

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

05.03 – КМР. 971 «С» 2022.08.26. 010 ПЗ

НУБІП України

АДУ-БОАЧЕ ОЛІВЕР

2022 р.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет агробіологічний

Кафедра генетики, селекції і насінництва ім. М. О. Зеленського

УДК 631.527:633.854.78

ПОГОДЖЕНО

Декан агробіологічного факультету

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри генетики,
селекції і насінництва ім. проф.
М. О. Зеленського

Тонка О. Л.

(підпис)

« »

2022 р.

Макарчук О. С.

(підпис)

« »

2022 р.

МАГІСТЕРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «СТВОРЕННЯ НОВИХ ГІБРИДІВ ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ ЗА
ДОПОМОГОЮ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ СЕЛЕКЦІЇ РОСЛИН»

Спеціальність 201 «Агрономія»

Освітня програма «Селекція і генетика сільськогосподарських культур»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Гарант освітньої програми

канд. с.-г. наук, доцент

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

доктор с.-г. наук, професор

Макарчук О.С.

(підпис)

Ковалишина Г.М.

(підпис)

Виконав

Аду-Боаче Олівер

(підпис)

КІЇВ – 2022

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет агробіологічний

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри генетики, селекції і
насівництва ім. проф. М. О. Зеленського

канд. с.-г. наук, доцент

Макарчук О. С.

(підпис)

2021 року

ЗАВДАННЯ

ДО ВИКОНАННЯ МАГІСТЕРСЬКОЇ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТУ

Гаркуші Олексію Юрійовичу

Спеціальність 201 Агроніомія

Освітня програма «Селекція і генетика сільськогосподарських культур»

Орієнтація освітньої програми освітньо-професійна

Тема магістерської кваліфікаційної роботи «Створення нових гібридів цукрової кукурудзи за допомогою сучасних методів селекції рослин»

затверджена наказом ректора НУБіП України від «26» серпня 2022р. №971 «С»

Термін подання завершеної роботи на кафедру 2022.10.10

Вихідні дані до магістерської кваліфікаційної роботи: інбредні лінії кукурудзи в генотипі яких наявні мутантні гени структури ендосперму – *su*, *se* та *sh* зразки звичайної цукрової кукурудзи (інбредні лінії) – YSH-1556-1, HVB15, SE-SH1106, CE-395, MS-SU270, генетичні маркери для ПЛР аналізу – RFLP, RFPD, SCAR, STS.

Перелік питань, що підлягають дослідженню:

- 1) описати технологію селекційного процесу створення гібридів кукурудзи із підвищеним вмістом моноцукрів;
- 2) методом ПЛР-аналізу визначити наявність мутантних генів структури ендосперму в досліджуваних інбредних лініях;
- 3) методом внутрішньовидової гібридизації передати крохмал-модифікуючі гени *su*, *se* та *sh* від самоzapильних ліній до гібридів, створених на їх основі;
- 4) дослідити колекційний та вихідний матеріал кукурудзи за морфологічними та цінними господарськими ознаками;
- 5) провести аналіз зразків на придатність до інтенсивних систем вирощування.

Дата видачі завдання «29» жовтня 2021 р.

Керівник магістерської кваліфікаційної роботи

Ковалишина Г.М.

(підпис)

Завдання прийняв до виконання

Аду-Боаче Олівер

(підпис)

ЗМІСТ	
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. МУТАНТНІ ГЕНИ ЕНДОСПЕРМУ ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ ТА ЯК ВОНИ БУЛИ УТВОРЕНІ.....	11
1.1. Su (цукровий) мутантний ген.....	11
1.2. Se (підсилювача цукру) мутантний ген.....	13
1.3. Sh-2 (Shrunken-2) мутантний ген.....	15
1.4. Розведення цукрової кукурудзи на солодкість	17
1.5. Маркери ДНК.....	17
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	19
2.1. Місце експерименту.....	19
2.1.1. Матеріали	19
2.1.2. YSH-1556-1	20
2.1.3. IBBI5	20
2.1.4. SE-SH1106.....	21
2.1.5. CE-395	21
2.1.6. MS-SU 270.....	22
2.2. Генетичні маркери.....	22
2.2.1. Морфологічні маркери.....	23
2.2.2. Біохімічні маркери.....	23
2.2.3. Цитологічні маркери.....	23
2.2.4. Класифікація молекулярних маркерів.....	24
2.3. Екстракція ДНК.....	25
2.3.1. Як працює цей підхід.....	25

2.3.2. Пристрій, що використовується для виділення ДНК.....	26
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	27
2.4.1. Як працює ПЛР.....	27
2.4.2. Компоненти ПЛР.....	28
РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ.....	29
3.1. Вибір і посадка насіння.....	29
3.2. Екстракція ДНК з відібраних зразків.....	35
3.2.1. Апарат.....	36
3.2.2. Процедура.....	37
3.3. Завантаження ДНК на гель-електрофорез.....	41
3.4. Як отримано ПЛР.....	43
3.5. Результати реакції ПЛР.....	45
РОЗДІЛ 4. ВИБІР ТА ПОСАДКА ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ.....	48
4.1. Вибір бажаних генотипів цукрової кукурудзи.....	48
4.1.1. Фізичні характеристики лінії цукрової кукурудзи YSH 1556-1	48
4.1.2. Фізичні характеристики лінії цукрової кукурудзи CE 395	49
4.2. Посадка цукрової кукурудзи.....	49
4.2.1. Полив, тип ґрунту і підживлення	50
4.3. Схрещування двох обраних батьківських ліній	51
РОЗДІЛ 5. ОТРИМАНИЙ ГІБРИД ТА ЗБИРАННЯ УРОЖАЮ.....	54
5.1. Заготівля та збір	54
5.1.1. Характеристики та особливості нового гібрида F1	54
5.1.2. Морфологічна та агротехнічна характеристика гібрида F1	54

НУБІ! ПІРАІНІ

НУБІ! ПІРАІНІ

НУБІ! ПІРАІНІ

НУБІ! ПІРАІНІ

НУБІ! ПІРАІНІ

НУБІ! ПІРАІНІ

НУБІ! ПІРАІНІ

Список літературних творів

6. Висновок

57

56

ВСТУП

НУБІП УКРАЇНИ

Кукурудза є однією з найрізноманітніших зернових культур, доступних природі, і існує багато видів кукурудзи, які в основному згруповані за характеристиками ендосперму зерен. Найпопулярнішими видами кукурудзи є борошніста, зубовидна, попсова, солодка, воскова та стручкова. Фізичний вигляд кожного типу ядра визначається структурою ендосперму його кількістю та якістю.

НУБІП УКРАЇНИ

Кукурудзу вперше одомашнили корінні жителі південної Мексики близько 10 000 років тому і з тих пір кукурудза стала основною їжею для людей. Завдяки цьому виробництво кукурудзи перевершило виробництво пшениці та рису [1, 19].

НУБІП УКРАЇНИ

З іншого боку, цукрова кукурудза — це різновид кукурудзи, який класифікується як *Zea mays, var, rugosa* і має жовті, білі та двокольорові зерна, які є солодкими, а іноді й дуже солодкими, залежно від типів генів, присутніх у їх незрілій або молочній стадії внаслідок високого вмісту цукру. Нижчий осмотичний потенціал досягається в результаті підвищення рівня цукру в зернах цукрової кукурудзи, що потім призводить до більшого поглинання води зернами. Цукрову кукурудзу споживають як овоч, який здебільшого їдять люди, або безпосередньо з кукурудзяного качана, або шляхом відділення солодких зерен від качана, це також основна овочева культура, яка вирощується в усьому світі переважно для споживання у свіжому вигляді, ніж як корм для тварин [19].

НУБІП УКРАЇНИ

Невідома мутація в польовій кукурудзі призводить до появи цукрової кукурудзи, і це також може статися в результаті природних мутацій у гені, який контролює перетворення цукру на крохмаль всередині ендосперму зерна. На відміну від сортів зернової кукурудзи, які здебільшого вважаються тваринницькими, і їх переважно збирають, коли їх зерна повністю дозріли та висохли, солодку кукурудзу збирають, коли вона перебуває на молочній стадії і її споживають як овоч. Це так, тому що процес дозрівання цукрової кукурудзи

НУБІП УКРАЇНИ

Невідома мутація в польовій кукурудзі призводить до появи цукрової кукурудзи, і це також може статися в результаті природних мутацій у гені, який контролює перетворення цукру на крохмаль всередині ендосперму зерна. На відміну від сортів зернової кукурудзи, які здебільшого вважаються тваринницькими, і їх переважно збирають, коли їх зерна повністю дозріли та висохли, солодку кукурудзу збирають, коли вона перебуває на молочній стадії і її споживають як овоч. Це так, тому що процес дозрівання цукрової кукурудзи

НУБІП УКРАЇНИ

споживають як овоч. Це так, тому що процес дозрівання цукрової кукурудзи

вимагає перетворення цукру в крохмаль і, крім того, цукрова кукурудза найчастіше погано зберігається, тому її необхідно вживати у свіжому вигляді або консервувати, або заморозити до того, як зерна затвердіють [19].

Якщо солодка кукурудза залишається на зберіганні занадто довго або якщо її збирають пізно, то в цьому випадку сахароза у звичайній солодкій кукурудзі швидко перетворюється на крохмаль, у результаті існує велика ймовірність того, що зерна цукрової кукурудзи можуть втратити стільки, скільки 50%-60% сахарози при нормальній температурі протягом 24 годин після збору врожаю. У XIX столітті сорти цукрової кукурудзи стали широко доступними в Сполучених Штатах та в інших частинах світу. Мільйони сортів солодкої кукурудзи все ще розробляються та виробляються і в наші дні.

Солодка кукурудза має незліченну кількість харчових цінностей, наприклад, солодка кукурудза має дуже важливу антиоксидантну дію, що може зменшити шанси захворіти серцево-судинними захворюваннями та раком. І зовсім нещодавно була розроблена солодка кукурудза, яка має високий вміст вітаміну А та двох каротиноїдів, зеаксантину та лютеїну, які, якщо вживати в належних кількостях, ці поживні речовини можуть уповільнити або уникнути спалаху вікових захворювань.

Кілька досліджень спричинили існування багатьох відомих генетичних мутацій, які складають різні види солодкої кукурудзи. Початкові сорти, які були створені, призвели до мутантного *su* (цукрового) алеля. Звичайні сорти містять у зерні приблизно 5-10% цукру. Сорти солодкої кукурудзи, у яких присутній ген *sh* (*shrunkен*), виробляють більшу частку цукру, ніж звичайні сорти *su* з вмістом цукру 22 %, а також мають набагато довший термін зберігання. Це означає, що вони зберігаються протягом тривалого часу, перш ніж вміст цукру перетворюється на крохмаль, внаслідок цього його в основному називають суперсолодким. Інший поширений і популярний сорт, який був розроблений, призвів до *se* (підсилювача цукру). Загальні фізичні характеристики солодкої кукурудзи з присутнім у ній геном *shrunkен-2* (*sh2*) пов'язані з тим, що зріле зерно солодкої кукурудзи стає дуже

сухим і зменшується, коли воно досягає молочної стадії. Менша кількість крохмалю зберігається в ендоспермі цукрової кукурудзи *sh* і тому містить більше цукру і солодша, ніж звичайна солодка кукурудза *sh* (цукриста) і *se* (підсилювач цукру). Всі алелі, відповідальні за розвиток цукрової кукурудзи, є рецесивними [2, 8].

Таким чином, у цьому дослідженні було обрано один сорт солодкої кукурудзи з кожного з цих мутантних алелів, таких як *sh* (цукристий), *se* (підсилювач цукру) і *sh* (зморшкуватий), включаючи звичайну кременисту кукурудзу та схрещування солодкої кукурудзи з *se-sh* видами. Це новий підхід, використаний ВНІС, українською селекційною компанією для впровадження його

в селекцію цукрової кукурудзи, щоб точно знати гени, які присутні в лініях і гібридах цукрової кукурудзи. Цей підхід також пришвидшить процес створення, оскільки селекціонер, знаючи гени, присутні в лініях цукрової кукурудзи, допомагає йому швидко приймати рішення щодо того, які лінії та гібриди йому слід вибрати. Цей підхід також допоможе легко й точно відстежити родовід певної лінії.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 1. МУТАНТНІ ГЕНИ ЕНДОСПЕРМУ ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ І ЯК ВОНИ УТВОРИЛИСЯ

У нинішні роки селекціонери наполегливо працювали над формуванням численних мутантних генів у селекції цукрової кукурудзи. Деякі з них полягали в покращенні вмісту цукру, розробці ліній із раннім цвітінням і, найголовніше, у створенні ліній та гібридів із довшим терміном зберігання. У цьому дослідженні ми приділили більше уваги трьом (3) мутантним генам цукрової кукурудзи, а саме:

- ❖ *Su* (цукристий)
- ❖ *Se* (підсилувач цукру)
- ❖ *Sh2* (зморшкуватий-2)

1.1. *Su* (цукровий) мутантний ген

Мутантний ген *su* (цукровий) є найстарішим типом солодкої кукурудзи, яка містить більше цукру та менше крохмалю. Він більш кращий щодо глибини посадки, росту та схожості, ніж інші види. Існування рецесивного цукристого (*su*) генотипу в цукровій кукурудзі має високу тенденцію до затримки перетворення цукру в крохмаль під час розвитку ендосперму, що переважно призводить до солодкого смаку, а не крохмалистого. У цукровій кукурудзі ген був приєднаний до короткого плеча хромосоми 4 [2, 12].

Фермент, що розгалужує крохмаль класу II, який є енергійним у клітинних пластидах, кодується геном *su* (цукровий). Під час синтезу крохмалю існує зв'язок між крохмалем і гідролізом ізоамілази за допомогою α -(1,6), тому на цьому етапі ген *su* (цукровий) забезпечує середнє підвищення загального рівня цукру в ядрах. Недоліком є те, що перетворення цукру на крохмаль у зернах

відбувається дуже швидко і в більшості випадків призводить до короткого періоду збору врожаю до того, як вміст цукру в зернах знизиться після основного етапу споживання в їжу, який становить приблизно 75% вологи в зерні кукурудзи. Ген *su*, як правило, не має виняткового солодкого смаку, оскільки це суперечить його назві.

Тим не менш, це призводить до підвищення рівня фітоглікогену (зволожувач, який складається з високочистого вмісту фітоглікогену, який витягується із цукрової кукурудзи) або водорозчинних полісахаридів. Звичайні сорти солодкої кукурудзи мають поліроване зерно та гладкі ознаки звичайної цукрової кукурудзи, це є результатом присутності фітоглікогену та водорозчинних полісахаридів в ендоспермі зерен кукурудзи [2, 15].



Рисунок 1.1. Морфологічний вигляд цукристих типів. Насіння має блідо-жовтий колір і дуже дрібне за розміром.

Через те, що цукор перетворюється на крохмаль, бажано не вирощувати його при низьких температурах.

1.2. Мутантний ген *Se* (підсилювач цукру).

Мутантний ген *se* (*sugary enhancer*) також є рецесивним трансформатором мутації гена *sugary* (*su*). Алель енхансера цукристості, коли є гомозиготним, зростає до абсолютного цукру в нормальному цукристому (*su*) до рівня, рівного рівням у зернах різної кукурудзи. Характеристики гена *se* (підсилювача цукру) на зерні кукурудзи – високий загальний вміст цукру, прозорий колір і повільне висихання – в основному досліджувалися на інбредній лінії цукрової кукурудзи. У післязбиральний період ген *se* (підсилювач цукру) забезпечує більший вміст вологи в зернах цукрової кукурудзи, а також підтримує приблизно підвищений рівень фітоглікогену протягом цього часу. До важливості цього гена відносяться зниження рівня перикарпної ядра, що робить ядра більш ніжними і підвищує рівень цукру-мальтози. Ген *se* (підсилювач вмісту цукру) надає приблизно в 1,5-2 рази більше сахарози ядрам на вершині зрілості врожаю, порівняно з мутантними зернами гена цукру в той час, коли гени *su* (підсилювач вмісту цукру) та *se* (підсилювач цукру) є рецесивними. Довге плече хромосоми 2 у солодкій кукурудзі знаходиться там, де розташований локус гена енхансера цукру. Нуклеотидна послідовність гена *se* (підсилювача цукру) наразі залишається невідомою, і не тільки це, але й ферментативна основа *se* також залишається невідомою. З огляду на всі ці проблеми, спадковість гена *se* (підсилювача цукру) можна отримати, маючи нормальний досвід у галузі молекулярних маркерів [2].

Ендосперм зерен із цукристим покращувачем іноді може містити вдвічі більше цукру, ніж цукристий тип і, оскільки цей цукор все ще перетворюється на крохмаль, тож вуха зберігають свій солодкий смак протягом тривалого періоду часу. Гени, посилені цукром, у кукурудзі представлені двома різними типами, такими як гомозиготні та гетерозиготні. У гомозиготній кукурудзі з підвищеним вмістом цукру два з цих генів поєднані разом, тому 100% зерен, отриманих у наступному поколінні, мають підвищений вміст цукру у них, але, з іншого боку,

гетерозиготна кукурудза *se* має лише один ген *se*, присутній у ній, і тому, відповідно до законів успадкування Менделя, 75% зерен є цукристими, а 25% залишаються цукристими [17].

Оскільки індустрія насіння солодкої кукурудзи посилює свої зусилля з розробки нових гібридів і ліній, що містять гени *se*, вона також постраждала від того факту, що зерна кукурудзи *su* та *se* не можна легко й точно розрізнити під час сегрегації. Це уповільнює програму створення, і в кінці кожної програми створення рослина не може досягти точного результату. Щоб вирішити цю проблему, селекціонери цукрової кукурудзи починають використовувати маркери ДНК у своїх селекційних програмах, і завдяки цьому вони прагнуть отримати точні селекції у своїх лініях виробництва цукрової кукурудзи, а також можуть створювати різні сорти гібриди цукрової кукурудзи [5].



Рисунок 1.2. Тип солодкої кукурудзи *se* (підсилювач цукру).

Морфологічно вона майже схожа на цукрову кукурудзу. Це є однією з причин, чому впровадження ДНК-маркерів є важливим у селекційному процесі.

1.3. *Sh-2 (Shrunken-2)* Мутантний ген

Сорти кукурудзи з геном *sh2* здебільшого називають «суперсолодкими», тому що цей ген солодкої кукурудзи містить найбільшу кількість цукру в ендоспермі зерна кукурудзи. У насінні цього сорту солодкої кукурудзи зберігається менше крохмалю, тому вони мають меншу вагу та виглядають зморщеними. Їх називають зморщеними через їх зменшений зовнішній вигляд. Ген *sh-2*, не схожий на інші типи солодкої кукурудзи, уповільнює перетворення цукру на крохмаль, у результаті чого суперсолодка кукурудза отримує тривалий сезон збору врожаю, ніж інші генотипи.

Незважаючи на те, що *sh2* є найбільш переважним серед інших сортів, він має проблеми, такі як отримання більш теплого ґрунту в деяких частинах світу для кращого проростання та правильного росту рослин [18].

На молочній стадії *sh-2* (зморщений-2), приблизно через 20 днів після запилення, ген цукрової кукурудзи *sh2* містить 30% сахарози, що є найбільшою кількістю, з вмістом сахарози в 3 і 8 разів більше (10%). У Сполучених Штатах суперсолодка кукурудза була вперше розроблена в 1950 році професором Джоном Логнаном з Університету Іллінойсу, що зробило насінневий фонд штату Іллінойс першою компанією, яка випустила суперсолодку кукурудзу під назвою «Illini Xtra Sweet». Протягом п'яти років відбулося широке поширення цукрової кукурудзи типу *sh2*, яка зросла з 2% до 89% [13].

На початку розробки мутантних генів цукрової кукурудзи було рекомендовано, що рецесивний *sh-2* (зморщений) може мати величезну функцію в галузі розведення цукрової кукурудзи. Було проведено переконливу кількість наукових досліджень щодо високого вмісту цукру в гені *sh-2* (зморщений) після рекомендації. Довге плече хромосоми 3 у солодкій кукурудзі — це місце, де розташований ген *sh-2* (зморщений), який кодує велику субодиницю AD-глюкозопірофосфорилази (AGP), яка належить до класу I enzyme. Цей фермент відповідає і відіграє величезну роль у перетворенні цукру на крохмаль. Повністю

культивованим ген сухої зморщеної солодкої кукурудзи містить приблизно вдвічі більше загального вмісту цукру, відносно 1/3-1/2 рівня крохмалю та лише фрагментарний рівень фітоглікогену порівняно зі звичайним су (цукристим) солодким. Мутантний ген кукурудзи. Звичайний сорт солодкої кукурудзи sh-2, який також називають «надсолодким», становить величезну перевагу на комерційному ринку кукурудзи Сполучених Штатів. На вершині зрілості ген sh-2 (shrunken-2) солодкої кукурудзи загалом призводить до повного зниження рівня вуглеводів і демонструє відносно більший час цукристості порівняно з нормальним мутантним геном su (цукриста). Було встановлено, що ген sh-2 (shrunken-2) впливає на збільшення солодкості кукурудзи в генетичному складі. З іншого боку, також було встановлено, що включення цього гена в генетичний склад солодкої кукурудзи знижує вміст WSP (водорозчинного полісахариду), зменшуючи вміст ендосперму та також зменшуючи вміст крохмалю. Несприятливо те, що нормальний ген sh-2 (shrunken-2) солодкої кукурудзи не має кремового та гладкого вигляду нормального мутантного гена se (підсилювача цукру) та su (цукру) через знижений рівень водорозчинних полісахаридів (WSP). Через низький рівень вмісту крохмалю він, таким чином, знижує енергетичні рівні нормального мутантного гена sh-2, тим самим роблячи розсаду низькою енергією, поганою схожістю та низьким ростом розвитку рослин порівняно зі звичайними мутантними генами su та se. Це також призводить до меншої ваги, які легко пошкоджуються рослини цукрової кукурудзи, які насам не здатні протистояти стресу навколишнього середовища, такому як вітер і сильний дощ, і, що найгірше, призводять до того, що селекціонери цукрової кукурудзи втрачають поле для цукрової кукурудзи [2].



Fig 1.3 є морфологічним видом цукрової кукурудзи Шрунке-2 (sh-2). Він виглядає дуже зморщеним, тому його назва зморщений-2

1.4. Розведення цукрової кукурудзи на солодкість

Методи селекції, застосовані у звичайній солодкій кукурудзі, використовувалися селекціонерами для покращення комерційних гібридів протягом багатьох років. Цей підхід включає покращення гомозиготних інбредних ліній шляхом самозапилення та подальшого відбору всіх бажаних ознак за допомогою методу родоходу. Щоб визначити, які з гібридів мають високий комерційний потенціал, необхідно провести схрещування в інбредних лініях і потім дослідити гібриди після схрещування. Три мутантних гена *su*, *se*, *sh-2* широко і активно використовувалися селекціонерами солодкої кукурудзи в останні роки, або окремо, або в поєднанні з недавньою селекцією для отримання гібридів і ліній з високим вмістом цукру [9].

1.5. ДНК-МАРКЕРИ

ДНК-маркер — це послідовність із розпізнаним фізичним розташуванням у хромосомі, яка може бути використана для ідентифікації людей. Маркери використовуються для відстеження успадкування близького гена, який не був розпізнаний, але має відоме розташування. Генетичний маркер сам по собі може не виконувати функції або бути частиною гена. ДНК-маркер може мати форму довгої або короткої послідовності ДНК. Картування генів було обмежено для розпізнавання протягом тривалого часу організмів за нормальними фенотиповими маркерами. Це було на додаток до генів, які без зусиль кодували помітні характеристики, такі як форма насіння. Генне картування стало обмеженим через неадекватну кількість цих типів ознак. Ці проблеми спонукали до відкриття генних

маркерів, які розпізнають особливості, які неможливо побачити в організмах. Генетичні маркери були згруповані в дві категорії, такі як. [6].

- ❖ Молекулярний маркер, який виявляє варіації або поліморфізм на рівні ДНК, наприклад зміни нуклеотидів. Що стосується молекулярних маркерів, у картуванні генів є три операції:

- ❖ Існує прямиий опис маркерами цікавого гена, а не продукту гена, і тому він служить цілеспрямованим пристроєм для скринінгу гібридів соматичних клітин.

- ❖ Маркери також допомагають у фізичному відношенні генів і найчастіше використовуються в дослідженні ДНК і легко перевіряються навички.

- ❖ Адекватні маркери для побудови генетичних карт за допомогою аналізу зчеплення найчастіше забезпечуються молекулярними маркерами [10].

- ❖ Біохімічні маркери, які досліджують варіації на рівні генного продукту, такі як зміни амінокислот і білка. Маркери ДНК демонструють два способи успадкування, які є доміантним і рецесивним, у результаті цього, якщо генетичний шлях гомозигот і гетерозигот можна диференціювати, тоді маркер позначається як співдомінантний. ДНК-маркери відіграють життєво важливу роль у генетичному картуванні, категорично в ідентифікації позиції різних алелів, які знаходяться поруч один з одним на точній хромосомі [10, 11].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Місце експерименту

Дане лабораторне дослідження проводилося в лабораторному дослідницькому центрі ВНІС, що розташований за адресою: вул. Академіка Заболотного, 150, Київська область, Україна, 03680. Дослідження пройшло низку методів, доки воно не дійшло до успішної стадії. І деталі цих методів були надані наступним чином:

2.1.1. Матеріали

У цьому дослідженні використано шість проростків кукурудзи, які складаються з гомозиготних ліній кожного з генів цукрової кукурудзи (*su*, *se* та *sh*), гетерозиготних ліній, які є комбінацією ліній цукрової кукурудзи *se* та *sh*, було обрано щоб проаналізувати та дізнатися тип генів, присутніх у цій лінії кукурудзи, і який з них є домінантним і, нарешті, проростки звичайної зернової кукурудзи. Ці матеріали були відзначені в експерименті як:

- ❖ YSH-1556-1;
- ❖ IBB15;
- ❖ SE-SH 1106;

- ❖ CE-395;
- ❖ MS-SU 270.

2.1.2. YSH-1556-1

YSH-1556-1 є гомозиготною лінією *sh*. Його вирощували в фільтрувальному папері в спеціальних умовах і протягом 5-6 днів, він розвивався в розсаді, а потім збирав і був готовий для вилучення ДНК (рис. 2.1).

Два з цих сортів були спочатку висаджені, а потім після проростання я оглянув і відібрав здорові саджанці для виділення ДНК. Його зберігали в теплиці

при температурі 25 градусів і при слабкому освітленні. Він спочатку протягом двох днів виріс у пагін, а потім з пагона розвинувся в розсаду.



Figure 2.1.

2.1.3. IBB15

Це гомозиготна зернова кукурудза, яка також була вирощена в фільтрувальному папері і також поміщена в спеціальні умови, необхідні для її росту.



Fig 2.2 – проросток кукурудзи на звичайне зерно, який використовувався в дослідженнях.

Оскільки це була кукурудза на зерно і з моїми меншими знаннями про звичайне зерно, я спочатку не знав, за якою схемою росту я повинен вирощувати цю лінію

зубів, але, зібравши більше інформації від експертів, я переконався, що вирощуватиму її так само як вирощував лінії цукрової кукурудзи.

2.1.4. SE-SH1106

Це комбінація (схрещування) ліній цукрової кукурудзи se та sh. Його також вирощували на фільтрувальному папері та зберігали в контрольованих умовах, щоб сприяти його правильному росту.

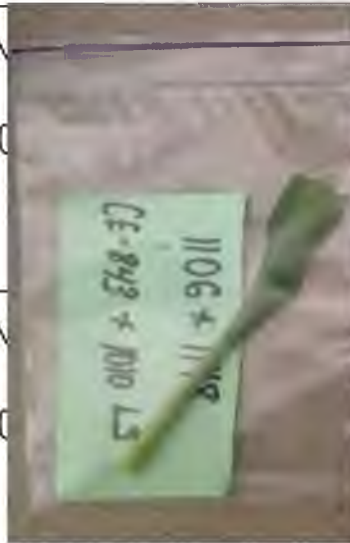


Fig. 2.1 також є проєктом схрещування цукрової кукурудзи між генами se та sh

2.1.5. SE-395

Це лінія se (підсилювач цукру). Ця лінія є однією з найкращих ліній у селекційних матеріалах цукрової кукурудзи у ВНС. Його також вирощували на фільтрувальному папері, як і інші сорти кукурудзи, але не схожі на інші, цій лінії знадобилося більше тижня, щоб розвиватися в розсаді. Це було результатом поганого стану, але цей рядок є пізнім рядком, до якого знадобилося багато часу.



Fig 2.4 має два зображення, позначені як А і В. А – це розсада цукрової кукурудзи типу se, тоді як В – розсада цукрової кукурудзи типу su

2.1.6. MS-SU 270

Це су (солодкий) рядок. І взято з селекційних матеріалів програми селекції цукрової кукурудзи ВНС. Подібно до того, як усі матеріали вирощувалися у фільтрувальному папері, цей матеріал також вирощувався у фільтрувальному папері за тnx самих умов, що й інші, і так само, як лінія se займала багато часу, щоб розробити, цей конкретний також потребував багато часу, щоб перетворитися на розсада.

2.2. Генетичні маркери

ДНК маркери є основним явищем у вивченні селекції рослин. Генетичний маркер — це послідовність ДНК із розпізнаним розташуванням хромосоми, яка домінує над певною ознакою. Вони діють як індикатори, які міцно пов'язані з геном. ДНК-маркери в основному поділяються на дві категорії:

Молекулярні маркери та класичні маркери. Класичні маркери бувають різних типів, таких як цитологічні, морфологічні та біохімічні маркери, і деякі приклади:

❖ Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP)

- ❖ Випадково ампліфікована поліморфна ДНК (RAPD)
- ❖ Поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів
- ❖ Прості область, що характеризується послідовністю (SCAR) і
- ❖ Послідовність мічених сайтів (STS) [12, 13].

2.2.1 Морфологічні маркери

Такі ознаки, як колір квітки, структура насіння та звички росту, можна фізично диференціювати за морфологічними маркерами. Ці маркери прості, оскільки не потребують спеціального інструменту. Крім того, для їх роботи не потрібні молекулярні та біохімічні особливості. Ці маркери використовувалися селекціонерами протягом багатьох років для досягнення успішних результатів у своїх програмах розведення. Оскільки він є хорошим маркером, він має недоліки, такі як те, що іноді на них впливає рівень росту рослин, а також їх небагато [13].

2.2.2 Біохімічні маркери

Біохімічні маркери — це кілька молекулярних форм ферментів, які кодуються різними генами та мають однакові цілі. Вони з користю були використані для виявлення генетичного різноманіття, потоку генів, поділу та структури популяції [13].

2.2.3 Цитологічні маркери

Цитологічні маркери — це маркери, які пов'язані з варіаціями кількості, форми та розміру, смуг, порядку та положення хромосом. Варіації, які відбуваються у варіаціях, які підтверджують розподіли гетерохроматин і еухроматин. Наприклад, R-смуги перетворюються на G-смуги, G-смуги складаються з фарбування Гімзи, тоді як Q-смуги складаються з хінакрин-гідрохлориду. У диференціації мутованої та нормальної хромосоми можна використовувати ці хромосомні бенчмарки, і, крім

того, у фізичному картуванні такі маркери також можна використовувати для опису групи зчеплення [13].

2.2.4 Класифікація молекулярних маркерів

Існують різні категорії, у які молекулярні маркери згруповані на основі:

1. Форма передачі, яка складається з органел, успадкованих від батьківської сторони, органел, успадкованих від материнської сторони, і двобатьківської ядерної спадковості.
2. Метод виявлення, який також складається з молекулярних маркерів на основі гібридизації або ПЛР
3. Форма дії генів, яка складається з домінантних або рецесивних маркерів

Дуже різні типи молекулярних маркерів були виявлені та успішно використані в галузі генетики та селекції.

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (RFLP): це молекулярний маркер, який використовується для відстеження певної послідовності ДНК під час її руху між клітинами. Ці молекулярні маркери є звичайним типом молекулярних маркерів і базуються на гібридизації клонованої ДНК з фрагментами ДНК.

Найчастіше вони являють собою одну комбінацію клонів або рестриктаз. Молекулярні маркери в основному використовуються в селекції рослин і стосуються клонування гена ПЛР-реакції з дивних місць геному рослини. Молекулярні маркери використовуються для мічення білків, і тому вони призначені для ідентифікації ферментів, які відрізняються від амінокислот, але які активують той самий ідентичний амінокислотний зворотний зв'язок [14].

2.3. Екстракція ДНК

Екстракція ДНК — це витіснення дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) із клітин, у яких вона регулярно існує [15].

У багатьох діагностичних методичних підходах екстракція ДНК часто є першим кроком, який використовується для виявлення вірусів і бактерій у середовищі існування, а також для виявлення генетичних розладів. У цьому підході використовується перелік методів, але вони не обмежуються:

- ❖ Поліморфізм довжини кінцевого рестрикційного фрагмента (T-RFLP): T-RFLP здебільшого використовується для ідентифікації, розрізнення та вимірювання часткових і часових структур у середовищах морських бактерій.
- ❖ Флуоресцентна гібридизація in situ (FISH): ця молекулярна техніка допомагає розпізнати та обчислити точні групи бактерій.
- ❖ Секвенування

2.3.1 Як працює цей підхід

Щоб успішно застосувати цей підхід, необхідно дотримуватися протоколів:

- ❖ Розкрийте (лізуйте) віруси або клітини, які містять ДНК, що викликає занепокоєння: часто спочатку використовують обробку зразка ультразвуком, а потім змішують його з фенолом.

Найбільш ефективний для руйнування білкових клітинних стінок. Щоб видалити ліпідні оболонки, необхідно додати детергент.

- ❖ З додаванням протеази, ДНК-асоційовані білки та інші клітинні білки можуть бути зруйновані. Осадженню білка сприяє додавання ацетату амонію або натрію, який є сольовою сполукою. Таким чином, білок залишатиметься в

органічній стадії або навіть буде обережно витягнутий, коли зразок переміщують з фенол-хлороформом і потім центрифугують. Після цього кроку ДНК буде знайдено на межі розділу між двома фазами.

- ❖ Щоб досягти належного осадження ДНК, її слід змішати з холодним етанолом або ізопропанолом, а потім центрифугувати. Спирт слугуватиме для промивання, щоб позбутися попередньо доданої солі, оскільки ДНК нерозчинна в спирті, потім вона виїде з розчину.

- ❖ Після цього знову промийте отриманий осад ДНК холодним спиртом і відцентрифугуйте для відновлення осаду.

- ❖ ДНК можна повторно суспендувати в буфері, такому як Tris, після вивільнення спирту з гранули та дозволу йому висохнути [14, 15].

2.3.2 Пристрій, що використовується для виділення ДНК

Для належного розщеплення або лізису клітин на ранніх стадіях екстракції використовується пристрій, який називається bead beater, щоб зробити ДНК доступною. До скляних кульок додається Eppendorf, що містить досліджуваний зразок, і бісер сильно вібрає розчини, що потім змушує скляні кульки руйнувати клітини. Ультразвук і френч-прес також є альтернативними методами, які можна використовувати для лізування клітин. Потім ДНК повторно суспендують у буфері.

Щоб підтвердити наявність ДНК, зразки повинні пройти електрофорез на агарозному гелі, який містить бромід етидію або флуоресцентний барвник, який реагує з ДНК під УФ-світлом.

Центрифуга, яка обертається зі швидкістю 15 000–20 000 обертів на хвилину (об/хв), щоб сприяти належному розподілу різних фаз екстракції. Центрифуга також допомагає відправити ДНК після промивання солей ізопропанолом.

Для розчинення ДНК в агарозному гелі з електричним зарядом додатково використовується гелева коробка. ДНК рухається крізь гель до позитивно зарядженої молекули в результаті негативно зарядженої молекули, коли чорний і

червоний дротик забиваються в джерело живлення постановки. ДНК рухається з різною швидкістю відповідно до їх розмірів, при цьому більші шматки рухаються повільніше через порове середовище, це призводить до поділу за розміром, який можна вилучити лише в гелі [15].

2.4 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Полімеразна ланцюгова реакція, яка скорочено називається (ПЛР), є дуже швидким і економічним підходом до копіювання та ампліфікації невеликих ділянок ДНК. Дослідження відокремлених ділянок ДНК майже недосяжне без використання ПЛР-ампліфікації, оскільки переконлива кількість ДНК має вирішальне значення для генетики та молекулярного аналізу. ПЛР зосереджена на використанні здатності ДНК-полімерази для синтезу нових ланцюгів ДНК, взаємозалежних із запропонованими ланцюгами матриці. ДНК потребує праймера, щоб додати до першого нуклеотиду, оскільки ДНК-полімераза може включати нуклеотид лише до попередньо існуючої групи 3'-ОН. Ця необхідність робить можливим окреслити певну частину шаблонної послідовності, яку індивід хоче розширити. Полімеразна ланцюгова реакція має велике значення в багатьох лабораторних методах, таких як виявлення бактерій і вірусів, діагностика генетичних розладів і ДНК-відбитки [16, 17].

2.4.1 Як працює ПЛР

Щоб ампліфікувати певну ділянку ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, спочатку зразок нагрівають, це робиться для денатурації ДНК або розкладання ДНК на дві частини одноланцюгової ДНК. Після цього, використовуючи початкові ланцюги як матриці, полімераза Таq синтезує та утворює два нових ланцюги ДНК. Це призводить до відповідності початкової ДНК, причому кожна з нових молекул містить стару та нову нитки ДНК, тому кожна з

цих ниток може бути використана для створення двох нових копій. Це призводить до понад мільйона моделей початкового сегмента ДНК. І все тому, що цикл денатурації нової ДНК повторюється 30-40 разів. Загальний процес ПЛР комп'ютеризований і може бути виконаний за кілька годин. Термоциклер — це машина, яка використовується для керування ПЛР, і вона запрограмована на забезпечення температури, необхідної для реакції, щохвилини, щоб забезпечити денатурацію ДНК. На кінці окремого нуклеотиду знаходиться зовнішній ланцюг драбини. З іншого боку нуклеотиду буде пара з нуклеотидом, що тримається на зовнішньому ланцюзі драбини. Нуклеотиди мають специфічні зв'язки, які вони утворюють. Усі літери А поєднуються з Т, а С – лише з G. Отже, кожна літера є супроводом іншої. Оригінальні копії клітин виготовляються за допомогою цього шаблону сполучення [18].

2.4.2 Компоненти ПЛР

- ❖ ДНК-полімераза: це форма ферментів, які синтезують нові ланцюги ДНК, які відповідають плямистій послідовності. ДНК-полімераза Taq (*Thermis aquaticus*) є найбільш часто використовуваним ферментом, але

- ❖ Pfu ДНК-полімераза (*Pycococcus furiosus*), її використовують усі, оскільки вона має дуже високу точність копіювання ДНК. Хоча ці ферменти абсолютно різні, всі вони мають властивості, які роблять їх актуальними для ПЛР, тобто вони здатні встановлювати нові ланцюги ДНК за допомогою ДНК-матриць і праймерів. Вони також стійкі до нагрівання.

- ❖ Нуклеотиди (dNTP): це окремі одиниці нуклеотидних основ, тобто А, Т, G і С, які є основними будівельними блоками для ланцюгів ДНК.

- ❖ Праймери: це короткі сегменти одноланцюгової ДНК, які є невід'ємною частиною цільової послідовності.

❖ Шаблони ДНК: це зразок ДНК, який містить цільову послідовність. Висока температура застосовується до початкової дволанцюгової молекули ДНК, щоб відокремити нитки один від одного.

❖ Буфери: хлорид калію часто використовується як буфер, який запускає відпал праймера в полімеразі Taq. Буфер в основному встановлюється на 8-

9,5
❖ $MgCl_2$: цей елемент сприяє ампліфікації полімерази Taq та підвищенню її активності [18, 19].

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

НУБІП Україні

РОЗДІЛ 3. ОТРИМАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ

3.1 Вибір і посадка насіння

На початку експерименту для посіву було відібрано насіння цукрової кукурудзи, які вже використовуються як лінії у ВНІС. Два насіння були відібрані з кожного з генів солодкої кукурудзи (цукристого (su), цукристого підсилювача (se) і зморщеного гена (sh-2) разом з двома насінням із нормальної зернової кукурудзи та ще двома насінням із цукрової кукурудзи, отриманої як схрещування генів su і sh.

Після відбору насіння цим насінням було надано спеціальні коди на основі їхніх генотипів для легкої ідентифікації, причому SE-395 була лінією підсилювача цукрів, SE-SH 1106 — це щось середнє між енхансером цукрів і shrunken-2, а IBB15 — лінією Кукурудза на зерно, 1556-1 зморщена лінія-2 і MS-SU 270 цукрова лінія.

У моєму прагненні отримати дуже точні та швидкі результати, це насіння було вирощено за спеціальною технікою. Ці насіння вирощували у вологому фільтрувальному папері та поміщали в контрольовані умови для досягнення швидкого проростання.

Нижче наведено крок за кроком підхід, у якому було вирощено це насіння:

- ❖ Перш за все сухий фільтрувальний папір був складений навпіл горизонтально, а потім знову складений у чотири квадратні форми з кодами цих насіння, написаними на них. Оскільки насіння буде поміщено на фільтрувальний папір для росту та проростання, на них повинні бути написані етикетки для легкої ідентифікації, оскільки насіння є різних сортів, і будь-яка помилка, допущена на цьому етапі, зробить весь експеримент неточним. Можна використовувати фільтрувальний папір будь-якого розміру залежно від того, наскільки великою чи малою є кількість вашого зразка.



Fig 3.1 сухий фільтрувальний папір, маркований відповідно до кодів насіння.

- ❖ По-друге, фільтрувальний папір змочують у воді, щоб зробити його вологим, це робиться тому, що вода залишається поверх умов, необхідних для



проростання.

Fig 3.2 фільтрувальний папір змочують у воді, щоб зробити його вологим для проростання.

- ❖ Після цього вологий фільтрувальний папір кладуть на гладку поверхню, а потім розгортають складені шари.



Fig 3.3 розгорнутий вологий/фільтрувальний папір з етикетками.

- ❖ Потім вологий фільтрувальний папір відкривають, обережно знімаючи верхній шар, щоб прокласти шлях для ідеального розташування насіння.

Насіння розташовується так, щоб зародок був спрямований донизу, а сім'ядоля була звернена вгору, оскільки зародок виростає, утворюючи кореневу систему, а сім'ядоля – утворює систему пагонів. Зрештою, система пагонів — це те, що необхідно для вилучення ДНК, оскільки вона розвиватиметься для формування листя.



Fig 3.4 показано добре розташоване насіння на вологому фільтрувальному папері

- ❖ На цьому етапі, коли насіння вже розміщено у вологому фільтрувальному папері, я покриваю верхній шар вологого фільтрувального паперу, а потім складаю вологий фільтрувальний папір навпіл і кладу чорний копіювальний папір між кожною половиною. Це робиться для того, щоб корінці не виростили з фільтрувального паперу.



Fig 3.5 показує верхній шар вологого фільтрувального паперу, вкритий насінням всередині.



Fig 3.6 показує вологий фільтрувальний папір із насінням / копювальний папір

- ❖ Після того, як копювальний папір покладено на вологий фільтрувальний папір, я складаю вологий фільтрувальний папір, накриваю фільтрувальний папір картонним папером і зав'язую його гумовою стрічкою. Картонний папір призначений для міцного утримання фільтрувального паперу, щоб насіння не рухалося зі свого початкового положення.



(A)



(B)

Fig 3.7 Показані зображення (вказують на зображення (A)) зі складеним вологим фільтрувальним папером, причому картонний папір міцно тримає його, тоді як на малюнку (B) зображено просто складений вологий фільтрувальний папір.

- ❖ Нарешті, склавши вологий фільтрувальний папір і міцно тримаючи його картонним папером, я поклав у контейнер, наповнений водою. Це робиться тому, що вода залишається життєво важливою необхідністю для проростання, це забезпечує потребу води підніматися через фільтрувальний папір до насіння, щоб сприяти проростанню насіння в результаті капілярності води. Потім я накриваю контейнер, щоб забезпечити достатню

вологість для насіння, а потім залишаю проростати в теплиці, яка належить ВНС при температурі 24 градуси за Цельсієм. Цукрову кукурудзу зазвичай вирощують при високій температурі, оскільки вона перетворює цукор на крохмаль, якщо її вирощувати в зоні дуже низьких температур, кукурудза буде піддаватися грибковій інфекції.



Fig 3.8 показано насіння, повністю посаджене в фільтрувальний папір і поміщене в емність з водою, і залишено рости.

❖ Через 3-6 днів насіння проростає і вже має листя.



Fig 3.9 показано, як насіння цукрової кукурудзи повністю проросло в розсаду лише за тиждень.

Після того, як насіння повністю проросло в розсаду, я зрізав розсаду, залишивши тільки гнілі насіння. Потім я складаю посівки в окремі гумові пакети з етикетками. Потім я зберігаю їх у морозилці в лабораторії, щоб підготувати до екстракції. Насіння кладуть в морозильну камеру, щоб залишалося свіжим і більш життєздатним до ДНК, з якої потрібно виділити. У ситуації, коли саджанці зберігаються погано, екстракція ДНК може бути дуже складною та складною, і в більшості випадків дослідник повинен виконувати екстракцію багато разів, щоб отримати точний результат, і в більшості випадків дослідники навіть не можуть для виявлення ДНК із культур або їхніх зразків, усе тому, що вони зберігалися погано або вони зберігалися при поганій температурі.

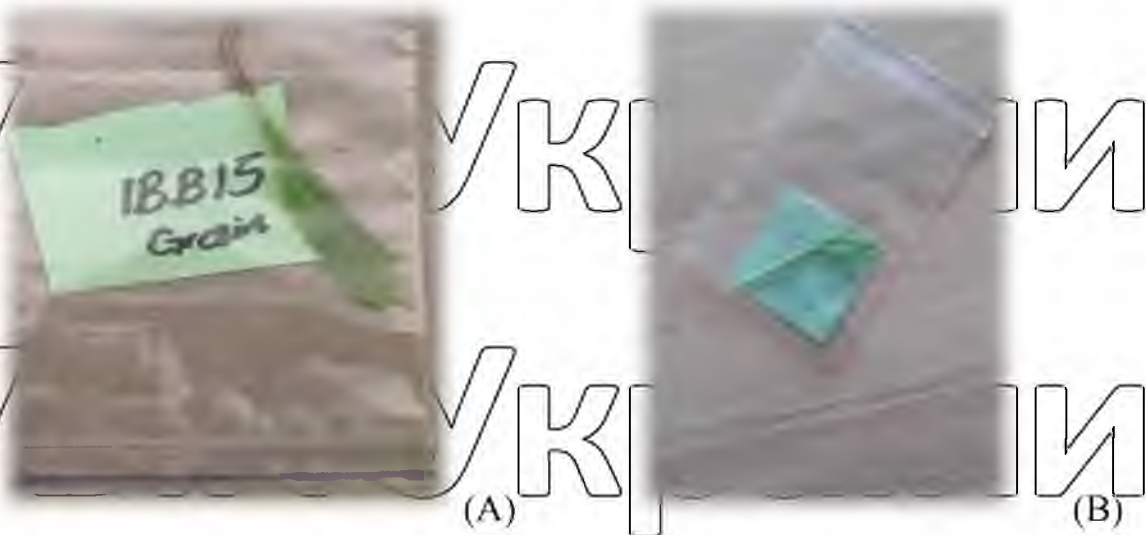


Fig 3.9.1 показує всі саджанці, поміщені в різні гумові мішки; на малюнку (А) зображена зернова кукурудза, а на малюнку (В) — солодка кукурудза з генами se, на зображенні (С) — усі саджанці.

3.2. Екстракція ДНК з відібраних зразків

Оскільки екстракція ДНК — це просто видалення дезоксирибонуклеїнової кислоти з клітин, і оскільки головна мета цього дослідження — дізнатися точні гени, присутні у вибраних цукрові сорти кукурудзи. Перш ніж розпочати екстракцію, ми відібрали саджанці цукрової кукурудзи або зразки, з яких буде відібрано ДНК, і в кінці були відібрані ці різні сорти цукрової кукурудзи:

- ❖ SE-395: цей сорт солодкої кукурудзи містить ген підсилювача цукру
- ❖ SE-SH 1106: ця лінія є щось середнє між солодким і зморщеним геном.
- ❖ IBV15: це звичайна кукурудза
- ❖ 1556-1: цей рядок містить зморщений ген-2
- ❖ MS-SU 270: лінія солодкої цукрової кукурудзи

Усі ці лінії цукрової кукурудзи є частиною солодких матеріалів, які використовуються в програмі селекції цукрової кукурудзи у ВНІС, оскільки це дослідження допоможе точно дізнатися тип генів, присутніх у цих лініях, а також дізнатися, чи існують ці лінії в ній гомозиготні стан або гетерозиготний.

Для виділення ДНК можна використовувати різні протоколи, але в цьому дослідженні я використовував метод на основі діоксиду кремнію.

Наведені нижче кроки систематично показують, як відбувалося виділення ДНК:

3.2.1 Апарат

- ❖ Ступка або випарна чаша
- ❖ Товкач
- ❖ Пробник
- ❖ Епендорф
- ❖ Лабораторні породи
- ❖ Центрифуга
- ❖ 90% етанол
- ❖ Буферний розчин
- ❖ Протеїназа

- ❖ Сухий блок-нагрівач лабораторної пробірки або мантийний нагрівач
- ❖ Апарат RT-PCR
- ❖ Апарат для електрофорезу гелю

3.2.2 Процедура



❖ Я спочатку стерилізую ступку і товчачик і робоча зона перед початком експеримент.

❖ Після стерилізації я поміщаю зразки в ступку з їх мітками, розміщеними під розчином, щоб мати можливість легко ідентифікувати зразки.



Fig 3.2.1 показуючи зразки, поміщені в ступку та готові до розтирання з етикеткою під ними.

- ❖ Потім зразки подрібнюють у м'яку форму, а потім я додаю 1 мл, що еквівалентно 1000 мікролітрам буфера та 5 мікролітрам протеїнази. Протеїназа - це особливий білок, який руйнує ферментативні ефекти в клітині.



Fig 3.2.2 позначає подрібнені зразки з буфером і протеїназою

❖ Потім я вилив зразки рідини в Eppendorf з написаними на них етикетками, а потім перенесіть їх у лабораторну пробірку для нагрівання сухого блоку при температурі 65 градусів за Цельсієм протягом 30 хвилин.



Fig 3.2.3 зразки, поміщені в нагрівач

❖ Після того, як зразки пройшли нагрівання, я переніс їх у центрифугу на швидкості 8000 протягом 6 хвилин.

НУБІП Україна



Fig 3.2.4 пробки в центрифугі

- ❖ Відразу після вилучення зразків із центрифуги я отримав суспензію. Діоксид кремнію осів під Eppendorf, тому я зробив розчин із суміші буфера та універсального розчинника в іншому свіжому Eppendorf, а потім додав 150 мікролітрів кожного зразка до кожного



A



B

Fig 3.2.5 показує два зображення A і B, причому зображення а є зразками, розташованими в ап

Тримач Еппендорфа з маркуванням і малюнком B є зразками, щойно вилученими з Еппендорфа, і, як ви можете бачити на малюнку, кремнезем осідає на дні Еппендорфа.

- ❖ Потім я переніс зразки назад у нагрівач, щоб він нагрівався при температурі 65 градусів протягом 5 хвилин, але на цьому етапі я струшую зразки через кожну хвилину

НУБІП Україна

- ❖ Після того, як зразки були зняті з нагрівача, я негайно помістив їх у центрифугу на



швидкості 8000 на 2 хвилини.

Fig 3.2.6 показує зразок після його змішування з універсальним розчинником і буфером

- ❖ Я помітив, що в розчині була інша суспензія після того, як зразки були вилучені з Eppendorf, але в цей час я видалив рідину суспензії у верхній частині розчину за допомогою пробовідбірника, залишаючи діоксид кремнію в Eppendorf.



Fig 3.2.7 показує порожній Eppendorf лише з кремнеземом

- ❖ Після спустошення Eppendorf і залишення залишків, я додав 300 мікролітрів промивного розчину до кожного зразка, а потім повернув їх у центрифугу.



Fig 3.2.8 це був розчин для миття, який використовувався.

- ❖ Коли зразки завершили центрифугування, я потім відібрав розчин із Eppendorf за допомогою пробовідбірника, залишивши діоксид кремнію під Eppendorf, додав ще один промивний розчин до діоксиду кремнію та повернув його назад у центрифугу.
- ❖ Після цього процесу я обережно витяг рідину з Eppendorf, залишившись лише кремнеземом, який на даний момент може бути ДНК, РНК або білком.
- ❖ Оскільки Eppendorf порожній і містить лише діоксид кремнію, я поставив їх у нагрівач, щоб він висушився від будь-якої рідини.
- ❖ Після того як Eppendorf висох, я додав 2 мікролітри води Milli-Q до зразків, а потім залишив для відстоювання протягом 5 хвилин.

3.3 Завантаження ДНК на гель-електрофорез

Перш ніж помістити зразок в апарат ПЛР для отримання реакції, я спочатку завантажив зразки на гель-електрофорез. Це було зроблено, щоб дізнатися якість вилученої ДНК, а також хотілося точно знати, чи отримана ДНК, РНК або білок.

Зразки були завантажені під час електрофорезу, і виявилось, що я не тільки витягнув ДНК, але й уся вилучена ДНК була високої якості та придатна для проведення ПЛР.

НУБІП Україна



НУБІП Україна

НУБІП України Fig 3.3.1 показує зразки, уже завантажені на гель.

Кожен зразок змішували з маркером, а потім завантажували на гель, після завантаження в гель включається гель-електрофорез і негативно заряджені молекули відходять від негативного полюса електричного струму, а менші молекули рухаються швидше, ніж більші молекули через гель, це в результаті утворює смуги.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

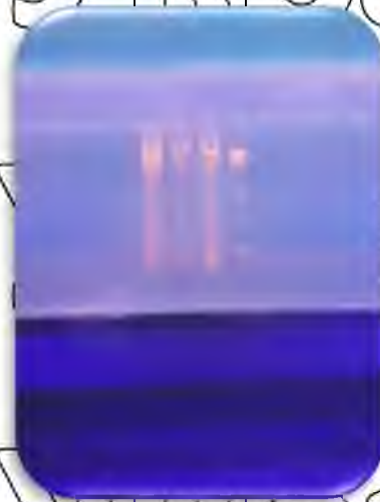


Fig 3.3.2 показує смуги ДНК, утворені після електрофорезу в гелі

Читаючи з лівого боку рис. 3.3.2, перша смуга представляє SE-SH 1106, за нею йде 1556-1, а потім IBV15, остання розбита смуга є маркером.

НУБІП України

НУБІП України

3.4 Як отримано ПЛР

Після того, як гель було завантажено і вказано на його високу якість, з'явилася можливість провести його через реакцію ПЛР. Перш ніж зробити ПЛР, були потрібні протоколи реакції, щоб допомогти їй. Цей протокол називається основною сумішшю (мм) для ПЛР. У таблиці нижче показано протоколи, які використовувалися, і концентрацію для них.

Мм для ПЛР	20 microliters	
dNtp	2 μ L	16 μ L
MgSO ₄	2 μ L	16 μ L
Буфер Taq	2 μ L	16 μ L
Праймери	0,6 кожного	4
ДНК	0.5 μ L	
Полімераза	1,5 мікролітрів	8 μ L
H ₂ O	11.5	92

Tab 1.1. у таблиці наведено протоколи та концентрацію, що використовуються для зразків перед проведенням реакції ПЛР.

mm (основна суміш) є сумішшю dNtp, MgSO₄ і буфера Taq

Праймери були створені та впорядковані на основі генетичного алеля дикого типу в цукровій кукурудзі shrunken-2 та sh2-r. Інформація про праймери така:

3' частина з GenBank: KJ811996.1

Sh2-R3'F_1: GCAGAGGGGTAACAGCGACT

Sh2-R3'R_1: CAGCAAAGTTGATCCCGCCTT

613bp

Sh2-R3'F_2: TCCACCGCTCTAGTCGTTGC

Sh2-R3'R_2: ACTCACTGTCTTACATAECASTTCG

400bp

5' частина з GenBank: KJ811995.1

НУБІП України

Sh2-R5⁺F_1: ATTTGCAGCATTCTCAAACACAGT

Sh2-R5⁺R_1: TCGGGGTATTCCCATCACCT

496bp

НУБІП України

Sh2-R5⁺F_2: ATTTGCAGCATTCTCAAACACAG

Sh2-R5⁺R_2: ATCTGCGTTTGATGAGGGAGT

388bp

НУБІП України

Sh2-wt_F1: CTGCTATCATTTTTGGGCGGAG

Sh2-wt_R1: ATGGCGGTTAAGCGAAGTAGA

471bp

НУБІП України

Sh2-wt_F2: TCTTAGAACGCTCACCAGTGT

Sh2-wt_R2: ATGGCGGTTAAGCGAAGTAGA

638bp

НУБІП України

Праймери SH2-wt посилюють алель дикого типу, який буде відсутній у гомозиготному мутанті (гомозиготна цукрова кукурудза). Праймери SH2-r, ампліфікують фрагмент, який належить мутантному алелю.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

3.5 Результати реакції ПЛР

Після того, як зразки, що містять ДНК, і праймери були завантажені на ПЛР, був отриманий дуже хороший і точний результат, і ці результати відповідали головній меті цієї дослідницької роботи. На фотографії, показаній на рис. 3.3.3, показано смуги ДНК різних генів цукрової кукурудзи (об'єкт) і те, як вони ампліфікувалися за допомогою різних основ праймерів, які використовувалися.

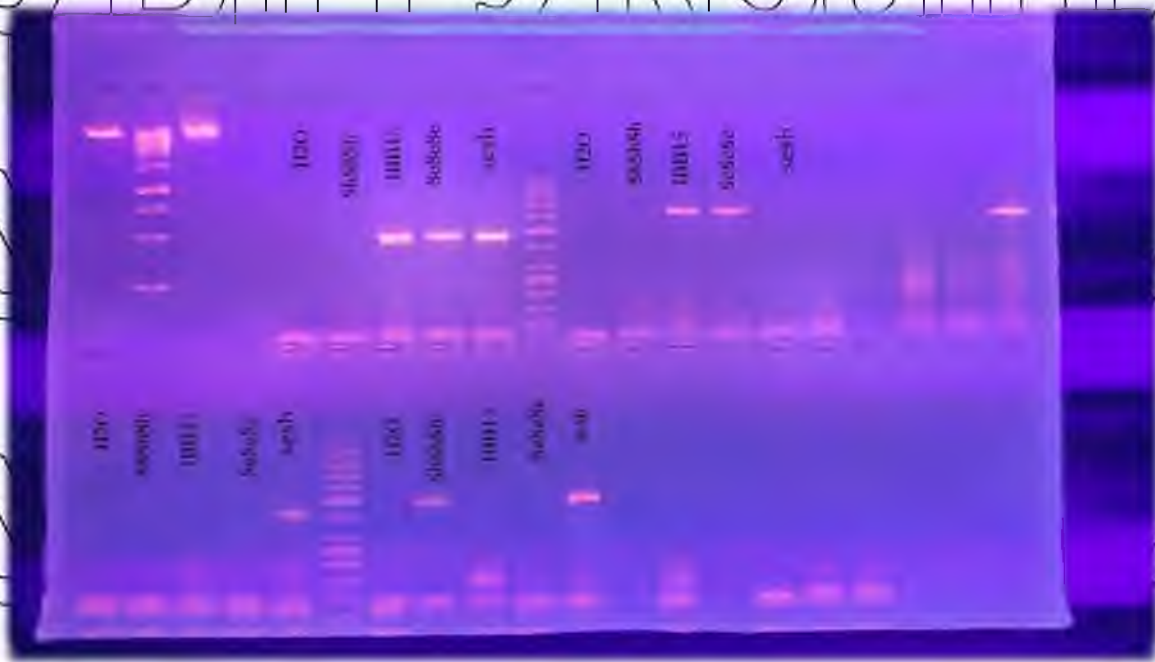


Fig 3.3.3 це фото показує остаточні результати цієї роботи та вказує на смуги ДНК різних утворених генів солодкої кукурудзи та те, як вони були ампліфіковані за допомогою різних баз праймерів.

- ❖ Перша серія смуг у верхньому лівому куті фотографії на рис. 3.3.3 була посилена за допомогою Sh2-wt_F1 з 471 п.н., але можна побачити, що з цукрової кукурудзи з геном sh (15561) не було отримано жодних смуг, тому в іншому сенсі також можна сказати, що не було отримано жодного маркера для цукрової кукурудзи з ген sh (15561), оскільки він не ампліфікується за допомогою Sh2-wt_F1. Більше того, у випадку солодкої кукурудзи зі схрещуванням генів se та sh виявилася смуга або маркер, це тому, що це гетерозиготна лінія, у ній присутні гени se та sh, і коли se посилюється, з Sh2-wt_F1 це дає змогу зразку CE-395 бути сумісним із Sh2-wt_F1.

❖ Другий набір смуг після першого також був ампліфікований за допомогою Sh2-wt_R2 з 638 bp. Він працював так само, як і перший, що означає, що основа праймера Sh2-wt_R2 не ампліфікується за допомогою гомозиготного гена цукрової кукурудзи sh, а скоріше посилюється за допомогою гетерозиготної цукрової кукурудзи, наданої буде наявність гена se.

❖ А потім у нижньому лівому куті фотографії, рис. 3.3.3, також є набори смуг, але ці смуги були ампліфіковані за допомогою бази праймера Sh2-R3'F_2 з 400 п.о., і, як це видно на смужці цукрової кукурудзи з гомозиготних генів

sh, що є смуга, що означає, що існує маркер для цього типу цукрової кукурудзи (1556-1), тому можна сказати, що зразок 1556-1, який є гомозиготним типом цукрової кукурудзи sh, посилюється за допомогою Sh2-R3 База ґрунтовки F_2. У випадку зразка CE-395 він не посилюється

настільки сильно в Sh2-R3'F_2, оскільки це гомозиготний тип se солодкої кукурудзи, але оскільки зразок SE-SH 1106 містить як se, так і sh у гетерозиготному стані та оскільки sh ампліфікується за допомогою Sh2-R3'F_2, це робить можливим ампліфікацію SE-SH 1106 в основі праймера Sh2-R3'F_2.

❖ Нарешті, наступний набір смуг був ампліфікований за допомогою основи праймера Sh2-R5'F_1 з 496 bp. У цьому наборі смуг можна побачити, що зразок 1556-1, який є гомозиготною лінією цукрової кукурудзи sh, ампліфікується за допомогою основи праймера Sh2-R5'F_1 і SE-SH 1106,

яка також є гетерозиготною лінією цукрової кукурудзи. посилюється за допомогою основи праймера Sh2-R5'F_1. Для CE-395, який є гомозиготним типом цукрової кукурудзи se, не було утворено жодного маркера або смуг, це означає, що основа праймера Sh2-R5'F_1 не сумісна зі зразком CE-395.

❖

НУБІП УКРАЇНИ

На завершення цього розділу було виявлено, що основа праймера Sh2-wt_F1 ампліфікується із зразком SE-395, який є гомозиготним типом se солодкої кукурудзи, але не ампліфікується із зразком 1556-1, який є гомозиготним типом sh кукурудзи солодкої, тоді як зразок SE -392-5 не ампліфікується в основі праймера Sh2-R5'F_1, а скоріше у зразку 1556-1.

НУБІП УКРАЇНИ

Але найцікавіша частина цього дослідження та прорив у цьому дослідженні полягає в тому, що зразок SE-SH 1106, який є гетерозиготною лінією, ампліфікується як у основі праймера Sh2wt_F1, так і в основі праймера Sh2-R5'F_1, як це видно на рис. 3.3.3. .

НУБІП УКРАЇНИ

Ці дослідження зробили програму селекції цукрової кукурудзи у ВНІС дуже перспективною, оскільки поєднання цих двох ліній дозволить отримати хороший гібрид, який зможе конкурувати на світовому ринку цукрової кукурудзи.

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 4. ВИБІР ТА ПОСАДКА ЦУКРОВОЇ КУКУРУДЗИ

4.1 Вибір бажаних генотипів цукрової кукурудзи для посіву

Після результатів ПЛР і знання генів, присутніх у кожному із зразків цукрової кукурудзи, відібраних і використаних для експерименту, цукрова кукурудза на рис. 2.1 (1556-1), яка є гомозиготною лінією цукрової кукурудзи Sh, і цукрова кукурудза в 2.4 (SE-295), де гомозиготна лінія цукрової кукурудзи Se була обрана як батьківські лінії для схрещування для виведення гібриду цукрової кукурудзи E1

4.1.1 Фізичні характеристики лінії цукрової кукурудзи YSH 1556-1

YSH 1556-1 — це суперсолодка гомозиготна лінія з унікальними фізичними характеристиками, такими як:

- ❖ Він має висоту $211,7 \pm 3,62$ см і ширину $96,0 \pm 2,17$ см.
- ❖ Діаметр стебла на 20 см від землі $2,21 \pm 0,089$ см
- ❖ Маса повної рослини з коренем $0,833 \pm 0,0491$ кг
- ❖ Він має більш високий вміст цукру (30%) присутньої сахарози
- ❖ Ядра качана зморщені



Fig 4.1.1 це показує зовнішній вигляд солодкої кукурудзи YSH 1556-1

4.1.2 Фізичні характеристики лінії цукрової кукурудзи SE-395

SE-395 – це гомозиготний тип солодкої кукурудзи підсилювача цукру, з такими спеціальними характеристиками, як:

- ❖ Ген енхансера цукру є модерацією нормального гена цукру (su). Він не такий солодкий, як sh2, солодкість типів se значно перевершує типи su. Ядра se мають кремений ендосперм, як у типів su, на відміну від типів sh2.
- ❖ Перетворення цукру на крохмаль відбувається повільніше у типів se, ніж у типів su, але не так повільно, як у типів sh2.
- ❖ Нікніть типів se неперевершена.
- ❖ Як і у всіх видів насіння, енергія розсади типів se може змінюватися залежно від сорту та посівного матеріалу, однак, як клас, типи se загалом краще проростають і мають більшу енергію розсади, ніж типи sh2.



Fig 4.1.2 також показує фізичний вигляд солодкої кукурудзи типу SE-395

4.2 Посадка цукрової кукурудзи

Перед посадкою цукрової кукурудзи враховувалися певні фактори. Цукрова кукурудза – величезна трава. Оскільки цукрова кукурудза переважно запилюється вітром. Чоловіча квітка (китиця) повинна скинути свої пилкові зерна на всю жіночу маточку (шовк), щоб ядра успішно розрослися. У ситуації, коли запилення не відбувається, в отриманих качанах можуть бути прогаліни. Цукрова кукурудза в качанах найкраще росте довгим і спекотним літом. Кажуть, що кілька сортів щасливіші в більш прохłodному кліматі. Якщо це стосується вас, спробуйте гібрид

і почніть під прикриттям. У більш холодних регіонах добре приживаються ранні види.

Насіння цукрової кукурудзи висівали безпосередньо в ґрунт у підігрітому вигляді. Одна рослина цукрової кукурудзи дає принаймні один качан, а часто й два. Для цього я посадив не менше 20 рослин для пристойного врожаю. Ґрунт, на якому була висаджена цукрова кукурудза, був теплим при 13 °C (55 °F) або вище. Суперсолодкі сорти потребують ґрунту з температурою близько 18 °C (65 °F) або вище. Ґрунт підготували, ретельно перекопавши і додавши добре перепрілий компост. Цукрову кукурудзу посадили блоками, щоб сусідня цукрова кукурудза могла запилювати одна одну. Відстань між кожною солодкою кукурудзою становила 14-18 дюймів (35-45 см).



Fig 4.2 показує рослини цукрової кукурудзи, вирощені в рядках із CE-395, вирощеними поруч із VSH 1556-1

4.2.1 Полив, ґрунт і внесення добрив

Цукрова кукурудза швидко росте і потребує достатньої кількості води для сприяння її росту. За посушливих погодних умов одне або два глибоких замочування на тиждень ефективніше, ніж кілька легких поливів. Після посіву цукрової кукурудзи в кожному рядку прсклали зрошувальні системи та поливали рослини двічі на день.

Цукрова кукурудза віддає перевагу добре дренажним, піщаним ґрунтам із рН у межах 5,6-6,8.

Цукрова кукурудза під час посадки повинна бути піддана повному сонячному світлу або доступу до світлодіодних ламп у ситуаціях, коли кукурудза вирощується в теплиці. Цукрова кукурудза, як і інші види кукурудзи, є важким азотозивильником і

потребує достатнього підживлення. Спочатку рослини вносили універсальні добрива, щоб дати кукурудзі хороший старт. Якщо рослини цукрової кукурудзи мали близько десяти листочків, я підживив рослини добривом багатим на азот.

4.3 Схрещування двох обраних батьківських ліній

На початку 9-10-го тижня після появи сходів відібрані батьківські рослини цукрової кукурудзи вступили у вирішальний період, коли потрібне успішне запилення для перетворення потенційних зерен у життєздатні зерна, що розвиваються. Рослини на той час досягли повного розміру. Китиці були повністю видні, а шовк з'явився через 2-3 дні. На цьому етапі почалася гібридизація між рослинами, яка тривала протягом 1-2 тижнів.

Під час гібридизації використовувалися батьківські рослини цукрової кукурудзи SE-395, який є геном цукрової кукурудзи se, і YSH 1556-1, який є геном цукрової кукурудзи sh. SE-395 була жіночою рослиною і була схрещена з YSH 1556-1, яка була встановлена як чоловіча рослина.

На початку схрещування колос жіночої рослини цукрової кукурудзи (SE-395) був відрізаний, щоб відкрити шовк. Вуха було вирізано стерилізованими ножицями, щоб звільнити шовк на вусі від будь-якого забруднення для досягнення успішного схрещування.



A



B

Fig 4.3 показує фотографії розрізаного вуха SE-395. На фото А зображено шовк без покриття, а на фото В — шовк.

Шовк, який з'являється у вусі, відразу закривають пакетом, щоб запобігти його забрудненню.

Після зрізання та покриття колоса жіночої рослини накривають китицю чоловічої рослини, щоб отримати пилкове зерно для схрещування з жіночою рослиною.

Китицю чоловічої рослини цукрової кукурудзи накривали на добу. Це було зроблено для отримання свіжого пилкового зерна для схрещування з жіночою рослиною. Для схрещування необхідне свіже пилкове зерно, оскільки це забезпечить успішне схрещування двох батьківських ліній. Китиці чоловічої рослини були закриті лише тоді, коли китиці розділилися надвоє.



Fig 4.3.1 показує повністю дозрілу китицю чоловічої рослини цукрової кукурудзи

Китиці накривали коричневими паперовими пакетами і залишали на добу. Через

один день пилкове зерно впало з китиць у коричневий паперовий пакет. Пилкові зерна, зібрані з китиць у коричневі мішки, використовували для схрещування з жіночою рослиною цукрової кукурудзи. Це було зроблено шляхом обережного висипання пилкових зерен на шовк, який з'явився на вусі жіночої рослини, а потім накривання схрещеного жіночого вуха великим коричневим мішком.

Після схрещування на великому коричневому мішку були зроблені ярлики, щоб надати інформацію про дату схрещування та батьків, між якими проводилося схрещування.

Після того, як уся ця інформація була написана на етикетці та успішно проведено схрещування, колос жіночої рослини був обережно та повністю закритий коричневим пакетом, захищаючи колос від будь-яких зовнішніх пилкових зерен.



Fig 4.3.2 показано пилкові зерна, зібрані з китиць у мішечки на фото А, і китиці, накриті для збору пилкових зерен на фото В

Після схрещування між СЕ 395 та YSH 1556-1 рослини залишили та постійно перевіряли до повного дозрівання.

РОЗДІЛ 5. ОТРИМАННИЙ ГІБРИД ТА ЗБИРАННЯ УРОЖАЮ

5.1 Заготівля та збір

Новий гібрид цукрової кукурудзи був створений через три-чотири тижні після гібридизації. Урожай збирали вручну, оскільки поле було заповнене іншою рослиною цукрової кукурудзи з іншою генетичною структурою. Створений новий гібрид зібрано в заготівельні мішки та відправлено на станцію для експертизи.



Fig 5.1 показує фото нового гібрида F1, створеного між CE-395 та YSH 1556-1

5.1.1 Характеристики та особливості нового гібрида F1

Створений новий гібрид має ряд особливостей і характеристик, які виникли в результаті схрещування двох батьків. Гібрид – середньостиглий супероолодкий гібрид з молочно-білими зернами та оновленим смаком. Цей гібрид можна полюбити завдяки соковитим зернам.

5.1.2 Морфологічна та агротехнічна характеристика гібрида F1

Цей новий гібрид цукрової кукурудзи F1 має покращені морфологічні та сільськогосподарські характеристики порівняно з батьківськими рослинами.

Група стиглості	Середній сезон
Період вегетації	76-78 днів

Використання	Для свіжого ринку, переробки, заморозки, консервування
Гібридний тип	Двосторонній гібрид ш-2
Цукристість	22%
Довжина вуха	24-26 cm
Діаметр вуха	5 cm
Форма вуха	Циліндричні
Колір зерен	Жовтий
Глибина зерен	12 cm
Висота рослини	185 cm
Кількість колосків на рослині	1.5-2
Номер зернового ряду	20-22
Кількість зерен в рядку	45-50
Загальна кількість зерен у колосі	900
Стійкість до стресів	Тепло-і сухостійкість
Стійкість до хвороб	Гельмінтоспоріоз, фузаріоз і устилаго
Planting recommendations	1000 рослин/га

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

6. Висновок

Тому я приходжу до висновку, що введення ДНК-маркерів у нашу програму розведення допоможе нам у дуже швидкій програмі розведення з точним відбором і прийняттям рішень, але не тільки з точним прийняттям рішень, але це дослідження проклало шлях, щоб мати можливість відстежити родину конкретної бажаної лінії солодкої кукурудзи, а також знати не лише фізичні риси наших селекційних матеріалів, але й знати їх генетичний склад.

Це дослідження дозволило чітко та з доказами визначити правильний генетичний склад використаних зразків.

Він також виявив правильну та багатособіжну комбінацію генів цукрової кукурудзи, яка призведе до отримання дуже хороших гібридів і ліній.

Нарешті, це дослідження знову проклало шлях для масового виробництва солодкої кукурудзи, оскільки ми змогли дізнатися тип присутніх генів, і тому стало можливим виробляти солодку кукурудзу у дуже великих масштабах.

REFERENCES

Beadle, G. W. (1980). The ancestry of corn. *Scientific American*, 242
 Clark, D. P., Pasterisnik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). *Polymerase Chain Reaction. Molecular Biology*, 168–198. doi:10.1016/b978-0-12-813288-3.0006-9

[DNA Extraction \(carleton.edu\)](http://carleton.edu)

[Examples of Molecular Markers | Plant Genetics \(biologydiscussion.com\)](http://biologydiscussion.com)

[GENETIC MANIPULATION OF SWEET CORN QUALITY AND STRESS RESISTANCE - UNIVERSITY OF ILLINOIS \(usda.gov\)](http://genetics.illinois.edu)

[Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits](http://genetics.illinois.edu)

<https://doi.org/10.1180/13102818.2017.1400401>

<https://seedworld.com/how-sweet-it-is/>

<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>

<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/molecular-marker>

<https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works>

<https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works>

[List of sweetcorn varieties - Wikipedia](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[Microsoft Word - IJPB-3-2007Proof.doc \(globalsciencebooks.info\)](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[Molecular markers: Classes, Uses, Characteristics and Reproducibility - Scope Heal](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[PHYTOGLYCOGEN - Kewpie Corporation - datasheet \(specialchem.com\)](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[Polymerase Chain Reaction \(PCR\) \(nih.gov\)](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[Sugarv. Sugar Enhanced and Supersweet Sweet Corn | The Green Thumb 2.0 \(wordpress.com\)](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[University of Vermont \(uvm.edu\)](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[WO2011019331A1.pdf](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

[METHODS FOR ENHANCING THE PRODUCTION AND CONSUMER TRAITS OF PLANTS \(Electronic resource\) / Bryant // 1. -1702. - : file:///C:/Users/Admin/Downloads/WO2011019331A1.pdf.](https://www.sciencenewsforstudents.org/article/explainer-how-pcr-works)

Kurilich, A.C. and Juvik, J.A. 1999. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in Zea mays. *J. Food and Agric. Chem.* 47: 1948-1955.

Kurilich, A.C. and Juvik, J.A. 1999. Simultaneous quantification of carotenoids and tocopherols in corn kernel extracts by HPLC. *J. Liq. Chrom. and Rel. Technol.* 22:2925-2934.

Katzir, N., Tzuri, G., Meir, A., Chenka, T., Goldman, T., Juvik, J., Bar-Zur, A. and Tadmor, Y. 1999. RAPD analysis of two pairs of *su1*/*se1*/*su1Se1* near-isogenic lines for the identification of chromosomal regions affecting the sugary enhancer phenotype. *Maydica* 44:149-153.

Kurilich, A.C. 1999. Genetic investigations of carotenoid and tocopherol variability in sweet corn. M.S. dissertation, University of Illinois. 107 p.

Yousef, G.G. 2000. Empirical evaluation of marker-assisted selection for improving quantitative traits in sweet corn. Ph.D. dissertation, University of Illinois. 177 pp.

Brown, A., Pataky, J. and Juvik, J.A. 2001. Quantitative trait loci associated with resistance to Stewart's wilt, northern corn leaf blight, and common rust in sweet corn. *J. Phytopathol.* 91(3): 393-400.

Yousef, G.G. and Juvik, J.A. 2001. Comparison of phenotypic and marker-assisted selection for quantitative traits in sweet corn. *Crop Science* 41:645-655.

НУБІП України

Frelichowski, J. and Juvik, J.A. 2001. Sesquiterpene carboxylic acids from a wild tomato species affect larval feeding behavior and survival of *Helicoverpa zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Econ. Entomol.* 94:1249-1259.

Tadmor, Y., Tracy, W.F., Yousef, G.G., Juvik, J.A. and Raboy, V. 2001. Low phytic acid-1 (Lpa-1) does not affect sugar metabolism in sugary1 kernels. *Maydica.* 46:11-19.

Yousef, G.G. and Juvik, J.A. 2002. Enhancement of seedling emergence in sweet corn by marker-assisted backcrossing of beneficial QTL. *Crop Science* 42:96-104.

Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Klein, B.P., Wallig, M.A. and Juvik, J.A. 2002. Content variation in bioactive food components. *Nutrition Today* 37:208-210.

Kurilich, A.C., Jeffery, E.H., Juvik, J.A., Wallig, M.A. and Klein, B.P. 2002. Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *J. Agric and Food Chem.* 50:5053-5057.

Schultz, J.A. 2003. Methods to improve marker-assisted selection for the sugary enhancer1 (se1) gene in maize. Ph.D. thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign. 119 pp.

Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keck, A.S., Matusheski, N., Klein, B.P. and Juvik, J.A. 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 16 (3): 323-330.

Juvik, J.A., Yousef, G.G., Han, T., Tadmor, Y., Azanza, F., Tracy, W.F., Bar-Zur, A. and Rocheford, T.R. 2003. QTL influencing kernel chemical composition and seedling stand establishment in maize with the *shrunk2* and *sugary enhancer1* endosperm mutations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 864-875.

Frelichowski, J. and Juvik, J.A. 2005. Inheritance of sesquiterpene carboxylic acid synthesis in crosses of *Lycopersicon-hirsutum* with insect susceptible tomatoes. *Plant Breeding* 124:277-281.

Characteristics of the Major Sweet Corn Genotypes - Northwest Seed & Pet (nwseed.com)

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ