

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

ДЕРКАЧ КАТЕРИНА ВІКТОРІВНА

УДК 577.21:57.085.2:633.15

**БІОТЕХНОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ  
ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР**

03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Державній установі Інститут зернових культур НААН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,  
**Сатарова Тетяна Миколаївна**,  
Державна установа Інститут зернових культур  
НААН України,  
завідувач лабораторії біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий  
співробітник  
**Матвєєва Надія Анатоліївна**,  
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії  
НАН України, завідувач лабораторією адаптаційної  
біотехнології, старший науковий співробітник  
відділу генетичної інженерії

доктор біологічних наук, старший науковий  
співробітник  
**Дубровна Оксана Василівна**,  
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,  
провідний науковий співробітник відділу  
генетичного поліпшення рослин

Захист дисертації відбудеться 18 жовтня 2018 р. об 11.00 на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. академіка Заболотного, 148, м. Київ – 143, Україна, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: м. Київ, вул. академіка Заболотного, 148.

Автореферат розіслано \_\_\_ вересня 2018 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 26.202.01,  
кандидат біологічних наук



К. В. Листван

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сьогодні для більшості культурних рослин актуальним завданням є диференціальна характеристика біотехнологічного потенціалу їхніх генотипів залежно від генетичної спорідненості, а саме упорядкування за молекулярно-генетичними маркерами, визначення ступеня тотипотентності і здатності до регенерації в культурі *in vitro* та компетентності до генетичної трансформації.

Кукурудза – це ємний монотипний культурний рід, який потребує детальної внутрішньовидової класифікації. Однак, у даний час поділ генотипів кукурудзи (*Zea mays* L.) на підвиди орієнтується лише на прояв фенотипової ознаки будови зернівки, а класифікація за групами адаптації або гетерозисними групами не виключає залежність від дії факторів зовнішнього середовища. Водночас внутрішньовидова класифікація культурного виду *Z. mays* покликана бути філогенетичною, ґрунтуватися на спільному походженні генотипів. Філогенетично спорідненими групами генотипів у кукурудзи є типи зародкової плазми. Селекційні якості основних типів зародкової плазми кукурудзи є добре вивченими (Тройер, 2000), але їхня комплексна біотехнологічна характеристика відсутня.

Віднесення того чи іншого генотипу кукурудзи до певного типу зародкової плазми відбувається, як правило, за родоводом (педіґрі). Але дані родоводів сучасних ліній, гібридів, сортів часто є недосконалыми, суб'єктивними, інколи втраченими. Використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів є актуальним та потенційно ефективним для внутрішньовидової класифікації та систематизації генофонду культурних рослин, оскільки враховує спорідненість та варіювання на рівні геномів, на відміну від методів, що базуються на порівнянні за фенотиповими ознаками (Сиволап и др., 2011; Волкова, 2015; Nadeem et al., 2017).

Клітинно-інженерні особливості кукурудзи, пов'язані з реакцією в культурі *in vitro*, зокрема зі здатністю до калусогенезу і регенерації рослин як основи для отримання соматоклональних варіантів, клітинної селекції, генетично-інженерних та інших маніпуляцій, для різних типів селекційно перспективних зародкових плазм є слабо вивченими. Диференційований підхід до калусогенезу і регенерації у різних плазм показав широке варіювання показників залежно від походження генотипів (Azad et al., 2015; Geetha et al., 2015 та ін.). Більшість біотехнологічних досліджень ведуться на модельних генотипах кукурудзи (Ombori et al., 2008; Malini et al., 2015 та ін.), тоді як сучасні селекційно перспективні генотипи через слабку тотипотентність комерційних зародкових плазм лишаються поза увагою дослідників. Детальне вивчення клітинно-інженерного потенціалу сучасних зародкових плазм кукурудзи не проводилося.

Надактуальними для України є дослідження з генетичної модифікації вітчизняних генотипів основних видів сільськогосподарських культур. Ефективність генетичної трансформації залежить від компетентності генотипу рослини (Ishida et al., 2007; Kuchuk, 2017). Розробка єдиної методики

трансформації для таких культур як кукурудза є неможливою через тиск генетичних особливостей певних споріднених груп генотипів. З цієї причини важливим етапом генетично-інженерної характеристики того чи іншого типу зародкової плазми є ідентифікація генотипів, компетентних до трансформації, та генотипспецифічна оптимізація всіх етапів отримання трансгенних рослин. Компетентність до біолістичної трансформації окремих типів зародкової плазми у кукурудзи, а також ліній і гібридів, створених в Україні, є невизначеною.

Найперспективнішою для вирощування в Україні є зародкова плазма кукурудзи Ланкастер (Дзюбецький та ін., 2012), проте вона не залучена до широких біотехнологічних досліджень.

Отже, комплексна біотехнологічна характеристика філогенетично споріднених груп генотипів культурних рослин, зокрема зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи, за молекулярно-генетичними маркерами, клітинно- і генетично-інженерним потенціалом є актуальною і практично значимою.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано у лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур Національної академії аграрних наук України відповідно до тематичного плану за завданням 23.01.03.02Ф «Розробити новітні біотехнології створення генотипів кукурудзи, адаптованих до зональних агрокліматичних умов, із заданими споживчими властивостями» Програми наукових досліджень 23 «Сільськогосподарська біотехнологія 2011-2015 рр.», № держреєстрації 0111U004712 та за завданням 23.00.01.06Ф «Розробити фундаментальні основи молекулярно-генетичних і клітинних біотехнологій для селекційного поліпшення кукурудзи» Програми наукових досліджень 23 «Біотехнологія і генетика в рослинництві 2016-2020 рр.», № держреєстрації 0116U001246.

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи була біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за молекулярно-генетичними маркерами, клітинно-інженерним та генетично-інженерним потенціалом.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні задачі дослідження.

1. Провести генотипування ліній плазми Ланкастер та ліній інших типів зародкової плазми кукурудзи за маркерами одонуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-маркерами).

2. Провести порівняльний аналіз результатів SNP-генотипування представників різних типів зародкової плазми кукурудзи та ідентифікувати алельні варіанти SNP-маркерів, специфічні для ліній плазми Ланкастер.

3. За даними SNP-аналізу оцінити генетичне різноманіття ліній кукурудзи усередині плазми Ланкастер.

4. Оцінити калусогенний потенціал ліній і гібридів кукурудзи плазми Ланкастер в культурі *in vitro* порівняно з лініями-стандартами високої калусогенної здатності та розробити заходи для його оптимізації.

5. Оцінити регенераційний потенціал ліній і гібридів плазми Ланкастер в культурі *in vitro* порівняно з лініями-стандартами високої регенераційної здатності та розробити заходи для його оптимізації.

6. Провести генетичну трансформацію кукурудзи чужорідними генами *uidA* і *bar* на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер методом біолістики.

7. Дослідити наявність трансгенів та морфобіологічні особливості у рослин-трансформантів кукурудзи в поколіннях від самозапилення.

8. Отримати трансгенні гербіцидостійкі інбредні лінії кукурудзи на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологічний потенціал кукурудзи.

*Предмет дослідження* – молекулярно-генетичні, клітинно-інженерні та генетично-інженерні особливості генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер.

*Методи дослідження* – молекулярно-генетичні методи, метод культури клітин, тканин та органів *in vitro*, методи генетичної інженерії, метод польових досліджень, методи статистичного аналізу даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено порівняння різних типів зародкової плазми кукурудзи за маркерами однонуклеотидного поліморфізму ДНК та ідентифіковано набір алелів SNP-маркерів, характерний для плазми Ланкастер. Поглиблено уявлення про внутрішньовидовий поліморфізм ДНК та спорідненість генотипів кукурудзи. Дістало подальше обґрунтування залучення методів сучасного широкогеномного аналізу до внутрішньовидової класифікації та кластеризації філогенетично споріднених груп генотипів культурних видів рослин.

Вперше досліджено здатність до калусогенезу та регенерації у 10 ліній кукурудзи плазми Ланкастер та 53 гібридів F<sub>1</sub> за їхньою участю. На прикладі плазми Ланкастер показано можливість підвищення тотипотентності слабкочутливих комерційних плазм за використання них як компонентів гібридів з модельними лініями інших плазм з високим калусогенним та регенераційним потенціалом. Оптимізовано комплекс умов культивування *in vitro* генотипів кукурудзи, розроблено біотехнологічні схеми індукції калусогенезу, субкультивування калусної тканини та регенерації рослин з урахуванням вимог сучасних ліній плазми Ланкастер.

Вперше в Україні проведено генетичну трансформацію вітчизняних генотипів кукурудзи методом біолістики з використанням чужорідних генів *uidA* та *bar* з отриманням п'яти поколінь рослин-трансформантів від самозапилення. Вперше в Україні на прикладі зародкової плазми Ланкастер отримано трансгенні лінії кукурудзи, стійкі до гербіциду «Баста»<sup>TM</sup>. Розроблено ефективну генетично-інженерну стратегію для комерційних плазм на базі генетичної трансформації гібридів F<sub>1</sub> між перспективними у селекційному відношенні лініями певної плазми та високототипотентними модельними лініями з наступними відборами на селективному фоні та інбридингом.

**Практичне значення.** Складені SNP-паспорти ліній кукурудзи плазми Ланкастер та інших плазм мають важливе значення для сертифікації та ідентифікації ліній та у захисті авторських прав. Методичні принципи

маркування приналежності ліній кукурудзи до певної плазми на прикладі Ланкастер за зміною співвідношення частот алелів SNP-маркерів рекомендовано використовувати у розподілі селекційного генофонду кукурудзи за типами зародкової плазми. Встановлена за аналізом одонуклеотидного поліморфізму генетична структура ліній кукурудзи, результати їхньої кластеризації та розраховані попарні генетичні SNP-дистанції представляють інтерес в селекційному процесі на етапі створення вихідних популяцій для інбридингу, а також для розробки гетерозисних моделей і прогнозування рівня гетерозису при визначення батьківських компонентів гібридів F<sub>1</sub>.

Ідентифіковано лінії кукурудзи плазми Ланкастер, стабільні за здатністю до калусогенезу та регенерації рослин *in vitro* незалежно від варіювання умов довкілля. Виділено генотипи кукурудзи, які можуть слугувати донорами високої здатності для індукції калусогенезу та регенерації у біотехнологічних дослідженнях з клітинної селекції, генетично-інженерних технологіях. Запропоновано до використання в біотехнологічному та селекційному процесі гібриди за участю ліній Ланкастер з підвищеною здатністю до утворення калусів різних типів та регенерації рослин. Рослини-регенеранти передано для використання в селекції як вихідний матеріал.

Отримано вісім трансгенних інбредних ліній кукурудзи на основі плазми Ланкастер, стійких до діючої речовини гербіциду «Баста»<sup>TM</sup> фосфінотрицину. Дані лінії рекомендовано використовувати в селекційному процесі як батьківські форми гібридів, стійких до гербіцидів на основі фосфінотрицину, а також як донори гена *bar* для поширення серед плазми Ланкастер та інших плазм шляхом схрещувань.

За результатами SNP-аналізу створено в співавторстві і зареєстровано в Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, гібрид кукурудзи Корунд. Матеріали дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі під час викладання змістовного модуля «Біотехнологія рослин» для студентів напряму підготовки «Біотехнологія».

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем особисто складено огляд літератури, проведено експериментальні дослідження, виконано статистичний аналіз отриманих результатів. Планування роботи та узагальнення результатів виконано разом з науковим керівником. Дослідження з генетичної інженерії виконано спільно з завідувачем відділу молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, к.б.н. Б. В. Моргуном та науковим співробітником цього відділу, к.б.н. І. О. Нітовською.

Авторство в наукових працях, опублікованих у співавторстві, складає 15-90% і полягає в плануванні і виконанні експериментальної частини роботи, узагальненні результатів і написанні статей, тез та методичних рекомендацій. Частка авторства у зареєстрованому гібриді кукурудзи становить 5%.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень доповідалися на III Конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 2017), Міжнародній науковій конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 2017), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Роль наукових

досліджень в забезпеченні процесів інноваційного розвитку аграрного виробництва України» (Дніпропетровськ, 2016), International scientific conference «Molecular Microbiology and Biotechnology» (Odessa, 2016), 53<sup>rd</sup> і 58<sup>th</sup> Annual Maize Genetics Conferences (USA, 2011, 2016), Всеукраїнської науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2014), Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур» (Одеса, 2014), X Міжнародній конференції «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013), Міжнародній науковій конференції «Современные аспекты генетической инженерии растений» (Київ, 2011), на засіданнях науково-методичної ради ДУ Інститут зернових культур НААН.

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 19 основних наукових праць, з яких 9 – наукові статті, зокрема 7 статей у фахових виданнях України у галузі біологічних наук, в тому числі 2 – у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних, та 10 матеріалів і тез доповідей наукових конференцій.

**Структура дисертації.** Основний текст дисертації викладено на 161 сторінці комп'ютерного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, трьох розділів з викладенням результатів експериментальних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел включає 395 найменувань, серед них 242 іноземними мовами. Основна частина дисертаційної роботи вміщує 35 таблиць і 20 рисунків.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

У розділі показано актуальність характеристики біотехнологічного потенціалу культурних рослин. Проаналізовано сучасний стан класифікації генофонду кукурудзи, приділено увагу походженню генотипів зародкової плазми Ланкастер. Узагальнено наявну інформацію про використання молекулярно-генетичних маркерів для дослідження поліморфізму геному кукурудзи, тотипотентність та здатність до регенерації рослин *in vitro*, результати і перспективи генетично-інженерних досліджень кукурудзи.

**Матеріали та методи досліджень.** Матеріалом для дослідження слугували інбредні лінії та гібриди F<sub>1</sub> кукурудзи (*Zea mays* L.). Для молекулярно-генетичної характеристики плазми Ланкастер використовували масив з 91 лінії, який складався з двох груп: 1) 31 лінія, що за родоводом відносяться до плазми Ланкастер (L), в тому числі дві широковідомі лінії Ланкастер Mo17 та Oh43 – типові представники основних однойменних підплазм Mo17 та Oh43; 2) 60 ліній, що за родоводом відносяться до інших, неланкастерівських, плазм (NL): 23 лінії плазми Айодент, 15 ліній плазми Рейд (BSSS), 7 ліній плазми Лакон (Європейська кремениста), 1 лінія плазми A188, 1 лінія плазми Chi31, 1 лінія плазми PLS61, 12 ліній плазми Мікс. Визначення ступеня гетерозиготності за

SNP-маркерами гібридів  $F_1$  проводили для п'яти гібридів та їхніх батьківських ліній. Для клітинно-інженерної характеристики плазми Ланкастер в культурі *in vitro* як матеріал використовували десять сучасних ліній кукурудзи даної плазми та лінії-стандарту високої чутливості в культурі *in vitro* A188, Chi31 та PLS61, прямі та зворотні гібриди  $F_1$  між лініями плазми Ланкастер, а також між лініями Ланкастер та лініями-стандартами. В розділі, присвяченому генетично-інженерній характеристиці плазми Ланкастер, як матеріал використовували лінії кукурудзи плазми Ланкастер, а також лінії плазм Лакон, Su<sub>1</sub> та PLS61, їхні прямі і зворотні гібриди  $F_1$ .

Молекулярно-генетичну характеристику плазми Ланкастер проводили за алейним станом маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-маркерів). SNP-генотипування ліній кукурудзи проводили з використанням GoldenGate тесту та системи зчитування результатів Illumina VeraCode на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (BDI, США). ДНК виділяли за ЦТАБ-методом (Дрейпер, 1991). SNP-генотипування зразків ДНК, закріплених на матриці SAM, з використанням GoldenGate тесту проводили в повністю автоматизованому режимі на обладнанні Illumina BeadStation 500 G (Illumina, Inc., USA). В роботі використано панель BDI-III з 384 SNP-маркерів (Venkatramana, 2012). Маркери даної панелі є біалельними, розташовуються на всіх 10 хромосомах і мають PIC>0,25. Визначення репрезентативності та інформативності використаних SNP-маркерів в наборі досліджуваних ліній, а також SNP-характеристики окремих ліній і груп ліній для використаного набору маркерів виконували за (Botstein et al., 1980; Lu et al., 2009). Ідентифікацію алейного стану SNP-маркерів, специфічного для ліній Ланкастер, проводили за спеціально розробленою методикою.

Основним методом, використаним при клітинно-інженерній характеристиці плазми Ланкастер, був метод культури клітин, тканин і органів *in vitro* (Бутенко, 1964; Кушнір, Сарнацька, 2005). Донорні рослини кукурудзи вирощували в польових умовах у 2010-2012 рр. за методикою польового досліду (Лебідь та ін., 2008). Як експланти для ініціації калусної тканини використовували ізольовані незрілі зародки кукурудзи довжиною 1-1,5 мм, віком 10-12 діб. Основним середовищем для індукції калусогенезу і субкультивування калусної тканини було модифіковане середовище N<sub>6</sub> (Chu et al., 1975). Для індукції регенерації як базове використовували модифіковане середовище MS (Murashige, Skoog, 1962). Модифікацію середовищ здійснювали залежно від цілей і задач конкретних експериментів. Індукцію калусогенезу і субкультивування калусної тканини проводили за температури 25-27°C у темряві, а регенерацію рослин – за тієї самої температури на світлі інтенсивністю 2000-5000 люкс при 16-годинному фотоперіоді.

Генетичну трансформацію проводили шляхом біолістичної обробки 10-20-добових калусів, які утворилися на щитках незрілих зародків. Для трансформації використовували вектор pANC25 (Christensen et al., 1996), який містив ген  $\beta$ -глюкуронідази *uidA* від *Escherichia coli* та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *bar* від *Streptomyces hygrosopicus*, обидва під контролем промотору гена убіквітину кукурудзи. Підготовку плазмідної



ДНК виконували за (Василенко, 2010), біолістичну обробку – за (Finer et al., 1992), підготовку рослинного матеріалу до трансформації та подальше культивування – за (Нітовська та ін., 2014). Селекцію на етапі субкультивування калусної тканини вели на фоні 10 мг/л фосфінотрицину у темряві, на етапі регенерації – на фоні 5 мг/л фосфінотрицину на світлі. З метою виявлення транзйентної експресії гена *uidA* проводили гістохімічний аналіз активності  $\beta$ -глюкуронідази в калусах через чотири доби після обстрілу та в листках рослин-регенерантів за (Jefferson, 1987). Наявність гена *bar* в ДНК калусів, рослин-регенерантів та їхнього потомства встановлювали методом полімеразної ланцюгової реакції за (Somma et al., 2006), довжина очікуваного фрагмента ампліфікації – 411 п.н. Сформовані калусною тканиною рослини-регенеранти (покоління  $T_0$ ) висаджували в біологічні склянки, потім – в пакети з ґрунтом, а після приживлення – у вегетаційні посудини з об'ємом ґрунту 20 дм<sup>3</sup>. Рослини  $T_0$  самозапильовали або схрещували з рослинами вихідного генотипу. Насіння поколінь із зародками  $T_1$ - $T_6$  висівали в ґрунтові криті теплиці та вирощували за загально прийнятою методикою вирощування кукурудзи в закритому ґрунті (Столяренко и др., 1991). Розмноження рослин  $T_1$ - $T_6$  проводили шляхом самозаплення. Рослини поколінь  $T_2$ - $T_6$  у фазі сходів випробовували на стійкість до фосфінотрицину на селективному фоні, оцінюючи ступінь виживаності рослин за 5-бальною шкалою через 20 діб після обробки гербіцидом та у фазі повної стиглості зерна. Селективний фон створювали шляхом обприскування сходів розчином гербіциду «Баста»<sup>TM</sup> в концентрації 1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин.

Результати досліджень опрацьовано статистично за методами принципового компонентного аналізу, дисперсійного аналізу і кластерного аналізу з використанням комп'ютерних програм Excel, Tassel, Statistica10 та Structure.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР ЗА SNP-МАРКЕРАМИ

В даному розділі представлено характеристику генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за алельним станом маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК (SNP-маркерами). Проведено SNP-генотипування 91 лінії кукурудзи і складено SNP-паспорти ліній Ланкастер та інших плазм.

**Групування та кластеризація ліній кукурудзи за результатами SNP-аналізу.** З метою відокремлення ліній кукурудзи, які за даними родоводу віднесені до плазми Ланкастер, від інших плазм і визначення, чи співпадає таке групування з групуванням за SNP-маркерами, було проведено аналіз розподілу досліджених ліній за алельним станом SNP-маркерів методами якісного кластерного аналізу (принциповий компонентний аналіз, побудова дендрограм за методом повного зв'язку) і кількісного кластерного аналізу (аналіз генетичної структури ліній за програмою Structure).

Принциповий двовимірний компонентний аналіз попарних SNP-дистанцій (рис. 1) показав, що перший принциповий компонент (PCA1) пояснює 35,95%

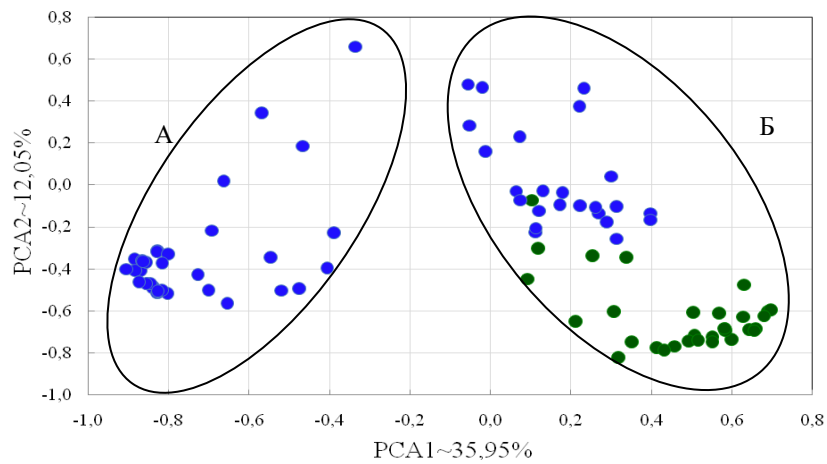


Рис. 1. Двовимірний діаграма принципного компонентного аналізу попарних генетичних SNP-дистанцій між 91 лінією кукурудзи. Окремі лінії представлено крапками; зеленим кольором вказано лінії, які за педігрі відносяться до плазми Ланкастер, а синім – лінії неланкастерівських зародкових плазм. Масив досліджуваних ліній за першим принципним компонентом PCA1 розпадається на дві фракції – А і Б

загального варіювання та поділяє досліджуваний масив з 91 лінії на дві фракції – А і Б, водночас всі лінії, які за педігрі вважаються Ланкастер, потрапляють у фракцію Б. Другий принципний компонент (PCA2), який пояснює 12,05% загального варіювання, відокремлює більшість ліній Ланкастер від решти ліній фракції Б, хоча мало місце деяке перекриття зон розташування L- та NL-ліній. Таким чином, принципний компонентний аналіз результатів SNP-генотипування підтвердив відокремленість групи ліній Ланкастер у загальному масиві проаналізованих ліній.

Якісний кластерний аналіз, виконаний шляхом побудови дендрограми генетичних взаємовідносин між 91 лінією кукурудзи методом повного зв'язку (рис. 2), також показав близькість інформації родоводів і результатів SNP-аналізу, зокрема, відокремленість ліній Ланкастер (кластер I.1.1), хоча мало місце і деяке перекриття розташування ланкастерівських та неланкастерівських ліній (кластер I.1.2). Заразом результати кластеризації засвідчили певні істотні відмінності у ліній, близьких до Oh43, порівняно з лініями, близькими до Mo17 (підпідкластер I.1.1), що вказує на генетичну гетерогенність усередині самої плазми Ланкастер.

Аналіз генетичної структури ліній за програмою Structure (кількісний кластерний аналіз) (рис. 3) дозволив оцінити внесок предкових популяцій в геном сучасних ліній за алельним станом SNP-маркерів і довів наявність двох груп серед масиву з 91 лінії кукурудзи. Лінії, які за педігрі відносяться до плазми Ланкастер, усі ввійшли до однієї і тієї ж групи – групи 2. За коефіцієнтом приналежності до групи 2 ( $Q=0,889\pm 0,119$ ) лінії плазми Ланкастер достовірно відрізнялися від неланкастерівських ліній ( $Q=0,390\pm 0,103$ ).

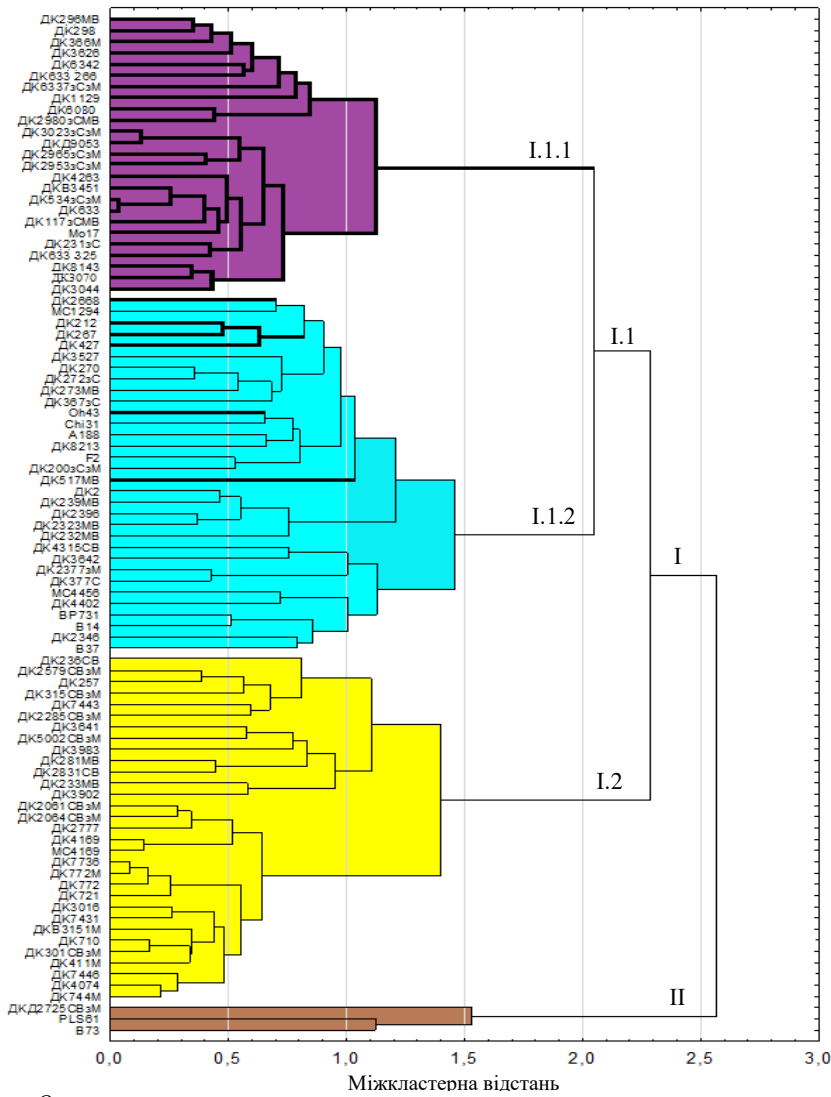


Рис. 2. Дендрограма генетичних взаємовідносин між 91 лінією кукурудзи за результатами SNP-аналізу, побудована методом повного зв'язку. Примітка. Лінії, які за педігрі відносяться до Ланкастер, показано жирними рисками.

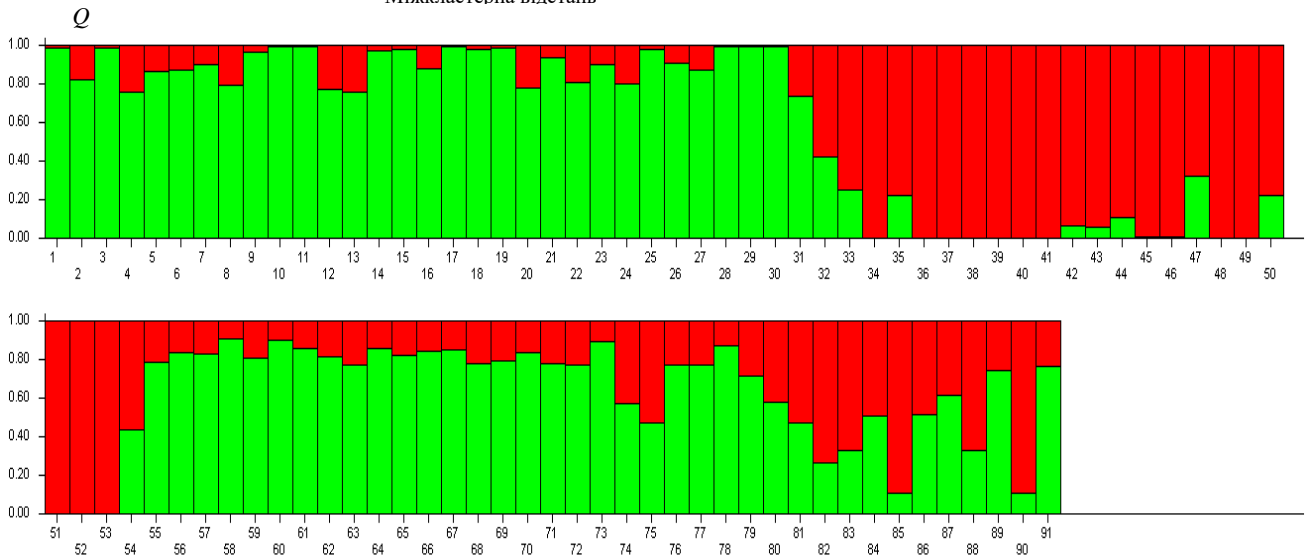


Рис. 3. Кількісний кластерний аналіз генетичної структури ліній кукурудзи за результатами SNP-генотипування (програма Structure,  $k=2$ ). Примітка. Кожен стовпчик відповідає одній лінії; частку кожної групи в генотипі лінії показано часткою забарвлення певним кольором: група 1 позначена червоним кольором, група 2 – зеленим кольором. Розподіл ліній за педігрі: 1-31 – лінії плазми Ланкастер (L), 32-91 – NL-лінії, де 32-54 – Айодент, 55 – A188, 56 – Chi31, 57 – PLS61, 58-64 – Лакон, 65-79 – Рейд, 80-91 – Мікс.

Отже, результати принципового компонентного аналізу, якісного кластерного аналізу за методом повного зв'язку, аналізу генетичної структури ліній за Structure співпадають і підтверджують наявність серед проаналізованого масиву окремої групи ліній, склад якої співпадає з лініями, віднесеними за педігрі до плазми Ланкастер.

**Алельний стан SNP-маркерів, характерний для ліній кукурудзи плазми Ланкастер.** З метою ідентифікації алельного стану SNP-маркерів, специфічного для ліній плазми Ланкастер, було проаналізовано різницю між частотами мажорних алелів SNP-маркерів у вихідній групі неланкастерівських ліній та частотами однойменних алелів у похідній групі – групі Ланкастер. На основі найбільших значень такої різниці складено формулу алельного стану десяти маркерів, найхарактернішого для Ланкастер. Специфічний набір алелів SNP-маркерів за панеллю BDI-III для плазми Ланкастер становить 332Г, 151А, 256А, 331Т, 335Ц, 185Ц, 343А, 181Ц, 288А та 190А (назви дезоксирибонуклеотидів поряд з номером маркера подано за скороченими назвами азотистих основ: А – аденін, Т – тимін, Г – гуанін, Ц – цитозин).

**Оцінка варіювання та спорідненості ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за SNP-маркерами.** Для визначення варіювання та спорідненості ліній усередині плазми Ланкастер за SNP-маркерами було проаналізовано основні показники одонуклеотидного поліморфізму ДНК. Зародкова плазма Ланкастер характеризувалася середніми значеннями частоти мажорного алеля SNP-маркерів на рівні  $0,7678 \pm 0,0159$ , тоді як група неланкастерівських ліній –  $0,6977 \pm 0,0143$ . Показник генного різноманіття ліній Ланкастер коливався в межах  $0,1701-0,1873$ , у NL-ліній –  $0,1725-0,1901$ , тобто, його значення в групі ліній Ланкастер були достовірно менші, на рівні в середньому  $0,1174 \pm 0,0015$ , порівняно з групою неланкастерівських ліній, де він в середньому склав  $0,1808 \pm 0,0009$ . В групі ліній неланкастерівських плазм, порівняно з групою Ланкастер, ліміти генетичних SNP-дистанцій були ширшими ( $0,0316-0,8000$  проти  $0,0035-0,5333$ ), а середнє значення – достовірно вищим ( $0,4229 \pm 0,0061$  проти  $0,3377 \pm 0,0099$ ). Отже, отримані дані очікувано засвідчили значне генетичне різноманіття групи ліній, де зібрані представники декількох неланкастерівських плазм, і, водночас, зазначили чималий рівень різноманіття усередині групи Ланкастер.

Спорідненість ліній Ланкастер української селекції з типовими представниками цієї плазми за результатами SNP-генотипування коливалася у межах  $50,2-85,3\%$  для Mo17 та  $46,7-63,5\%$  для Oh43. Тобто, алельний стан близько половини використаних одонуклеотидних маркерів у ліній Ланкастер української селекції та у типових представників цієї плазми збігався. Можна припустити, що такі алельні варіанти маркерів є стародавніми, були передані ще від вихідного сорту Ланкастер, а алельні варіанти решти маркерів привнесені в процесі селекції в Україні.

Гетерозиготність за SNP-маркерами у гібридів  $F_1$  склала в середньому  $41,4 \pm 2,3\%$ , а у їхніх батьківських ліній – лише  $1,4 \pm 0,4\%$ . Існує значний потенціал підвищення гетерозиготності простих гібридів, що дозволяє очікувати збільшення ступеня гетерозису відносно батьківських ліній.

## КЛІТИННО-ІНЖЕНЕРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР У КУКУРУДЗИ

Для клітинно-інженерної характеристики плазми Ланкастер було обрано десять ліній цієї плазми, які за результатами SNP-аналізу показали високу спорідненість з типовими представниками даної плазми – лініями Mo17 (52,2-89,3%) та Oh43 (53,3-66,8%) та представляють основні підплазми і групи плазми Ланкастер (*Mo17*, *Mo17mix*, *Oh43*, *Mo17/Oh43*), а також 53 гібрида F<sub>1</sub> за участю ліній даної плазми. За здатністю до калусогенезу і регенерації рослин *in vitro* лінії-представники плазми Ланкастер порівнювали з відомими високототипотентними лініями A188, Chi31 та PLS61 однойменних зародкових плазм, які розглядали як лінії-стандарти. Окрему увагу приділено характеристиці тотипотентності гібридів між лініями Ланкастер та гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами.

**Калусогенез в культурі *in vitro* у генотипів зародкової плазми Ланкастер.** Потенціал утворення калусної тканини I типу у ліній Ланкастер був низький ( $7,8 \pm 1,3\%$ ), але значно підвищувався у гібридів F<sub>1</sub> між ними ( $45,4 \pm 5,6\%$ ) (табл. 1). Високою частотою утворення калусної тканини I типу характеризувалися гібриди ліній Ланкастер з лініями A188 ( $53,6 \pm 8,1\%$ ), Chi31 ( $75,4 \pm 6,6\%$ ) та PLS61 ( $74,7 \pm 5,3\%$ ). Проте, потенціал утворення калусної тканини II типу був вищим у ліній цієї плазми ( $62,6 \pm 4,6\%$ ), ніж у гібридів ліній Ланкастер між собою ( $34,4 \pm 5,1\%$ ), ліній Ланкастер з A188 ( $42,2 \pm 6,9\%$ ), Chi31 ( $0,7 \pm 1,1\%$ ) та PLS61 ( $17,9 \pm 2,6\%$ ).

Таблиця 1

Порівняльна характеристика калусогенезу у гібридів між лініями плазми  
Ланкастер, гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами та їхніх  
батьківських ліній

Генотипи	Кількість досліджених генотипів, шт.	Частота утворення (%)	
		калусів I типу	калусів II типу
Лінії			
Лінії Ланкастер	10	$7,8 \pm 1,3$	$62,6 \pm 4,6$
A188	1	0	$92,0 \pm 6,3$
Chi31	1	0	$84,6 \pm 6,7$
PLS61	1	$48,6 \pm 7,4$	$47,5 \pm 7,4$
Гібриди			
Ланкастер×Ланкастер	21	$45,4 \pm 5,6$	$34,4 \pm 5,1$
Ланкастер×A188	6	$53,6 \pm 8,1$	$42,2 \pm 6,9$
Ланкастер×Chi31	6	$75,4 \pm 6,6$	$0,7 \pm 1,1$
Ланкастер×PLS61	20	$74,7 \pm 5,3$	$17,9 \pm 2,6$

Усередині плазми Ланкастер спостерігалось значне варіювання за калусогенною здатністю. Середні рівні ознак загальної частоти калусогенезу, частоти утворення морфогенних калусів, зокрема I та II типів, пропорційно збільшувалися в досліджених підплазмах і групах у напрямку

*Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43* разом з насиченням неспорідненим генетичним матеріалом.

Реципрокний ефект за інтенсивністю калусогенезу відмічено як для гібридів між ланкастерівськими лініями, так і для гібридів ліній Ланкастер з A188, Chi31 і PLS61. Інтенсифікація утворення калусної тканини I типу відбувалася переважно при використанні як материнської – лінії плазми Ланкастер. Для калусної тканини II типу в групах гібридів між лініями Ланкастер та лініями Ланкастер і PLS61 інтенсивність калусоутворення підвищувалася, якщо за материнську використовувалася лінія, яка належала до підплазми *Oh43* плазми Ланкастер.

Суттєвий вплив на калусогенну здатність, зокрема утворення калусів I та II типу, у ліній Ланкастер мали генотип (відповідно  $\eta^2=5,9\pm0,2\%$  та  $\eta^2=4,6\pm0,2\%$ ) та умови року проведення досліджень (відповідно  $\eta^2=5,9\pm0,2\%$  та  $\eta^2=10,4\pm0,04\%$ ). Проте вирішальною була взаємодія генотипового та екологічного факторів (відповідно  $\eta^2=24,2\pm0,4\%$  та  $\eta^2=23,4\pm0,3\%$ ). Лінії плазми Ланкастер, стабільно за роками продуктивні стосовно утворення калусів II типу, були нестабільними за утворенням калусів I типу (рис. 4).

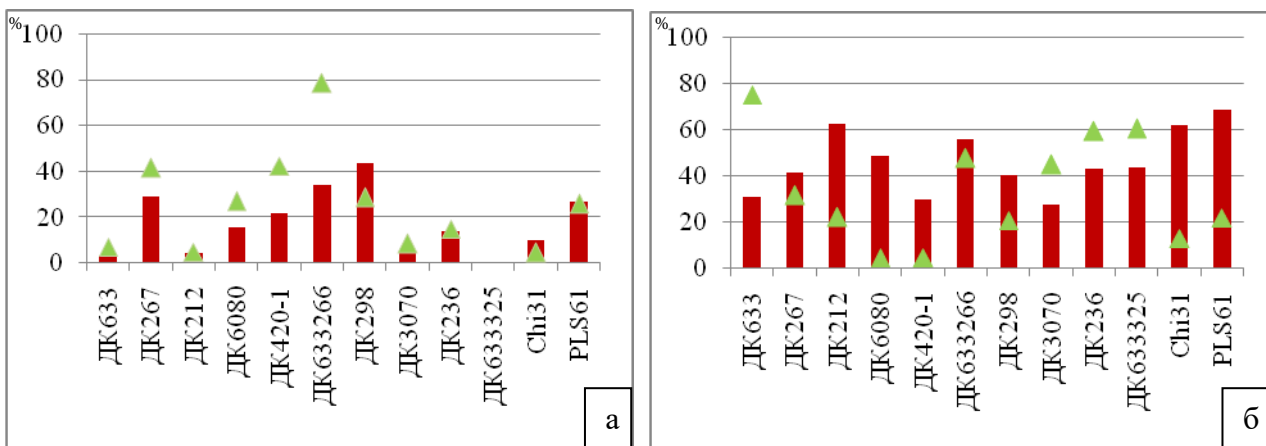


Рис.4. Взаємозв'язок показників індукції калусогенезу та сили впливу умов року для частоти утворення калусів I типу (а) і II типу (б) у ліній кукурудзи. Червоними стовпчиками показано рівень показників індукції калусогенезу (%), зеленими трикутниками – рівень сили впливу умов року (%)

Сахароза при підвищенні концентрації в середовищі індукції калусогенезу з 30 до 60 г/л у ліній Ланкастер і ліній-стандартів стимулювала калусогенез I типу та інгібувала калусогенез II типу. Цефотаксим в концентраціях 150 і 300 мг/л в середовищі індукції калусогенезу пригнічував утворення калусної тканини I типу та стимулював утворення калусної тканини II типу у ліній Ланкастер. Модифікація складу середовища для індукції калусогенезу, зокрема за складом мінеральної основи, вмістом сахарози і цефотаксиму, викликала варіювання показників калусогенезу залежно від генотипу.

**Регенерація рослин в культурі *in vitro* у генотипів зародкової плазми Ланкастер.** Встановлено, що рівень регенераційної здатності генотипів

Ланкастер визначається генотипом, віком та типом калусної тканини, а також складом живильних середовищ для індукції калусогенезу та індукції регенерації.

Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів, яка характеризує регенераційний потенціал, варіювала залежно від генотипу і для калусної тканини I типу у ліній Ланкастер знаходилася на рівні  $24,8 \pm 5,6$  шт., у ліній-стандартів  $-154,8 \pm 13,1$  шт., а у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами  $-53,6 \pm 4,3$  шт. Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів у ліній Ланкастер для 60-добової калусної тканини II типу відзначалася на рівні  $4,0 \pm 3,2$  шт., у ліній-стандартів  $-41,2 \pm 6,1$  шт., а у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами  $-42,4 \pm 5,1$  шт. Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів, яку вдалося отримати з 90-добової калусної тканини II типу, у ліній Ланкастер була дуже низькою ( $3,7 \pm 3,3$  шт.), у ліній-стандартів цей показник був дещо вищим ( $27,7 \pm 4,6$ ), у гібридів  $-$  мав проміжне значення ( $12,3 \pm 2,5$  шт.). Тривале культивування калусної тканини II типу призводило до зниження кількості рослин-регенерантів. Для калусної тканини II типу у всіх досліджених генотипів спостерігалось співпадіння значень загальної та ефективної частоти регенерації, що принципово відрізняє її від калусної тканини I типу.

У ліній Ланкастер і гібридів між лініями Ланкастер та лініями-стандартами регенерація рослин відбувалася як шляхом органогенезу, так і шляхом ембріодогенезу (рис. 5, 6). Співвідношення цих типів морфогенезу залежало від генотипу, типу калусної тканини та тривалості періоду її субкультивування до трансплантації на регенераційне середовище.

Ключовими для дорощування рослин-регенерантів покоління  $R_0$  є їхня приживаність та адаптація після перенесення з умов *in vitro* у ґрунт. Приживаність рослин-регенерантів зростала на 26,5% при зволоженні ґрунту розчином біогумату  $-$  продуктом переробки соняшникового лушпиння культурою черв'яків *Eisenia foetida*.

Отже, генотипи плазми Ланкастер мають специфічні якісні та кількісні характеристики калусогенного та регенераційного потенціалу, що необхідно враховувати в клітинно-інженерних дослідженнях. Розроблено біотехнологічні схеми індукції калусогенезу, субкультивування калусної тканини та регенерації рослин з урахуванням вимог ліній плазми Ланкастер.

## ГЕНЕТИЧНО-ІНЖЕНЕРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР У КУКУРУДЗИ

В даному розділі представлено характеристику особливостей та ефективності генетичної трансформації ліній і гібридів кукурудзи плазми Ланкастер та деяких інших плазм. В результаті біолістичної трансформації калусної тканини генотипів кукурудзи даної плазми вектором рАНС25 з чужорідними генами *uidA* та *bar* були отримані трансгенні калуси, а з них  $-$  рослини-регенеранти. На основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер отримано 8 трансгенних гербіцидостійких інбредних ліній.



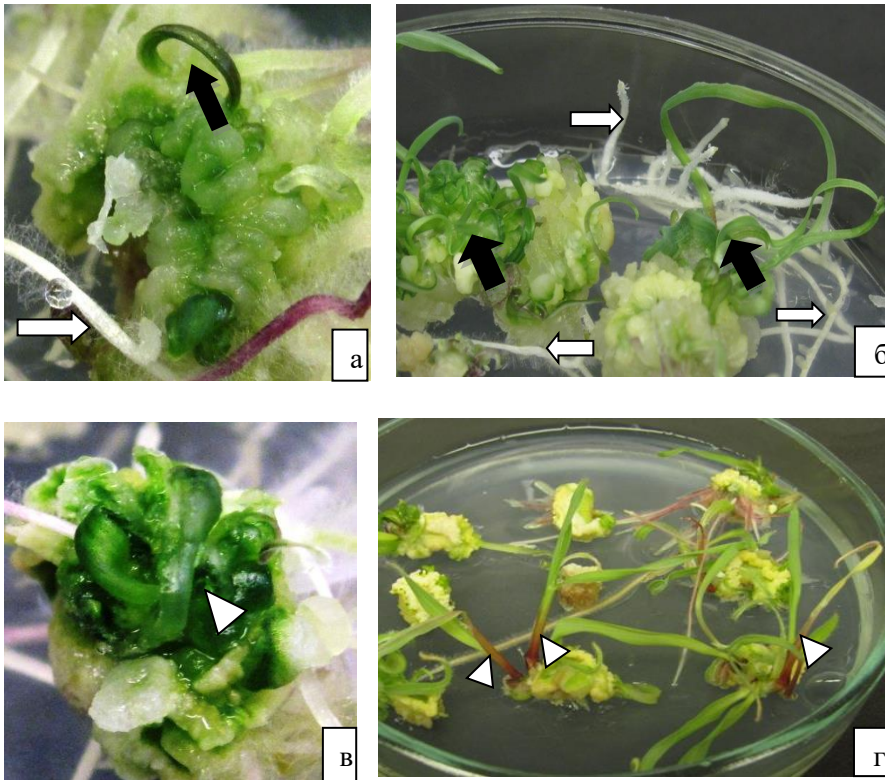


Рис. 5. Регенерація рослин шляхом органогенезу у кукурудзи: а-б – утворення на калусній тканині листкоподібних структур (чорні стрілки), корені (білі стрілки) розвиваються несполучено з ними; в-г – утворення рослинок у вигляді пагонів (трикутники), у цих рослинок корінці відсутні

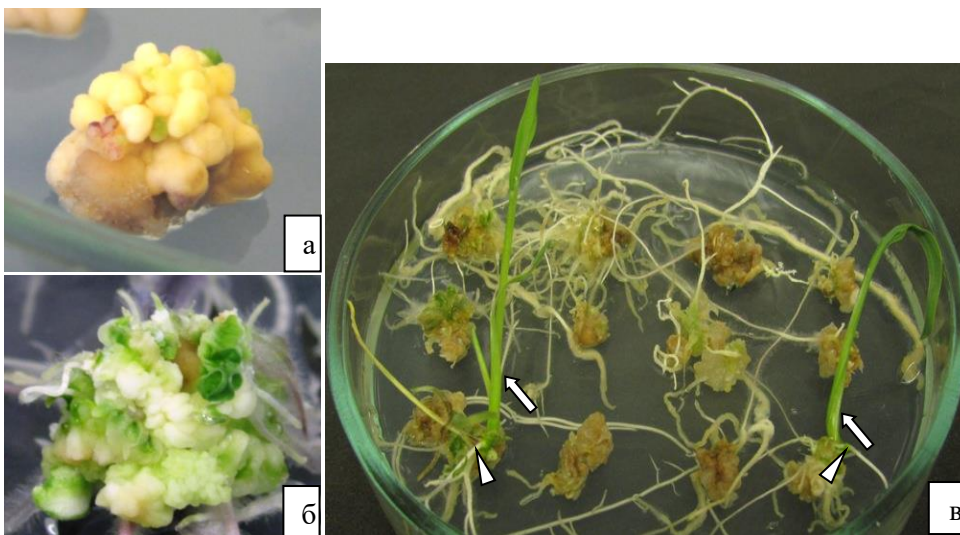


Рис. 6. Регенерація рослин шляхом ембріодогенезу у кукурудзи: а – розвиток ембріодів на середовищі для калусогенезу; б – подальший розвиток ембріодів на середовищі для індукції регенерації; в – регенерація рослин шляхом ембріодогенезу: у проростка пагін (стрілка) і корінець (трикутник) розвиваються сполучено



**Результати біолістичної трансформації на етапі культури *in vitro*.**

Транз'єнтна експресія гена *uidA* у біолістично оброблених калусах зареєстрована для всіх досліджених ліній і гібридів. Частота транз'єнтної експресії гена *uidA* у проаналізованих ліній коливалася в межах 20-90%. У ліній Ланкастер ДК633266 і ДК267 частота транз'єнтної експресії складала відповідно 40% і 20% з рівнем експресії в 1 бал. У всіх проаналізованих гібридів частота транз'єнтної експресії складала 100%. У гібрида з лінією Ланкастер PLS61×ДК633266 і його зворотної комбінації рівень транз'єнтної експресії гена *uidA* в 4-5 балів мали відповідно 78,6 і 66,6% біолістично оброблених калусів.

Фосфінотрицин як селективний агент в середовищах для індукції калусогенезу та регенерації мав пролонговану дію, а його вплив суттєво блокував життєдіяльність калусної тканини не на етапі калусогенезу, а в період регенерації рослин. Позитивний вплив генетичної трансформації геном *bar* за стійкістю до фосфінотрицину вперше проявлявся на етапі регенерації рослин.

Встановлено, що реакція калусної тканини та рослин-регенерантів  $T_0$  на процедуру біолістичної трансформації з використанням чужорідних генів *uidA* і *bar* та селективний тиск фосфінотрицину були генотипоспецифічними. Лінії Ланкастер демонстрували високі значення частоти трансформації у гібридах з лінією PLS61: для PLS61×ДК633266 та його зворотної комбінації частота трансформованих калусів досягла 100%, для ДК267×PLS61 частота фосфінотрициностійких калусів складала  $87,2 \pm 3,6\%$ , а частота фосфінотрициностійких рослин-регенерантів  $T_0$  –  $52,5 \pm 5,4$  рослин на 100 калусів.

**Результати вирощування та тестування рослин-трансформантів в поколіннях  $T_0$ - $T_6$ .** За результатами ПЛР-аналізу ген *bar* був відсутній у геномі батьківських ліній донорного гібрида PLS61×ДК633266 (рис. 7). Вперше ген *bar* реєструвався за ПЛР в калусній тканині, біолістично обробленій вектором з даним геном. Ген *bar* був присутній в рослинах покоління  $T_0$ , регенерованих *in vitro* з біолістично обробленої калусної тканини та передавався від рослин  $T_0$  наступним поколінням  $T_1$ - $T_6$  при статевому способі розмноження, зокрема при самозапиленні. На рисунку 8 представлено результати молекулярно-генетичного аналізу рослин-трансформантів покоління  $T_2$  на присутність гена *bar* (як референсний використано ген алкогольдегідрогенези 1 кукурудзи (*adh1*)).

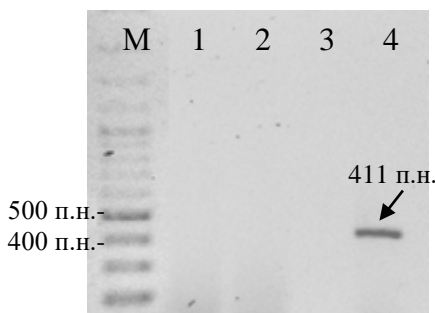


Рис. 7. Електрофорез продуктів ампліфікації загальної ДНК рослин кукурудзи з праймерами до гена *bar* у ліній PLS61 і ДК633266 вихідного гібрида PLS61×ДК633266, використаного для біолістичної трансформації: М – маркер молекулярної маси з кроком 100 п.н.; 1 – лінія PLS61; 2 – лінія ДК633266; 3 – негативний контроль (вода); 4 – позитивний контроль

(генетично трансформований тютюн). Довжина очікуваного фрагмента для гена *bar* – 411 п.н.

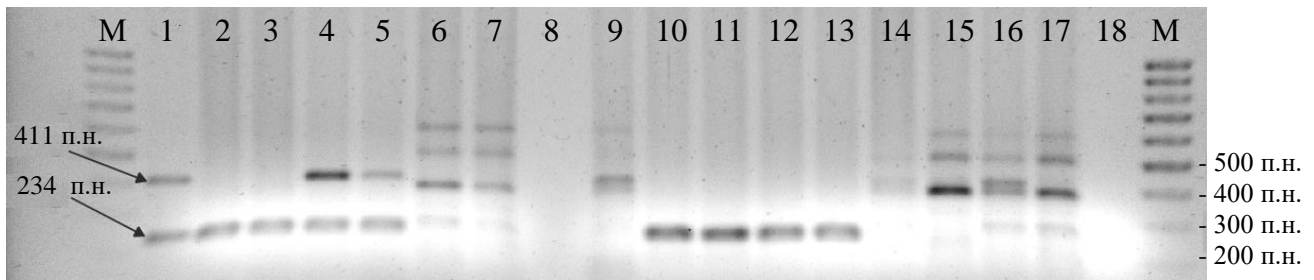


Рис.8. Електрофорез продуктів ампліфікації загальної ДНК рослин кукурудзи T<sub>2</sub> вихідного генотипу PLS61×ДК633266 з праймерами до генів *bar* та *adh1*: М – маркер молекулярної маси з кроком 100 п.н.; 1-7,9-17 – рослини кукурудзи, біолістично оброблені вектором з геном *bar*; 8 – без внесення проби (без ДНК, без реактивів для ампліфікації); 18 – негативний контроль (без ДНК, але з реактивами для ампліфікації); 1-5 – мультиплекс з праймерами до генів *bar* та *adh1*; 6,7,9,14-17 – ампліфікація з праймерами лише до гена *bar*; 10-13 – ампліфікація з праймерами до гена *adh1*. Довжина очікуваного фрагмента для гена *bar* – 411 п.н., для гена *adh1* – 234 п.н.

Ген *bar* в поколінні T<sub>2</sub> виявлявся за ПЛР як після селекції на гербіцидному фоні, так і в рослинах, які вирощувалися без впливу селективного фактора. Присутність гена *bar* в ДНК рослини не завжди забезпечувала максимальну виживаність після обробки гербіцидом, деякі *bar*-позитивні рослини пригнічувалися гербіцидом. В пізніх поколіннях від самозапилення зафіксовано зростання виживаності рослин після обробки гербіцидом до 100% (табл. 2).

Таблиця 2

Вживаність на гербіцидному фоні рослин кукурудзи, отриманих в поколіннях від самозапилення T<sub>2</sub>-T<sub>6</sub> після біолістичної трансформації геном *bar* вихідного генотипу PLS6×ДК633266

Покоління	Кількість рослин, оброблених гербіцидом «Баста» <sup>ТМ</sup> , шт.	На 20-добу від обробки гербіцидом,			На кінець вегетаційного періоду, частота виживаності,%
		частота виживаності,%	середній бал виживаності	частота рослин з балом виживаності 4-5, %*	
T <sub>2</sub>	162	64,5±8,2	1,8	19,8±6,3	46,4±8,5
T <sub>3</sub>	96	80,0±9,5	3,3	30,2±9,4	67,6±11,2
T <sub>5</sub>	170	92,9±3,9	3,6	74,7±6,7	74,7±6,7
T <sub>6</sub>	134	100,0±0,0	4,0	95,5±3,6	95,5±3,8

Примітка. \* – процентне відношення кількості рослин з балами виживаності 4 і 5, до кількості рослин, оброблених гербіцидом.

На основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер, зокрема гібрида PLS61×ДК633266, отримано 8 трансгенних гербіцидостійких інбредних ліній.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вперше надано комплексну біотехнологічну характеристику генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за молекулярно-генетичними маркерами, клітинно-інженерним та генетично-інженерним потенціалом. Встановлено особливості генотипів плазми Ланкастер за SNP-маркерами, визначено їхній калусогенний і регенераційний потенціал *in vitro*, оцінено компетентність до біолістичної трансформації.

1. Результати принципового компонентного, кластерного, дисперсійного аналізу та аналізу генетичної структури ліній за алельним станом маркерів однонуклеотидного поліморфізму ДНК засвідчують відокремленість групи ліній кукурудзи, які за родоводом відносяться до зародкової плазми Ланкастер. Специфічний набір алелів SNP-маркерів за панеллю BDI-III для плазми Ланкастер становить 332Г, 151А, 256А, 331Т, 335Ц, 185Ц, 343А, 181Ц, 288А та 190А.

2. Зародкова плазма Ланкастер характеризується середніми значеннями частоти мажорного алеля SNP-маркерів на рівні  $0,7678 \pm 0,0159$  і показника генного різноманіття ліній –  $0,1774 \pm 0,0015$ . Розмір SNP-дистанцій між лініями Ланкастер в середньому становить  $0,3377 \pm 0,0099$  і свідчить про значне генетичне різноманіття усередині даної плазми.

3. Для плазми Ланкастер спостерігається значне варіювання за калусогенною здатністю в культурі *in vitro*. Середні рівні ознак загальної частоти калусогенезу, частоти утворення морфогенних калусів, зокрема I та II типів, пропорційно збільшуються в досліджених підплазмах і групах у напрямку *Mol17* → *Mol17mix* → *Oh43* → *Mol17/Oh43* разом з насиченням неспорідненим генетичним матеріалом.

4. Потенціал утворення калусної тканини I типу у ліній Ланкастер низький ( $7,8 \pm 1,3\%$ ), але він значно підвищується у гібридів  $F_1$  між ними ( $45,4 \pm 5,6\%$ ) та з лініями-донорами високої тотипотентності A188 ( $53,6 \pm 8,1\%$ ), Chi31 ( $75,4 \pm 6,6\%$ ) та PLS61 ( $74,7 \pm 5,3\%$ ). Втім, потенціал утворення калусної тканини II типу є вищим у ліній Ланкастер ( $62,6 \pm 4,6\%$ ), ніж у їхніх міжлінійних гібридів ( $34,4 \pm 5,1\%$ ), ліній Ланкастер з A188 ( $42,2 \pm 6,9\%$ ), Chi31 ( $0,7 \pm 1,1\%$ ) та PLS61 ( $17,9 \pm 2,6\%$ ).

5. Суттєвий вплив на калусогенну здатність, зокрема, утворення калусів I та II типів, у ліній Ланкастер мають генотип (відповідно  $5,9 \pm 0,2\%$  та  $4,6 \pm 0,2\%$ ) та умови року проведення досліджень (відповідно  $5,9 \pm 0,2\%$  та  $10,4 \pm 0,04\%$ ), однак вирішальною є взаємодія генотипового та екологічного факторів (відповідно  $24,2 \pm 0,4\%$  та  $23,4 \pm 0,3\%$ ). Лінії плазми Ланкастер, стабільно за роками продуктивні стосовно утворення калусів II типу, є нестабільними за утворенням калусів I типу.

6. У ліній Ланкастер і гібридів між лініями Ланкастер та лініями-стандартами співвідношення типів морфогенезу (органогенез/ембріодогенез) залежить від генотипу, типу та тривалості періоду культивування калусної тканини до трансплантації на регенераційне середовище. Регенераційна здатність ліній кукурудзи плазми Ланкастер визначається генотипом, типом і

віком калусної тканини, а також складом живильних середовищ для індукції калусогенезу та індукції регенерації.

7. Регенераційний потенціал калусної тканини I типу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер в середньому складає  $24,8 \pm 5,6$  рослин на 100 калусів, але суттєво підвищується у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами – в середньому до  $53,6 \pm 4,3$  рослин на 100 калусів. Регенераційний потенціал калусної тканини II типу у ліній Ланкастер в середньому досягає лише  $3,7 \pm 3,3$  шт. і підвищується у гібридів до  $12,3 \pm 2,5$  шт.

8. Реакція калусної тканини та рослин-регенерантів  $T_0$  на процедуру біолістичної трансформації з використанням чужорідних генів *uidA* і *bar* та селективний тиск фосфінотрицину є генотипоспецифічною. Лінії плазми Ланкастер демонструють високі значення частоти трансформації у гібридах з лінією PLS61: для PLS61×ДК633266 та його зворотної комбінації частота трансформованих калусів досягла 100%, для ДК267×PLS61 частота фосфінотрицинстійких калусів склала  $87,2 \pm 3,6\%$ , а частота фосфінотрицинстійких рослин-регенерантів  $T_0$  –  $52,5 \pm 5,4$  рослин на 100 калусів.

9. В пізніх поколіннях від самозапилення *bar*-трансформантів, отриманих на базі лінії ДК633266 плазми Ланкастер, виживаність рослин після обробки гербіцидом зростає до 100%. Молекулярно-генетичний аналіз підтвердив успадкування трансгена *bar* в поколіннях від самозапилення.

10. На основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер, зокрема гібрида PLS6×ДК633266, отримано 8 трансгенних гербіцидостійких інбредних ліній.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. SNP-паспорти ліній кукурудзи, результати аналізу генетичної структури ліній та їхньої кластеризації як для всього проаналізованого масиву, так і окремо для ліній Ланкастер рекомендовано до використання в селекційному процесі цієї культури на етапі створення вихідних популяцій для інбридингу, а також у захисті авторських прав на лінії і гібриди  $F_1$ .

2. Розраховані попарні генетичні SNP-дистанції між лініями плазми Ланкастер та лініями інших плазм рекомендовано використовувати в селекційному процесі для розробки гетерозисних моделей та прогнозування рівня гетерозису на етапі визначення батьківських компонентів гібридів  $F_1$ .

3. Як стабільні з високими значеннями показників одночасно за загальною частотою калусогенезу, частотою утворення морфогенних калусів та частотою утворення калусів II типу рекомендовано використовувати лінії Ланкастер ДК298, ДК6080, ДК212 і ДК420-1.

4. Для отримання калусної тканини I типу серед гібридів між лініями Ланкастер рекомендовано використовувати прямі та зворотні комбінації ДК6080×ДК267, ДК236×ДК267 та ДК633266×ДК212, в групі гібридів з А188 – А188×ДК420-1, з Chi31 – ДК3070×Chi31, з PLS61 – ДК633×PLS61 та ДК633266×PLS61. Для отримання калусної тканини II типу серед гібридів між лініями Ланкастер рекомендовано використовувати прямі та зворотні

комбінації ДК212×ДК6080, ДК6080×ДК633325, ДК236×ДК633325, в групі гібридів з А188 – А188×ДК298, з PLS61 – ДК298×PLS61, пряму і зворотну комбінацію ДК212×PLS61.

5. Для інтенсифікації індукції калусогенезу I типу у ліній Ланкастер рекомендовано використання сахарози в середовищі індукції калусогенезу у підвищеній до 60 г/л концентрації. Для стимулювання утворення калусної тканини II типу у ліній Ланкастер рекомендовано використання цефотаксиму в концентрації 150 мг/л, а для отримання рослин-регенерантів з неї – 0,1 мг/л індолилмасляної кислоти.

6. Для підвищення інтенсивності морфогенезу і регенерації шляхом непрямого ембріодогенезу рекомендовано використовувати гібриди ліній Ланкастер з лінією А188 і збільшувати тривалість культивування калусної тканини I типу на середовищі для індукції калусогенезу до 60 діб.

7. Для біолістичної трансформації вітчизняних генотипів кукурудзи рекомендовано використовувати калусну тканину гібридів F<sub>1</sub> між вітчизняними лініями плазми Ланкастер та модельними лініями з високою калусогенною та регенераційною здатністю.

8. Отримані *bar*-трансгенні лінії кукурудзи рекомендовано використовувати в селекційному процесі як батьківські форми гібридів, стійких до гербіцидів на основі фосфіотрицину, а також як донори гена *bar* для поширення серед ліній плазми Ланкастер та інших плазм шляхом схрещувань.

## СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті:

1. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Морфогенез *in vitro* у ліній кукурудзи гетерозисної групи Ланкастер. *Цитология и генетика*. 2017. № 51 (1). С. 61–68. (Особистий внесок здобувача: планування і виконання експерименту, аналіз результатів, формулювання висновків, підготовка статті).

2. **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М., Борисова В. В., Черчель В. Ю., Дзюбецький Б.В. Групування та кластеризація ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу. *Regulatory mechanisms in biosystems*. 2017. № 8 (3). С. 343–348. (Особистий внесок здобувача: планування досліджу, аналіз і обговорення отриманих результатів, написання статті).

3. **Деркач К. В.**, Борисова В. В., Сатарова Т. М., Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю., Федько М. М. Ідентифікація ліній кукурудзи плазми Ланкастер серед інших типів зародкової плазми за результатами SNP-аналізу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. № 20. С. 58–63. (Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання основних положень та висновків, написання статті).

4. **Деркач К. В.**, Сатарова В. В., Борисова В. В., Черчель В. Ю. Алельний стан SNP-маркерів, характерний для ліній кукурудзи плазми Ланкастер. *Вісник Товариства генетиків і селекціонерів*. 2017. № 15 (1). С. 32–39. (Особистий

*внесок здобувача: планування експерименту, аналіз результатів, написання статті).*

5. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Регуляція морфогенезу *in vitro* у ліній кукурудзи групи Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія Біологія. Екологія.* 2016. Т. 24 (1). С.253–257. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експерименту, опрацювання результатів, написання статті).*

6. **Деркач К. В.** Динаміка калусогенезу в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина.* 2012. № 3 (1). С. 24–28. *(Особистий внесок здобувача: планування експерименту, спостереження, аналіз отриманих даних, написання статті).*

7. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Калусогенний потенціал ліній кукурудзи групи Ланкастер в умовах *in vitro*. *Вісник Дніпропетровського національного університету. Сер. Біологія. Екологія.* 2011. № 19 (1). С. 16–21. *(Особистий внесок здобувача: планування і виконання експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

8. **Derkach K. V.**, Satarova T. M., Dzubetsky B. V., Borysova V. V., Cherchel V. Yu., Cherenkov A. V. Relationship between maize Lancaster inbred lines according to SNP-analysis. *Maize Genetics Cooperation Newsletter.* 2017. № 91. С. 1–6. *(Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків, написання статті).*

9. **Деркач Е. В.**, Абраїмова О. Е., Борисова В. В., Черчель В. Ю., Сатарова Т. Н. Биотехнологические и молекулярно-генетические характеристики линий кукурузы селекционной группы Ланкастер. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2013. Т. 15 № 3 (5). С. 1596–1600. *(Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання статті).*

### **Тези наукових доповідей:**

1. **Деркач К. В.**, Борисова В. В., Сатарова Т. М. Спорідненість ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу. *Біологія рослин та біотехнологія: збірка тез третьої конф. молодих учених (Київ, 16–18 трав. 2017 р.).* Київ, 2017. С. 38. *(Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз отриманих даних, написання тез).*

2. **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М., Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю., Борисова В. В. Характеристика ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за допомогою SNP-маркерів. *Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин: тези доповідей Міжнародної наук. конф. (Одеса, 12 верес. 2017 р.).* Одеса, 2017. С. 41-42. *(Особистий внесок здобувача: аналіз і обговорення отриманих даних, написання тез).*

3. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М., Тишковська Т. О. Оцінка ефективності генетичної трансформації незрілих зародків кукурудзи за дії гербіцидного навантаження. *Роль наукових досліджень в забезпеченні процесів інноваційного розвитку аграрного виробництва України: матеріали*

Всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів (Дніпропетровськ, 25–26 трав. 2016 р.). Дніпропетровськ, 2016. С. 18–19. (*Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз і обговорення отриманих даних, написання тез*).

4. **Derkach K. V.** The evaluation of survival rate of maize *in vitro* regenerated plants in soil under artificial climate. *Molecular Microbiology and Biotechnology: abstracts of International scientific conference* (Odessa, June 21-23, 2016). Odessa, 2016. P. 12. (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експерименту, аналіз отриманих даних, написання тез*).

5. **Derkach K. V.**, Abraimova O. E., Satarova T. M., Goncharov Yu. A. Factors affecting on the ratio of types of morphogenic *in vitro* in different maize heterotic groups. *58<sup>th</sup> Annual Maize Genetics Conference: abstracts of International scientific conference* (Jacksonville, March 17-20, 2016). Hyatt Regency, Jacksonville, Florida, 2016. P. 156. (*Особистий внесок здобувача: виконання експерименту, аналіз отриманих даних, написання тез*).

6. Молитва О. А., **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Нітовська І. О., Моргун Б. В., Сатарова Т. М. Біолістична трансформація калусних тканин кукурудзи. *Біотехнологія: звершення та надії: збірник тез III Всеукраїнської наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених* (Київ, 15–16 трав. 2014 р.). Київ, 2014. С. 70–71. (*Особистий внесок здобувача: планування експерименту, аналіз і обговорення отриманих даних, написання тез*).

7. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Нітовська І. О., Моргун Б. В., Борисова В. В., Сатарова Т. М. Результати генетичної трансформації гібриду кукурудзи PLS61×ДК633/266. *Інновації в сучасній селекції та генетиці сільськогосподарських культур: тези доповідей Всеукраїнської наук. конф. молодих вчених* (Одеса, 28–30 жов. 2014 р.). Одеса, 2014. С. 74–76. (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експерименту, обговорення отриманих даних, написання тез*).

8. **Деркач Е. В.**, Абраїмова О. Е., Сатарова Т. Н. Факторы, определяющие соотношение типов морфогенеза в каллусной ткани кукурузы. *Биология клеток растений in vitro и биотехнология: тезисы X Международной конф.* (Казань, 14–18 окт. 2013 р.). Казань, 2013. С. 113–114. (*Особистий внесок здобувача: планування і виконання експерименту, аналіз і обговорення отриманих даних, написання тез*).

9. Абраїмова О. Є., Нітовська І. О., **Деркач К. В.**, Рудас В. А., Моргун Б. В., Сатарова Т. М. Проліферація трансформованої калусної тканини кукурудзи під дією гербіцидного навантаження. *Современные аспекты генетической инженерии растений: тезисы Международной конф.* (Київ, 30 мая–1 июня 2011 г.). Київ, 2011. С. 12. (*Особистий внесок здобувача: виконання експерименту, обговорення отриманих даних, написання тез*).

10. **Derkach K. V.**, Satarova T. M., Abraimova O. E. Influence of sucrose on *in vitro* callusogenesis of Lancaster inbred lines. *53<sup>rd</sup> Annual Maize Genetics Conference: abstracts of International scientific conference* (St.Charles, March 17-20, 2011). Pheasant Run, St.Charles, Illinois, 2011. P. 103. (*Особистий внесок здобувача: виконання експерименту, аналіз отриманих даних, написання тез*).

## АНОТАЦІЯ

**Деркач К. В. Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2018.

У роботі надано біотехнологічну характеристику генотипам кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за молекулярно-генетичними маркерами, клітинно-інженерним та генетично-інженерним потенціалом.

Проаналізовано результати SNP-генотипування ліній Ланкастер та інших типів зародкової плазми та ідентифіковано алельні варіанти SNP-маркерів, специфічні для ліній Ланкастер. Оцінено генетичне різноманіття ліній усередині плазми Ланкастер.

Досліджено калусогенний і регенераційний потенціал ліній і гібридів плазми Ланкастер в культурі *in vitro* та розроблено заходи для його оптимізації.

Проведено генетичну трансформацію генотипів Ланкастер чужинними генами *uidA* і *bar* методом біоістики. Досліджено наявність трансгенів в поколіннях рослин-трансформантів від самозапилення. Отримано трансгенні гербіцидостійкі інбредні лінії кукурудзи на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер.

**Ключові слова:** кукурудза *Zea mays* L., зародкова плазма Ланкастер, SNP-маркери, культура *in vitro*, калусогенез, регенерація, біоістична трансформація, ген *bar*.

## АННОТАЦИЯ

**Деркач Е. В. Биотехнологическая характеристика линий кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2018.

В работе представлена биотехнологическая характеристика генотипов кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер по молекулярно-генетическим маркерам, клеточно-инженерному и генетически-инженерному потенциалу.

Проанализировано результаты SNP-генотипирования линий Ланкастер и других типов зародышевой плазмы и идентифицировано аллельные варианты SNP-маркеров, специфических для линий Ланкастер. Оценено генетическое разнообразие линий в середине плазмы Ланкастер.

Исследовано каллусогенный и регенерационный потенциал линий и гибридов плазмы Ланкастер в культуре *in vitro* и разработаны меры для его оптимизации.

Проведено генетическую трансформацию генотипов Ланкастер чужеродными генами *uidA* и *bar* методом биоістики. Исследовано присутствие трансгенов в поколениях растений-трансформантов от самоопыления. Получено трансгенные гербицидоустойчивые инбредные линии кукурузы на основе исходного материала плазмы Ланкастер.



**Ключевые слова:** кукуруза *Zea mays* L., зародышевая плазма Ланкастер, SNP-маркеры, культура *in vitro*, каллусогенез, регенерация, биолистическая трансформация, ген *bar*.

## SUMMARY

**Derkach K. V. The biotechnological characteristic of maize Lancaster germplasm genotypes. – Manuscript.**

Thesis for a PhD. degree for the specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kyiv, 2018.

The biotechnological characteristic of maize Lancaster germplasm genotypes according to the results of molecular genetic, cell engineering and genetic engineering studies is introduced in the thesis.

A comparative analysis of the results of SNP genotyping of representatives of maize Lancaster germplasm inbreds and other types of maize germplasm was performed. Allelic variants of SNP-markers specific for Lancaster germplasm inbreds were identified. A specific set of Lancaster germplasm alleles was determined by the frequencies of the major alleles of the ten *top*-SNP markers in comparison with inbreds of other germplasms. The genetic diversity of the maize inbreds within Lancaster germplasm was estimated. The presence of two subclusters within Lancaster germplasm was confirmed by the cluster analysis. One, the Mo17 inbred, was a typical representative of the *Mo17* subplasm, and the other, the Oh43 inbred, was a typical representative of the *Oh43* subplasm. Relationship of modern Lancaster inbreds with typical representatives of this germplasm, based on SNP-genotyping, ranged in 52.2-89.7% for Mo17 and 48.2-66.8% for Oh43.

Cell engineering investigations showed that Lancaster genotypes had specific qualitative and quantitative characteristics of the callusogenesis and regeneration potential, which differentiated them from the representatives of other maize germplasms, that should be taken in cell engineering studies. There were significant variations in the callusogenic ability inside the Lancaster germplasm. The average levels of the common frequency of callusogenesis, the frequency of morphogenic callus formation, in particular type I and type II, increased proportionally in the studied subplasms and groups in the direction of *Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43*, along with the saturation of unrelated genetic material. Lancaster germplasm inbreds, stable over the years, were productive for the formation of calli of type II but unstable for the formation of calli of type I. The regeneration potential of Lancaster germplasm inbreds was low, but increased in hybrids with inbreds of high cultural response A188, Chi31 and PLS61. It is noted that the modification of the media for induction of callusogenesis and regeneration led to variability of callusogenesis and regeneration parameters depending on genotype.

Genetic engineering investigations showed the existence of potential of the possibility of involving of Lancaster genotypes to genetic transformation. The biolistic transformation of callus tissues of such genotypes by vector pAHC25 with foreign genes *uidA* and *bar* was carried out. It was noted that phosphinothricin as a selective agent of the media for callusogenesis and regeneration had a prolonged

influence, and its effect significantly inhibited the vital activity of maize callus tissue not on the stage of callusogenesis, but during the period of plant regeneration. The positive effect of genetic transformation with gene *bar* on resistance to phosphinothricin is first demonstrated at the stage of plant regeneration. The expression of *bar* gene was also confirmed by the treatment of plants in the phase of seedlings with a herbicide «Basta»<sup>TM</sup>. In later generations of self-pollination the survival of plants after treatment with a herbicide reached up to 100%.

Eight new transgenic maize inbreds within Lancaster germplasm resistant to active ingredient of «Basta»<sup>TM</sup> herbicide, phosphinothricin, were obtained.

**Key words:** maize *Zea mays* L., Lancaster germplasm, SNP-markers, culture *in vitro*, callusogenesis, regeneration, biolistic transformation, gene *bar*.