразу після виділення або

зберігали за температури +4°C не довше одного місяця. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично за довжинами хвиль 260 і 280 нм.

Перед постановкою ПЛР ДНК стандартизували до робочої концентрації 80 нг, оскільки різна кількість матриці у реакційній суміші може спричинити нерівномірну інтенсивність смуг, появу неспецифічних продуктів або відсутність ампліфікації.

2.4. Підбір функціональних ДНК-маркерів

Функціональні маркери посухостійкості були обрані на основі літературних даних щодо SNP PZA0355.1 та PZA01671.1. Перший поліморфізм пов'язаний із геном *dhn1*, який кодує дегідрин, білок із групи LEA, що бере участь у відповіді рослин на водний дефіцит. Другий поліморфізм асоційований із геном *rsp41*, який кодує багатий на аргінін/серин фактор сплайсингу. Для цих SNP було застосовано CAPS-маркери *dhnC397* та *rspC1090*, оскільки відповідні алельні варіанти створюють або усувають сайти рестрикції, що можна виявити після ампліфікації, рестрикційного розщеплення та електрофорезу.

Для оцінки потенціалу біофортificaції використовували маркер *crtRB1-3'TE*, пов'язаний із геном β -каротин-гідроксилази 1. Цей ген має значення для метаболізму каротиноїдів, оскільки його алельний стан впливає на накопичення β -каротину в ендоспермі зерна. За маркером *crtRB1-3'TE* розрізняють кілька алельних варіантів, з яких алель 543 п.н. вважається сприятливим щодо підвищеного вмісту β -каротину. У межах даного дослідження цей маркер використовували як функціональний індикатор перспективності ліній для селекції на підвищену харчову цінність.

2.5. Генотипування за функціональними маркерами посухостійкості

Для оцінки потенційної посухостійкості ліній кукурудзи використовували два функціональні CAPS-маркери: *dhnC397* для гена *dhn1* та *rspC1090* для гена *rsp41*. Обидва маркери ґрунтуються на виявленні SNP, які змінюють сайт рестрикції. Тому методика включала два послідовні етапи: спочатку ампліфікацію фрагмента, що містить досліджуваний поліморфізм, а потім рестрикційне розщеплення амплікону відповідною ендонуклеазою. Після електрофорезу алельний стан визначали за розміром отриманих фрагментів.

Поліморфізм гена *dhn1* визначали за допомогою маркера *dhnC397*. У результаті ПЛР очікували амплікон довжиною 164 п.н., що містить SNP-варіант CCAAAG/CCAAGG. Для цього маркера алель CCAAAG (A), асоційований із підвищеною посухостійкістю, не розщеплюється рестриктазою і проявляється як фрагмент 164 п.н. Алель CCAAGG (G) містить сайт рестрикції *StyI/Eco130I*, тому після обробки утворює фрагменти приблизно 131 та 33 п.н. У зв'язку з невеликим розміром короткого фрагмента основним діагностичним критерієм була поява фрагмента 131 п.н. разом зі зникненням або зменшенням інтенсивності нерозщепленого амплікону.

Поліморфізм гена *rsp41* визначали за допомогою маркера *rspC1090*. У цьому випадку амплікон довжиною 286 п.н. містив SNP, що впливає на сайт рестрикції *HpaII/MspI*. Алельний варіант CCGG (G), пов'язаний із посухостійкістю, після рестрикції формує два фрагменти довжиною 225 та 61 п.н. Натомість варіант CCAG (A) не містить відповідного сайту рестрикції і після обробки зберігається у вигляді нерозщепленого фрагмента 286 п.н. Таким чином, для *rspC1090* сприятливим вважали профіль 225+61 п.н., тоді як профіль 286 п.н. інтерпретували як несприятливий щодо досліджуваної ознаки.

ПЛР для функціональних маркерів проводили за температурним режимом, що включав початкову денатурацію при 94°C протягом 5 хв, 30

основних циклів з етапами денатурації, відпалу та елонгації довжиною 1 хв кожен, а також фінальну елонгацію при 72°C протягом 5 хв. Температура відпалу становила 60°C. Склад реакційної суміші наведений у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

**Склад реакційної суміші для ампліфікації CAPS-маркерів
посухостійкості**

Компонент	Кінцева концентрація	Об'єм, мкл
10× DreamTaq Green Buffer	1x	2
dNTP, 2 мМ	200 мкМ	0.4
Taq-полімераза, 5 U/мкл	1 U	0.2
Прямий праймер, 10 мкМ	1 мкМ	1
Зворотний праймер, 10 мкМ	1 мкМ	1
Вода для ПЛР	-	13.4
ДНК	-	2
Загальний об'єм	-	10

Після ампліфікації ПЛР-продукти піддавали рестрикційному аналізу. Для dhnC397 використовували Eco130I/StyI у відповідному буфері, інкубували реакцію при 37°C протягом 4 год, після чого фермент інактивували при 65°C протягом 20 хв. Для rspC1090 застосовували рестриктазу HpaII/MspI за аналогічним принципом, але інактивацію проводили при 80°C. До рестрикційної суміші вносили ПЛР-продукт, воду, буфер і рестриктазу (табл. 2.2).

Після завершення інкубації продукти рестрикції аналізували методом горизонтального електрофорезу.

Усі профілі рестрикції інтерпретували з урахуванням можливості неповного розщеплення. Якщо на електрофореграмі одночасно спостерігали нерозщеплений продукт і фрагменти рестрикції, оцінювали співвідношення інтенсивності смуг і за потреби повторювали рестрикцію. Неповне розщеплення могло бути пов'язане з недостатньою активністю ферменту,

наявністю інгібіторів у ПЛР-суміші, помилкою у температурі інкубації або надмірною кількістю амплікону. Особливо обережно інтерпретували слабкі низькомолекулярні фрагменти, оскільки вони можуть мати меншу інтенсивність і частково мігрувати близько до фронту барвника.

Таблиця 2.2

Склад реакційних сумішей для рестрикційного аналізу

Рестрикція за праймером dhnC397	
Компонент	Об'єм, мкл
ПЛР-продукт	10
dH ₂ O	18
Buffer 0	2
Рестриктаза Eco130I	2
Рестрикція за праймером rspC1090	
Компонент	Об'єм, мкл
ПЛР-продукт	10
dH ₂ O	18
Buffer Tango	2
Рестриктаза MspI	2

2.6. Генотипування за маркером crtRB1-3'TE

Для визначення алельного стану гена crtRB1 використовували маркер crtRB1-3'TE. Цей маркер є ПЛР-маркером, що дає змогу розрізнити алелі за довжиною ампліфікованих фрагментів. Алель 1 характеризується фрагментом 543 п.н. і вважається сприятливим щодо накопичення β-каротину. Алель 2 проявляється як комбінація фрагментів 296+875 п.н., а алель 3 – як комбінація 296+1221+1880 п.н. У наданих електрофоретичних даних для алеля 3 враховували фрагменти 296 та 1221 п.н., оскільки використаний маркер молекулярної маси не забезпечував надійного визначення фрагмента 1880 п.н.

ПЛР для crtRB1-3'TE проводили у реакційному об'ємі 10 мкл. До складу суміші входили 10× DreamTaq Green Buffer у кінцевій концентрації 1×, dNTP

у кінцевій концентрації 1 мМ, Taq-полімераза в кількості 0,75 од., прямий та 2 зворотні праймери у кінцевій концентрації 0,5 мкМ кожний, вода та матрична ДНК. Використання трьох праймерів було необхідним для диференціації алельних варіантів 3'-ділянки гена *crtRB1*, оскільки різні комбінації праймерів ампліфікують фрагменти, що відповідають наявності або відсутності транспозонної вставки.

Температурний режим ампліфікації включав початкову денатурацію при 94°C протягом 5 хв, 30 циклів ампліфікації та фінальну елонгацію при 72°C протягом 5 хв. У межах кожного циклу денатурацію проводили при 94°C протягом 1 хв, відпал праймерів – при 60°C протягом 1 хв, елонгацію – при 72°C протягом 1 хв. Після завершення ПЛР продукти ампліфікації розділяли методом горизонтального електрофорезу разом із маркером молекулярної маси 100 bp DNA ladder.

Інтерпретацію результатів проводили за наявністю специфічних смуг. Генотипи з фрагментом 543 п.н. відносили до носіїв сприятливого алеля. Генотипи з профілем 296+875 п.н. відносили до носіїв алеля 2, а генотипи з фрагментами 296+1221 п.н. – до носіїв алеля 3.

Лінії, що несуть сприятливий алель 543 п.н., можуть розглядатися як джерела для подальшої селекції на підвищений вміст β -каротину. Водночас остаточна оцінка таких ліній має враховувати не лише *crtRB1*, а й загальну генетичну віддаленість, наявність алелів посухостійкості та агрономічні характеристики, які можуть бути досліджені на наступних етапах селекційного процесу.

2.7. Електрофоретичне розділення ампліконів та цифровий аналіз електрофореграм

Продукти ПЛР та рестрикційного аналізу розділяли методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі з концентрацією 3%. Для

коротких CAPS-фрагментів застосовували гелі підвищеної концентрації, що забезпечували кращу роздільну здатність у діапазоні приблизно 60-300 п.н. Для маркера crtRB1-3'TE, де очікували фрагменти 543, 875 та 1221 п.н., використовували умови, придатні для розділення фрагментів середнього розміру. На кожний гель обов'язково наносили маркер молекулярної маси 100 bp DNA ladder, які використовували для побудови калібрувальної залежності між міграційною відстанню та довжиною фрагмента.

Перед нанесенням зразків у лунки гелю продукти ампліфікації перемішували та коротко центрифугували. Електрофорез проводили до достатнього розділення діагностичних фрагментів. Після завершення гель візуалізували у гель-документувальній системі та зберігали цифрове зображення у форматі, придатному для подальшого аналізу. Для кожної електрофореграми перевіряли чіткість фокусу, рівномірність освітлення, відсутність пересвічених смуг і наявність маркера молекулярної маси. Зображення, на яких неможливо було надійно визначити положення смуг, не використовували для остаточного генотипування без повторного електрофорезу.

Розміри ампліконів визначали у програмі TotalLab. Для цього на електрофореграмі спочатку задавали доріжку маркера молекулярної маси та відповідні відомі розміри фрагментів. Програма будувала калібрувальну криву, після чого для кожної досліджуваної доріжки визначали положення смуг і розраховувала їх орієнтовний розмір у парах нуклеотидів. Отримані значення перевіряли вручну, особливо у випадках, коли смуги були розмитими, мали низьку інтенсивність або розташовувалися близько до сусідніх фрагментів.

Для кожної електрофореграми формували таблицю первинних даних, у якій зазначали код зразка, назву маркера, номер доріжки, розмір виявленого фрагмента та примітку щодо якості смуги. Якщо для одного маркера було отримано кілька незалежних електрофореграм або повторів, остаточний алельний стан встановлювали за узгодженим результатом.

Після аналізу у TotalLab результати експортували до робочої таблиці Excel.

У процесі електрофоретичного аналізу враховували специфіку кожного функціонального маркера. Для CAPS-маркерів важливим було встановлення факту рестрикційного розщеплення або його відсутності, а також наявності діагностичних фрагментів очікуваного розміру. Для crtRB1-3'TE потрібно було розрізнити фрагменти, які відповідають різним алельним станам, зокрема 543, 875 і 1221 п.н.

2.8. Обробка результатів та інтегрована оцінка селекційного матеріалу

Обробку результатів функціонального маркерного аналізу проводили після формування фінальної матриці алельних станів. У матриці рядки відповідали дослідженим лініям кукурудзи, а стовпці – маркерам dhnC397, rspC1090 та crtRB1-3'TE. Для кожної лінії зазначали розмір діагностичного фрагмента або набір фрагментів після рестрикційного аналізу, після чого результат переводили у селекційно інтерпретований алельний стан.

Для маркера dhnC397 сприятливим вважали профіль 164 п.н., що відповідав алелю А, пов'язаному з геном dhnl. Профіль 131+33 п.н. інтерпретували як алель G. Для маркера rspC1090 сприятливим вважали профіль 225+61 п.н., що відповідав алелю G гена rsp41, тоді як нерозщеплений фрагмент 286 п.н. інтерпретували як алель А. Для маркера crtRB1-3'TE сприятливим щодо підвищеного накопичення β -каротину вважали фрагмент 543 п.н.; профілі 296+875 п.н. та 296+1221 п.н. розглядали як менш бажані алельні варіанти.

Для кожного функціонального маркера підраховували кількість ліній із відповідним алельним станом та визначали їхню частку від загальної кількості досліджених генотипів. Окремо виділяли групи ліній, які мали сприятливий алель лише за одним маркером, за двома маркерами посухостійкості або

одночасно за всіма трьома функціональними маркерами. Такий підхід давав змогу перейти від окремої інтерпретації електрофоретичних профілів до узагальненої характеристики селекційної цінності кожної лінії.

Інтегрована оцінка селекційного матеріалу передбачала поєднання двох інформаційних блоків: маркерної характеристики за посухостійкістю та маркерної характеристики за потенціалом накопичення каротиноїдів. Для практичної інтерпретації даних формували умовний інтегрований профіль лінії, який включав код лінії, походження, алельний стан crtRB1-3'TE, алельний стан dhnC397, алельний стан rspC1090 та попередню селекційну категорію.

До категорії найвищої перспективності відносили лінії, які мали сприятливі алелі за обома маркерами посухостійкості та сприятливий алель crtRB1-3'TE. До групи високої перспективності відносили лінії, що поєднували два сприятливі алельні стани, зокрема за маркерами dhnC397 і rspC1090. Лінії з одним сприятливим маркером розглядали як потенційні донори окремої ознаки, а генотипи без сприятливих алельних станів за дослідженими маркерами мали нижчий пріоритет у межах даної схеми.

Результати такої обробки не розглядали як остаточну селекційну оцінку врожайності або адаптивності. Вони характеризували лише молекулярно-генетичний рівень дослідження. Тому запропонований підхід слід розуміти як інструмент попереднього добору, який має бути доповнений польовими випробуваннями, фенотиповою оцінкою посухостійкості, аналізом урожайності, стабільності ознак і фактичного вмісту каротиноїдів у зерні. Однак саме функціональний маркерний скринінг дає змогу суттєво звузити коло матеріалу для подальших поглиблених досліджень і раціональніше планувати селекційні схрещування.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати скринінгу алелів посухостійкості у селекційному матеріалі

Стійкість кукурудзи до дефіциту вологи є складною кількісною ознакою, формування якої залежить від взаємодії багатьох фізіологічних, біохімічних і молекулярно-генетичних механізмів. Саме тому маркерна оцінка за окремими функціональними локусами не може повністю замінити польове фенотипування за умов водного стресу, проте вона є доцільною на етапі попереднього добору селекційного матеріалу. У цій роботі скринінг посухостійкості здійснювали за двома CAPS-маркерами, що дозволяють ідентифікувати SNP-варіанти генів *dhn1* та *rsp41*, для яких у літературі описано асоціацію з реакцією кукурудзи на посуху [12, 13].

Перший маркер, *dhnC397*, використовували для оцінювання поліморфізму гена *dhn1*. Ген *dhn1* кодує дегідрин – білок, що належить до групи LEA-білків і накопичується у рослинних тканинах у відповідь на дегідратацію. Дегідрини беруть участь у стабілізації клітинних структур, захисті білків і мембран, а також у підтриманні функціонального стану клітини за умов зниження водного потенціалу. Тому наявність алельного варіанта, асоційованого з посухостійкістю, розглядається як один із можливих молекулярних індикаторів адаптивного потенціалу лінії [14].

Другий маркер, *rspC1090*, пов'язаний із геном *rsp41*, який кодує білок, багатий на аргінін/серин, залучений до процесів сплайсингу пре-мРНК. Для рослин відповідь на стрес часто пов'язана зі зміною профілю альтернативного сплайсингу, внаслідок чого один ген може формувати декілька транскриптів, що відрізняються функціональною активністю. Отже, маркер *rspC1090* відображає інший рівень регуляції стресової відповіді, ніж *dhnC397*: якщо

дегідрин пов'язаний переважно із захисними білками, то *rsp41* може бути залучений до посттранскрипційної регуляції стрес-індукованих генів [15].

Інтерпретацію результатів (табл. 3.1) проводили за розмірами продуктів рестрикції. Для маркера *dhnC397* фрагмент 164 п.н. відповідав алельному варіанту CCAAAG (A), що не розщеплюється рестриктазою *StyI* і розглядався як сприятливий щодо посухостійкості. Фрагменти 131+33 п.н. відповідали варіанту CCAAGG (G), за якого наявний сайт рестрикції. Для маркера *rspC1090*, навпаки, сприятливим вважали варіант CCGG (G), що після обробки *HpaII*/*MspI* утворює фрагменти 225 та 61 п.н.; нерозщеплений амплікон 286 п.н. відповідав алельному стану CCAG (A), який у застосованій схемі оцінювали як менш бажаний [13].

Таблиця 3.1

Схема інтерпретації результатів функціонального маркерного аналізу

Маркер	Ген/локус	Принцип виявлення	Інтерпретація сприятливого алеля
<i>dhnC397</i>	<i>dhn1</i>	CAPS-аналіз SNP A/G; рестрикція <i>StyI</i>	164 п.н. – алель А, асоційований із підвищеною посухостійкістю
<i>rspC1090</i>	<i>rsp41</i>	CAPS-аналіз SNP A/G; рестрикція <i>HpaII</i> / <i>MspI</i>	225+61 п.н. – алель G, асоційований із посухостійкістю
<i>crtRB1-3'TE</i>	<i>crtRB1</i>	ПЛР-ідентифікація InDel-поліморфізму 3'TE	543 п.н. – алель 1, асоційований із підвищеним вмістом β-каротину

За результатами CAPS-аналізу маркера *dhnC397* у досліджених ліній виявлено два типи електрофоретичних профілів. Наявність нерозщепленого фрагмента 164 п.н. свідчила про алельний стан А, а поява фрагмента 131 п.н., із урахуванням короткого фрагмента 33 п.н., який міг бути слабо помітним у агарозному гелі, – про алельний стан G. На електрофореграмі першої групи зразків (рис. 3.1) чітко ідентифіковано сприятливий амплікон 164 п.н. у

більшості проаналізованих ліній, тоді як лінія SCP1243 характеризувалася наявністю продукту рестрикції, що відповідає несприятливому варіанту за цим маркером.

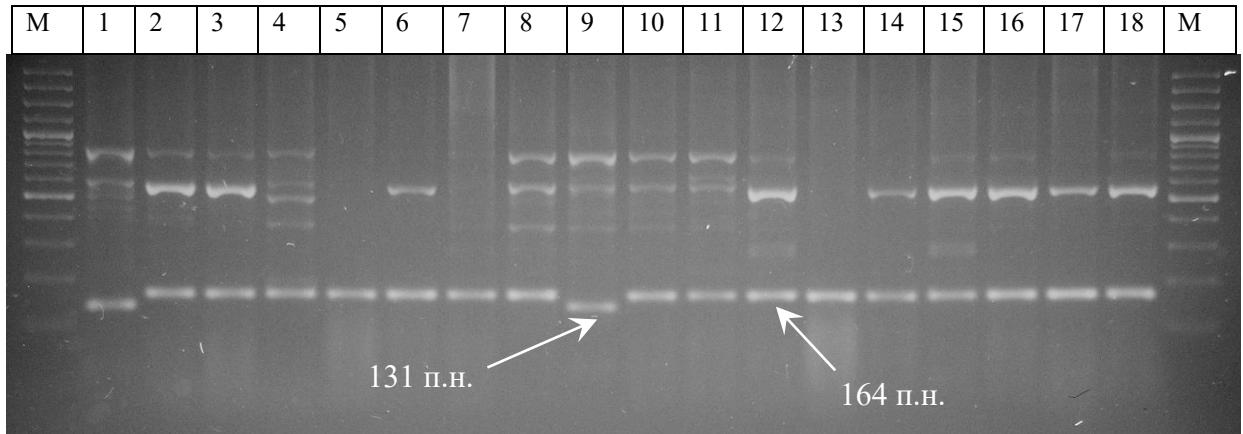


Рис. 3.1. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу ДНК ліній кукурудзи з маркером *dhnC397*: М – маркер молекулярної маси 100 bp; 1 і 9 – SCP1243; 2-3 – SCP1244; 4-5 – SCP1245; 6-7 – SCP1246; 8 – SCP1247; 10-11 – SCP1248; 12-13 – SCP1249; 14-15 – SCP1250; 16-17 – SCP1251; 18 – SCP1252

Аналогічну закономірність спостерігали під час аналізу другої групи зразків. На електрофореграмі ідентифіковано як нерозщеплені фрагменти 164 п.н., так і продукти рестрикції, що відповідають алельному стану G (рис. 3.2). До ліній із несприятливим варіантом за *dhnC397* належали, зокрема, SCP1270, SCP1268 та SCP1266, тоді як для SCP1289, SCP1285, SCP1269, SCP1267 і SCP1265 виявлено алельний варіант А. Сукупний аналіз усіх 30 зразків показав, що сприятливий алель А за маркером *dhnC397* був наявний у 22 лініях, тобто у 73,3 % дослідженого матеріалу. Такий розподіл свідчить про досить високу представленість цього алельного стану в аналізованій групі ліній.

Під час інтерпретації результатів за *dhnC397* необхідно враховувати, що CAPS-аналіз є чутливим до якості ампліфікації та повноти рестрикції. У частині доріжок спостерігалися додаткові слабкі фрагменти, більші за очікувані, що могло бути наслідком неповної рестрикції, неспецифічної

ампліфікації або ампліфікації паралогічних послідовностей. Для геному кукурудзи, який характеризується значною часткою повторюваних елементів і складною організацією багатьох генних родин, така особливість не є несподіваною. У сучасній літературі підкреслюється, що під час використання CAPS-маркерів у рослинних культур важливо поєднувати оцінку очікуваних фрагментів із критичним аналізом якості електрофоретичного профілю, оскільки саме чистота ампліфікації та повнота рестрикції визначають надійність подальшої алельної інтерпретації [16].

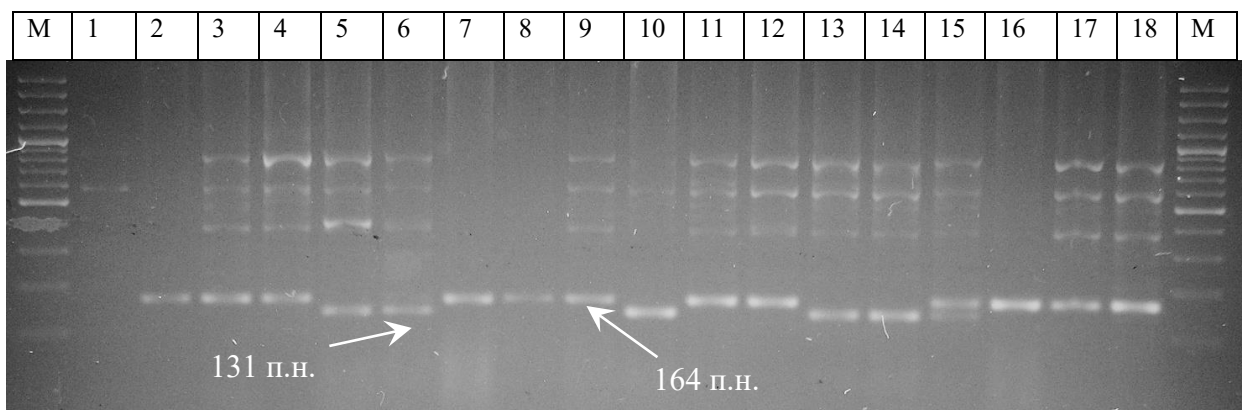


Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу ДНК ліній кукурудзи з маркером *dhnC397*: М – маркер молекулярної маси 100 bp; 2-3 – SCP1289; 4 – SCP1285; 5-6 – SCP1270; 7 – SCP1285; 8-9 – SCP1269; 10 – SCP1268; 11-12 – SCP1267; 13 – SCP1268; 14-15 – SCP1266; 16-17 – SCP1265; 18 – SCP1252

Для маркера *rspC1090* було виявлено інший характер розподілу алельних станів. У першій групі зразків переважав нерозщеплений фрагмент 286 п.н., який відповідає алельному стану А і, відповідно до застосованої схеми, характеризує генотипи як менш бажані щодо посухостійкості за цим локусом (рис. 3.3). Такий профіль виявлено у ліній SCP1243, SCP1244, SCP1245, SCP1246, SCP1247, SCP1248, SCP1249, SCP1250 та SCP1251. Отриманий результат демонструє, що навіть у разі наявності сприятливого алеля за *dhnC397* частина ліній не має сприятливого алеля за *rspC1090*, тобто генетична основа потенційної посухостійкості в дослідженому матеріалі є неоднорідною.

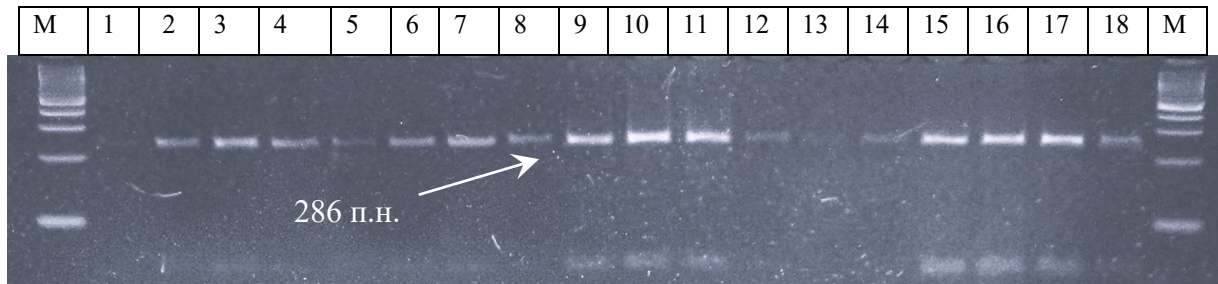


Рис. 3.3. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу ДНК ліній кукурудзи з маркером *rspC1090*: М – маркер молекулярної маси 100 bp; 1-2 – SCP1243; 3-4 – SCP1244; 5-6 – SCP1245; 7-8 – SCP1246; 9-10 – SCP1247; 11-12 – SCP1248; 13-14 – SCP1249; 15-16 – SCP1250; 17-18 – SCP1251

У другій групі зразків, наведених на рис. 3.4, ідентифіковано як нерозщеплений амплікон 286 п.н., так і фрагменти 225 та 61 п.н., що відповідають сприятливому алельному стану G. Зокрема, фрагменти 225 п.н. та 225+61 п.н. виявлено у ліній SCP1255, SCP1256, SCP1258, SCP1259, SCP1269, SCP1270, SCP1285 та SCP1289. За повною зведеною таблицею результатів сприятливий алель G за маркером *rspC1090* був наявний у 14 із 30 ліній, що становить 46,7 % дослідженої вибірки. Отже, на відміну від *dhnC397*, маркер *rspC1090* є більш диференційним для цієї групи матеріалу.

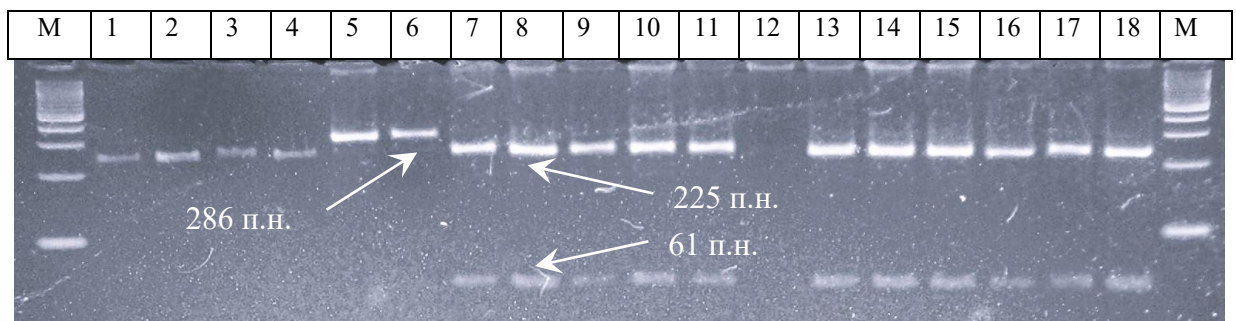


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів рестрикційного аналізу ДНК ліній кукурудзи з маркером *rspC1090*: М – маркер молекулярної маси 100 bp; 1-2 – SCP1255; 3-4 – SCP1256; 5-6 – SCP1257; 7-8 – SCP1258; 9-10 – SCP1259; 11-12 – SCP1269; 13-14 – SCP1270; 15-16 – SCP1285; 17-18 – SCP1289

Порівняння двох маркерів (табл. 3.2) показало, що алель *dhnC397*-А у дослідженому матеріалі траплявся значно частіше, ніж алель *rspC1090*-G. Це

може свідчити про різний ступінь представленості відповідних функціональних варіантів у вихідній зародковій плазмі. Водночас посухостійкість не слід ототожнювати з одним маркером, оскільки вона є багатокomпонентною ознакою. Саме тому найбільшу цінність у межах цього етапу оцінки мають генотипи, в яких сприятливі алелі виявлено одночасно за двома маркерами.

Таблиця 3.2

Розподіл досліджених ліній за комбінаціями алельних станів маркерів посухостійкості

Група	Алельний стан dhnC397	Алельний стан rspC1090	Кількість ліній	Частка, %	Лінії
I	164 (A)	225+61 (G)	9	30,0	SCP1252, SCP1253, SCP1255, SCP1258, SCP1263, SCP1265, SCP1269, SCP1285, SCP1289
II	164 (A)	286 (A)	13	43,3	SCP1244, SCP1245, SCP1246, SCP1247, SCP1248, SCP1249, SCP1250, SCP1251, SCP1254, SCP1257, SCP1261, SCP1262, SCP1267
III	131+31 (G)	225+61 (G)	5	16,7	SCP1256, SCP1259, SCP1264, SCP1268, SCP1270
IV	131+31 (G)	286 (A)	3	10,0	SCP1243, SCP1260, SCP1266

До першої групи, яка є найперспективнішою з погляду маркерної оцінки потенційної посухостійкості, належали дев'ять ліній: SCP1252, SCP1253, SCP1255, SCP1258, SCP1263, SCP1265, SCP1269, SCP1285 та SCP1289. Вони поєднували сприятливий алель A за маркером dhnC397 зі сприятливим алелем G за маркером rspC1090. Така комбінація є найбільш бажаною, оскільки

відображає наявність двох різних молекулярних компонентів адаптації до дефіциту води: білкового захисту клітин від дегідратації та регуляції стрес-індукованої експресії через механізми сплайсингу.

Друга група включала 13 ліній із сприятливим алелем за *dhnC397*, але без сприятливого алеля за *rspC1090*. Такі генотипи не слід повністю виключати з подальшої селекційної роботи, оскільки вони можуть мати інші механізми адаптації до посухи, не охоплені використаними маркерами. Проте з позиції інтегрованого маркерного підходу вони потребують додаткового фенотипового підтвердження. Третя група включала п'ять ліній із протилежною комбінацією: несприятливим станом за *dhnC397* і сприятливим за *rspC1090*. Такі лінії потенційно можуть бути цікавими як носії окремого регуляторного компонента стресової відповіді, але за комплексною оцінкою поступаються першій групі. Найменш пріоритетною за цим блоком є четверта група, до якої увійшли SCP1243, SCP1260 та SCP1266, оскільки в них не виявлено жодного з двох сприятливих алельних станів.

Отриманий розподіл узгоджується із сучасним уявленням про те, що функціональні маркери в селекції на стійкість до абіотичних стресів повинні використовуватися не ізольовано, а у вигляді маркерної панелі. Liu та співавтори показали, що CAPS-маркери, пов'язані з *dhn1* і *rsp41*, можуть бути застосовані для ідентифікації алельних станів, асоційованих із посухостійкістю кукурудзи [13]. Однак автори також підкреслювали, що ефективність таких маркерів залежить від генетичного фону, тому інтерпретація результатів повинна здійснюватися у зв'язку з походженням матеріалу та подальшим фенотиповим аналізом. У нашому випадку саме таке обережне трактування є найбільш коректним: результати маркерного скринінгу дають змогу виділити пріоритетні лінії для наступного етапу селекційного вивчення, але не є остаточним доказом польової посухостійкості.

3.2. Генотипування зразків за алелями гена crtRB1

Окремим напрямом дослідження було генотипування ліній кукурудзи за маркером crtRB1-3'TE, який пов'язаний з алельним станом гена β -каротингідроксилази 1. Ген crtRB1 є одним із ключових генів каротиноїдного шляху, оскільки бере участь у перетворенні β -каротину на ксантофіли. Зменшення активності відповідного ферменту може сприяти накопиченню β -каротину в ендоспермі зерна. Саме тому алельні варіанти crtRB1 становлять значний інтерес для біофортificaції кукурудзи провітаміном А [18].

Для маркера crtRB1-3'TE описано три основні електрофоретичні профілі: 543 п.н., що відповідає алелю 1; 296+875 п.н., що відповідає алелю 2; та 296+1221+1880 п.н., що відповідає алелю 3. У селекційному аспекті найбільш бажаним вважають алель 1, оскільки його наявність асоційована з підвищеним накопиченням β -каротину в зерні. Алелі 2 і 3 розглядають як менш сприятливі щодо цієї ознаки. Такий підхід широко застосовується у маркер-асоційованому доборі матеріалу для створення біофортифікованих форм кукурудзи [18, 19].

У дослідженій вибірці з 30 ліній сприятливий алель 1 було виявлено лише у лінії SCP1285. На електрофореграмі, де представлені лінії SCP1268, SCP1269, SCP1270, SCP1252 та SCP1285, саме у SCP1285 спостерігався фрагмент 543 п.н., тоді як у решти зразків переважали фрагменти 296 та 875 п.н., характерні для алеля 2. Це свідчить про те, що серед ліній, включених до першої групи електрофоретичного аналізу, тільки SCP1285 має маркерний профіль, потенційно пов'язаний із підвищеним накопиченням β -каротину (рис. 3.5).

У другій групі зразків, де були проаналізовані лінії SCP1263, SCP1262, SCP1264, SCP1265, SCP1261, SCP1266, SCP1267 та SCP1253, сприятливий амплікон 543 п.н. не виявлено (рис. 3.6). У цих зразках спостерігалися профілі, що відповідають алелю 2 або алелю 3. Зокрема, наявність амплікону 1221 п.н. свідчила про третій алельний стан гена crtRB1, який у літературі описаний як

менш бажаний щодо накопичення β -каротину. Оскільки в цьому дослідженні використовували маркер молекулярної маси 100 бр, фрагмент 1880 п.н., характерний для повного профілю алеля 3, не був включений до надійної зони оцінювання; тому інтерпретацію алеля 3 здійснювали за наявності фрагментів 296 та 1221 п.н. у поєднанні з відсутністю сприятливого фрагмента 543 п.н.

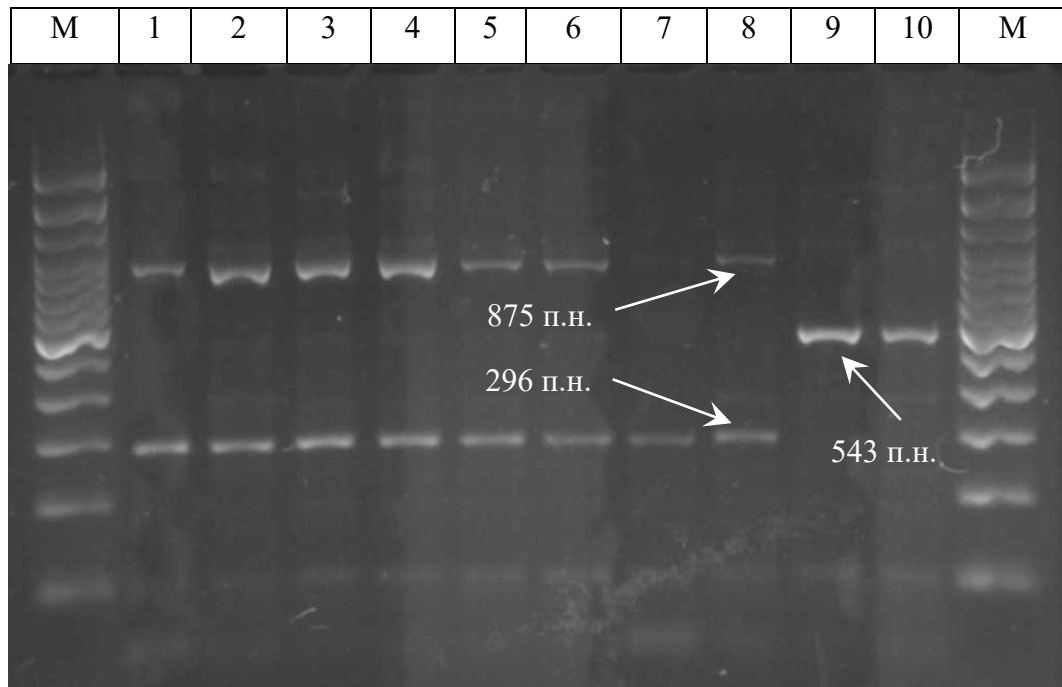


Рис. 3.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній кукурудзи з маркером crtRB1-3'TE: М – маркер молекулярної маси 100 бр; 1-2 – SCP1268; 3-4 – SCP1269; 5-6 – SCP1270; 7-8 – SCP1252; 9-10 – SCP1285

За зведеними результатами (табл. 3.3), алель 2 з профілем 296+875 п.н. був найпоширенішим і виявлений у 23 із 30 ліній, що становить 76,7 % вибірки. Алель 3 з профілем 296+1221 п.н. був ідентифікований у шести ліній, тобто у 20,0 % матеріалу. Сприятливий алель 1 з фрагментом 543 п.н. виявлено лише в однієї лінії, SCP1285, що становить 3,3 %. Такий розподіл свідчить про низьку представленість маркерного варіанта, асоційованого з підвищеним рівнем β -каротину, у дослідженій групі ліній.

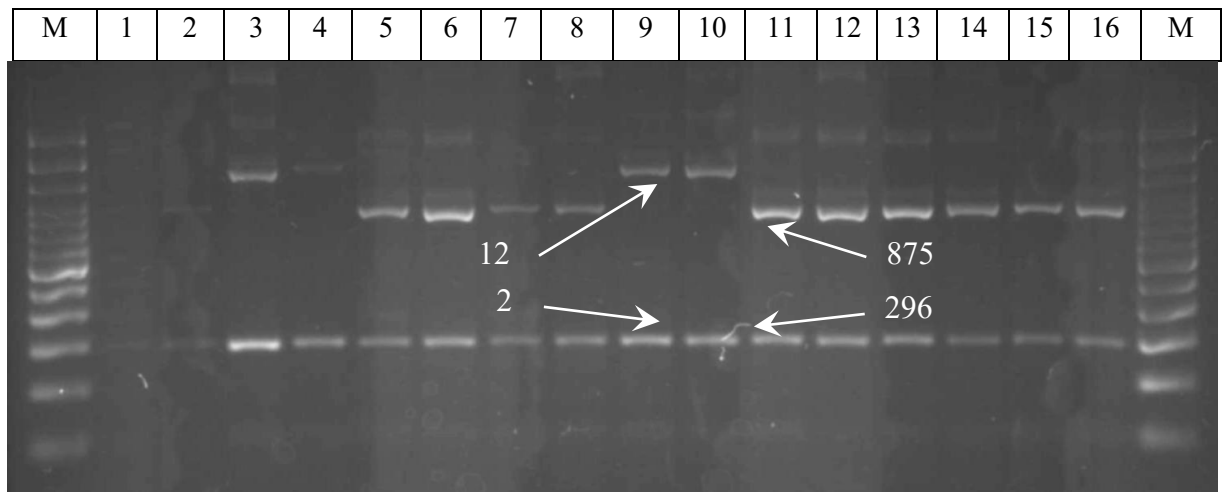


Рис. 3.6 Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній кукурудзи з маркером crtRB1-3'TE: М – маркер молекулярної маси 100 bp; 1-2 – SCP1263; 3-4 – SCP1262; 5-6 – SCP1264; 7-8 – SCP1265; 9-10 – SCP1261; 11-12 – SCP1266; 13-14 – SCP1267; 15-16 – SCP1253

Таблиця 3.3

Розподіл алельних варіантів crtRB1-3'TE у досліджених лініях кукурудзи

Алель	Селекційна інтерпретація	Кількість ліній	Частка, %	Лінії
543 п.н.	Сприятливий щодо накопичення β -каротину	1	3,3	SCP1285
296+875 п.н.	Менш сприятливий	23	76,7	SCP1243, SCP1244, SCP1245, SCP1246, SCP1247, SCP1248, SCP1249, SCP1250, SCP1251, SCP1252, SCP1253, SCP1254, SCP1255, SCP1258, SCP1260, SCP1263, SCP1264, SCP1265, SCP1266, SCP1267, SCP1268, SCP1269, SCP1270
296+1221 п.н.	Менш сприятливий	6	20,0	SCP1256, SCP1257, SCP1259, SCP1261, SCP1262, SCP1289

Отриманий результат має важливе практичне значення. З одного боку, низька частота сприятливого алеля crtRB1-3'TE свідчить, що досліджений селекційний матеріал не є масово збагаченим на маркерні варіанти, пов'язані з підвищеним вмістом β -каротину. З іншого боку, виявлення хоча б однієї лінії з алелем 1 є цінним, оскільки така лінія може бути використана як донор сприятливого алеля у програмах біофортificaції. У цьому аспекті SCP1285 становить особливий інтерес, оскільки поєднує бажаний профіль за crtRB1 з двома сприятливими алелями маркерів посухостійкості.

Порівняння з літературними даними підтверджує доцільність використання маркера crtRB1-3'TE для попередньої оцінки матеріалу. Yan та співавтори встановили, що варіації у crtRB1 істотно впливають на накопичення β -каротину в зерні кукурудзи, а сприятливі алелі цього гена можуть бути використані для створення провітамін-А-збагачених форм [18]. Liu та співавтори продемонстрували ефективність маркер-асоційованого перенесення crtRB1 у лінії якісної білкової кукурудзи, що підтверджує практичну селекційну цінність цього локусу [22]. Natesan та співавтори, аналізуючи місцеві форми кукурудзи з Північно-Східного Гімалайського регіону Індії, також показали зв'язок поліморфізму crtRB1 з відмінностями у вмісті β -каротину та підкреслили значення пошуку донорів сприятливих алелів у різноманітному генетичному матеріалі [19].

У нашому випадку частота сприятливого алеля була низькою, що є очікуваним для селекційного матеріалу, який створювався не виключно як біофортифікований, а як багатофункціональна зародкова плазма для різних напрямів селекції. Водночас саме така ситуація демонструє перевагу функціонального маркерного скринінгу: без проведення тривалих біохімічних вимірювань вмісту каротиноїдів можливо швидко виділити одну лінію, яку доцільно включити до подальшого поглибленого фенотипового аналізу та схрещувань.

3.3. Інтегрована оцінка генотипів та розробка підходу до оцінки селекційного матеріалу кукурудзи

Інтегрована оцінка селекційного матеріалу повинна враховувати те, що різні маркери характеризують різні аспекти цінності генотипу. Маркери *dhnC397* та *rspC1090* відображають потенційну здатність ліній до формування стійкості до дефіциту вологи, тоді як *crtRB1-3'TE* пов'язаний із харчовою цінністю зерна через можливість підвищеного накопичення β -каротину. Тому результати доцільно узагальнювати не лише за кожним маркером окремо, а й у вигляді інтегрального функціонального профілю.

Для попередньої оцінки було запропоновано просту бальну схему: за наявності сприятливого алеля за кожним із трьох функціональних маркерів лінія отримувала один бал. Максимальна кількість балів становила три: один бал за *dhnC397-A*, один бал за *rspC1090-G* та один бал за *crtRB1-3'TE-543*. Така схема не претендує на заміну комплексної селекційної оцінки, проте вона є зручною для ранжування матеріалу на етапі лабораторного скринінгу за цільовими ознаками посухостійкості та підвищеного вмісту каротиноїдів.

З позиції практичної селекції найбільш цінними є лінії, які одночасно мають кілька бажаних маркерних ознак. Генотип із трьома сприятливими алелями може розглядатися як пріоритетний донор для поєднання адаптивності та підвищеної провітамінної цінності. Генотипи з двома сприятливими алелями, особливо якщо обидва маркери належать до блоку посухостійкості, можуть бути використані в програмах створення адаптивних гібридних комбінацій. Лінії з одним сприятливим маркером доцільно залишати для додаткового аналізу лише за умови цінних агрономічних або генетичних характеристик, тоді як лінії без сприятливих маркерних станів мають нижчий пріоритет у межах саме цієї схеми (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Інтегрований функціональний профіль досліджених ліній кукурудзи за маркерами посухостійкості та вмісту каротиноїдів

№	Назва лінії	crtRB1-3'TE	dhnC397	rspC1090
1	SCP1243	296+875	131+31 (G)	286 (A)
2	SCP1244	296+875	164 (A)	286 (A)
3	SCP1245	296+875	164 (A)	286 (A)
4	SCP1246	296+875	164 (A)	286 (A)
5	SCP1247	296+875	164 (A)	286 (A)
6	SCP1248	296+875	164 (A)	286 (A)
7	SCP1249	296+875	164 (A)	286 (A)
8	SCP1250	296+875	164 (A)	286 (A)
9	SCP1251	296+875	164 (A)	286 (A)
10	SCP1252	296+875	164 (A)	225+61 (G)
11	SCP1253	296+875	164 (A)	225+61 (G)
12	SCP1254	296+875	164 (A)	286 (A)
13	SCP1255	296+875	164 (A)	225+61 (G)
14	SCP1256	296+1221	131+31 (G)	225+61 (G)
15	SCP1257	296+1221	164 (A)	286 (A)
16	SCP1258	296+875	164 (A)	225+61 (G)
17	SCP1259	296+1221	131+31 (G)	225+61 (G)
18	SCP1260	296+875	131+31 (G)	286 (A)
19	SCP1261	296+1221	164 (A)	286 (A)
20	SCP1262	296+1221	164 (A)	286 (A)
21	SCP1263	296+875	164 (A)	225+61 (G)
22	SCP1264	296+875	131+31 (G)	225+61 (G)
23	SCP1265	296+875	164 (A)	225+61 (G)
24	SCP1266	296+875	131+31 (G)	286 (A)
25	SCP1267	296+875	164 (A)	286 (A)
26	SCP1268	296+875	131+31 (G)	225+61 (G)
27	SCP1269	296+875	164 (A)	225+61 (G)
28	SCP1270	296+875	131+31 (G)	225+61 (G)
29	SCP1285	543	164 (A)	225+61 (G)
30	SCP1289	296+1221	164 (A)	225+61 (G)

За інтегрованою оцінкою лише одна лінія, SCP1285, отримала максимальні три бали. Вона має сприятливий алель crtRB1-3'TE 543 п.н., сприятливий алель 164 (A) за dhnC397 та сприятливий профіль 225+61 (G) за

rspC1090. Таким чином, SCP1285 є найперспективнішою лінією серед дослідженого матеріалу, оскільки поєднує маркерні ознаки двох селекційно важливих напрямів: потенційної посухостійкості та підвищеної провітамінної цінності зерна. Особливо важливо, що ця лінія походить від Mo17, тобто від генетичного фону, який відрізняється від більшості досліджених ліній, створених на основі ДКС 4541, H8523 або H9241.

До групи високого пріоритету за функціональними маркерами увійшли вісім ліній із двома сприятливими алелями: SCP1252, SCP1253, SCP1255, SCP1258, SCP1263, SCP1265, SCP1269 та SCP1289. Більшість із них має поєднання двох маркерів посухостійкості без сприятливого алеля crtRB1. Для цих ліній основним напрямом подальшого використання може бути селекція на адаптивність до дефіциту вологи, а також включення до схрещувань із донорами сприятливого алеля crtRB1, зокрема з SCP1285. Окремо слід звернути увагу на SCP1289, яка має сприятливі алелі за двома маркерами посухостійкості, але належить до групи з алелем 3 crtRB1, що обмежує її цінність для біофортифікації без додаткового схрещування з донором алеля 1.

Лінії з одним сприятливим алелем становили найбільшу частину матеріалу. Вони можуть бути використані як додаткові джерела окремих ознак, однак їхня селекційна цінність у межах поставленої мети є нижчою порівняно з генотипами груп I та II. Наприклад, низка ліній ДКС 4541 має сприятливий алель за dhnC397, але не має сприятливого алеля за rspC1090 та crtRB1. Це означає, що їх не слід автоматично виключати з роботи, але для підтвердження практичної цінності потрібні фенотипові випробування за умов посухи, оцінка продуктивності та перевірка комбінативної здатності.

Лінії SCP1243, SCP1260 та SCP1266 не мали жодного зі сприятливих алельних станів за трьома дослідженими функціональними маркерами. У межах запропонованого підходу вони належать до групи низького пріоритету. Проте така класифікація не означає повної відсутності селекційної цінності, оскільки ці лінії можуть мати інші корисні ознаки, не охоплені використаними

маркерами. Остаточне рішення щодо їхнього використання має прийматися після аналізу морфологічних, агрономічних та біохімічних даних.

Загалом запропонований підхід дозволяє сформувати послідовний алгоритм використання функціональних маркерів у попередній оцінці селекційного матеріалу кукурудзи. На першому етапі здійснюється генотипування ліній за окремими функціональними маркерами. На другому етапі результати переводяться в селекційно інтерпретовані алельні стани: сприятливий або несприятливий. На третьому етапі формується інтегрований профіль кожної лінії, в якому враховується кількість і тип сприятливих алелів. На четвертому етапі лінії ранжуються за пріоритетністю для подальших схрещувань, фенотипування та включення до селекційних програм.

Важливо, що така схема є відкритою для подальшого доповнення результатами фенотипових і біохімічних досліджень. Після проведення польових випробувань до інтегрованої оцінки можна додати показники фактичної посухостійкості, продуктивності, стабільності розвитку та реального вмісту каротиноїдів у зерні. Це дозволить не лише встановити, які генотипи мають бажані функціональні алелі, а й визначити, чи реалізуються ці алелі у практично значущих фенотипових показниках. Саме поєднання функціонального маркерного скринінгу з подальшим фенотиповим підтвердженням становить завершений підхід до оцінки селекційного матеріалу кукурудзи.

Порівняння отриманих результатів із сучасними підходами до маркер-асоційованої селекції підтверджує доцільність такого формату оцінювання. Функціональні маркери мають перевагу над нейтральними маркерами в тому, що вони пов'язані з конкретними генами або поліморфізмами, які можуть впливати на прояв селекційно важливих ознак [5]. Водночас їхнє використання потребує обережної інтерпретації, оскільки навіть функціональний маркер зазвичай пояснює лише частину фенотипової мінливості. Тому найкоректнішою стратегією є не заміна класичної селекційної оцінки, а створення багаторівневої системи добору, у якій

молекулярні маркери застосовуються для попереднього відбору перспективних генотипів і зменшення обсягу подальших польових або біохімічних випробувань.

У межах дослідженої вибірки найважливішим результатом є ідентифікація лінії SCP1285 як комплексно перспективної за трьома функціональними маркерами. Її доцільно розглядати як ключовий об'єкт для подальшого аналізу вмісту каротиноїдів у зерні, фенотипового тестування за умов водного дефіциту та використання в селекційних схрещуваннях. Лінії групи II доцільно залучати як джерела потенційної посухостійкості, тоді як лінії груп III і IV потребують додаткового обґрунтування їхнього використання на основі інших ознак. Таким чином, функціональний маркерний аналіз уже на цьому етапі дозволив зменшити неоднорідну групу з 30 ліній до обмеженого набору найбільш перспективних генотипів для подальшої селекційної роботи.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження підтвердило ефективність використання функціональних ДНК-маркерів для попередньої оцінки селекційного матеріалу кукурудзи за ознаками посухостійкості та вмісту каротиноїдів. А лінія SCP1285 може бути рекомендована як пріоритетний матеріал для подальшого вивчення та використання в селекційних програмах, спрямованих на поєднання адаптивності до посухи та підвищеної каротиноїдної цінності зерна.

1. За маркером *dhnC397*, пов'язаним з геном *dhn1*, сприятливий алельний варіант CCAAAG (A) виявлено у 22 із 30 досліджених ліній кукурудзи. За маркером *rspC1090*, пов'язаним з геном *rsp41*, сприятливий алельний стан CCGG (G) встановлено у 14 із 30 ліній.

2. Одночасну наявність сприятливих алельних станів за обома маркерами посухостійкості встановлено у дев'яти ліній: SCP1252, SCP1253, SCP1255, SCP1258, SCP1263, SCP1265, SCP1269, SCP1285 та SCP1289. Ці генотипи можна розглядати як найбільш перспективні за маркерною оцінкою потенційної посухостійкості та рекомендувати для подальшого фенотипового тестування за умов водного дефіциту.

3. За маркером *crtRB1-3'TE*, асоційованим із вмістом β -каротину в зерні, сприятливий алель 1, що відповідає фрагменту 543 п.н., виявлено лише в одній лінії – SCP1285. Алель 2 з профілем 296+875 п.н. був найпоширенішим і встановлений у 23 ліній, тоді як алель 3 з профілем 296+1221 п.н. виявлено у шести ліній. Отримані результати свідчать про низьку частоту сприятливого алеля *crtRB1* у дослідженому матеріалі та про особливу цінність лінії SCP1285 як потенційного джерела підвищеного накопичення β -каротину.

4. Інтегрована оцінка результатів функціонального маркерного аналізу показала, що лінія SCP1285 є найперспективнішою серед дослідженого матеріалу, оскільки поєднує сприятливий алель *crtRB1-3'TE* 543 п.н. зі сприятливими алельними станами за обома маркерами посухостійкості – *dhnC397* і *rspC1090*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. OECD/FAO (2024). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2024-2033*. Paris: OECD Publishing; Rome: FAO.
2. Nuss, E. and Tanumihardjo, S. (2010). Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(4), pp. 417–436.
3. McMillen, M., Mahama, A., Sibiya, J., Lübberstedt, T. and Suza, W. (2022). Genomic tools for the development of climate resilient maize. *Frontiers in Genetics*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1001001> [Accessed 28 Oct. 2022].
4. Sheoran, S., Kaur, Y., Kumar, S., Shukla, S., Rakshit, S. and Kumar, R. (2022). Genetic improvement of drought tolerance in maize: progress, challenges and opportunities. *Frontiers in Plant Science*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872566> [Accessed 30 May 2022].
5. Daryanto, S., Wang, L. and Jacinthe, P.-A. (2016). Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLOS ONE*, [online] Volume 11(5), p. e0156362. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156362> [Accessed 25 May 2016].
6. Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D., Huang, Y., Huang, M., Yao, Y., Bassu, S., Ciais, P., Durand, J., Elliott, J., Ewert, F., Janssens, I., Li, T., Lin, E., Liu, Q., Martre, P., Müller, C., Peng, S., Peñuelas, J., Ruane, A., Wallach, D., Wang, T., Wu, D., Liu, Z., Zhu, Y., Zhu, Z. and Asseng., S. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), pp. 9326–9331.
7. Mangal, V., Verma, L., Singh, S., Saxena, K., Roy, A., Karn, A., Rohit, R., Kashyap S., Bhatt, A. and Sood, S. (2024). Maize improvement under changing climate: breeding and genomic approaches. *Heliyon*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35513> [Accessed 15 Aug. 2024].

8. Collard, B.C. and Mackill, D.J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363(1491), pp. 557–572.
9. Islam, S., Timsina, J., Salim, M., Majumdar, K. and Gathala, M. K. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Agronomy*, [online] Volume 8, p. 121. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy8070121> [Accessed 16 Jul. 2018].
10. Ribaut, J.-M. and Ragot, M. (2007). Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), pp. 351–360.
11. Yan, J., Kandianis, C., Harjes, C., Bai, L., Kim, E., Yang, X., Skinner, D., Fu, Z., Mitchell, S., Li, Q., Fernandez, M., Zaharieva, M., Babu, R., Fu, Y., Palacios, N., Li, J., Dellapenna, D., Brutnell, T., Buckler, E., Warburton, M. and Rocheford, T. (2010). Rare genetic variation at *Zea mays* crtRB1 increases β -carotene in maize grain. *Nature Genetics*, 42, pp. 322–327.
12. Natesan, S., Singh, T.S., Duraisamy, T., Chandrasekharan, N., Chandran, S., Adhimoolam, K., Muniyandi, S.J., Sampathrajan, V., Nalliappan, G.K., Muthurajan, R. and Meitei, L.J. (2020). Characterization of crtRB1 gene polymorphism and β -carotene content in maize landraces originated from North Eastern Himalayan Region of India. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, [online] Volume 4, p. 78. Available at: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00078> [Accessed 12 Jun. 2020].
13. Andersen, J.R. and Lubberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. *Trends in Plant Science*, 8(11), pp. 554–560.
14. Seleiman, M.F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H.H. and Battaglia, M.L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, [online] Volume 10(2), p. 259. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants10020259> [Accessed 28 Jan. 2021].

15. Chen, S., Dang, D., Liu, Y., Ji, S., Zheng, H., Zhao, C., Dong, X., Li, C., Guan, Y., Zhang, A. and Ruan, Y. (2023). Genome-wide association study for drought-related traits in maize. *Frontiers in Plant Science*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1165582> [Accessed 8 May 2023].
16. Zhang, N., Liu, B., Ye, F., Chang, J., Zhou, Y., Wang, Y., Zhang, W., Zhang, X., Xu, S. and Xue, J. (2023). Genetic architecture and candidate genes associated with drought tolerance in maize. *BMC Plant Biology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04489-0> [Accessed 6 Oct. 2023].
17. Yang, Y., Wang, B., Wang, J., He, C., Zhang, D., Li, P., Zhang, J. and Li, Z. (2022). A drought-responsive maize locus regulates stomatal movement and improves drought tolerance. *Plant Physiology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac340> [Accessed 21 Jul. 2022].
18. Cao, L., Ye, F., Fahim, A., Ma, C., Pang, Y., Zhang, X., Zhang, Q. and Lu, X. (2024). Functional characterization of drought-related genes in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00122-024-04625-w> [Accessed 15 May 2024].
19. Rorat, T. (2006). Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 11(4), pp. 536–556.
20. Graether, S.P. and Boddington, K.F. (2014). Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Frontiers in Plant Science*, [online] Volume 5, p. 576. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00576> [Accessed 31 Oct. 2014].
21. Kulkarni, K.P., Appiah, R.K., Reddy, U.K. and Melmaiee, K. (2024). Cleaved amplified polymorphic sequence markers in horticultural crops: current status and future perspectives. *Agronomy*, [online] Volume 14(11), p. 2598. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy14112598> [Accessed 4 Nov. 2024].
22. Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J. and Pepper, A.E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms:

- experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal*, 14(3), pp. 387–392.
23. Liu, S., Hao, Z., Weng, J., Li, M., Zhang, D., Pan, G., Li, X., Xie, C. and Zhang, S. (2015). Identification of two functional markers associated with drought resistance in maize. *Molecular Breeding*, [online] Volume 35, p. 53. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0231-7> [Accessed 24 Jan. 2015].
 24. Bouis, H.E. and Saltzman, A. (2017). Improving nutrition through biofortification: a review of evidence from HarvestPlus, 2003 through 2016. *Global Food Security*, 12, pp. 49–58.
 25. Harjes, C., Rocheford, T., Bai, L., Brutnell, T., Kandianis, C., Sowinski, S., Stapleton, A., Vallabhaneni, R., Williams, M., Wurtzel, E., Yan, J. and Buckler, E. (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, 319, pp. 330–333.
 26. Liu, L., Jeffers, D., Zhang, Y., Ding, M., Chen, W., Kang, M.S. and Fan, X. (2015). Introgression of the crtRB1 gene into quality protein maize inbred lines using molecular markers. *Molecular Breeding*, [online] Volume 35, p. 154. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0349-7> [Accessed 16 Jul. 2015].
 27. Zhou, Y., Han, Y., Li, Z., Fu, Y., Fu, Z., Xu, S. and Yang, X. (2012). ZmcrtRB3 encodes a carotenoid hydroxylase that affects the accumulation of alpha-carotene in maize kernel. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(4), pp. 260–269.
 28. Owens, B., Lipka, A., Magallanes-Lundback, M., Tiede, T., Diepenbrock, C., Kandianis, C., Kim, E., Cepela, J., Mateos-Hernandez M., Buell, C., Buckler, E., DellaPenna, D., Gore, M. and Rocheford, T. (2014). A foundation for provitamin A biofortification of maize: genome-wide association and genomic prediction models of carotenoid levels. *Genetics*, 198(4), pp. 1699–1716.
 29. Suwarno, W.B., Pixley, K.V., Palacios-Rojas, N., Kaeppler, S.M. and Babu, R. (2015). Genome-wide association analysis reveals new targets for

- carotenoid biofortification in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 128, pp. 851–864.
30. Garoma, B., Azimach, G., Bante, K. and Menkir, A. (2024). Assessing the carotenoid profiles and allelic diversity of yellow maize inbred lines adapted to mid-altitude subhumid maize agroecology in Ethiopia. *Frontiers in Plant Science*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1406550> [Accessed 23 Jul. 2024].
 31. Sagare, D.B., Shetti, P., Reddy, S.S., Surender, M. and Pradeep, T. (2015). Screening of maize (*Zea mays L.*) germplasm for crtRB1-3'TE allele enhancing provitamin A concentration in endosperm. *Research Environment and Life Sciences*, 8(4), pp. 673–674.
 32. Amoah, P., Adetimirin, V., Anokye, B., Ilesanmi, O., Unachukwu, N. and Aporva, E. (2025). Characterization of carotenoid profiles and presence of functional markers in sub-tropical maize (*Zea mays L.*) inbred lines. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 61(2), pp. 86–99.
 33. Menkir, A., Diengm, I., Meseka, S., Maziya-Dixon, B., Bossey, B., Muhyideen, O., Ewool, M., Coulibaly, M. and Mengesha, W. (2025). Concurrent enhancement of provitamin A and yield in tropical maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1611495> [Accessed 27 Jul. 2025].
 34. Chandrasekharan, N., Ramanathan, N., Pukalenth, B., Chandran, S., Manickam, D., Adhimoolam, K., Nalliappan, G., Manickam, S., Rajasekaran, R., Sampathrajan, V., Muthusamy, V., Hossain, F., Gupta, H. and Natesan, S. (2022). Development of β -carotene, lysine and tryptophan-rich maize genotypes by combining crtRB1 and opaque2 genes. *Scientific Reports*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11585-y> [Accessed 20 May. 2022].
 35. Prysiazniuk, L., Honcharov, Y., Shytikova, Y., Hurska, V. and Tkachyk, S. (2022). Marker-trait association analysis of functional gene markers for carotenoids across diverse maize inbred lines. *Journal of*

- Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.55251/jmbfs.1444> [Accessed 1 Aug. 2022].
36. Sagare, D.B., Shetti, P., Surender, M., Reddy, S.S., Pradeep, T. and Anuradha, G. (2018). Maize: potential crop for provitamin A biofortification. *Maydica*, 63(2), pp. 1–11.
 37. Prasanna, B.M., Palacios-Rojas, N., Hossain, F., Muthusamy, V., Menkir, A., Dhliwayo, T., Ndhlela, T., San Vicente, F., Nair, S.K., Vivek, B.S., Zhang, X., Olsen, M. and Fan, X. (2020). Molecular breeding for nutritionally enriched maize: status and prospects. *Frontiers in Genetics*, [online] Volume 10, p. 1392. Available at: <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01392> [Accessed 21 Feb. 2020].
 38. Sayadi Maazou, A.-R., Gedil, M., Adetimirin, V., Meseka, S., Mengesha, W., Babalola, D., Offorredo, Q. and Menkir, A. (2021). Marker-trait association analysis of functional gene markers for carotenoids across diverse maize inbred lines. *Agronomy*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy11102022> [Accessed 9 Oct. 2021].
 39. Присяжнюк, Л.М., Гринів, С.М., Мельник, С.І., Шитікова, Ю.В., Діхтяр, І.О. та Таганцова, М.М. (2023). Методи молекулярно-генетичного аналізу для оцінки сортів рослин на ВОС та сортової ідентифікації: методичні рекомендації. Вінниця: ТОВ «ТВОРИ».
 40. Hao, Z., Li, X., Xie, C., Weng, J., Li, M., Zhang, D., Bai, L., Zhang, S. and Li, X (2011). Identification of functional genetic variations underlying drought tolerance in maize using SNP markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(8), pp. 641–652.
 41. Palusa, S.G., Ali, G.S. and Reddy, A.S.N. (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *The Plant Journal*, 49(6), pp. 1091–1107.