

Національна академія аграрних наук України
Державна установа Інститут зернових культур

Національна академія наук України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Деркач Катерина Вікторівна

УДК 577.21:57.085.2:633.15

ДИСЕРТАЦІЯ
БІОТЕХНОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ
ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

03.00.20 «Біотехнологія»

біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
(доктора філософії)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Деркач К.В.

Науковий керівник
Сатарова Тетяна Миколаївна
доктор біологічних наук
професор

Дніпро – 2018

АНОТАЦІЯ

Деркач К. В. Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 біотехнологія (091 – Біологія).

Місце виконання: Державна установа Інститут зернових культур Національної академії аграрних наук України, м. Дніпро.

Захист відбудеться у спеціалізованій вченій раді К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України, м. Київ, 2018.

В дисертаційному дослідженні надано біотехнологічну характеристику генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за результатами молекулярно-генетичних, клітинно-інженерних та генетично-інженерних досліджень.

Молекулярно-генетичні особливості ліній плазми Ланкастер у кукурудзи проаналізовано на основі SNP-генотипування 91 лінії, серед яких 29 сучасних ліній, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, а також 60 ліній інших типів зародкової плазми. SNP-генотипування проведено за панеллю маркерів BDI-III. Показано, що результати принципового компонентного аналізу, аналізу генетичної структури ліній за програмою Structure, якісного кластерного аналізу за методом повного зв'язку та дисперсійного аналізу співпадають і підтверджують наявність серед проаналізованого масиву окремої групи ліній, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер. Встановлено специфічний набір алелів плазми Ланкастер, визначений за частотами мажорних алелів десяти *top*-SNP-маркерів в порівнянні з групою ліній інших типів зародкової плазми, який визначається як BDI-III-332Г, BDI-III-151А, BDI-III-256А, BDI-III-331Т, BDI-III-335Ц, BDI-III-185Ц, BDI-III-343А, BDI-III-181Ц, BDI-III-288А та BDI-III-190А.

Середнє значення розміру генетичних SNP-дистанцій між лініями Ланкастер ($0,3377 \pm 0,0099$) свідчило про значне генетичне різноманіття усередині даної плазми за алельним станом маркерів однонуклеотидного поліморфізму. Усередині плазми Ланкастер за допомогою кластерного аналізу підтверджено наявність двох підкластерів, до одного з яких входить типовий представник підплазми *Mo17* – лінія *Mo17*, а до іншого – типовий представник підплазми *Oh43* – лінія *Oh43*. Спорідненість сучасних ліній плазми Ланкастер з типовими представниками цієї плазми за результатами SNP-генотипування коливається у межах 52,2-89,7% для *Mo17* та 48,2-66,8% для *Oh43*.

За результатами SNP-генотипування встановлено, що лінії кукурудзи ДК633, ДК267, ДК212, ДК6080, ДК633266, ДК298, ДК3070, ДК236 та ДК633325, обрані як представники плазми Ланкастер для подальших біотехнологічних досліджень в культурі *in vitro*, належать до обох підплазм даної плазми. Вони мають спорідненість з типовими представниками даної плазми *Mo17* та *Oh43* на рівні відповідно 54,0-85,3% і 48,8-63,5%, з лініями-стандартами високої тотипотентності в культурі *in vitro* A188, Chi31 і PLS61 – на рівні відповідно 54,9%, 53,9% та 45,5%. За результатами SNP-аналізу обрані лінії можуть розглядатися як базові для клітинно- і генетично-інженерної характеристики даного типу зародкової плазми.

Клітинно-інженерні дослідження показали, що генотипи зародкової плазми Ланкастер мають специфічні якісні та кількісні характеристики калусогенного та регенераційного потенціалу, які відрізняють їх від представників інших плазм кукурудзи, що необхідно враховувати в клітинно-інженерних дослідженнях. Усередині плазми Ланкастер спостерігається значне варіювання за калусогенною здатністю. Середні рівні 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. Лінії плазми Ланкастер, стабільно за

роками продуктивні стосовно утворення калусів II типу, є нестабільними за утворенням калусів I типу.

Відзначено, що лінії A188, Chi31 та PLS61 не тільки володіють високою калусогенною та регенераційною здатністю, але і виступають як донори даних ознак в гібридах з лініями кукурудзи плазми Ланкастер. Зокрема, вони значно підвищують потенціал утворення калусної тканини I типу у гібридів F_1 (з $7,8 \pm 1,3\%$ до $45,4 \pm 5,6\%$).

Відзначено, що модифікація складу середовищ для індукції калусогенезу і регенерації призводить до варіювання залежно від генотипу інтенсивності утворення калусів і рослин-регенерантів. Сахароза в середовищі індукції калусогенезу при підвищенні концентрації з 30 до 60 г/л для ліній плазми Ланкастер і ліній-стандартів в цілому стимулює калусогенез I типу та інгібує калусогенез II типу. Цефотаксим в концентраціях 150 і 300 мг/л в середовищі індукції калусогенезу пригнічує утворення калусної тканини I типу та стимулює утворення калусної тканини II типу у ліній плазми Ланкастер.

Кількість рослин-регенерантів, отриманих на 100 калусів, у ліній плазми Ланкастер для 30-добової калусної тканини I типу знаходилася в межах 0-51,3 шт. (в середньому $24,8 \pm 5,6$ шт.). У ліній стандартів цей показник був у межах 76,9-234,1 шт. (в середньому $154,8 \pm 13,1$ шт.), а у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами – 8,3-138,5 шт. (в середньому $53,6 \pm 4,3$ шт.). Для 60-добової калусної тканини цей показник у ліній Ланкастер був у межах 0-8,0 шт. (в середньому $4,0 \pm 3,2$ шт.), у ліній-стандартів – 10,3-82,9 шт. (в середньому $41,2 \pm 6,1$ шт.), а у їхніх гібридів – 8,9-428,6 шт. (в середньому $42,4 \pm 5,1$ шт.). Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів, які вдалося отримати з 90-добової калусної тканини II типу, у ліній Ланкастер була дуже низькою (0-12,1 шт., в середньому $3,7 \pm 3,3$ шт.). У ліній-стандартів цей показник був вищий (12,0-52,8 шт., в середньому $27,7 \pm 4,6$), а у гібридів мав проміжне значення (1,7-31,8 шт., в середньому $12,3 \pm 2,5$ шт.). Тривале культивування калусної тканини II типу призвело до зниження кількості рослин-регенерантів.

Важливими для отримання рослин-регенерантів покоління R_0 є приживаність та адаптація після перенесення з умов *in vitro* у ґрунт, які суттєво покращуються за зволоження ґрунту водним розчином біогумату – продуктом переробки соняшникового лушпиння культурою черв'яків *Eisenia foetida*. Запроваджений комплекс заходів дорошування рослин-регенерантів від моменту їхнього утворення на середовищі для індукції регенерації до адаптації у ґрунті в умовах *in vivo* дозволив підвищити загальну виживаність рослин з 20,7% до 58,5%.

Генетично-інженерні дослідження показали можливість залучення генотипів кукурудзи плазми Ланкастер до робіт з генетичної трансформації. Проведено біолістичну трансформацію калусної тканини генотипів даної плазми вектором рАНС25 з чужорідними генами *uidA* та *bar*. Ген *uidA* кодує фермент β -глюкуронідазу з *Escherichia coli* і найчастіше використовується як репортерний. Ген *bar* кодує фермент фосфінотрицинацетилтрансферази з *Streptomyces hygroscopicus* і при перенесенні в геном рослин надає їм стійкості до фосфінотрицину – діючої речовини гербіциду «Баста»TM. Охарактеризовано особливості та ефективність генетичної трансформації, отримано трансгенні калуси, рослини-регенеранти покоління T_0 і потомство рослин-трансформантів поколінь T_1 - T_6 від самозапилення.

У ліній зародкової плазми Ланкастер ДК633266 і ДК267 частота транзійентної експресії гена *uidA* склала відповідно 40% і 20% з рівнем експресії в 1 бал з п'яти можливих. У гібрида з лінією Ланкастер PLS61×ДК633266 і його зворотної комбінації рівень транзійентної експресії гена *uidA* в 4-5 балів мали відповідно 78,6 і 66,6% біолістично оброблених калусів.

Відмічено, що фосфінотрицин як селективний агент в середовищах для калусогенезу та регенерації має пролонговану дію, а його вплив суттєво блокує життєдіяльність калусної тканини кукурудзи не на етапі калусогенезу, а в період регенерації рослин. Позитивний вплив генетичної трансформації

геном *bar* за стійкістю до фосфінотрицину вперше проявляється на етапі регенерації рослин.

Лінії плазми Ланкастер у гібридах з лінією PLS61 демонструють високу результативність трансформації. Так, для PLS61×ДК633266 та його зворотної комбінації частота *bar*-позитивних 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/100 калусів.

Успадкування гена *bar* від рослин T_0 , де його присутність підтверджена за ПЛР, наступними поколіннями T_1 - T_2 підтверджено молекулярно-генетичним аналізом. Ген *bar* в поколінні T_2 було виявлено за ПЛР як після селекції на гербіцидному фоні, так і в рослинах, які вирощувалися без впливу селективного фактора. В пізніх поколіннях від самозапилення зафіксовано зростання виживаності рослин після обробки гербіцидом до 100%.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено порівняння різних типів зародкової плазми кукурудзи за маркерами одонуклеотидного 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_1 за їхньою участю. На прикладі плазми Ланкастер показано можливість підвищення тотипотентності слабкочутливих комерційних плазм за використання їх 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 біоістики 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»TM. Розроблено ефективну генно-інженерну стратегію для комерційних плазм на базі генетичної трансформації гібридів F₁ між перспективними у селекційному відношенні лініями певної плазми та високотипотентними модельними лініями з наступними відборами на селективному фоні та інбридингом.

На прикладі плазми Ланкастер вперше складено комплексну біотехнологічну характеристику типу зародкової плазми – внутрішньовидової категорії культурних рослин, що об'єднує філогенетично споріднені генотипи.

Практичне значення одержаних результатів. Складені SNP-паспорти ліній кукурудзи плазми Ланкастер та інших плазм мають важливе значення для ідентифікації ліній та у захисті авторських прав. Методичні принципи маркування приналежності ліній кукурудзи до плазми Ланкастер за зміною співвідношення частот алелів SNP-маркерів рекомендовано використовувати у розподілі селекційного генофонду кукурудзи по типах 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 F₁.

Ідентифіковано лінії кукурудзи плазми Ланкастер, стабільні за здатністю до калусогенезу та регенерації незалежно від варіювання умов оточуючого

середовища. Виділено генотипи кукурудзи, які можуть слугувати донорами високої здатності для індукції калусогенезу та регенерації у біотехнологічних дослідженнях з клітинної селекції, генно-інженерних технологіях. Запропоновано до використання в біотехнологічному та селекційному процесі гібриди за участю ліній даної плазми з підвищеною здатністю до утворення калусів різних типів та регенерації рослин. Рослини-регенеранти передано для використання в селекції як вихідний матеріал.

Отримано вісім нових інбредних трансгенних ліній кукурудзи на основі вітчизняних генотипів плазми Ланкастер, стійких до діючої речовини гербіциду «Баста»TM 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 ліній 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».

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

Список публікацій:

1. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Морфогенез *in vitro* у ліній кукурудзи гетерозисної групи Ланкастер. *Цитология и генетика*. 2017. Т. 51, № 1. С. 61-68.
2. 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. Т.20. С. 58-63.

3. **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. Vol. 8, № 3. P. 343–348.

4. **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. Vol. 91. P. 1–6.

5. **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. Т. 15, № 1. С. 32–39.

6. **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, № 2. С.253-257.

7. **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.

8. **Деркач К. В.** Динаміка калусогенезу в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина*. 2012. Т. 1, Вип. 3. С. 24-28.

9. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Калусогенний потенціал ліній кукурудзи групи Ланкастер в умовах *in vitro*. *Вісник Дніпропетровського національного університету. Серія Біологія. Екологія*. 2011. Т. 1. Вип. 19. С. 16-21.

10. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Черчель В. Ю., Дзюбецький Б. В., Моргун Б. В., Нітовська І. О., Сатарова Т. М. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи. *Зернові культури*. 2017. № 2. С.232–241.

11. **Derkach K. V.**, Abraimova O. E., Satarova T. M. Viability of maize *in vitro* regenerated plants hybrids in soil under artificial climate. *Bulletin Institute of Agriculture of Steppe Zone NAAS of Ukraine*. 2016. № 10. P. 36–40.

12. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Вплив фізіологічно активних речовин на збереження морфогенності калусів кукурудзи за тривалого культивування *in vitro*. *Зрошуване землеробство: міжвід. тем. наук. зб.* 2013. Вип.60. С. 89–92.

13. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Черноусова Н.М., Сметанін В. Т., Сатарова Т. М. Оптимізація регенераційного потенціалу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*. 2012. Т. 4. С. 465 – 470.

14. **Derkach K. V.**, Abraimova O. E., Satarova T. M. Dynamics of callusogenesis in Lancaster inbred lines. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2012. Vol. 85. P. 12-14.

15. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.** Використання калусних тканин кукурудзи у селекції *in vitro* на стійкість до абіотичних факторів. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2012. № 3. С. 16–19.

16. Сатарова Т. М., **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є. Оцінка реципрокного ефекту в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Бюлетень Інституту зернового господарства*. 2011. № 40. С. 20–24.

17. Спосіб адаптації рослин-регенерантів кукурудзи у ґрунті: пат. 73966 Україна: А01Н 4/00 / **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Гармаш С. М., Сатарова Т. М.; заявл. 23.12.10; опубл. 10.10.12, Бюл. № 19.

18. Спосіб експлантації незрілих зародків кукурудзи *in vitro*: пат. 58347 Україна: А01Н 4/00 / О. Є. Абраїмова, Г. Р. Піралов, **К. В. Деркач**, Т. М. Сатарова; заявл. 20.09.10; опубл. 11.04.11, Бюл. № 7.

19. Свідоцтво № 150421. ДН Корунд, кукурудза звичайна – *Zea mays* L., Заявка № 12004133, Автор(и): Дзюбецький Б. В., Ільченко Л. А., Рябченко Е. М., Гайдаш О. Л., Федоренко Е. М., Черчель В. Ю.,

Боденко Н. А., Федько М. М., **Деркач К. В.**, 2014 р. Київ: Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України, 2015. 367 с.

20. **Деркач К. В.**, Сатарова В. В., Борисова В. В. Алельний стан SNP-маркерів ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер (методичні рекомендації). Дніпро, 2017. С. 1–8.

21. **Деркач К. В.**, Сатарова В. В., Борисова В. В. SNP-паспорти ліній та гібридів кукурудзи (в електронному вигляді). Дніпро, 2017. С. 1–4.

22. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Біотехнологія рослин та тварин» для студентів напряму «Біотехнологія» усіх форм навчання / укл.: В. Т. Сметанін, Т. М. Сатарова, О. Є. Абраїмова, **К. В. Деркач**, Г. І. Сировнєв, А. А. Гейсун. Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. 28 с.

23. **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: НАУ, 2017. С. 38.

24. **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М., Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю. Оцінка гетерозиготності гібридів кукурудзи та їх вихідних ліній за результатами SNP-аналізу. *Наукове забезпечення інноваційного розвитку агропромислового комплексу в умовах змін клімату: Міжнародна наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів* (Дніпро, 25–26 трав. 2017 р.). Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. С. 30-31.

25. **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: СГІ – НЦНС, 2017. С. 41-42.

26. **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.

27. **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: I. I. Mechnikov National University, 2016. P. 12.

28. **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 group. *58th Annual Maize Genetics Conference* (March 17-20 2016). Hyatt Regency, Jacksonville, Florida, 2016. P. 156.

29. **Abraimova O. E.**, Satarova T. M., Morgun B. V., Nitovska I. O., Derkach K. V., Cherenkov A. V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. *57th Annual Maize Genetics Conference* (March 12-15 2015). Pheasant Run, St. Charles, Illinois, USA, 2015. P. 140.

30. Satarova T. N., **Derkach E. V.**, Abraimova O. E., Dzubetskij B. V., Cherchel V. Yu., Goncharov Yu. A. Types of morphogenesis in callus tissue of Lancaster maize group. *56th Annual Maize Genetics Conference* (March 13-16 2014). Beijing, China, 2014. P. 131.

31. 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: ВЦ НУБіП, 2014. С. 70–71.

32. **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: Астропринт, 2014. С. 74–76.

33. Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Застосування фітогормонів в культурі *in vitro* у кукурудзи. *Фітогормони, гумінові речовини*

та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища: матеріали доповідей IX Міжнародної конф. «daRostim 2013 (Львів, 7–10 жовт. 2013 р.). Львів, 2013. С. 6.

34. Гармаш С. М., Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Розробка біотехнологічних заходів регуляції росту та розвитку сільськогосподарських культур. *Новітні досягнення біотехнології: тези доповідей II Міжнародної наук.-практ. конф.* (Київ, 24–25 жовт. 2013 р.). Київ: НАУ, 2013. С. 35–36.

35. **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.

36. **Деркач Е. В.**, Абраїмова О. Е., Сатарова Т. Н. Регенерационный потенциал гибридов кукурузы с участием линий А188, PLS61 и Chi31. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей IV Міжнародної наук.-техніч. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених.* (Дніпропетровськ, 24–26 квіт. 2013 р.). Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2013. С. 41.

37. Гармаш С. М., Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Вплив біогумату на адаптацію рослин у ґрунті після культивування *in vitro*. *Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє: тези доповідей VIII Міжнародної наук.-практ. конф.* (Київ, 19-22 лист. 2012 р.). Київ, 2012. С. 86–87.

38. **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Біотехнологічна характеристика калусогенезу реципрокних гібридів кукурудзи. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей V Міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених* (Дніпропетровськ, 20–22 квітня 2011 р.). Дніпропетровськ, 2011. С. 473.

39. Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Олійник Т. О., Сатарова Т. М. Проліферація калусної тканини кукурудзи під дією гербіцидного навантаження. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей V Міжнародної*

наук.-техніч. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених (Дніпропетровськ 20–22 квіт. 2011 р.). Дніпропетровськ, 2011. С. 458.

40. 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.

41. **Derkach K. V.**, Satarova T. M., Abraimova O. E. Influence of sucrose on *in vitro* callusogenesis of Lancaster inbred lines. *53rd Annual Maize Genetics Conference*, 17 – 20 March 2011. Pheasant Run, St.Charles, Illinois, 2011. P. 103.

42. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.** Біотехнологія отримання морфогенних калусів та регенованих рослин для генетично різнорідних форм кукурудзи. *Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин: збірник праць наук.-практ. конф.* Одеса: Астропринт, 2016. С. 132–138.

43. Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Черчель В. Ю., Сатарова Т. М. Характеристика соматоклональних варіантів кукурудзи. *Стан і перспективи розвитку селекції та насінництва кукурудзи в умовах зміни клімату: матеріали Міжнародної наук.-практ. конф.* (Харків, 7–9 лип. 2015 р.). Харків : Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, 2015. С. 10–12.

SUMMARY

Derkach K. V. Biotechnological characteristics of maize Lancaster germplasm genotypes. – Qualification scientific work (Manuscript).

Thesis for a degree of the Candidate of Biological Sciences (Ph.D) in specialty 03.00.20 – Biotechnology (091 – Biology).

The study has been performed at Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Dnipro.

Defence of the thesis is to be held at the meeting of specialized academic council K 26.202.01 at the Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

A biotechnological description of maize Lancaster germplasm genotypes according to the results of molecular genetic, cell engineering and genetic engineering studies was characterized in the thesis.

The molecular genetic features of maize Lancaster germplasm inbreds were analyzed on the basis of the SNP-genotyping of 91 inbreds, among which 29 modern inbreds, which in pedigree refer to the Lancaster germplasm, and 60 inbreds of other types of germplasm. SNP-genotyping was carried out for BDI-III panel. It was shown that the results of the principle component analysis, the analysis of the genetic structure of the inbreds by the program Structure, the qualitative cluster analysis by the method of full connection and dispersion analysis were coincided and confirmed the presence of a separate group of inbreds among the analyzed data array, which in pedigree refer to Lancaster germplasm. A specific set of Lancaster germplasm alleles, determined by the frequencies of the major alleles of the ten *top*-SNP markers in comparison with the group of other types of germplasm inbreds, was defined as BDI-III-332G, BDI-III-151A, BDI-III-256A, BDI III-331T, BDI-III-335C, BDI-III-185C, BDI-III-343A, BDI-III-181C, BDI-III-288A and BDI-III-190A.

The average value of the size of the genetic SNP distances between Lancaster inbreds (0.3377 ± 0.0099) indicated a significant genetic diversity within this germplasm for the allelic state of single nucleotide polymorphism markers. 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. The relationship between modern Lancaster germplasm inbreds and typical representatives of this germplasm, based on SNP-genotyping results, was ranged from 52.2-89.7% for Mo17 and 48.2-66.8% for Oh43.

According to the results of SNP-genotyping, maize inbreds ДК633, ДК267, ДК212, ДК6080, ДК633266, ДК298, ДК3070, ДК236 and ДК633325, having been selected as representatives of Lancaster germplasm for further biotechnological studies *in vitro*, are belonged to both subplasms of this germplasm. They have the relationships with the typical representatives of this germplasm Mo17 and Oh43 at the levels of 54.0-85.3% and 48.8-63.5%, respectively, and with inbreds-standards A188, Chi31 and PLS61 with the high totipotentiality *in vitro* at the levels of 54.9%, 53.9% and 45.5%, respectively. According to SNP analysis, selected lines can be considered as basic for cell and genetically engineering characteristics of this germplasm.

Cell engineering investigations were shown 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 into account in cell engineering studies. A significant variation of ability to callusogenesis within Lancaster was observed. Average levels of the general frequency of callusogenesis, the frequency of morphogenic callus formation, in particular, of I and II types, proportionately increased in investigated subplasms and groups in the direction of *Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43*, simultaneously with the cumulation of unrelated genetic material. Lancaster germplasm inbreds, which are stable and productive over the years for the II type callus formation, are unstable for the I type callus formation.

It is noted that inbreds A188, Chi31 and PLS61 not only have high ability to callusogenesis and regeneration, but also act as donors of these characteristics in

hybrids between them and maize Lancaster inbreds. In particular, they significantly increase the potential of the I type callus formation in F_1 hybrids (from $7.8 \pm 1.3\%$ to $45.4 \pm 5.6\%$).

It is noted that the modification of the media for induction of callusogenesis and regeneration led to variability of the parameters of callusogenesis and regeneration depending on genotype. Increasing the concentration of sucrose in the medium for callus induction from 30 to 60 g/L generally stimulated for Lancaster inbreds and inbreds-standards callusogenesis of I type and inhibits it of II type. Cefotaxime at 150 and 300 mg/L in the medium for induction of callusogenesis suppressed I type callus formation and stimulated II type callus formation for Lancaster inbreds.

The number of plant regenerants produced per 100 calli for maize Lancaster inbreds for 30-days I type callus tissue was within the range of 0-51.3 pcs. (on average 24.8 ± 5.6 pcs.). For the inbreds-standards it was within the range 76.9-234.1 pcs. (on average 154.8 ± 13.1 pcs), but in hybrids between Lancaster inbreds and inbreds-standards it was within the range of 8,3-138,5 pcs. (on average 53.6 ± 4.3 pcs.). For 60-days callus tissue of Lancaster inbreds this value was within the range of 0-8.0 pcs. (on average 4.0 ± 3.2 pcs), for the inbreds-standards – 10,3-82,9 pcs. (on average 41.2 ± 6.1 pcs), but for their hybrids – 8.9-428.6 pcs. (on average 42.4 ± 5.1 pcs.). The number of regenerants per 100 calli that had been obtained from 90-days II type calli of Lancaster inbreds was very low (0-12.1 pcs., on average 3.7 ± 3.3 pcs.). This value for the inbreds-standards was somewhat higher (12,0-52,8 pcs, on average 27.7 ± 4.6 pcs), but for hybrids it had an intermediate value (1,7-31,8 pcs, on average 12.3 ± 2.5 pcs.). Long cultivation of II type callus tissue has led to a decrease in the number of regenerated plants.

Survival and adaptation after transfer from *in vitro* to soil conditions are important for regenerated plants of the R_0 generation. They were significantly improved under soil moisture with water solution biohumate – the product of sunflower husk processing with the culture of worms *Eisenia foetida*. The implemented measures for upgrowing of regenerated plants from the moment of

their formation on the medium for induction of regeneration up to adaptation in soil under *in vivo* conditions allowed to increase the overall survival of plants from 20,7% to 58,5%.

Genetic engineering studies have shown the potential of the incorporation of Lancaster genotypes to genetic transformation. The biolistic transformation of callus tissues of such genotypes by plasmid vector pAHC25 with foreign genes *uidA* and *bar* was carried out. Gene *uidA* encoding the enzyme β -glucuronidase from *Escherichia coli* and is most often used as a marker gene. Gene *bar* encoding the enzyme phosphinothricinacetyltransferase from *Streptomyces hygroscopicus* and, when transferred to the plant genome, gives them resistance to phosphinitricin, the active ingredient of the herbicide Basta,. Features and efficiency of genetic transformation were characterized. Transgenic calli, regenerated plants of T₀ generation and progeny of transformant plants of T₁-T₆ generations of self-pollination were obtained.

The transient expression rate of *uidA* gene was 40% and 20% respectively for the Lancaster germplasm inbreds ДК633266 and ДК267 with an expression level of 1 point out of 5 possible. The *uidA* gene transient expression level at 4-5 points had respectively 78.6 and 66.6% biolistically treated callus in the hybrids with Lancaster inbred PLS61×ДК633266 and its inverse combination.

It has been noted that phosphinothricin as a selective agent of the media for callusogenesis and regeneration has a prolonged influence, and its effect significantly inhibits 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 *bar* gene on resistance to phosphinothricin is first manifested at the stage of plant regeneration.

Lancaster germplasm inbreds showed high values of the transformation frequency in hybrids with PLS61: the frequency of *bar*-positive calli reached 100% for PLS61×ДК633266 and its reciprocal combination, the frequency of phosphinothricin-resistant calli was $87.2 \pm 3.6\%$ for ДК267×PLS61, and the

frequency of phosphinothricin-resistant regenerated plants T_0 was 52.5 ± 5.4 plants/100 calli.

The inheritance of *bar* gene from plants T_0 , where its presence was confirmed through PCR, to the subsequent generations T_{1-2} was confirmed by molecular genetic analysis. The *bar* gene in T_2 generation was detected by PCR both after selection on the herbicide background and in plants grown without the influence of the selective factor. The increase of the survival of plants after treatment with a herbicide up to 100% was fixed in later generations of self-pollination.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time a comparison of different types of maize germplasm via single nucleotide polymorphism markers of DNA was carried out and a set of SNP-markers was identified, which is typical for Lancaster germplasm. The conception about DNA interspecific polymorphism and the relationship of maize genotypes was deepened. The further foundation for the application of modern wide-genome analysis for intra-species classification and clusterization of phylogenetically related groups of genotypes of crops was obtained.

For the first time the ability to callusogenesis and regeneration in 10 maize Lancaster germplasm inbreds and 53 F_1 hybrids with their participation was investigated. The example of Lancaster shows possibility of increasing the totipotency of weakly responsive commercial germplasms through their use as components of hybrids with model inbreds of other germplasms with high callusogenic and regenerative potentials. The complex of conditions of cultivation *in vitro* of maize genotypes was optimized, biotechnological schemes of induction of callusogenesis, subcultivation of callus tissue and plant regeneration was developed taking into account the requirements of modern Lancaster inbreds.

For the first time in Ukraine a genetic transformation of native maize genotypes by biolistical method using foreign *uidA* and *bar* genes with obtaining the five generations of self-pollinated transformed plants was carried out. The example of Lancaster germplasm shows for the first time in Ukraine the production of maize transgenic inbreds resistant to herbicide Basta. An effective genetic

engineering strategy for commercial germplasms based on the transformation of F_1 hybrids between perspective inbreds of a certain germplasm and high-totipotencitive model inbreds with subsequent screening on the selective phone and inbreeding was developed.

The example of Lancaster germplasm for the first time to compile a complex biotechnological characteristic of the type of germplasm an intraspecific category of cultivated plants that combines phylogenetically related genotypes.

The practical significance of the results. Compiled SNP certificates of maize Lancaster and of other germplasms inbreds are essential for genotype identification and copyright protection. Methodological principles of marking the affiliation of maize inbreds to Lancaster germplasm by changing the ratio of the alleles frequencies of SNP-markers are recommended to be used in the distribution of the maize genotypes pool into types of germplasm. The genetic structure of maize inbreds, based on the analysis of single nucleotide polymorphism, the results of their clusterization and calculated pairwise SNP-distances are of interest in the breeding process at the stage of formation of initial populations for inbreeding, as well as for the development of heterosis models and prediction of heterosis level in the determination of parent components of F_1 hybrids.

Maize Lancaster germplasm inbreds was identified which were stable for callusogenesis and regeneration ability regardless of the variation of environmental conditions. Maize genotypes those can serve as donors of high-ability for callusogenesis and regeneration in biotechnological researches on cell selection and genetic engineering technologies were identified. Hybrids with the participation of inbreds of this germplasm with the increased ability to form various types of calli and plant regeneration were proposed for biotechnological and breeding processes. Regenerated plants were passed for breeding as initial material.

Eight new domestic transgenic maize inbreds within Lancaster germplasm resistant to active ingredient of Basta herbicide, phosphinothricin, were obtained. These lines are recommended for breeding process as parental forms of

phosphinothricin-resistant hybrids, as well as *bar* gene donors for expansion among the Lancaster germplasm inbreds and other germplasms by crossing.

Maize hybrid Corund was created in co-authorship and registered in the State Register of Varieties of Plants, suitable for distribution in Ukraine, according to the results of SNP-analysis. The materials of the thesis are involved into the educational process in module «Biotechnology of plants» for students of the direction «Biotechnology».

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

Publications:

1. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Морфогенез *in vitro* у ліній кукурудзи гетерозисної групи Ланкастер. *Цитология и генетика*. 2017. Т. 51, № 1. С. 61-68.

2. **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. Т.20. С. 58-63.

3. **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. Vol. 8, № 3. P. 343–348.

4. **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. Vol. 91. P. 1–6.

5. **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. Т. 15, № 1. С. 32–39.

6. **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, № 2. С.253-257.

7. **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.

8. **Деркач К. В.** Динаміка калусогенезу в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина*. 2012. Т. 1, Вип. 3. С. 24-28.

9. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Калусогенний потенціал ліній кукурудзи групи Ланкастер в умовах *in vitro*. *Вісник Дніпропетровського національного університету. Серія Біологія. Екологія*. 2011. Т. 1. Вип. 19. С. 16-21.

10. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Черчель В. Ю., Дзюбецький Б. В., Моргун Б. В., Нітовська І. О., Сатарова Т. М. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи. *Зернові культури*. 2017. № 2. С.232–241.

11. **Derkach K. V.**, Abraimova O. E., Satarova T. M. Viability of maize *in vitro* regenerated plants hybrids in soil under artificial climate. *Bulletin Institute of Agriculture of Steppe Zone NAAS of Ukraine*. 2016. № 10. P. 36–40.

12. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Вплив фізіологічно активних речовин на збереження морфогенності калусів кукурудзи за тривалого культивування *in vitro*. *Зрошуване землеробство: міжвід. тем. наук. зб.* 2013. Вип.60. С. 89–92.

13. **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Черноусова Н.М., Сметанін В. Т., Сатарова Т. М. Оптимізація регенераційного потенціалу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*. 2012. Т. 4. С. 465 – 470.

14. **Derkach K. V.**, Abraimova O. E., Satarova T. M. Dynamics of callusogenesis in Lancaster inbred lines. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2012. Vol. 85. P. 12-14.

15. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.** Використання калусних тканин кукурудзи у селекції *in vitro* на стійкість до абіотичних факторів. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2012. № 3. С. 16–19.

16. Сатарова Т. М., **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є. Оцінка реципрокного ефекту в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Бюлетень Інституту зернового господарства*. 2011. № 40. С. 20–24.

17. Спосіб адаптації рослин-регенерантів кукурудзи у ґрунті: пат. 73966 Україна: А01Н 4/00 / **Деркач К. В.**, Абраїмова О. Є., Гармаш С. М., Сатарова Т. М.; заявл. 23.12.10; опубл. 10.10.12, Бюл. № 19.

18. Спосіб експлантації незрілих зародків кукурудзи *in vitro*: пат. 58347 Україна: А01Н 4/00 / О. Є. Абраїмова, Г. Р. Піралов, **К. В. Деркач**, Т. М. Сатарова; заявл. 20.09.10; опубл. 11.04.11, Бюл. № 7.

19. Свідоцтво № 150421. ДН Корунд, кукурудза звичайна – *Zea mays* L., Заявка № 12004133, Автор(и): Дзюбецький Б. В., Ільченко Л. А., Рябченко Е. М., Гайдаш О. Л., Федоренко Е. М., Черчель В. Ю., Боденко Н. А., Федько М. М., **Деркач К. В.**, 2014 р. Київ: Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України, 2015. 367 с.

20. **Деркач К. В.**, Сатарова В. В., Борисова В. В. Алельний стан SNP-маркерів ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер (методичні рекомендації). Дніпро, 2017. С. 1–8.

21. **Деркач К. В.**, Сатарова В. В., Борисова В. В. SNP-паспорти ліній та гібридів кукурудзи (в електронному вигляді). Дніпро, 2017. С. 1–4.

22. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Біотехнологія рослин та тварин» для студентів напряму «Біотехнологія» усіх форм навчання / укл.: В. Т. Сметанін, Т. М. Сатарова, О. Є. Абраїмова, **К. В. Деркач**, Г. І. Сировнєв, А. А. Гейсун. Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. 28 с.

23. **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: НАУ, 2017. С. 38.

24. **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М., Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю. Оцінка гетерозиготності гібридів кукурудзи та їх вихідних ліній за результатами SNP-аналізу. *Наукове забезпечення інноваційного розвитку агропромислового комплексу в умовах змін клімату: Міжнародна наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів (Дніпро, 25–26 трав. 2017 р.). Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. С. 30-31.*

25. **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: СГІ – НЦНС, 2017. С. 41-42.*

26. **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.*

27. **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: I. I. Mechnikov National University, 2016. P. 12.

28. **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 group. *58th Annual Maize Genetics Conference (March 17-20 2016).* Hyatt Regency, Jacksonville, Florida, 2016. P. 156.

29. **Abraimova O. E.**, Satarova T. M., Morgun B. V., Nitovska I. O., Derkach K. V., Cherenkov A. V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. *57th Annual Maize Genetics Conference (March 12-15 2015).* Pheasant Run, St. Charles, Illinois, USA, 2015. P. 140.

30. Satarova T. N., **Derkach E. V.**, Abraimova O. E., Dzubetskij B. V., Cherchel V. Yu., Goncharov Yu. A. Types of morphogenesis in callus tissue of Lancaster maize group. *56th Annual Maize Genetics Conference* (March 13-16 2014). Beijing, China, 2014. P. 131.

31. 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: ВЦ НУБіП, 2014. С. 70–71.

32. **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: Астропринт, 2014. С. 74–76.

33. Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Застосування фітогормонів в культурі *in vitro* у кукурудзи. *Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища: матеріали доповідей IX Міжнародної конф. «daRostim 2013* (Львів, 7–10 жовт. 2013 р.). Львів, 2013. С. 6.

34. Гармаш С. М., Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Розробка біотехнологічних заходів регуляції росту та розвитку сільськогосподарських культур. *Новітні досягнення біотехнології: тези доповідей II Міжнародної наук.-практ. конф.* (Київ, 24–25 жовт. 2013 р.). Київ: НАУ, 2013. С. 35–36.

35. **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.

36. **Деркач Е. В.**, Абраимова О. Е., Сатарова Т. Н. Регенерационный потенциал гибридов кукурузы с участием линий A188, PLS61 и Chi31. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей IV Міжнародної наук.-техніч. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених.* (Дніпропетровськ, 24–26 квіт. 2013 р.). Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2013. С. 41.

37. Гармаш С. М., Абраимова О. Є., **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Вплив біогумату на адаптацію рослин у ґрунті після культивування *in vitro*. *Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє: тези доповідей VIII Міжнародної наук.-практ. конф.* (Київ, 19-22 лист. 2012 р.). Київ, 2012. С. 86–87.

38. **Деркач К. В.**, Сатарова Т. М. Біотехнологічна характеристика калусогенезу реципрокних гібридів кукурудзи. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей V Міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених* (Дніпропетровськ, 20–22 квітня 2011 р.). Дніпропетровськ, 2011. С. 473.

39. Абраимова О. Є., **Деркач К. В.**, Олійник Т. О., Сатарова Т. М. Проліферація калусної тканини кукурудзи під дією гербіцидного навантаження. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей V Міжнародної наук.-техніч. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених* (Дніпропетровськ 20–22 квіт. 2011 р.). Дніпропетровськ, 2011. С. 458.

40. Абраимова 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.* (Киев, 30 мая–1 июня 2011 г.). Киев, 2011. С. 12.

41. **Derkach K. V.**, Satarova T. M., Abraimova O. E. Influence of sucrose on *in vitro* callusogenesis of Lancaster inbred lines. *53rd Annual Maize Genetics Conference*, 17 – 20 March 2011. Pheasant Run, St.Charles, Illinois, 2011. P. 103.

42. Сатарова Т. М., Абраимова О. Є., **Деркач К. В.** Біотехнологія отримання морфогенних калусів та регенерованих рослин для генетично різномірних форм кукурудзи. *Сільськогосподарська біотехнологія:*

теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин: збірник праць наук.-практ. конф. Одеса: Астропринт, 2016. С. 132–138.

43. Абраїмова О. Є., **Деркач К. В.**, Черчель В. Ю., Сатарова Т. М. Характеристика соматоклональних варіантів кукурудзи. *Стан і перспективи розвитку селекції та насінництва кукурудзи в умовах зміни клімату: матеріали Міжнародної наук.-практ. конф. (Харків, 7–9 лип. 2015 р.)*. Харків : Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, 2015. С. 10–12.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	31
ВСТУП.....	32
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	40
1.1. Актуальність та проблеми біотехнологічних характеристик культурних рослин	40
1.2. Генофонд кукурудзи та його типізація	42
1.3. Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи	47
1.3.1. Використання молекулярно-генетичних маркерів для дослідження поліморфізму геному кукурудзи	47
1.3.2. Тотипотентність та здатність до регенерації рослин у кукурудзи <i>in vitro</i>	52
1.3.3. Результати і перспективи генетично-інженерних досліджень кукурудзи	61
1.4. Висновки до розділу 1	65
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	68
2.1. Загальна схема та організація дослідження	68
2.2. Матеріал дослідження	71
2.3. Методика дослідження	75
РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР ЗА SNP-МАРКЕРАМИ	85
3.1. Генотипування ліній кукурудзи за SNP-маркерами	85
3.2 Групування та кластеризація ліній кукурудзи за результатами SNP-аналізу	87
3.3. Алельний стан SNP-маркерів, характерний для ліній кукурудзи плазми Ланкастер	97

3.4. Оцінка варіювання та спорідненості ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за SNP-маркерами	102
3.5. SNP-характеристика ліній кукурудзи плазми Ланкастер, обраних для досліджень в культурі <i>in vitro</i>	108
3.6. Обговорення	113
3.7. Висновки до розділу 3	123
РОЗДІЛ 4. КЛІТИННО-ІНЖЕНЕРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР У КУКУРУДЗИ	
4.1. Калусогенез в культурі <i>in vitro</i> у генотипів зародкової плазми Ланкастер	126
4.1.1. Генотипові особливості індукції калусогенезу та суб-культивування у ліній та гібридів кукурудзи плазми Ланкастер ...	127
4.1.2. Варіювання показників калусогенезу у представників плази Ланкастер за зміни складу живильних середовищ	136
4.2. Регенерація рослин в культурі <i>in vitro</i> у генотипів зародкової плазми Ланкастер	142
4.2.1. Регенерація рослин плазми Ланкастер в умовах <i>in vitro</i> на середовищах для індукції регенерації	143
4.2.2 Оптимізація виживаності рослин-регенерантів у генотипів кукурудзи плазми Ланкастер у ґрунті	153
4.3. Обговорення	157
4.4. Висновки до розділу 4	162
РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНО-ІНЖЕНЕРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР У КУКУРУДЗИ	
5.1. Результати біолістичної трансформації на етапі культури <i>in vitro</i>	167
5.2. Результати вирощування та тестування рослин-трансформантів в поколіннях T ₀ -T ₆	179
5.2.1. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів в поколіннях T ₂ -T ₃	179

5.2.2. Молекулярно-генетичний аналіз рослин-трансформантів в поколіннях T ₀ -T ₂	187
5.3.Обговорення	195
5.4. Висновки до розділу 5	201
ВИСНОВКИ	204
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	207
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	209
ДОДАТКИ	254
ДОДАТОК А. ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ ДО РОЗДІЛУ 2	255
ДОДАТОК Б. ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ ДО РОЗДІЛУ 3	262
ДОДАТОК В. ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ ДО РОЗДІЛУ 4	288
ДОДАТОК Г. ДОДАТКОВІ МАТЕРІАЛИ ДО РОЗДІЛУ 5	303
ДОДАТОК Д. ДОВІДКИ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ	310

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

2,4-Д – дихлорфеноксиоцтова кислота;

А – аденін;

Г – гуанін;

Т – тимін;

Ц – цитозин;

АБК – абсцизова кислота;

БАП – 6-бензиламінопурин;

ДУ ІЗК НААН – Державна установа Інститут зернових культур
Національної академії аграрних наук;

ІМК – індолилмасляна кислота;

п.н. – пар нуклеотидів;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

Цт – цефотаксим;

BDI-III – панель SNP-маркерів;

К – тисяча;

kb – кілобаза (1×10^3 основ);

L – зародкова плазма Ланкастер;

MAF – частота міnorного алеля;

MAS – маркер-асоційована селекція;

NL – будь-яка неланкастерівська плазма;

PCA – принциповий компонентний аналіз (Principal Component Analysis,
метод головних компонент);

PIC – індекс інформативності молекулярного маркера за обсягом
генетичного поліморфізму, що виявляється;

SNP – одонуклеотидний поліморфізм;

SNPs – одонуклеотидні заміни;

SSR – дисперговані послідовності 2-8 п.н., що тандемно повторюються.

ВСТУП

Актуальність теми. Генотип рослин визначає будь-які властивості сучасних біотехнологічних і селекційних продуктів та лімітує успіх їхнього використання в різноманітних галузях біотехнології та сільського господарства. На сьогоднішній день нараховується безліч генотипів культурних рослин, для яких молекулярно-генетична характеристика та упорядкування залежно від генетичної спорідненості, а також аналіз клітинно- і генетично-інженерного потенціалу є актуальним завданням.

Кукурудза (*Zea mays* L.) як одна з найбільш продуктивних і цінних за біологічними властивостями сільськогосподарських культур [106, 141, 223] не тільки характеризується значним різноманіттям цінних генотипів [143], а і широко застосовується як модельний об'єкт у біологічних та біотехнологічних дослідженнях [123]. Генотипи кукурудзи як ємного монотипного культурного роду потребують детальної внутрішньовидової класифікації. Однак, у даний час поділ генотипів кукурудзи на підвиди орієнтується лише на прояв фенотипової ознаки будови зернівки, а класифікація за групами адаптації або гетерозисними групами не виключає залежність результатів від дії факторів зовнішнього середовища.

Разом з тим, внутрішньовидова класифікація культурного виду *Z. mays* покликана бути філогенетичною, ґрунтуватися на спільному походженні генотипів. Філогенетично спорідненими групами генотипів у кукурудзи є типи зародкової плазми [251, 351]. Сучасна селекція кукурудзи базується на використанні декількох основних типів зародкової плазми: Айодент, Міндзенпуста, Рейд (BSSS), Лакон, Ланкастер та деяких інших, які добре комбінуються в схрещуваннях [139, 351]. Селекційні якості основних типів зародкової плазми кукурудзи є добре вивченими за фенотипом, зокрема за фенологічними ознаками, рівнем гетерозису в схрещуваннях тощо [132, 144]. Разом з тим, цілісній біотехнологічній характеристиці основних типів зародкової плазми не надавалася увага дослідників.

Віднесення того чи іншого генотипу до певної зародкової плазми відбувається, як правило, за родоводом. Але дані родоводів (педігрі) сучасних ліній, гібридів, сортів є недосконалими, ним часто притаманні суб'єктивність, пропуски і втраченість записів, міксування неспоріднених генотипів в генотипі нащадка. Використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів розглядається як потенційно ефективний інструмент внутрішньовидової класифікації та систематизації генофонду культурних рослин, який враховує спорідненість та варіювання на рівні геномів, на відміну від методів, що базуються на порівнянні за фенотиповими ознаками [26, 129, 256, 297]. Залучення молекулярно-генетичних методів широкогеномного аналізу для оцінки, паспортизації та ідентифікації генетичного матеріалу кукурудзи є актуальним. Одним з таких методів є використання маркерів одонуклеотидного поліморфізму, які дозволяють визначати приналежність ліній кукурудзи до того чи іншого типу зародкової плазми, спорідненість ліній та генетичні дистанції між ними, що є важливим також в гетерозисній селекції і при паспортизації та визначенні авторських прав на сорти рослин.

Клітинно-інженерні біотехнологічні 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, генно-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 [177, 240, 295 та ін.]. Більшість біотехнологічних досліджень ведуться на модельних генотипах кукурудзи [38, 115, 122, 148], тоді як сучасні селекційно перспективні генотипи через слабку тотипотентність комерційних зародкових плазм лишаються поза увагою дослідників. Вивчення внутрішнього клітинно-інженерного потенціалу сучасних зародкових плазм кукурудзи не проводилися.

Надактуальними для України є дослідження з генетичної модифікації вітчизняних генотипів основних видів сільськогосподарських культур. Ефективність генетичної трансформації залежить від компетентності генотипу рослини, який трансформується [263, 277, 372, 381]. Розробка єдиної методики трансформації для таких культур як кукурудза є неможливою через тиск генотипових особливостей вихідних генотипів та їхніх споріднених груп. 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.

Зародкова плазма кукурудзи Ланкастер є найперспективнішою для вирощування у північній зоні Степу України. Вона характеризується значною продуктивністю, ранньостиглістю, посухо- та жаростійкістю, високою комбінаційною здатністю, інтенсивним стартовим ростом, толерантністю до хвороб [36, 37, 69], проте не залучена до широких біотехнологічних досліджень.

Таким чином, комплексна біотехнологічна характеристика філогенетично споріднених груп генотипів культурних рослин, зокрема основних типів зародкової плазми кукурудзи, є актуальною і практично значимою. Важливими складовими такої характеристики є широкогеномний аналіз за молекулярно-генетичними маркерами, а також дослідження клітинно- та генетично-інженерного потенціалу кожного типу зародкової плазми кукурудзи, зокрема перспективної для України зародкової плазми Ланкастер.

Зв'язок роботи з іншими 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 F₁ 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»™. Розроблено ефективну генетично-інженерну стратегію для комерційних плазм на базі генетичної трансформації гібридів F_1 між перспективними у селекційному відношенні лініями певної плазми та високотипотентними модельними лініями з наступними відборами на селективному фоні та інбридингом.

Практичне значення одержаних результатів. 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_1 .

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»TM 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. Результати досліджень доповідалися на 53rd-58th Annual Maize Genetics Conferences (USA, 2011-2013, 2015, 2016, China, 2014), X Міжнародній конференції «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013), Міжнародній науковій конференції «Современные аспекты генетической инженерии растений» (Київ, 2011), VIII та X Міжнародних наукових конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Алушта, 2012, Умань, 2017), II Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології» (Київ, 2013), IX Міжнародній конференції «daRostim 2013» (Львів, 2013), Міжнародній науковій конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 2017), International scientific conference «Molecular Microbiology and Biotechnology» (Odessa, 2016), III Всеукраїнській 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), III Конференція молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (Київ, 2017) та інших, на засіданнях науково-методичної ради ДУ Інститут зернових культур НААН.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 43 наукові праці, з яких 17 – наукові статті, зокрема 7 статей у фахових виданнях України у галузі біологічних наук (в т.ч. 2 – у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних), 3 статті – в закордонних виданнях, 20 матеріалів та тез доповідей наукових конференцій, 2 патенти на корисну модель, 1 авторське свідоцтво на сорт рослин, 3 методичні видання.

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

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Актуальність та проблеми біотехнологічних характеристик культурних рослин

Напрямами біотехнології рослин є молекулярні технології, клітинно-інженерні технології та генетично-інженерні технології поліпшення рослин та отримання цільових продуктів. До молекулярних біотехнологій рослин, зокрема ДНК-технологій, відносяться молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму геномів, різноманітні види маркер-асоційованої селекції, геномне редагування тощо. Клітинно-інженерні технології включають використання культури клітин, тканин і органів *in vitro* для отримання калусів різних типів, соматичних зародків, рослин-регенерантів задля мікроклонального розмноження, виробництва гаплоїдів і подвоєних гаплоїдних ліній, соматиклонів, суспензійних культур, культур протопластів, проведення клітинної селекції і парасексуальної гібридизації, отримання вторинних метаболітів *in vitro*. Генетично-інженерні біотехнології забезпечують створення трансгенних рослин з чужорідними генами, які надають рослині принципово нових властивостей [88, 95, 117, 155, 164].

Завдання біотехнології рослин завжди визначаються тим видом рослин, з яким працює дослідник, його генетичним потенціалом, особливостями системи розмноження, напрямками практичного використання, а прийоми і заходи, спрямовані на отримання біотехнологічного продукту завжди повинні враховувати морфобіологічні, фізіологічні та інші особливості виду, його генетичний поліморфізм тощо. Найчастіше біотехнологічні розробки в галузі біотехнології рослин мають практичний вихід в селекцію, рослинництво або промислове виробництво рослинної біомаси і вторинних рослинних метаболітів [117, 233], направлені на збереження генофонду рідкісних видів рослин [31, 87]. У культурних видів рослин біотехнологія

здатна забезпечити як помітне розширення генетичного різноманіття і суттєве прискорення класичного селекційного процесу, так і результати, на які не спроможна класична селекція – розвиток ознак, які взагалі не властиві даному виду, ведення відборів не за фенотипом, а за результатами геномного аналізу з поєднанням в одній рослині бажаних варіантів алелів тощо. Однак, кінцева результативність біотехнологій, які мають спрямованість у селекційний процес, залежить не тільки від їхнього рівня, але і від всього комплексу селекційних, фізіологічних, технологічних та інших факторів, які визначають положення тієї чи іншої сільськогосподарської рослини у сучасному виробництві.

Суттєвий прогрес сільськогосподарських культур, особливо тих, що вже досягли біологічної межі продуктивності, із застосуванням лише традиційних прийомів і методів селекції є проблематичним. Проте розробка і впровадження біотехнологічних підходів – молекулярно-генетичним методів, MAS-селекції, клітинної і генетичної інженерії мають значний потенціал для поліпшення тієї чи іншої культури [76, 79, 99, 100, 124, 126, 138, 152, 153, 164, 277, 359, 388 та ін.]. Однак, розпочаті з 80-х років 20-го сторіччя біотехнологічні дослідження рослин, в тому числі і кукурудзи, показали, що визначальним, а в той же час і лімітуючим фактором отримання позитивного результату у будь-якому напрямку біотехнології є генотип рослини. Враховуючи те, що у сільськогосподарських культур, селекція яких ведеться не одне десятиліття по всій Земній кулі, генофонд налічує тисячі генотипів, гостро постає питання вибору стратегії класифікації, добору, створення і поліпшення існуючих генотипів за ознаками, які забезпечують результативність MAS-селекції, клітинно- і генетично-інженерних досліджень. Один з напрямків вирішення даної проблеми – виділення і оцінка господарсько цінних груп генотипів спільного походження, які мають подібні, оптимізовані біотехнологічні характеристики, що дозволяє зменшити генотипову детермінованість і збільшити прогнозованість реакції новостворених генотипів. У кукурудзи такими групами споріднених

генотипів є так звані типи зародкової плазми [251, 361]. Таким чином, розробка молекулярних, клітинно- і генетично-інженерних біотехнологій рослин, адаптованих до спільних за походженням груп генотипів усередині виду, є актуальним завданням. Визначення біотехнологічного потенціалу цих груп та закріплення отриманої інформації у вигляді біотехнологічної характеристики природно існуючих груп споріднених генотипів складає основу розвитку окремої біотехнології рослин [164].

Біотехнологічна характеристика генотипів і їхніх груп являє собою оцінку з точки зору молекулярно-генетичного поліморфізму, який визначається за допомогою молекулярно-генетичних маркерів, та за реакцією в культурі *in vitro*, зокрема за здатністю до калусогенезу і регенерації [155]. Встановлення молекулярно-генетичного поліморфізму дозволяє визначати ступінь спорідненості і віддаленості генотипів, ідентифікувати генотипи та складати їхні унікальні молекулярно-генетичні паспорти, розробляти специфічні технології маркер-асоційованої селекції тощо. Вивчення особливостей поводження в культурі *in vitro* дозволяє відбирати генотипи з високим рівнем калусогенезу і регенерації для включення до програм з клітинної селекції та отримання соматоклональних варіантів, складає базу для генетичної трансформації окремих видів рослин. Таким чином, сучасна комплексна біотехнологічна характеристика генотипу або групи генотипів включає молекулярно-генетичну, клітинно-інженерну та генетично-інженерну характеристики.

1.2. Генофонд кукурудзи та його типізація

Кукурудза – одна з найбільш продуктивних та цінних за біологічними властивостями харчова, кормова і технічна культура. З неї виготовляється біля 3,5 тисяч видів продукції [106, 141, 223]. Кукурудза входить до трійки найпоширеніших культур у світі, а для України є ще і джерелом надходження валютних коштів. Експорт зерна кукурудзи збільшується з кожним роком і у

2016/2017 маркетинговому році становив 20 703 тисячі тонн [97]. Цінова ситуація на ринку кукурудзи відзначається стабільністю і починаючи з 2014 року вартість 1 тонни знаходиться в межах \$360—380 (дані на 14.03.2017 року) [9].

На сьогоднішній день за допомогою селекційних прийомів і методів створено високопродуктивні гібриди кукурудзи, врожайність зерна яких на відповідному агрофоні складає 12,0-15,5 т/га і сягає своєї біологічної межі [143]. Як результат добору поєднань специфічних алелів багатьох алельних і неалельних генів в генотипі вихідного матеріалу виникли лінії і гібриди кукурудзи з поліпшеною якістю врожаю за вмістом загального білка, лізину і триптофану, стійкі до певних хвороб і шкідників, посухо-, жаро- і холодостійкі, скоростиглі, чутливі до внесення добрив і зрошення [110, 113]. Разом з тим, перспективними завданнями для селекційного поліпшення кукурудзи є створення нових генотипів, які б поєднували у собі всі вищезгадані характеристики одночасно. На часі розробка технологій, які б забезпечували прискорення, здешевлення та зменшення частки ручної праці на всіх етапах селекційного процесу та виробництва зерна. З'являються і зовсім нові вимоги споживачів до виробників кукурудзи. Так, новітніми напрямками селекції кукурудзи виступають створення генотипів, збалансованих за поживною цінністю зерна (з високим вмістом білка, лізину, триптофану, треоніну, каротиноїдів, токоферолу, олії, антиоксидантів, певних вторинних метаболітів) і зеленої маси, генотипів зі швидкою втратою вологи зерном у період дозрівання, технічних гібридів з високим вмістом амілопектину, генотипів, стійких до гербіцидів, нових хвороб і шкідників.

Кукурудза є не тільки цінною зерновою культурою, а і унікальним науковим об'єктом, який протягом значного періоду розвитку біологічної науки використовувався як модельний. Саме при дослідженні кукурудзи були зроблені відкриття, які збагатили світову науку. Так, явище нестабільності і мобільності геному було відкрито Барбарою МакКлінток при вивченні кукурудзи [292, 293 та ін.]. На прикладі кукурудзи E.V. Ananiev et

al. [167-170] ідентифіковано структуру центромери хромосом. Геном кукурудзи – один з перших повністю секвенованих протяжних і складних геномів рослин [339]. Загалом багато питань організації та еволюції рослинних геномів, метилювання нуклеотидних послідовностей, імпринтингу було вирішено при скрупульозному та детальному аналізі геному цієї рослини, а важливе господарське значення кукурудзи активізувало розвиток прикладної геноміки і дозволило сформулювати фундаментальні засади маркер-асоційованої селекції, клітинної та генетичної інженерії рослин [26, 116, 117].

Кукурудза *Zea mays* L. відноситься до відділу вищих рослин *Angiospermae* (покритонасінні або квіткові), класу *Monocotyledonae* (однодольні), порядку *Poales* (злаки), родини *Poaceae* (мятликові) або *Gramineae* (злакові), триби *Maydeae* (маїсові), підтриби *Tripsacine* C. Presl. [33, 113, 251]. Сучасний культурний рід *Zea* L. є монотипним і представлений єдиним видом *Z. mays* L. spp. *mays* ($2n=20$) – кукурудза [20, 113]. У кукурудзи розрізняють вісім підвидів: (кремениста (*indurata* Sturt.), зубоподібна (*indentata* Sturt.), напівзубоподібна (*semidentata* Kulesh.), крохмалиста (*amylacea* Sturt.), розлусна (*evarta* Sturt.), цукрова (*saccharata* Korn.), восковидна (*ceratina* Kulesh.) та плівчаста (*tunicata* Sturt.)) [34, 113]. Основна кількість сучасних селекційних ресурсів кукурудзи відноситься до підвидів зубоподібної, напівзубоподібної та кременистої кукурудзи. Проте класифікація кукурудзи за підвидами є дещо умовною, оскільки вона не забезпечує чіткий розподіл генотипів і ґрунтується, зокрема, на зовнішньому вигляді зернівки, будові та консистенції зерна.

Сучасний селекційний генофонд кукурудзи є результатом багатьох циклів схрещувань та доборів серед декількох вихідних сортів і представлений кількома типами зародкової плазми. Згідно з [20, 132, 251, 361], типи зародкової плазми (зародкові плазми) – це окремі групи всередині культурного виду, які об'єднують значну кількість споріднених генотипів (сортів, синтетиків, елітних ліній тощо). Тобто певний тип зародкової плазми

(germplasm, синоніми – генетична плазма, генетична група) об'єднує генотипи кукурудзи, які мають спільне походження, тобто походять від одного вихідного сорту, і з високою імовірністю містять генетично споріднений матеріал. Сучасна селекція кукурудзи базується на використанні декількох основних типів зародкової плазми: Айодент, Міндзенпуста, Рейд (BSSS), Лакон, Ланкастер та інших, які добре комбінуються при схрещуваннях [139, 361]. Існує значна кількість генотипів екзотичних зародкових плазм – тропічних, субтропічних, азійських, латиноамериканських, китайських, місцевих популяцій Європи та США [91, 182, 284, 318, 328, 333, 351].

Генотипи зародкової плазми Ланкастер походять від вільнозапильного сорту Lancaster. Родина Hershey з округу Ланкастер, штат Пенсильванія (США) у 1860-1910 рр. працювала з місцевим напівкременистим сортом Lancaster. Відбір з цього сорту за господарсько цінними ознаками в умовах Пенсильванії привів до створення ранньостиглого і посухостійкого сорту Lancaster Sure Crop, який забезпечував сталий впевнений врожай [184, 361]. Окремо, з 1888 по 1920 рр. селекцією на основі вільнозапильного сорту Lancaster займалася родина Richey біля Ла Салля, штат Іллінойс, до якої насіння цього сорту потрапило з Пенсильванії через мігрантів. Родина Richey створила високоврожайний, з довгими качанами сорт Richey Lancaster [350].

Сучасні самозапилені лінії генетичної плазми Ланкастер походять від двох ліній першого циклу самозапилення (інбридингу): лінії C103 з сорту Lancaster Sure Crop і лінії Oh40B з сорту Richey Lancaster. Проте, найбільш успішними, які набули поширення та фактично є основою сучасного генофонду Ланкастер, стали лінії другого циклу самозапилення: Mo17 (походить від лінії C103 з сорту Lancaster Sure Crop) та Oh43 (походить від лінії Oh40B з сорту Richey Lancaster). Саме лінії Mo17 і Oh43 дали початок двом однойменним сучасним підплазмам плазми Ланкастер [139]. Загалом, лінії американської плазми Ланкастер відрізняються високою комбінаційною здатністю, посухо- та жаростійкістю, інтенсивним стартовим ростом,

середньою стійкістю до пухирчатої та летючої сажок, стеблової гнилі, толерантністю до хвороб листя, вилягання, мають кременисте чи зубоподібне зерно [132, 69, 36, 30]. Для умов Степу України з точки зору продуктивності, адаптивності та комбінаційної здатності плазма Ланкастер є найбільш перспективною. Зокрема, широко відома гетерозисна група Айодент/Ланкастер, яка є основною при створенні середньостиглих гібридів кукурудзи зі стабільним і високим урожаєм [91].

Господарсько важливі якості основних зародкових плазм кукурудзи в Україні активно вивчаються та використовуються у селекційному процесі. Але складність ведення родоводів, великий обсяг схрещувань, які виконуються кожного року, не дозволяють швидко і надійно ідентифікувати тип зародкової плазми окремого генотипу, повною мірою використати позитивні якості тієї чи іншої плазми в гетерозисній селекції. Сьогоднішній селекційний генофонд кукурудзи налічує десятки тисяч ліній і гібридів. Весь цей матеріал має бути класифікований за походженням, причому актуальним є створення класифікацій на основні геномних даних [26, 116, 391]. Разом з тим, молекулярно-генетичні, клітинно- та генетично-інженерні особливості основних типів зародкової плазми кукурудзи вивчені фрагментарно. Роботи в цьому напрямку в Україні тільки починають розвиватися, а зарубіжні дослідження з цього питання проводяться лише з зарубіжними генотипами та часто відсутні у відкритому друці.

Використання селекційно перспективних генотипів кукурудзи у біотехнологічних розробках, нажаль, не має значного поширення ні в Україні, ні закордоном. Найчастіше дослідження проводять з вже добре вивченими, модельними генотипами, які мають високий біотехнологічний, але низький господарський потенціал. В той же час у роботах з клітинної і генетичної інженерії з практичної точки зору необхідно використовувати генотипи з цінними селекційно ознаками.

Таким чином, дослідження біотехнологічного потенціалу, зокрема молекулярно-генетичних характеристик, клітинно- і генетично-інженерних

особливостей селекційно перспективних типів зародкової плазми кукурудзи стає актуальним завданням біотехнологічного супроводження селекційного процесу та потенційним інструментом підвищення його ефективності.

1.3. Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи

1.3.1. Використання молекулярно-генетичних маркерів для дослідження поліморфізму геному кукурудзи

Внутрішньовидова систематизація генетичних ресурсів культурних рослин є актуальною проблемою особливо для монотипних родів, таких як *Zea mays* L., оскільки за рахунок багаторічної світової селекції усередині таких видів виникли сотні, тисячі і, навіть, мільйони ліній, гібридів, місцевих популяцій, сортів. Геномна характеристика за алельним станом молекулярно-генетичних маркерів та упорядкування маси представників того чи іншого виду культурних рослин залежно від їхньої генетичної спорідненості є важливим завданням біотехнології. Окрім розробки філогенетичної класифікації молекулярно-генетична характеристика дозволяє встановити закономірності поширення специфічних алельних варіантів генів господарсько цінних та інших ознак серед генофонду культурної рослини, проводити асоціативне картування, виділяти споріднені групи та аргументовано обирати гетерозисні моделі сортів та гібридів. Внутрішньовидова класифікація культурних рослин, яка покликана бути філогенетичною, але базується лише на родоводах (педігрі) сучасних ліній, гібридів, сортів, як правило є недосконалою, бо родоводи мають такі недоліки, як суб'єктивність, пропуски в записах, неможливість відновлення тих їхніх частин, які відносяться до XIX – першої половини XX сторіччя, міксування неспоріднених генотипів в генотипі нащадка. Внутрішньовидова класифікація культурної рослини, яка основана на оцінці, наприклад, комбінаційної здатності, тобто поділ не на зародкові плазми, а на гетерозисні

групи, також не є такою, що влаштовує, оскільки прояв ознаки комбінаційної здатності залежить не тільки від генотипу, але і від факторів зовнішнього середовища. Можливо також провести внутрішньовидовий поділ генофонду культурної рослини за групами адаптації до варіюючих умов навколишнього середовища, але, як показують проведені дослідження [68, 83, 144], генотипи однієї групи адаптації не обов'язково є гомологічними за походженням. В той же час використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів розглядається як високо ефективний інструмент внутрішньовидової класифікації та систематизації генофонду культурних рослин, що враховує спорідненість та варіювання на рівні геномів на відміну від методів, які базуються на порівнянні за фенотиповими ознаками [26, 129, 256, 297].

У зв'язку з цим оцінка ступеня подібності геномів за визначеними, строго локалізованими сайтами чи локусами може слугувати інформативним джерелом для класифікації та систематизації генофонду культурних рослин. З іншого боку, для таких рослин як кукурудза, пшениця, жито, ячмінь, наукова селекція яких проводиться більше століття по всій земній кулі, важливо мати методи швидкого та надійного виділення серед загального пулу генотипів тих, що є спорідненими між собою та віддаленими від інших груп.

Використання молекулярно-генетичних маркерів в біотехнології господарсько-цінних рослин здійснюється у двох напрямках: паспортизація генотипів з метою їхньої ідентифікації, реєстрації і кластеризації та маркер-асоційована селекція за маркерами, певні алельні варіанти яких пов'язані з ефективним розвитком господарсько важливих ознак.

Розрізняють декілька десятків типів молекулярно-генетичних маркерів. При вивченні геному рослин у теперішній час використовуються маркери на основі поліморфізму довжини рестрикційних (RFLP) та ампліфікованих (AFLP) фрагментів, послідовності, що характеризують локус (STS), послідовності між простими повторами (ISSR), довільно ампліфікована поліморфна ДНК (RAPD), повтори простих послідовностей або

мікросателітні маркери (SSR), послідовності, що характеризують ампліфікований регіон (SCAR), маркери на основі ДНК-чипів для вивчення генетичного різноманіття (DArT), маркери однонуклеотидного поліморфізму (SNP) тощо [26, 129, 268, 367].

В провідних наукових центрах світу для оцінки спорідненості генотипів повсюдно використовується практика широкогеномного генотипування за молекулярно-генетичними, переважно SSR- та SNP-маркерами [349, 391, 255]. Існують різні думки щодо переваг чи недоліків цих двох типів маркерів саме для широкогеномного генотипування, хоча, нажаль, ключовим фактором у виборі типу маркерів є можливість доступу до обладнання та фінансування цього виду біотехнологічних досліджень. Але якщо виключити з обговорення фінансову сторону проблеми та зосередитись на порівнянні інформативності двох типів маркерів, то треба взяти до відома існуючу в науковій літературі точку зору, узагальнену Y. Wu et al. [378]. За [285, 378, 384] SSR-маркери забезпечують більшу роздільну здатність в аналізі генетичного різноманіття, а при визначенні структури популяції та відносної спорідненості значимість одного SSR-маркера подібна до значимості десяти SNP-маркерів, за D. Van Inghelandt et al. [363] – 7-11 SNPs. Це пояснюється меншою поліморфністю маркерів однонуклеотидного поліморфізму, ніж мікросателітних, оскільки максимальна кількість алелів для біалельного SNP-маркера дорівнює лише двом, а для мікросателітного маркера може сягати 5-7 і більше. Однак, як зазначає Y. Wu et al. [378], зазвичай для широкогеномного генотипування використовується кількість SNP-маркерів значно більша, ніж при генотипуванні з SSR-маркерами. Тобто при SNP-генотипуванні відбувається дослідження значно більшої кількості локусів, де розташовані маркери, з більшим покриттям геному, ніж при SSR-аналізі. Загалом, при оцінці генетичного різноманіття більша вага надається кількості локусів, ніж кількості алелів [129, 363]. До того ж поодинокі нуклеотидні поліморфізми є найбільш поширеними генетичними змінами у рослин [275].

В нашому дослідженні для молекулярно-генетичної характеристики плазми Ланкастер ми обрали використання SNP-маркерів, оскільки саме за однонуклеотидним поліморфізмом визначення характерних ознак групи Ланкастер раніше не проводилося. До того ж широкогеномний SNP-аналіз проводиться шляхом часткового секвенування і дозволяє створювати SNP-паспорти сучасних, селекційно перспективних ліній кукурудзи, що має ще і практичне значення, дозволяє депонувати результати та порівнювати їх із зразками, які генотиповані у минулому і будуть генотиповані у майбутньому.

Загалом, рівень однонуклеотидного поліморфізму у кукурудзи оцінюється як дуже високий – 1 нуклеотидна заміна на 44-75 п.н. [246, 236], зокрема в середньому 1 заміна на 31 п.н. в некодуючих районах і на 124 п.н. в кодуючих ділянках [196]. Рівень однонуклеотидного поліморфізму ДНК у різних підвидів та типів зародкової плазми суттєво розрізняється [229, 285, 332, 384].

Ми використали панель BDI-III з 384 SNP-маркерів, розроблену фірмою BioDiagnostics Inc. (США) [187], доступну нам з організаційних і фінансових причин, хоча використання більш ємних панелей SNP-аналізу в майбутньому, безумовно, має лише вітатися. В роботах, виконаних в світових наукових установах, для кукурудзи використовували панелі з кількістю SNP-маркерів від 1K, де K – тисяча штук [285, 340, 352] до 55-56K [376, 379] і навіть 680K [332], причому великий розмір панелей незавжди гарантував їхню велику інформативність, оскільки часто вони вміщують значну кількість маркерів з низькою частотою поліморфізму або взагалі мономорфних в проаналізованих наборах ліній. За такими ємними панелями генотиповано значні масиви зразків зі світових колекцій або загальнодержавних програм оцінки генетичних ресурсів. Але якщо відбувається SNP-генотипування зразків, які входять до конкретних селекційних програм, як, наприклад, 380 ліній Техаської селекційної програми [352], масив з 90 поширених ліній селекції компанії Монсанто [369] та інші, то кількість SNP-маркерів в панелях значно зменшується, але

вони обираються за більшим значенням індексу інформативності (PIC) і дозволяють отримати більше інформації при менших витратах.

Треба зазначити, що інші типи молекулярно-генетичних маркерів, особливо SSR-маркери теж широко використовуються для ідентифікації зародкових плазм і гетерозисних груп, характеристики генетичних ресурсів кукурудзи, ідентифікації і реєстрації ліній і гібридів, прогнозування гетерозису, маркуванні локусів господарсько цінних ознак [84, 129]. У кукурудзи SSR-маркери вважаються найбільш відповідними для побудови генетичних карт та оцінки генетичного різноманіття через високий рівень алельних варіацій і кодомінантність, надійність і відтворюваність [334, 276]. Результати кластеризації значної кількості ліній з різних селекційних програм за спеціально відібраними SSR-маркерами співпадали з розподілом ліній за даними педігрі та поділом на гетерозисні групи [217, 284, 328, 333, 351]. Генотипування зразків кукурудзи за визначеним набором RAPD- і SSR-маркерів широко застосовується і в Україні для вітчизняних селекційних програм і також засвідчує тенденцію до збігу результатів групування за цими типами маркерів з групуванням за родоводами та гетерозисними групами [25, 127, 128]. Однак, Ю. М. Сиволап и др. [129] за матеріалами дослідження [25] зазначають, що при ПЛР-аналізі з довільно обраними праймерами найбільше варіювання за величиною генетичних дистанцій серед гетерозисних груп притаманне саме Ланкастер. У представників Ланкастер відсутня також чітка кластеризація усередині групи, а значення генетичних дистанцій сягає максимального. У такій ситуації більш інформативним може виявитися інший підхід – широкогеномне генотипування за SNP-маркерами. Загалом треба зазначити, що результати використання SNP-аналізу саме для локальних селекційних програм стримано висвітлені в науковій літературі.

Використання молекулярно-генетичних маркерів дозволяє визначати особливості тієї чи іншої плазми та встановлювати приналежність ліній кукурудзи до неї, робити висновки стосовно спорідненості та віддаленості генотипів між собою для ведення комбінаційної селекції за усталеними

гетерозисними моделями, відстежувати авторські права на лінії і гібриди [337, 330, 378].

Знання про генетичне різноманіття всередині зародкових плазм за молекулярно-генетичними, зокрема SSR- і SNP-маркерами, дозволяє використовувати їх як функціональні для систематизації і раціонального використання генетичних ресурсів та селекційного матеріалу у програмах з підвищення врожаю [159, 285, 378, 384, 391]. У кукурудзи SNP-маркери успішно застосовують для маркування алельного стану генів, відповідальних за такі ознаки як колір стрижня качана та тип зернівки [17], стійкість до афлатоксину *Aspergillus flavus* [222], стеблової гнилі [195], фузаріозу [194], кукурудзяного метелика [269], посухостійкість [358], холодостійкість [329], засолоненість [287].

Не дивлячись на широке використання молекулярно-генетичних маркерів в паспортизації та реєстрації генотипів, оцінці поліморфізму за господарсько цінними ознаками, дослідження алельного стану маркерів, характерного для зародкових плазм кукурудзи, майже не проводилися, скоріше за все через те, що тип зародкової плазми раніше не розглядався як окрема ознака. Частково така характеристика виконувалася з використанням SSR-маркерів [129], в той час як широкогеномний аналіз та порівняння різних плазм за алельним станом SNP-маркерів не проводилися. Однак, з поширенням у сучасній селекції кукурудзи визначених гетерозисних моделей, широкогеномна молекулярно-генетична характеристика ліній за типом зародкової плазми стала вельми актуальною і своєчасною.

1.3.2. Тотипотентність та здатність до регенерації рослин у кукурудзи *in vitro*

Біотехнологічна характеристика того чи іншого виду культурних рослин як неодмінну складову включає характеристику потенціалу калусогенезу різних типів, морфогенезу та регенерації рослин в культурі *in vitro*, оскільки

саме такі феномени складають фундамент для робіт з клітинної та генної інженерії.

Калусогенез за [88] – це результат дедиференціювання та активних поділів і неорганізованого росту дедиференційованих клітин. Культивування *in vitro* здатне викликати дестабілізацію геному, наслідки якої проявляються у підвищеній генетичній мінливості нащадків рослин-регенерантів [11, 301]. Регенерація рослин – це відновлення органів, тканин, цілого організму з його частини чи окремої клітини. Вона пов'язана з їхньою тотипотентністю – властивістю соматичних клітин рослин повною мірою реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму, здатністю рослинних клітин фенотипово реалізувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК ядра [95, 142]. В основі регенерації лежать явища диференціювання клітин і морфогенезу [13, 22, 88]. У кукурудзи найпоширенішим джерелом отримання калусної тканини є незрілі зародки віком 12-14 діб та розміром 11-1,5 мм, обов'язково експлантовані щитком догори [8, 108, 111, 258].

Біотехнологічна характеристика покликана надати оцінку межам норми реакції не тільки конкретних ліній і гібридів, але і більш крупних угруповань, як, наприклад, зародкові плазми. Важливо також підібрати умови, які дозволять розширити норму реакції в культурі *in vitro* не взагалі у виду рослин, а у конкретних зародкових плазм порівняно з іншими.

Зародкова плазма об'єднує генотипи, які походять від одного вихідного сорту і мають підвищену генетичну спорідненість. Отже, можна припустити, що реакція в культурі *in vitro* представників одного типу зародкової плазми повинна бути схожою. Разом з тим, оскільки сучасні генотипи – це результат багатьох циклів схрещувань і доборів, культуральні властивості генотипів в середині плазм і підплазм можуть різнитися. В літературі описані результати культивування *in vitro* окремих ліній і гібридів без зазначення типу зародкової плазми. В більшості випадків культивувалися лише лінії-стандарти з високим біотехнологічним потенціалом, такі як A188 [8, 146, 364, 365], Chi31 [8, 82, 110, 146], B73 [110, 111], PLS61 [8, 102]. Тому важливим є

вивчення калусогенних і регенераційних властивостей нових перспективних у селекційному і біотехнологічному відношенні ліній однієї зародкової плазми, її підплазм для створення біотехнологій калусогенезу та регенерації окремих плазм. Робота О. Є. Абраїмової [3] показала, що урахування класифікації генотипів кукурудзи за зародковими плазмами в біотехнологічних дослідженнях *in vitro* є доцільним і виправданим, оскільки різні типи зародкової плазми мають різні вимоги до умов культивування. Вибір оптимальних умов для реалізації здатності до калусогенезу і регенерації у генотипів, які відносяться до комерційних зародкових плазм та гетерозисних груп, є актуальним через значну залежність здатності до калусоутворення та регенерації від генотипу експланта [8, 112, 201, 290].

У кукурудзи та інших злаків виділяють два типи калусів: калус I типу і калус II типу. Калус I типу росте повільно, білий або жовтий, щільний, компактний, швидко переходить до регенерації і не здатний до тривалої підтримки в культурі. Калус II типу відрізняється швидким ростом, зовні м'який, крихкий, білий або блідо-жовтий, часто прозорий, здатний до тривалої підтримки в культурі при регулярному субкультивуванні на свіже живильне середовище [248]. Два типи калусів мають різний біотехнологічний потенціал та займають кожен своє місце в біотехнологічних схемах отримання калусів і рослин-регенерантів [1, 3, 148, 193, 227, 228, 326].

Здатність до калусогенезу різних генотипів кукурудзи залежить від низки внутрішніх і зовнішніх факторів. До внутрішніх факторів, які впливають на калусогенез, відносяться стан донорної рослини, тип, розмір, стадія розвитку і генотип експланта [107, 123, 160, 163, 181, 248, 249, 288, 290, 303].

Генотип експланта є ключовим фактором, який визначає успіх калусоутворення, соматичного ембріогенезу та регенерації рослин. Дослідження з генетичного контролю здатності до морфогенного калусогенезу та регенерації у кукурудзи, як і у інших рослин, виявили, що лише невелика частка генотипів є чутливими в культурі *in vitro* [216, 257,

345], гібриди чутливіші, ніж лінії [14, 88, 186, 215, 247, 257], а «материнський ефект» в успадкуванні даних ознак проявляється нестабільно [16, 130]. В різних дослідженнях наводяться суперечливі дані щодо характеру успадкування ознак «частота утворення ембріогенних калусів» та «частота регенерації» у кукурудзи. Для різних генотипів в різних схемах схрещувань як суттєві зазначаються як адитивні ефекти генів, так і ефекти домінування та епістазу [130, 174, 368]. За [130] здатність до регенерації контролюється адитивно-домінантною системою з неповним домінуванням в локусах, а за збільшення ознаки відповідають рецесивні гени. Узагальнення різних публікацій свідчить, що у кукурудзи можливі такі типи успадкування здатності до регенерації, як домінування, наддомінування, неповне домінування, проміжне домінування, кодомінування, репресія [16, 78, 257], а екологічна варіанса і взаємодія «генотип-середовище» також є суттєвими складовими фенотипової варіанси цієї ознаки [392].

На початку досліджень генетичного контролю калусогенезу, соматичного ембріогенезу та регенерації в культурі незрілих зародків кукурудзи за допомогою RFLP-аналізу було встановлено, що з цими ознаками пов'язані певні ділянки на хромосомах 1, 2, 3 і 9 [174, 176, 370]. До баз даних MaizeGDB [289] та Gene NCBI [299] на 30.11.2017 занесено три локуси, пов'язані з соматичним ембріогенезом, в яких розташовані гени *serk 1*, *serk 2* та *serk 3*. Ці гени кодують попередники рецептороподібних кіназ соматичного ембріогенезу 1, 2 і 3 і розташовані відповідно в хромосомах бінах (плечах) 10.04(L), 5.05(L) і 4.05(L). Валідований статус в цих базах має лише ген *serk 2*, про який відомо, що він конститутивно експресується у всіх досліджених тканинах (як в ембріогенних, так і неембріогенних), так само як і ген *serk1* [179].

На сучасному етапі розвитку біологічної науки процес дедиференціації клітин при калусоутворенні досліджується не тільки на рівні геному, але і транскриптому та протеому [238, 239, 288, 344, 355, 366]. Показано, що насправді у процесі дедиференціації клітин при калусоутворенні значну роль

відіграють гени, які кодують ферменти загальних метаболічних та регуляторних шляхів – біосинтезу пірувату, трансдукції гормональних сигналів, реакції на стрес, проліферації клітин. Більш того, було виявлено, що до регуляції дедиференціації та соматичного ембріогенезу залучено і загальне для живих істот явище мовчання генів. Як відомо, його забезпечують мікроРНК. Один з класів мікроРНК, малі інтерферуючі РНК (siРНК), саме у посттранскрипційний період не дають змоги транскриптам цільових генів приймати участь у трансляції, і, тим самим, виступають регуляторами розвитку рослин, реакції на абіотичні та біотичні стресові фактори тощо [178, 180, 273, 390]. Встановлено, що ці види некодуючих РНК відіграють важливу роль у соматичному ембріогенезу багатьох видів рослин, зокрема бавовнику, тополі, цитрусових [279, 387, 377]. Для соматичного ембріогенезу в культурі незрілих зародків кукурудзи на прикладі високототипотентної лінії 18-599R китайськими дослідниками [239] було ідентифіковано цілу родину мікроРНК, яка приймала участь у регуляції роботи 87 цільових генів, задіяних у калусоутворенні. В цій же роботі ідентифіковано 861 диференційно експресовану siРНК для 576 відповідних цільових генів. Ці гени склали три кластери, які контролюють металоекзопептидазну, каталазну та О-метилтрансферазну активність клітин, транспорт ауксину, розвиток меристем і стебла, регулюють транскрипцію. Автори наголошують, що siРНК регулюють калусоутворення шляхом контролю експресії всіх цих цільових генів. Наведені дані свідчать про надскладний спосіб генетичного контролю ознак морфогенного калусогенезу та регенерації рослин і великі потенційні можливості варіювання цього контролю залежно від генотипу та зовнішнього середовища.

Оскільки кожна зародкова плазми кукурудзи має певну генетичну специфіку, дослідження клітинно-інженерних особливостей окремих зародкових плазм, зокрема селекційно перспективної плазми Ланкастер, є своєчасними. Актуальним також є виділення генотипів, високопродуктивних та стабільних не тільки за господарсько цінними, але і за біотехнологічними

ознаками всередині даної плазми і її підплазм з метою залучення їх до клітинно-інженерних, а також генетично-інженерних досліджень. Існують лише фрагментарні дані стосовно здатності до калусогенезу і регенерації *in vitro* різних зародкових плазм кукурудзи [319, 360]. Так, при порівнянні гібридів двох екзотичних плазм було показано, що плазма Cateto більш здатна до соматичного ембріогенезу і регенерації, ніж плазма Тухрейо [319]. В роботі [360] автори дійшли висновку, що лінії, які відносяться до зародкової плазми Reid, володіють меншою тотипотентністю *in vitro*, ніж лінії Lancaster. Загалом, закономірності розподілення чутливих і не чутливих до культивування *in vitro* генотипів кукурудзи серед різних типів зародкових плазм кукурудзи не з'ясовані. Не вивченою є і розповсюдженість сприятливих алелів генів, що контролюють процеси калусогенезу та регенерації, серед різних за походженням груп, хоча для інших, перш за все прямих господарсько цінних ознак, встановлена приуроченість певних алелів до того чи іншого типу зародкової плазми [71, 308, 389], що дозволяє, використовуючи різні типи молекулярно-генетичних маркерів, швидко добирати сприятливі плазми і генотипи при MAS-селекції.

До зовнішніх факторів калусоутворення можна віднести склад живильного середовища, довжину фотоперіоду, температуру культивування тощо. Причиною відмінностей у частоті утворення морфогенних калусів, їхній текстурі, швидкості росту і регенераційному потенціалі можуть бути різні джерела неорганічного азоту у середовищах MS та N₆ [111, 150, 166], особливо на фоні різного вмісту L-проліну [325]. Достатня кількість авторів спостерігали позитивний вплив L-проліну на формування ембріогенного калусу II типу [8, 149, 160, 316, 380 та ін.].

Калусогенез загалом ініціюється під впливом фітогормонів класу ауксинів – 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) та дикамби, які стимулюють індукцію калусоутворення та стримують регенерацію рослин [142, 237]. Згідно з [122], ауксинове навантаження у середовищі індукції може виявитися критичним фактором при визначенні подальших

морфогенетичних можливостей калусної тканини. Оптимальний вміст та експозиція 2,4-Д для індукції обох типів калусів лишаються дискусійними [191, 240, 306], але найбільш прийнятною для індукції калусу І типу видається концентрація 0,5-1 мг/л за [3] та 1-2 мг/л за [173]. Дискусійним є і характер впливу диамби на ініціацію калусогенезу різних типів, хоча більшість дослідників засвідчують її стимулюючу дію [122, 316, 327].

Абсцизова кислота (АБК) є фітогормоном, який забезпечує та регулює стан спокою у рослин. За одними даними АБК не впливає на ріст калусів кукурудзи [101], за іншими – має стимулюючий ефект на калусоутворення [8]. Фітогормон класу цитокінінів 6-бензиламінопурин (БАП) за [8] частково інгібує калусогенез. Антибіотик цефотаксим, що є напівсинтетичним аналогом цефалоспоринової, за [343] не впливає на соматичний ембріогенез в калусній культурі, отриманій з незрілих зародків кукурудзи.

Регенерація кукурудзи є суттєвою складовою біотехнологічного процесу, оскільки важливо не лише отримати калуси зі сталим чи зміненим генотипом, а і одержати фертильні рослини, які можна було б використовувати у подальших селекційних дослідженнях. Регенерація рослин *in vitro* є етапом біотехнологічного процесу, важливим для успіху досліджень з соматонального варіювання, селекції *in vitro*, генетичної трансформації тощо, коли отримані рослини-регенеранти характеризуються зміненим генотипом по відношенню до вихідних форм. І регенераційний потенціал калусної тканини, і тип морфогенезу, за яким утворюються рослини, є генетично контрольованими. Суттєвою для регенерації рослин з калусної тканини є і взаємодія генотипу з факторами середовища [88, 240].

В культурі *in vitro* у рослин, в т.ч. у кукурудзи, розрізняють 3 типи морфогенезу: органогенез (гемогенез та/або ризогенез), ембріодогенез та гістогенез [13]. Найбажанішим є ембріодогенез, оскільки при цьому типі морфогенезу корінь і пагін формуються спряжено, мають спільну провідну систему, що у подальшому забезпечує кращу приживаність в умовах *in vivo*.

Відповідно існують 2 шляхи регенерації у кукурудзи: органогенез та ембріогенез.

Встановлено [151], що реалізація регенераційної здатності залежить від ряду причин, в тому числі від сформованості і функціональної активності фотосинтетичного апарату в клітинах калусів. Згідно з [306] регенерація ембріогенного калусу контролюється декількома ядерними генами або кластерами генів. На прикладі лінії A188 відзначено [176], що існує головний ген або гени на довгому плечі хромосоми 9, який відповідає за формування ембріогенного калусу і рослинну регенерацію. Віднайдений позитивний і суттєвий зв'язок між *in vitro* проростанням насіння кукурудзи і здатністю до калусогенезу дозволив припустити S. T. Akinyosoye зі співавторами, що ці ознаки контролюються або ж схожими, або ж тісно пов'язаними генами [161].

Регенераційна здатність кукурудзи, окрім генотипу, залежить від таких факторів як вік і тип калусної тканини, особливостей складу середовищ для регенерації. Ключовим для середовища регенерації є вибір мінеральної основи [147, 325], вміст сахарози [201, 283], [305, 306], наявність AgNO_3 [111, 150, 362], фітогормональний склад [267, 305].

Зазвичай регенерація настає після зняття ауксинового навантаження на безгормональному середовищі або з додаванням фітогормонів класу цитокінінів чи гіберелінів [108, 147, 201, 240, 290, 305, 327, 346]. Використання антибіотика цефотаксиму здатно підвищувати частоту регенерації рослин кукурудзи. Окрім стимуляції морфогенного процесу, культивування на середовищах з цефотаксимом прискорює диференціювання калусу, що дозволяє отримувати максимальну кількість рослин у короткий термін [38].

Якщо отримані через соматичний ембріогенез рослини-регенеранти вже мають кореневу систему і потребують лише дорощування, то отримані через пагоневий морфогенез рослини-регенеранти не мають кореневої системи, тому потребують подальшого укорінення. Для укорінення застосовують

нафтилоцтову та індолилмасляну (ІМК) кислоти, хоча інформація щодо оптимальної концентрації цих речовин є суперечливою [201, 305, 306, 327].

В попередні роки фрагментарно вивчалася калусогенна та регенераційна здатність окремих ліній Ланкастер з Дніпровської селекційної програми. Так, в роботі Г. Р. Піралова і О. Є. Абраїмової [109] показана унікальна здатність ланкастерівської лінії ДК675 до довготривалого підтримання калусів в культурі без втрати регенераційного потенціалу. Цими авторами підтверджений високий морфогенетичний потенціал модельних ліній Chi31 і A188 та вперше розкрита значна тотипотентність лінії PLS61 [8, 122].

Комплексна робота О. Є. Абраїмової [3, 8, 108, 111, 122] дозволила провести скринінг здатності генетично різнорідних форм кукурудзи до культивування *in vitro* і оптимізувати процеси калусогенезу і регенерації рослин. Була показана специфічність потреб представників основних зародкових плазм кукурудзи стосовно факторів культивування *in vitro*. Зокрема, плазма Ланкастер визначена авторкою як найменш чутлива до умов культивування з 12 проаналізованих плазм. Загалом для окремих плазм на етапах індукції калусогенезу I і II типів, субкультивування та регенерації рослин специфічними були оптимальні значення таких факторів як розмір експланта, вміст вітамінів і амінокислот, 2,4-Д, дикамби та гідролізату казеїну, а для періоду регенерації ще і вміст манітолу, абсцизової кислоти і 6-бензиламінопурину. Разом з тим, зафіксовано фактори культивування *in vitro*, на варіювання яких представники різних плазм реагували однаково, – вміст AgNO₃, L-проліну, інозиту, сахарози, температурні умови та умови освітлення, а для регенерації з калусів II типу – ще й вміст 2,4-Д і БАП. Проведене дослідження виявило потребу у детальному вивченні потенціалу тотипотентності кожного окремого типу зародкової плазми, а також його варіювання усередині особливо ємних зародкових плазм.

1.3.3. Результати і перспективи генетично-інженерних досліджень кукурудзи

Рослини кукурудзи володіють величезними спадковими можливостями забезпечити суттєвий врожай необхідної якості та стійкість до біотичних і абіотичних стресів, які виникли за мільйони років природної еволюції та багаторічної штучної селекції. Тим не менш, існують певні, обумовлені геномом межі властивостей цієї рослини, які бажано було б розширити у сучасному агровиробництві. В різноманітних сферах застосування кукурудзи – у харчуванні людини і тварин, медицині, ветеринарії, промисловому виробництві тощо виникає попит на кукурудзу, генотип якої міг би забезпечити їй надприродні властивості, такі як біосинтез і накопичення вторинних метаболітів для вакцинації людей і тварин, вироблення специфічних ферментів для стійкості до неприродних речовин, стійкість до новітніх хвороб та шкідників тощо. Якісно поліпшити геном рослинного організму через привнесення чужинних цільових генів здатна генетична інженерія, яка у кукурудзи веде свій початок з 80-х років 20-го сторіччя. В декількох оглядах детально розглянуто історію розвитку досліджень з генетичної трансформації кукурудзи, селективні, маркерні, репортерні та господарсько цінні гени, використані в цих роботах, проаналізовано переваги і недоліки різних органів і тканин кукурудзи як мішеней для привнесення чужинних генів, методи їхньої доставки в геном кукурудзи тощо [114, 123, 263, 277, 372, 381]. Результати багаторічних досліджень дозволили обрати ефективні стратегії, методи та об'єкти саме для виду *Z. mays* і у теперішній час роботи з генетичної інженерії кукурудзи найуспішніше проводяться методом біолістики, найбільш ефективним для злаків [274, 322, 326, 342], хоча в останні роки розвиток отримали і роботи з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [93, 253, 254, 263, 264, 298, 326, 393], а також трансформації *in planta* [94, 136, 137, 265]. Як об'єкт для перенесення чужинних генів методами біолістики і *Agrobacterium*-опосередкованої

трансформації найчастіше використовуються калусні культури, отримані на щитках незрілих зародків з наступною регенерацією трансгенних рослин [250, 278, 315].

Основними напрямками робіт з генетичної інженерії кукурудзи, в яких вже отримані практичні результати, є стійкість до гербіцидів [192, 203, 225, 226, 231, 354], інших абіотичних факторів [162, 280, 323, 347, 348], шкідників [175, 225], збільшення врожаю [373], підвищення якості зерна [165, 185, 214, 230, 234, 260, 386, 394], синтез антигенів до хвороб людини і тварин [235, 324], синтез ферментів для різних галузей промисловості [259].

В США у 2016 році генетично модифікована кукурудза займала 38,1 мільйона гектарів ріллі [158]. На 26.11.2017 в Європейському реєстрі генетично модифікованої їжі і кормів [218] зафіксовано 27 записів трансформаційних подій у кукурудзи, дійсних в тому числі до 2027 року, які містять відомі чужинні гени стійкості до шкідників *cry1(A)b*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *cry1F*, *cry3Bb1*, *cry1A.105*, *vip3Aa20*, гербіцидів *pat*, *cp4epsps*, *terpsps*, селективні і маркерні гени *pmi* та *nptII*. За даними Міжнародної служби з оцінки агробіотехнологій (ISAAA), яка надає відомості про реєстрацію ГМ-сортів сільськогосподарських культур не тільки в Європі, але і в інших країнах, на 26.11.2017 зареєстровано 231 трансгенну подію для кукурудзи у шести номінаціях: стійкість до абіотичних стресів, модифікація росту/врожайності, стійкість до гербіцидів, стійкість до комах, модифікована якість продукції та система контролю за запиленням. Ці трансгенні події окрім вище перелічених генів містять ген *cspB* протеїну холодового шоку В з геному *Bacillus subtilis* для забезпечення посухостійкості, ген *athb17* *Arabidopsis thaliana* для збільшення маси качана, ген *cordapA* дигидродипіколінатсинтази *Corynebacterium glutamicum* для інтенсифікації синтезу лізину, синтетичний ген *amy797E* *Thermococcales* spp., який кодує термостатичну амілазу, важливу у виробництві біоетанолу, ген *phyA2* фітази *Aspergillus niger* для покращення біодоступності заліза, гени *ms45* протеїну *ma45* і *zm-aa1* α -амілази *Z. mays*, ген *dam* аденінметилази *Escherichia coli*, ген

барнази *Bacillus amyloliquefaciens* для контролю стерильності пилку та деякі інші [244].

Наукові дослідження, які призвели до отримання ГМ-сортів кукурудзи, продовжуються за декількома напрямками. До них відносяться пошук нових генетичних джерел стійкості у зв'язку зі зниканням до *Bt*-протеїнів у шкідників кукурудзи [271, 310, 382], використання трансгенних форм кукурудзи в теоретичних дослідженнях з протеоміки [183, 357], дослідження з експресії білків патогенних мікроорганізмів, зокрема *Vibrio cholerae* і *E. coli*, в зернівках кукурудзи для створення їстівних та інших типів рослинних вакцин [272]. Проводяться роботи з перенесення генів капринхімозину бактерій і тютюну в геном кукурудзи для отримання більш дешевого та стабільнішого хімозину для використання в переробці молока [281]. Розробляються і зовсім нові підходи до модифікації геному кукурудзи, зокрема технологія геномного редагування CRISPR-Cas9 [356, 395], KASP [27].

В Україні роботи з генетичної трансформації кукурудзи проводяться на рівні лабораторних досліджень через нерозробленість підзаконних актів до Закону «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» [77] для регуляції питань вирощування генетично-модифікованих рослин у відкритих системах, реєстрації ГМ-сортів, продуктів і кормів, що містять генетично-модифіковані складники. Тем не менш, в дослідженнях з генетичної модифікації кукурудзи, виконаних в Україні, зокрема в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН, Інституті фізіології рослин та генетики НАН та ДУ Інститут зернових культур НААН, було виявлено вплив генотипу калусної тканини на ефективність введення Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* в клітини калусу, доведено успішність встроювання гена *nptII* в геном ліній Chi31, ДК675 та PLS61 [2, 134]. Проведено перші успішні досліді з біолістичної трансформації калусної тканини I і II типів з використанням генів *uidA* від *Escherichia coli* і *bar* від *Streptomyces*

hygroscopicus, з'ясовано селективні концентрації фосфінотрицину для калусної тканини та рослин-регенерантів [2, 7], показано різну компетентність генотипів кукурудзи до біолістичної трансформації, отримано перші трансформовані калуси та рослини-регенеранти покоління T₀ [102]. Методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано трансгенні калусні лінії з геном *CP4epsps* та відпрацьовано методику їхньої селекції на гліфосаті [103]. Проводяться роботи з отримання трансгенної кукурудзи методом *in planta* [15, 96, 136, 137].

Розвиток робіт з генетичної модифікації сільськогосподарських культур в Україні стримується звуженим набором генетичних конструкцій із чужинними генами. В нашій роботі використано один з небагатьох доступних вектор рАНС25 за [197], який містить сторонні для кукурудзи гени *uidA* та *bar*. Ген *uidA* кодує β-глюкуронідазу *E. coli* і найчастіше використовується як маркерний. Ген *bar* з геному *S. hygroscopicus* кодує фермент фосфінотрицинацетилтрансферазу. Перенесення гена *bar* в геном рослин надає їм стійкості до гербіциду «Баста»TM. «Баста»TM представляє собою гербіцид контактної дії, діючою речовиною якого є глюфосинат амонію. Глюфосинат амонію представляє собою еквімолярну, рацемічну суміш D- і L-ізомерів фосфінотрицину. L-ізомер фосфінотрицину є структурним аналогом глутамату. В рослинах фермент глутамінсинтетаза за присутності АТФ каталізує утворення глутаміну з глутамату і аміаку, що призводить до знешкодження аміаку в тканинах рослин. Фосфінотрицин блокує роботу глутамінсинтетази через конкурентне інгібування. При інгібуванні глутамінсинтетази загибель клітин настає через токсичне накопичення аміаку. Фермент фосфінотрицинацетилтрансфераза, який кодує ген *bar*, ацетилює фосфінотрицин, що робить його неактивним стосовно зв'язування з глутамінсинтетазою рослинних клітин. Таким чином, рослини, які модифіковані геном *bar*, стають стійкими до фосфінотрицину (гербіциду «Баста»TM [123, 124, 203].

Загалом, в роботах з генетичної трансформації кукурудзи, які проводяться в Україні, дослідники намагаються використовувати модельні лінії Chi31, PLS61, лінії вітчизняної селекції з Дніпровської селекційної програми та їхні гібриди. Основним висновком стосовно вихідного матеріалу є встановлений факт залежності успіху трансформації від генотипу та переважне використання модельних ліній. Дослідження ефективності генетичної трансформації по окремим зародковим плазмам не проводилося, порівняння використання ліній і гібридів в генетичній трансформації кукурудзи виконувалося фрагментарно. Отримання поколінь рослин-трансформантів від самозапилення, дослідження їхніх морфобіологічних особливостей та успадкування трансгенів за результатами ПЛР, їхнє порівняння з успадкуванням фенотипового прояву трансгенів у поколіннях трансформантів не проводилося.

1.4. Висновки до розділу 1

Аналітичний огляд літературних джерел за темою дисертаційної роботи дозволив встановити ступінь дослідженості генотипів кукурудзи як об'єкта біотехнології та дозволяє зробити наступне узагальнення.

1. Успіх біотехнологічного процесу у кукурудзи суттєво залежить від генотипу рослини і потребує диференційованого підходу як до окремих генотипів, так і філогенетично споріднених груп генотипів, зокрема основних типів зародкової плазми.

2. Дослідження біотехнологічного потенціалу, зокрема молекулярно-генетичних характеристик, клітинно- і генетично-інженерних особливостей селекційно перспективних типів зародкової плазми кукурудзи, стають актуальним завданням біотехнологічного супроводження селекційного процесу та потенційним інструментом підвищення його ефективності.

3. Не дивлячись на широке використання молекулярно-генетичних маркерів в паспортизації та реєстрації генотипів, оцінці поліморфізму,

дослідження алельного стану маркерів, специфічного для зародкових плазм кукурудзи, порівняння різних плазм за алельним станом SNP-маркерів проводилося фрагментарно. З поширенням у сучасній селекції кукурудзи визначених гетерозисних моделей, молекулярно-генетична характеристика ліній за типом зародкової плазми стає вкрай актуальною.

4. Технології калусогенезу і регенерації рослин лежать в основі отримання таких біотехнологічних продуктів як калуси, соматичні зародки, рослини-регенеранти, соматклони, складають базу для робіт з генетичної трансформації методами біолістики і *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Такі технології для окремих зародкових плазм кукурудзи розроблені недостатньо. Калусогенний та регенераційний потенціал зародкової плазми Ланкастер досліджено фрагментарно, існуючі технології калусогенезу і регенерації потребують оптимізації безпосередньо для плазми Ланкастер.

5. Успішні роботи з генетичної інженерії у світі виконано на зарубіжних генотипах, а розроблені технології мають бути адаптовані до вихідного матеріалу вітчизняної селекції. Розробки з генетичної інженерії кукурудзи здебільшого проводяться на модельних генотипах, а можливість генетичної модифікації генотипів селекційно перспективної плазми Ланкастер не вивчалася.

У зв'язку з актуальністю біотехнологічних досліджень на рівні споріднених груп генотипів усередині виду та нерозробленістю їхніх біотехнологічних характеристик метою роботи була характеристика біотехнологічного потенціалу зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні задачі дослідження.

1.Провести генотипування за маркерами одонуклеотидного поліморфізму ліній плазми Ланкастер та ліній інших зародкових плазм кукурудзи.

2. Провести порівняльний аналіз результатів SNP-генотипування представників різних зародкових плазм 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 чужинними генами *uidA* і *bar* на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер методом біолістики.
7. Дослідити наявність трансгенів та морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи в поколіннях від самозапилення.
8. Отримати трансгенні гербіцидостійкі інбредні лінії кукурудзи на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна схема та організація дослідження

Експериментальні дослідження та аналіз отриманих даних проводили за загальною схемою, представленою на рисунку 2.1.

Згідно із загальною схемою досліджень для молекулярно-генетичної характеристики плазми Ланкастер у кукурудзи проводили SNP-генотипування ліній цієї плазми і ліній інших, неланкастерівських, плазм, складали SNP-паспорти проаналізованих ліній, розраховували та оцінювали параметри репрезентативності та інформативності використаних SNP-маркерів та параметри одонуклеотидного поліморфізму проаналізованих ліній. Далі за допомогою алгоритмів принципового компонентного аналізу, методів кластеризації, аналізу генетичної структури ліній, дисперсійного аналізу встановлювали в загальному масиві проаналізованих ліній наявність відокремлених груп та визначали статус ліній виявлених груп за педігрі. На наступному етапі проводили ідентифікацію алелів SNP-маркерів, специфічних саме для плазми Ланкастер, а також рідкісних, пропущених і унікальних SNP-алелів. SNP-характеристику плазми Ланкастер складали також за частотами мажорних і мінорних алелів, показником генного різноманіття ліній, генетичними дистанціями між лініями, спорідненістю ліній; оцінювали варіювання перелічених показників та порівнювали з аналогічними показниками у ліній неланкастерівських плазм. Проводили оцінку генетичної різноманітності та кластеризацію ліній усередині плазми Ланкастер та відносно типових представників цієї плазми – ліній Mo17 та Oh43. Окремо за алельним станом SNP-маркерів характеризували лінії плазми Ланкастер, які були обрані для подальших клітинно-інженерних досліджень в культурі *in vitro*, через визначення ступеня їхньої спорідненості до Mo17, Oh43 та ліній-стандартів чутливості в культурі *in vitro*.



Рис.2.1. Загальна схема дослідження

Для клітинно-інженерної характеристики плазми Ланкастер проводили оцінку калусогенного та регенераційного потенціалу *in vitro* у ліній плазми Ланкастер проти ліній-стандартів високої чутливості *in vitro* A188, Chi31 і PLS61 однойменних зародкових плазм. До характеристики також включали ступінь варіювання показників калусогенезу та регенерації рослин за зміни екологічних умов, в яких реалізується ознака, як на етапі *in vivo* (вирощування донорних рослин в різні календарні роки), так і на етапі *in vitro* (варіювання складу живильних середовищ). Проводили ідентифікацію генотипів Ланкастер, які виявляють високі і одночасно стабільні значення показників калусогенезу та регенерації.

Для генетично-інженерної характеристики плазми Ланкастер у кукурудзи оцінювали здатність до біолістичної трансформації калусної тканини генотипів Ланкастер вектором рАНС25 з чужорідними генами *uidA* і *bar*. Зокрема, проводили оцінку впливу процедури біолістичної трансформації на інтенсивність калусогенезу і регенерації, молекулярно-генетичний аналіз калусів та рослин-трансформантів в поколіннях T₀-T₆, вирощування та тестування рослин-трансформантів в поколіннях T₀-T₆ на селективному фоні для отримання генетично модифікованих ліній зародкової плазми Ланкастер.

Основний обсяг експериментальних досліджень виконано на базі лабораторії біотехнології ДУ Інститут зернових культур Національної академії аграрних наук України (м. Дніпро). Дослідження однонуклеотидного поліморфізму ДНК проведено на базі фірми BioDiagnostics Inc. (США). Вирощування донорних рослин та потомства рослин-регенерантів у ґрунті вели у Дослідному господарстві «Дніпро» ДУ ІЗК НААН (Дніпропетровська область). Експерименти з біолістичної трансформації виконано на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України спільно з к.б.н. Б. В. Моргуном та к.б.н. І. О. Нітовською згідно з Угодами про співробітництво та організацію взаємовідносин №1 від 18.05.2012 р. та №2 від 21.05.2014 р. між Державною установою Інститут зернових культур НААН України та Інститутом клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

2.2. Матеріал дослідження

Матеріалом для дослідження слугували інбредні лінії та гібриди F_1 кукурудзи (*Zea mays* L.), які відносяться до зубоподібного, напівзубоподібного, кременистого підвидів і, частково, підвидів цукрової та розлусної кукурудзи. Насіння всіх ліній отримано шляхом інбридингу, а насіння гібридів F_1 – шляхом гібридизації двох ліній. Приналежність генотипів до певного типу зародкової плазми визначалася за даними педігрі. Насіння ліній і частини гібридів кукурудзи було отримано від Відділу селекції і насінництва зернових культур Державної установи Інститут зернових культур НААН. Розмноження ліній шляхом контрольованого самозапилення та гібридизацію з отриманням частини гібридів F_1 проведено власноруч в польових умовах.

Для молекулярно-генетичної характеристики плазми Ланкастер шляхом SNP-генотипування (розділ 3) використовували масив з 91 лінії (табл. 2.1). Цей масив складався з двох груп: 1) лінії, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер (в тексті дисертації позначені як L-лінії); 2) лінії, які за педігрі відносяться до інших, неланкастерівських, плазм (позначені як NL-лінії). Перша група включала 31 лінію, серед яких дві широковідомі лінії плазми Ланкастер Mo17 та Oh43 – типові представники основних однойменних підплазм, та 29 перспективних ліній плазми Ланкастер, створені у північній підзоні Степу України в рамках Дніпровської селекційної програми. Друга група вміщувала 60 ліній неланкастерівських плазм, зокрема 23 лінії плазми Айодент, 15 ліній плазми Рейд (BSSS) (надалі – Рейд), 7 ліній плазми Лакон (Європейська кремениста) (надалі – Лакон), 1 лінію плазми A188, 1 лінію плазми Chi31, 1 лінію плазми PLS61, 12 ліній плазми Мікс. Лінії другої групи також вміщували як класичні широковідомі лінії, так і сучасні перспективні лінії.

Таблиця 2.1

Лінії кукурудзи, використані для SNP-генотипування

Лінії, які за педігрі відносяться до плазми Ланкастер (L)					
1	2	3	4	5	6
1	Mo17	12	ДК534зСзМ	23	ДК4263
2	Oh43	13	ДК633	24	ДК6080
3	ДК117зСМВ	14	ДК1129	25	ДК6337зСзМ
4	ДК212	15	ДК2668	26	ДК6342
5	ДК231зС	16	ДК2953зСзМ	27	ДК8143
6	ДК267	17	ДК2965зСзМ	28	ДК633266
7	ДК296МВ	18	ДК2980зСМВ	29	ДК633325
8	ДК298	19	ДК3023зСзМ	30	ДКВ3451
9	ДК366М	20	ДК3044	31	ДКД9053
10	ДК427	21	ДК3070		
11	ДК517МВ	22	ДК3626		
Лінії, які за педігрі відносяться до неланкастерівських плазм (NL)					
Лінії плазми Айодент					
32	ДК236СВ	40	ДК772	48	ДК4074
33	ДК257	41	ДК772М	49	ДК7431
34	ДК301СВзМ	42	ДК2061СВзМ	50	ДК7443
35	ДК315СВзМ	43	ДК2064СВзМ	51	ДК7446
36	ДК411М	44	ДК2579СВзМ	52	ДК7736
37	ДК710	45	ДК2777	53	ДКВ3151М
38	ДК721	46	ДК3016	54	ДКД2725СВзМ
39	ДК744М	47	ДК3641		
Лінії плазми Рейд					
55	ВР731	60	ДК2323МВ	65	ДК3902
56	ДК232МВ	61	ДК2346	66	ДК8213
57	ДК239МВ	62	ДК2377зМ	67	В14

Продовження табл. 2.1

1	2	3	4	5	6
58	ДК367зС	63	ДК2396	68	В37
59	ДК377С	64	ДК3642	69	В73
Лінії плазми Лакон					
70	ДК2	73	ДК272зС	76	F2
71	ДК200зСзМ	74	ДК273МВ		
72	ДК270	75	ДК3527		
Лінії плазм А188, Chi31, PLS61					
77	А188	78	Chi31	79	PLS61
Лінії плазми Мікс					
80	ДК233МВ	84	ДК3983	88	ДК5002СВзМ
81	ДК281МВ	85	ДК4169	89	МС1294
82	ДК2285СВзМ	86	ДК4315СВ	90	МС4169
83	ДК2831СВ	87	ДК4402	91	МС4456

Визначення ступеня гетерозиготності за SNP-маркерами гібридів F_1 проводили для п'яти гібридів, а саме ДК744М×ДК2323МВ, ДК721×ДК239МВ, ДКВ3151М×ДКВ3451, ДК772М×ДК6080МВ, ДК772×МС2380 та їхніх батьківських ліній.

Для клітинно-інженерної характеристики плазми Ланкастер в культурі *in vitro* (розділ 4) як матеріал використовували:

– десять сучасних ліній кукурудзи плазми Ланкастер (ДК212, ДК236, ДК267, ДК298, ДК420-1, ДК633, ДК3070, ДК6080, ДК633266, ДК633325). Всі ці лінії в своєму родоводі містили типових представників плазми Ланкастер – лінії Мо17 та/або Oh43, а деякі – і генетичний матеріал інших зародкових плазм (табл.2.2). Так, лінія ДК633 відноситься до підплазми *Мо17*; лінії ДК212, ДК267, ДК420-1 та ДК6080 – до підплазми *Oh43*; лінії ДК298 та ДК633266 мають родоводи, в яких присутні і *Мо17*, і *Oh43* (в тексті дисертації позначені як група *Мо17/Oh43*), а ДК236, ДК3070 та ДК633325 в

родоводах містять *Mo17* і представників інших плазм (позначені як група *Mo17mix*);

- лінії-стандарти високої чутливості в культурі *in vitro* A188, Chi31 та PLS61 однойменних зародкових плазм;
- прямі та зворотні гібриди F_1 між десятьма переліченими вище лініями плазми Ланкастер;
- прямі та зворотні гібриди F_1 між десятьма переліченими вище лініями плазми Ланкастер та лініями-стандартами A188, Chi31 і PLS61.

Таблиця 2.2

Походження сучасних ліній плазми Ланкастер, обраних для досліджень
в культурі *in vitro*

№ зп	Сучасна лінія плазми Ланкастер	Вихідні генотипи	№ зп	Сучасна лінія плазми Ланкастер	Вихідні генотипи
1	ДК633	Mo17	6	ДК298	Mo17/Oh43
2	ДК212	Oh43	7	ДК633266	
3	ДК267		8	ДК236	Mo17/F2
4	ДК420-1		9	ДК3070	Mo17/O2
5	ДК6080		10	ДК633325	Mo17/Мінд- зенпуста

В розділі, присвяченому генетично-інженерній характеристиці плазми Ланкастер (розділ 5), як матеріал використовували лінії кукурудзи плазми Ланкастер ДК267, ДК298, ДК633266, а також лінії ДК959 (плазма Лакон), RS15 (плазма Su_1 підвиду цукрової кукурудзи), PLS61 (плазма PLS61). Окрім ліній до генетичної трансформації були залучені прямі і зворотні гібриди F_1 ДК633266хPLS61, ДК959хPLS61, а також гібриди F_1 PLS61хКП7, ПРЖ5хКП7, ДК267хPLS61 і ДК959хДК232 (лінія ДК232 відноситься до плазми Рейд, лінії КП7 та ПРЖ5 – до плазми Рисова підвиду розлусної кукурудзи).

2.3. Методика дослідження

Методика аналізу однонуклеотидного поліморфізму ДНК кукурудзи за SNP-маркерами (розділ 3). В SNP-генотипуванні ліній кукурудзи використано панель BDI-III, яка містить 384 SNP-маркери. Дана панель розроблена фірмою BioDiagnostics, Inc. (США) на основі Illumina VeraCode Bead Plate [187]. Маркери даної панелі були обрані *in silico* за результатами аналізу 95 комерційних інбредних ліній селекції США, є біалельними, розташовуються на всіх 10 хромосомах і мають ранг конструктивності (designability rank score) $>0,6$ при можливому діапазоні 0–1 [18, 369]. Ранг конструктивності $>0,6$ забезпечує ефективне використання SNP-маркерів в GoldenGate тестуванні. SNP-маркери панелі BDI-III позначаються як BDI-III-1, BDI-III-10, BDI-III-100, BDI-III-101, BDI-III-102, ... BDI-III-99.

SNP-генотипування ліній кукурудзи шляхом аналізу однонуклеотидного поліморфізму ДНК за SNP-маркерами проводили з використанням GoldenGate тесту та системи зчитування результатів Illumina VeraCode [221, 261, 262, 369] на базі фірми BioDiagnostics, Inc. (США).

Для кожного зразка за методом середньої проби відбирали по 10 насінин і пророщували їх на фільтрувальному папері при температурі 26°C у темряві. З отриманих 7-добових пагонів виділяли ДНК за ЦТАБ-методом [129]. Виділена ДНК наносилася на матрицю Sentrix array matrice (SAM) ємністю у 96 зразків, з яких 94 представляли собою ДНК досліджуваних ліній, 2 – негативний контроль (вода). SNP-генотипування зразків ДНК, закріплених на матриці SAM, з використанням GoldenGate тесту проведено в повністю автоматизованому режимі на обладнанні Illumina BeadStation 500 G (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), укомплектованому пристроєм BeadReader для детекції з використанням флуоресцентних міток. Аналіз результатів флюоресценції вели за допомогою Illumina BeadStation Genome Studio Software. SNP-генотипування та визначення сигналу флюоресценції для

кожної лінії проводилося у 30-разовій повторності по кожному маркеру. Детекція флюоресценції нижче 0,25 не враховувалася і розглядалася як відсутність сигналу.

Первинні дані SNP-генотипування для кожного генотипу по кожному маркеру представляються як запис двох дезоксирибонуклеотидів, тобто вказується тип дезоксирибонуклеотиду в кожному з двох гомологічних сайтів гомологічних хромосом, де розташований SNP-маркер. В таблицях результатів назви дезоксирибонуклеотидів подано за скороченими назвами азотистих основ.

Визначення репрезентативності та інформативності використаних SNP-маркерів в наборі досліджуваних ліній проводили за такими показниками як частота пропущених даних за маркером i (%), частота мономорфних/диморфних маркерів в даному наборі ліній (%), частота мажорного/мінорного (MAF) алелів за маркером i в даному наборі ліній (частка одиниці), показник зсуву генного різноманіття маркера i в даному наборі ліній (частка одиниці), індекс інформативності маркера i в даному наборі ліній (PIC) (частка одиниці). SNP-характеристику окремих ліній і груп ліній для використаного набору маркерів вели за ступенем гомозиготності (%), гетерозиготності (%), показником генного різноманіття лінії (частка одиниці), розміром попарних генетичних дистанцій між лініями (частка одиниці), спорідненістю ліній (%). Визначення перелічених показників, способи їхніх розрахунків та потенційно можливі діапазони коливань за [188, 285] наведено в таблицях А.1-А.2 додатку А.

Методику ідентифікації алельного стану SNP-маркерів, специфічного для ліній плазми Ланкастер, представлено в розділі 3.

Методика дослідження калусогенезу та регенерації в культурі *in vitro* (розділ 4). Основним методом, використаним при клітинно-інженерній характеристиці плазми Ланкастер за калусогенною та регенераційною здатністю, був метод культури клітин, тканин і органів *in vitro* [22, 89].

Для отримання калусної тканини використовували незрілі зародки визначеного генотипу, ізольовані з донорних рослин. Донорні рослини кукурудзи вирощували в польових умовах у 2010-2012 рр. за методиками [35, 92, 140]. Розмноження ліній проводили шляхом штучного контрольованого самозапилення після ізоляції чоловічих і жіночих суцвіть паперовими ізоляторами. Для одержання насіння гібридів F_1 також ізолювали чоловічі і жіночі суцвіття материнської та батьківської форм, а потім проводили гібридизацію шляхом контрольованого перехресного запилення за [33, 73].

Як експланти для ініціації калусної тканини використовували ізольовані незрілі зародки кукурудзи довжиною 1-1,5 мм, отримані залежно від генотипу на 10-12-ту добу від запилення. До експлантації залучали незрілі зародки тільки з центральної частини качана. Стерилізацію качанів та ізоляцію незрілих зародків проводили за [104]. На варіант дослідження висаджували незрілі зародки з качанів п'яти-десяти донорних рослин.

Основним середовищем для індукції калусогенезу та субкультивування було модифіковане середовище N_6 за [198] з 30 г/л сахарози (позначено як N_630) та 60 г/л сахарози (N_660). Для індукції регенерації як базове використовували середовище MS за [296] з 20 г/л сахарози ($MS20$). Для дорошування і укорінення рослин-регенерантів використовували середовище з половинною концентрацією макро-, мікросолей MS і 5,5 г/л агару (середовище $\frac{1}{2}MS$). Ці основні середовища були модифіковані залежно від цілей і задач конкретних експериментів. Детально склад використаних в роботі живильних середовищ наведено у таблицях А.3-А.4. Середовища автоклавували під тиском 0,7-0,8 атм. протягом 40 хвилин, термолабільні компоненти стерилізували методом холодної стерилізації за допомогою фільтрів Millipore з діаметром отворів 0,22 μ .

Ізольовані незрілі зародки експлантували на живильне середовище щитком догори в чашки Петрі діаметром 90 мм, регенеранти пересаджували в культуральні склянки висотою 200 мм. При субкультивуванні калусної тканини використовували середовища того ж складу, що і для ініціації

калусогенезу, окрім спеціально зазначених випадків. Тривалість пасажу при підтриманні калусної тканини складала 14-30 діб залежно від інтенсивності її росту. Індукцію калусогенезу і субкультивування калусної тканини проводили при температурі 25-27°C у темряві. Регенерація рослин проходила при тій же температурі і 16-годинному фотоперіоді за інтенсивності освітлення 2000-5000 люкс.

Кількість незрілих зародків, висаджених на середовище для індукції калусогенезу N₆₃₀, залежно від генотипу лінії коливалася у межах 186-534 штук у 2010 р., 36-264 штук у 2011 р. та 82-513 штук у 2012 р. Дослідження з оцінки впливу складу мінеральної основи середовища індукції на ефективність калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер проводили в 2012 р., кількість незрілих зародків, висаджених на середовища для індукції калусогенезу, коливалася у межах 82-513 штук для середовища з N₆₃₀, та 10-100 штук для середовища MS30 залежно від лінії. Дослідження з впливу сахарози (у концентраціях 30 і 60 г/л) на індукцію калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер проводили в 2011 р., кількість незрілих зародків, висаджених на середовища для індукції калусогенезу, коливалася у межах 36-264 штук для N₆₃₀ та 120-430 штук для N₆₆₀ залежно від лінії.

Дослідження з впливу цефотаксиму на індукцію калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер проводили в 2011 р., кількість незрілих зародків, висаджених на середовища для індукції калусогенезу, коливалася у межах 120-309 штук для контрольного середовища без цефотаксиму, 73-197 штук для середовища з 150 мг/л цефотаксиму та 75-201 штук для середовища з 300 мг/л цефотаксиму залежно від генотипу ліній. Кількість калусів, висаджених на середовище для субкультивування з 150 мг/л цефотаксиму, була у межах 50-197 штук, з 300 мг/л цефотаксиму – 50-201 штук та 36-183 штук для контрольного середовища без цефотаксиму залежно від генотипу ліній. Кількість калусів, висаджених на регенераційні середовища, у ліній коливалася у межах 5-80, залежно від генотипу і варіанту досліду.

Дослідження з вивчення калусогенної здатності гібридів F_1 проводили у 2011 р. Кількість незрілих зародків гібридів F_1 , висаджених на середовище для індукції калусогенезу, коливалася залежно від генотипу у діапазоні від 44 до 363 штук; на середовище для регенерації висаджували по 8-179 штук калусів. Дослідження впливу ІМК у певних концентраціях на регенераційну здатність гібридів проводили у 2012 р., кількість висаджених на середовище для регенерації калусів залежно від генотипу коливалася у межах 15-70 штук.

Аналіз індукції калусогенезу проводили через 30 діб від експлантації незрілих зародків. Реєстрували такі показники як загальна частота калусогенезу (%), частота утворення морфогенних калусів (%), частоти утворення калусів I і II типів (%). При субкультивуванні калусів визначали такий показник як частота збереження калусів II типу (%) (на 120-у добу культивування). За необхідності реєстрували питому сиру масу калусів II типу, отриманих на 60-у добу субкультивування (мг). При аналізі регенерації рослин на 30-у добу культивування на середовищі для індукції регенерації визначали такі показники як загальна частота регенерації (%) та ефективна частота регенерації (%). Частоту органогенезу (%), частоту ембріодогенезу (%) та кількість рослин-регенерантів на 100 культивованих калусів (позначено як $R/100Ca$, шт./100 калусів) реєстрували починаючи з 30-ої доби культивування на середовищі для регенерації і до вичерпання регенераційного потенціалу калусу. Через 14 діб після перенесення рослин покоління R_0 у ґрунт (чорнозем:пісок, 4:1) в умови *in vivo* визначали приживаність рослин-регенерантів у ґрунті (%). Стан рослин-регенерантів R_0 на момент перенесення у ґрунт оцінювали за 5-бальною шкалою: 1 бал відповідав довжині пагона до 5 см, 2 бали – 6-10 см, 3 бали – 11-20 см, 4 бали – 21-30 см, 5 балів – більше 30 см. Після закінчення вегетації визначали виживаність рослин-регенерантів R_0 (%). Визначення перелічених показників та способи їхнього розрахунку наведено в таблиці А.5.

Гіпотетичний гетерозис за ознаками «частота утворення калусів I типу» і «частота утворення калусів II типу» визначали як процентне відношення

перевищення значень показника відповідної ознаки у гібрида F_1 до середнього значення показника у батьківських ліній. Істинний гетерозис за тими ж ознаками визначали як процентне відношення перевищення значень показника відповідної ознаки у гібрида F_1 до значення показника кращої батьківської лінії [113, 251].

Методика проведення генетично-інженерних досліджень шляхом біолістичної трансформації (розділ 5). Генетичну трансформацію проводили шляхом біолістичної обробки калусів, які утворилися на щитках незрілих зародків, на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України. Для цього ізольовані незрілі зародки довжиною 1,0-1,5 мм експлантували *in vitro* щитком догори на живильне середовище для індукції калусогенезу Б1 (табл. А.6). Це середовище представляло собою модифіковане середовище для індукції калусогенезу N_630 , в якому концентрацію сахарози було зменшено до 20 г/л та додано 0,5 мг/л дикамбі. Через 10-20 діб молоді калуси, що утворилися на щитках незрілих зародків, піддавали біолістичній трансформації.

Для трансформації використовували вектор рАНС25 [197], який містив ген β -глюкуронідази *E. coli* (*uidA*) та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *S. hygrosopicus* (*bar*), обидва під контролем промотору гена убіквітину кукурудзи (рис. 2.2).

Абсорбцію плазмідної ДНК на мікроносії виконували за [23]. Біолістичну обробку проводили за допомогою модифікованої гармати типу particle inflow gun (PIG) [224] за тиску гелію 118 psi, зменшення тиску у камері гармати до 1 psi та відстані від макроносія з металевими частинками до рослинного матеріалу у 19 см. Підготовку рослинного матеріалу до трансформації та подальше культивування проводили за [102]. Зокрема, за чотири години до початку обстрілу зародки з калусною тканиною викладали у вигляді кола діаметром близько 3 см на живильне середовище Б1+0,3 М манітолу для запобігання осмотичному шоку клітин під час пошкодження їх мікрочастинками. За добу після обстрілу зародки з калусною тканиною

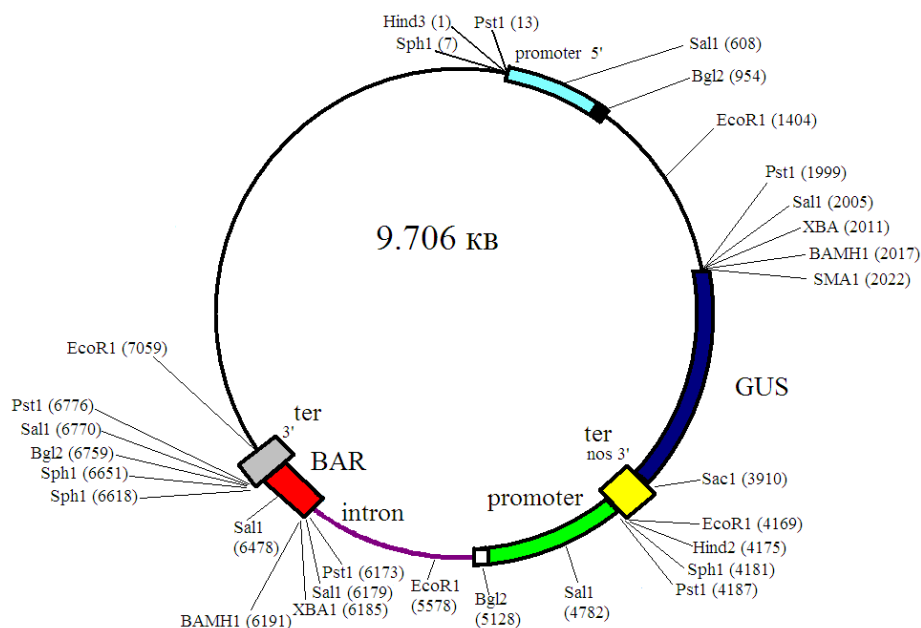


Рис. 2.2. Вектор рАНС25 за [197]

знову переносили на середовище Б1 (без манітолу). Кількість експлантів, яку обробляли одним пострілом, становила від 15 до 35 залежно від розмірів калусів.

Через 5-6 діб після біолістичної обробки рослинний матеріал переносили на селективне середовище для калусогенезу Б2 (табл. А.6), яке містило як селективний агент 10 мг/л фосфінотрицину та не вміщувало гідролізат казеїну, і вирощували у темряві при 27°C. Контрольні калуси культивували на середовищі Б1. Субкультивування калусів на свіжі середовища того ж складу проводили кожні два тижні. Для індукції регенерації калуси переносили на середовища Б3 (табл. А.6) та Б3+5 мг/л фосфінотрицину. З наступного пасажу з середовищ для індукції регенерації вилучали AgNO_3 та 2,4-Д, концентрацію БАП збільшували до 0,25 мг/л.

Частоту утворення морфогенних калусів в дослідях з генетичної трансформації визначали на 30-у добу після біолістичної обробки, а загальну частоту регенерації рослин – на 60-у добу від біолістичної обробки. Для визначення питомого приросту сирої маси калусів II типу після біолістичної обробки використовували калуси після 90 діб субкультивування у темряві на контрольному Б4 та селективному середовищі Б4+5 мг/л фосфінотрицину

(табл. А.6). Для кожного варіанту цього дослідження визначали вихідну сирю масу кожного окремого калусу з добірки у 25-126 штук залежно від варіанту та сирю масу того ж самого калусу через 90 діб культивування. Питомий приріст калусів II типу (мг) розраховували як відношення середньої різниці між сирою масою калусів через 90 діб культивування та вихідною сирою масою тих самих калусів до загальної кількості проаналізованих калусів.

Сформовані калусною тканиною рослини-регенеранти (покоління T_0) висаджували в біологічні склянки на безгормональне середовище Б5 (табл. А.6) і культивували при 26°C, 16-годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 2000-5000 люкс для дорошування та укорінення. Рослини-регенеранти T_0 з біологічних склянок пересаджували в пакети з ґрунтом (чорнозем:пісок, 4:1), а після приживлення – у вегетаційні посудини з об'ємом ґрунту 20 дм³. Вирощували рослини T_0 у ґрунті також при 26°C, 16-годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 5000-10000 люкс. В період квітання волоті і качани рослин T_0 ізолювали паперовими ізоляторами. Рослини T_0 самозапилювали або, при неможливості провести самозапилення, схрещували з рослинами вихідного генотипу. Насіння з рослин T_0 , що містило зародки покоління T_1 , збирали у фазі повної стиглості. Насіння із зародками поколінь T_1 - T_6 висівали в ґрунтові криті теплиці та вирощували за загально прийнятою методикою вирощування кукурудзи у закритому ґрунті [133]. Розмноження рослин T_1 - T_6 проводили шляхом контрольованого самозапилення після ізоляції волотей і качанів. Рослини поколінь T_2 - T_6 у фазі сходів випробовували на стійкість до фосфінотрицину на селективному фоні. Селективний фон створювали шляхом обприскування сходів розчином гербіциду «Баста»TM в концентрації 1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин. Спостереження за реакцією контрольних та дослідних рослин проводили через 20 діб після обробки гербіцидом та у фазі повної стиглості зерна. Для визначення ступеня ураження рослин через 2-3 тижні після обробки гербіцидом «Баста»TM використовували 5-бальну шкалу: 0 балів – загибель рослин; 1 бал – рослина сильно уражена, пожовкла на більш

як 75%, але жива впродовж 2-3 тижнів після обробки; 2 бали – рослина поживкла на 50-75%; 3 бали – рослина поживкла менш, ніж на 50%; 4 бали – кінчики листочків рослини поживкли, але на загальний стан рослини це не вплинуло; 5 балів – рослини вижили, поживклих ділянок на рослинах не виявлено. Інші методичні особливості вирощування, спостережень та тестування рослин-трансформантів поколінь T₂-T₆ подано в розділі 5.

З метою виявлення транзійтної експресії гена *uidA* проводили гістохімічний аналіз активності β-глюкуронідази в калусах через чотири доби після обстрілу та в листках рослин-регенерантів за [266], оцінюючи частоту транзійтної експресії гена *uidA* (%) (табл. А.7).

Наявність гена *bar* в ДНК калусів, рослин-регенерантів та їхнього потомства встановлювали методом полімеразної ланцюгової реакції за [353] з використанням праймерів: *bar1f1* (форвардний) 5'-ACATCGAGACAAGCACGGTC-3' та *bar1r2* (реверсний) 5'-GCCAGAAACCCACGTCATGC-3'. Продукти реакції фракціонували в 1% агарозному гелі з бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) у трис-боратній буферній системі при 8 В/см протягом 90 хв. Довжина очікуваного фрагмента – 411 п.н. Як негативний контроль використовували пробу без ДНК, але з усіма іншими компонентами ПЛР-суміші, та ДНК калусів кукурудзи, які не піддавалися біолістичній трансформації. Як позитивний контроль використовували ДНК генетично трансформованих за геном *bar* тютюну і кукурудзи.

З метою оцінки ефективності трансформації визначали такі показники як частота трансформованих калусів (ЧТ1, %), частота фосфінотрицинстійких калусів (ЧТ2, %), частота фосфінотрицинстійких рослин-регенерантів T₀ (ЧТ3, рослин/100 калусів), частота виживаності на гербіцидному фоні рослин, отриманих в поколіннях від самозапилення T₂-T₆ після біолістичної трансформації вихідного генотипу (ЧВ, %). Визначення перелічених показників, способи їхнього розрахунку наведено в таблиці А.7.

Статистичний аналіз експериментальних даних включав аналіз варіаційного ряду, дисперсійний аналіз, двовимірний принциповий компонентний аналіз, якісний і кількісний кластерний аналіз за [12, 74, 90, 112, 129, 154, 190, 241, 374].

Дані в таблицях представлені у вигляді $\bar{x} \pm \Delta$, де $\bar{x}$ – середнє арифметичне значення показника, Δ – довірчий інтервал, розрахований як $\Delta = m \cdot t_{0,05}$, де m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – критерій Стюдента за рівня значущості 0,05. В окремих випадках були прийняті рівні значущості 0,01 та 0,001, про що зазначено у описах відповідних експериментів. Сила впливу фактора в таблицях дисперсійного аналізу представлена у вигляді $\eta^2 \pm \Delta_{\eta^2}$, де η^2 – показник сили впливу фактора, Δ – довірчий інтервал, розрахований як $\Delta = m \cdot F_{0,05}$, де m – похибка показника сили впливу, $F_{0,05}$ – коефіцієнт Фішера за рівня значущості 0,05, окрім окремо зазначених випадків. Перевірку гіпотез стосовно достовірності порушення співвідношення частот мажорного і мінорного алелів SNP-маркерів проводили за критерієм χ^2 [90, 374].

Для розрахунку генетичних SNP-дистанцій використовували програму Tassel [314]. Двовимірний принциповий компонентний аналіз проводили за попарними генетичними SNP-дистанціями, без обертання, за допомогою програми Statistical0 згідно з [154, 190, 241]. Якісний кластерний аналіз провели шляхом побудови дендрограм за методом повного зв'язку [21, 129, 189] за попарними генетичними SNP-дистанціями між лініями з використанням програми Statistical0. Кількісний кластерний аналіз алельного стану SNP-маркерів у ліній досліджуваного масиву (аналіз генетичної структури лінії) проводили за комп'ютерною програмою Structure [10, 219, 220, 320, 321].

Правопис україномовних термінів подано згідно зі спеціалізованими словниками біологічної термінології [24, 32].

РОЗДІЛ 3

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

Метою досліджень, представлених у даному розділі, є складання геномної характеристики певного типу зародкової плазми кукурудзи безпосередньо за набором дезоксирибонуклеотидів, зокрема за тими з них, які слугують маркерами однонуклеотидного поліморфізму ДНК.

У розділі 3 наводяться результати SNP-генотипування масиву ліній, в якому представлені основні типи зародкової плазми кукурудзи. Проведено ідентифікацію ліній плазми Ланкастер серед інших типів плазм за специфічним алельним станом SNP-маркерів з використанням принципового компонентного аналізу, аналізу генетичної структури ліній за програмою Structure, кластерного аналізу за методом повного зв'язку і дисперсійного аналізу. Ідентифіковано специфічний гаплотип зародкової плазми Ланкастер як сполучення специфічних алельних варіантів певних SNP-маркерів та оцінено частку генетичної варіабельності, яку він охоплює. Визначено ступінь спорідненості та різноманіття ліній усередині плазми Ланкастер та надано SNP-характеристику ліній, які у подальшому використано для визначення здатності даного типу плазми до калусогенезу, регенерації *in vitro* та інших клітинно- і генетично-інженерних біотехнологічних процесів.

3.1. Генотипування ліній кукурудзи за SNP-маркерами

Генотипування за 384 SNP-маркерами панелі BDI-III було виконано для 91 лінії кукурудзи, куди увійшли 29 ліній з Дніпровської селекційної програми, які за даними педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, типові представники цієї плазми – широковідомі лінії Mo17 та Oh43 та 60 ліній, які за педігрі відносяться до інших, неланкастерівських типів зародкової плазми, зокрема 23 лінії плазми Айодент, 15 ліній плазми Рейд, 7

ліній плазми Лакон, 1 лінія плазми A188, 1 лінія плазми Chi31, 1 лінія плазми PLS61 та 12 ліній плазми Мікс, неспорідненої з Ланкастер. Повний перелік ліній та їхню характеристику див. в таблиці 2.2.

Результати проведеного SNP-генотипування представлено нами у вигляді SNP-паспорів 91 лінії, які зберігаються в електронній базі [60]. SNP-паспорт кожної лінії містить інформацію про тип дезоксирибонуклеотиду в кожному з SNP-маркерів. В таблиці Б.1 додатку Б наведено зразок SNP-паспорту на прикладі лінії ДК2668.

На основі отриманої інформації про алельний стан маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК нами було розраховано частоти їхніх мажорних та мінорних алелів в групі ліній плазми Ланкастер (L) та в групі ліній неланкастерівських плазм (NL) (табл. Б.2). Також нами розраховано попарні генетичні SNP-дистанції між $n=91$ лінією, всього $n \times n - n = 8190$ дистанцій (табл. Б.3). Було обчислено також значення показника генного різноманіття ліній (табл. Б.4), показника зсуву генного різноманіття SNP-маркерів та індексу інформативності SNP-маркерів (PIC) (табл. Б.5). Отримані розрахункові значення перелічених показників було використано як первинні дані для подальшого аналізу.

Проведене генотипування 91 лінії за 384 SNP-маркерами панелі BDI-III дозволило отримати інформацію щодо алельного стану $384 \times 91 \times 2 = 69888$ маркерних сайтів. Оцінка результатів SNP-генотипування показала, що середня гетерозиготність проаналізованих зразків склала 1,25%, в середньому 0,0-0,4 гетерозиготних SNP-сайтів на одну лінію, що свідчить про високу, на рівні 98,75%, гомозиготність досліджених ліній. Гетерозиготні SNP-сайти було вилучено з подальших видів аналізу і розрахунків. Кількість ліній, у яких був ідентифікований тип нуклеотиду в маркерних сайтах, в середньому знаходилася на достатньо високому рівні 89,0 ліній на один SNP-маркер, що складає 97,8% набору ліній, що аналізувалися. Частотою пропущених даних $>20\%$ характеризувалися лише шість маркерів. Інформація за цими маркерами враховувалася лише для ліній, для яких вони

мали достатній сигнал детекції. Частка мономорфних маркерів в досліджуваному наборі ліній склала 0,7%, а диморфних відповідно – 99,3%. Частотою мінорного алеля $>0,2$ характеризувалися переважна більшість (80,6%) диморфних маркерів. В досліджуваному наборі ліній середній індекс інформативності використаних маркерів PIS сягнув високого рівня (0,3144) при потенційно можливому діапазоні значень 0-0,3750, а середній показник зсуву генного різноманіття маркерів склав 0,2984, що трохи перевищує медіанну позначку можливого діапазону значень 0-0,5000. Таким чином, значення ключових показників одонуклеотидного поліморфізму ДНК в досліджуваному наборі ліній і з використаним набором SNP-маркерів знаходяться в допустимих межах, що дозволяє перейти безпосередньо до аналізу отриманих даних.

Метою першого етапу узагальнення результатів SNP-генотипування було проведення кластеризації та встановлення можливості виділення в загальному масиві проаналізованих ліній окремих груп, які за типом дезоксирибонуклеотидів в маркерних сайтах виявляють більшу близькість усередині групи, ніж з рештою ліній проаналізованого масиву.

3.2. Групування та кластеризація ліній кукурудзи за результатами SNP-аналізу

Завдання групування і кластеризації досліджуваного масиву ліній за алельним станом SNP-маркерів та ідентифікації кластеру ліній плазми Ланкастер серед загальної добірки ліній вирішувалася нами шляхом проведення принципового компонентного аналізу, якісного кластерного аналізу з побудовою дендрограми, кількісного кластерного аналізу генетичної структури ліній з використанням комп'ютерної програми Structure та дисперсійного аналізу.

Принциповий компонентний аналіз (PCA, метод головних компонент) дозволяє провести зменшення кількості об'єктів аналізу за рахунок нових

основних змінних величин, досягти скорочення розмірності опису, здійснити візуалізацію даних та виділення значимої інформації. Основи принципового компонентного аналізу розроблено в працях [154, 190, 241 та ін.]. Результати принципового компонентного аналізу генетичних SNP-дистанцій між всіма лініями проаналізованого набору представлено на рисунку 3.1.

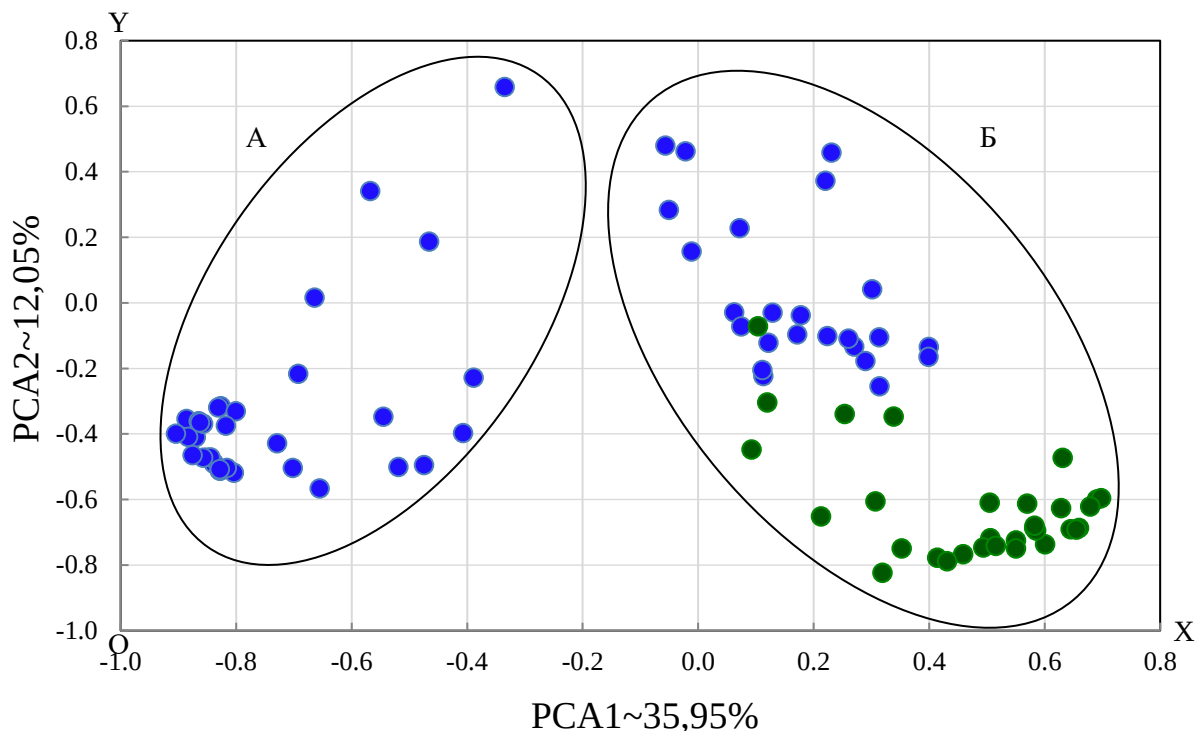


Рис. 3.1. Двовимірний графік принципового компонентного аналізу генетичних SNP-дистанцій між 91 лінією кукурудзи. Окремі лінії представлені крапками; зеленим кольором вказано лінії, які за педігрі відносяться до плазми Ланкастер, а синім – лінії неланкастерівських зародкових плазм. Масив досліджуваних ліній за першим принциповим компонентом PCA1 розпадається на дві фракції – А, Б

Двовимірний компонентний аналіз показав, що перший принциповий компонент (PCA1) пояснює 35,95% загального варіювання та поділяє досліджуваний масив з 91 лінії на дві фракції – А і Б. Уздовж вісі ОХ фракція А візуалізується в інтервалі $-1,0 - -0,2$, а фракція Б – в інтервалі $-0,1 - +0,8$. При тому всі лінії, які за педігрі вважаються Ланкастер (темно-зелені крапки на рис. 3.1), потрапляють у фракцію Б, розташовану на верхньому (правому)

кінці вісі ОХ. Другий принциповий компонент (РСА2), який пояснює 12,05% загального варіювання, відокремлює більшість ліній Ланкастер (нижній кінець вісі ОУ) від решти ліній фракції Б, хоча має місце деяке перекриття зон розташування L- та NL-ліній. Таким чином, принциповий компонентний аналіз попарних SNP-дистанцій підкреслює відокремленість групи ліній Ланкастер у загальному масиві проаналізованих ліній.

Для безпосередньої кластеризації та встановлення ієрархії ліній в проаналізованому масиві нами було проведено якісний кластерний аналіз SNP-дистанцій між 91 лінією кукурудзи. За Ю.М.Сиволап и др. [129] «кластер» – це група об’єктів, які мають спільні властивості, а характеристиками «кластера» є внутрішня однорідність та зовнішня ізольованість. Кластерна модель представлення об’єктів передбачає, що об’єкти з подібними властивостями відносяться до одного кластера, і найчастіше має вигляд дендрограми. В роботі ми використали один з ієрархічних агломеративних методів кластерного аналізу – метод повного зв’язку (complete-linkage clustering, дальні сусіди) [21, 129, 189]. На рисунку 3.2 представлено дендрограму генетичних взаємовідносин 91 лінії кукурудзи для попарних SNP-дистанцій, побудовану за методом повного зв’язку.

Як видно з рисунку 3.2, на представлений дендрограмі виділяються два основні кластери: кластер I, до якого входять 88 ліній (96,7%), і кластер II, який містить лише 3 лінії (3,3%) – ДКД2725СВзМ, PLS61 та В73 (показаний коричневим кольором). Кластер I розпадається на два підкластери, верхній (I.1) та нижній (I.2). Всі проаналізовані лінії, які за родоводом визначаються як Ланкастер, а також частина NL-ліній, потрапляють в підкластер I.1, всього 57 ліній. В підкластер I.2 (жовтий) входить 31 лінія, що за педігрі не відноситься до Ланкастер. Підкластер I.1 розпадається в свою чергу на два підпідкластери: I.1.1 (фіолетовий), до якого входять 25 ліній, та I.1.2 (бірюзовий), до якого входять 32 лінії. Характерно, що всі лінії, які об’єднує

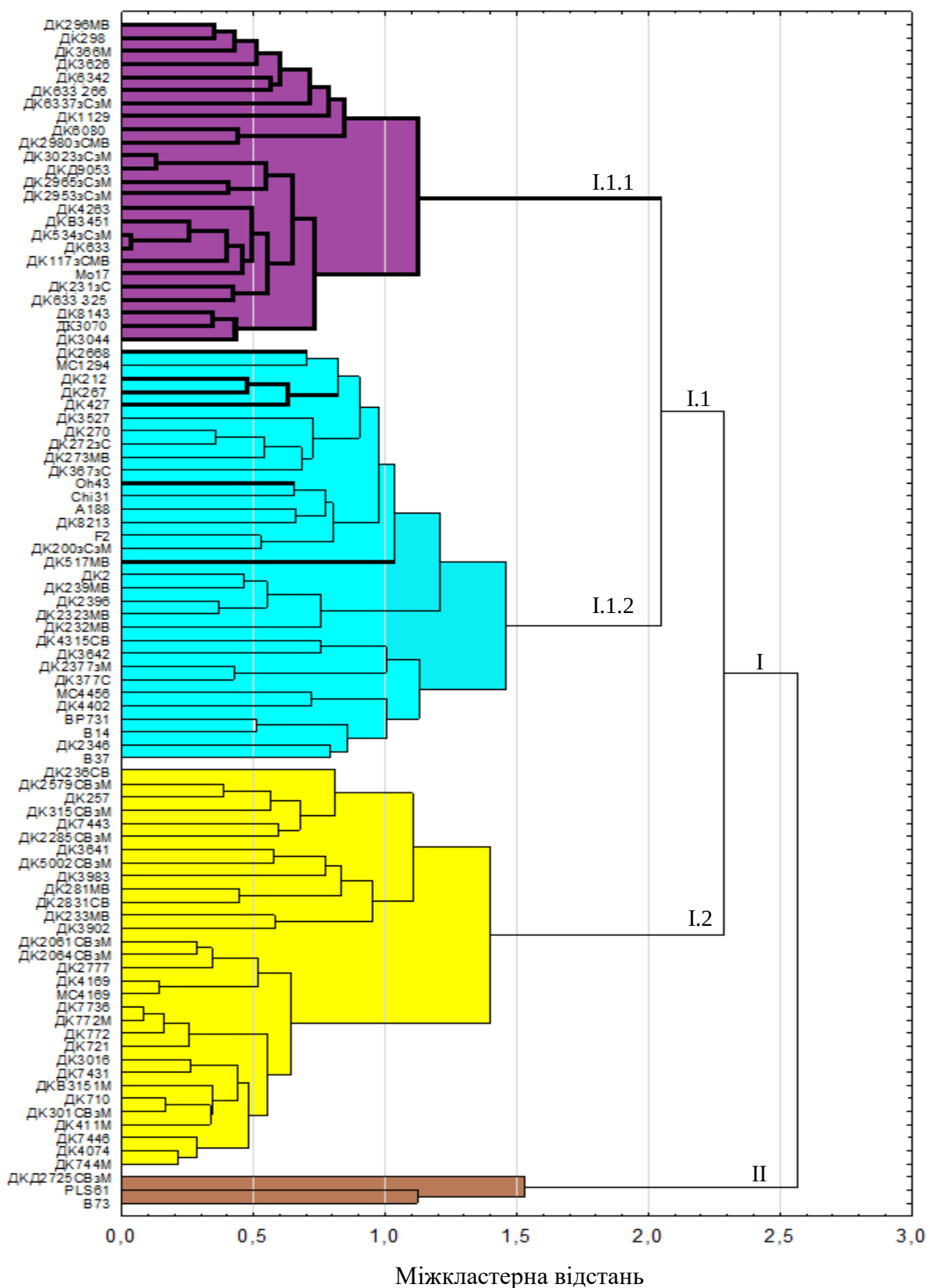


Рис. 3.2. Дендрограма генетичних взаємовідносин між 91 лінією кукурудзи за результатами SNP-аналізу, побудована методом повного зв'язку. Лінії, які за педігрі відносяться до Ланкастер, показано жирними рисками, інші пояснення в тексті

підпідкластер I.1.1, за педігрі відносяться до плазми Ланкастер, зокрема публічна лінія Mo17, яка є типовим представником підплазми *Mo17*. До підпідкластера I.1.2 входять типовий представник іншої підплазми плазми Ланкастер – лінія Oh43, а також ще 5 ліній, які вважаються Ланкастер за родоводом, що складає 18,8% від загального обсягу цього підпідкластера. Таким чином, побудована дендрограма вказує на близькість інформації родоводів і SNP-аналізу стосовно генетичних зв'язків досліджених ліній кукурудзи, зокрема виокремленості ліній Ланкастер. Разом з тим, результати кластеризації свідчать і про певні істотні відмінності у ліній, близьких до Oh43, порівняно з лініями підпідкластеру I.1.1, близькими до Mo17, що вказує на генетичну гетерогенність усередині самої плазми Ланкастер.

На наступному етапі дослідження необхідно було з'ясувати генетичну структуру ліній досліджуваного масиву в цілому і специфіку генетичної структури ліній саме плазми Ланкастер. Генетична структура лінії за [320] – це сукупність генів та нуклеотидних послідовностей негенних районів геному, специфічна для даної лінії. Аналіз генетичної структури ліній досліджуваного масиву проведено нами як кількісний кластерний аналіз через визначення внеску предкових популяцій в геном сучасної лінії за комп'ютерною програмою Structure, запропонованою J.K. Pritchard зі співробітниками [219, 220, 320, 321]. Structure – це статистична програма для вивчення генетичної структури популяції за полілокусними генотиповими даними [10, 232]. При проведенні даного виду аналізу за [219] приймаються наступні припущення: 1) зразки, що аналізуються, є комплексом особин з k популяцій, а кожна популяція характеризується певним набором частот алелів в кожному локусі. Окремі особини зразку відносяться ймовірно до однієї з популяцій або приєднуються до двох і більше популяцій, якщо їхні генотипи вказують, що вони змішані; 2) припускається, що всередині популяцій розщеплення за локусами відповідає закону Харді-Вайнберга, має місце рівноважне зчеплення генів, а мутаційний процес та тісно розташовані маркери не враховуються; 3) обумовлене предками походження кожного

алеля є незалежним. Для аналізу отриманих даних за Structure [219] ми обрали *змішану модель*, якою передбачено, що особини, які аналізуються, можуть мати змішане походження, тобто, теоретично, особина i може успадкувати певну частку свого геному від предків з однієї, декількох або всіх k популяцій. *Змішана модель* враховує комплексність та гібридність популяцій, які були вихідними при створенні сучасних ліній кукурудзи. Для аналізу результатів SNP-генотипування досліджуваного масиву ліній нами також обрано *модель корельованої частоти алелів*, яка передбачає, що популяції нащадків k , генотипи яких складають зразок, є результатом корельованого дрейфу частот алелів предкових популяцій.

Для аналізу за Structure як вихідні дані нами використано масив алельних варіантів SNP-маркерів у проаналізованих ліній. Визначення оптимальної кількості основних груп (k) для оцінки отриманих даних показало, що статистично значимим є $k=2$ (рис. 3.3).

Structure дозволяє розрахувати коефіцієнти приналежності генотипу до кожної з k -груп (Q -коефіцієнти), тобто визначити залишковий внесок предків в геном сучасної лінії-нащадка. Як такими, що належать до певної групи вважаються лінії з $Q \geq 0,600$ [10, 320]. В таблиці Б.6 наведено коефіцієнти приналежності Q для досліджених ліній кукурудзи при $k=2$, а на рисунку 3.4. – графічне зображення співвідношення часток двох груп в геномах досліджених ліній.

Як видно з рисунку 3.4 та таблиці Б.6, 33,0% ліній дослідженого набору відносяться до групи 1, 60,4% – до групи 2, а 6,6% не належать жодній з груп, оскільки мають коефіцієнти приналежності $Q < 0,600$. Середня генетична дистанція за SNP-маркерами між лініями групи 1 склала 0,2280, а групи 2 – 0,3497, що свідчить про більше генетичне різноманіття останньої групи, оскільки крім ліній плазми Ланкастер вона вміщує деякі лінії плазм Лакон, Рейд, A188, Chi31, PLS61, окремі лінії Мікс. Середня частка участі окремої лінії в групі 1 склала 44,0%, а в групі 2 – 56,0%.

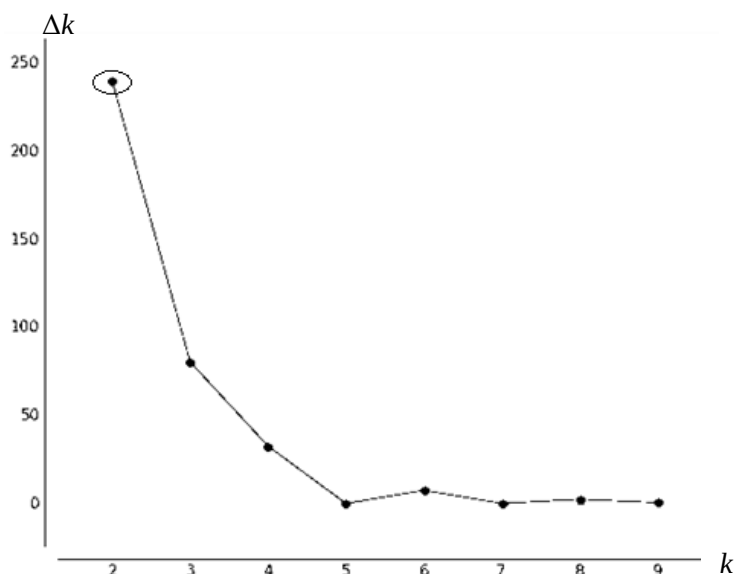


Рис. 3.3. Залежність кількості груп (k) від показника Δk при аналізі результатів SNP-генотипування 91 лінії кукурудзи за програмою Structure. Найвищий пік відповідає статистично значимій кількості груп

Q

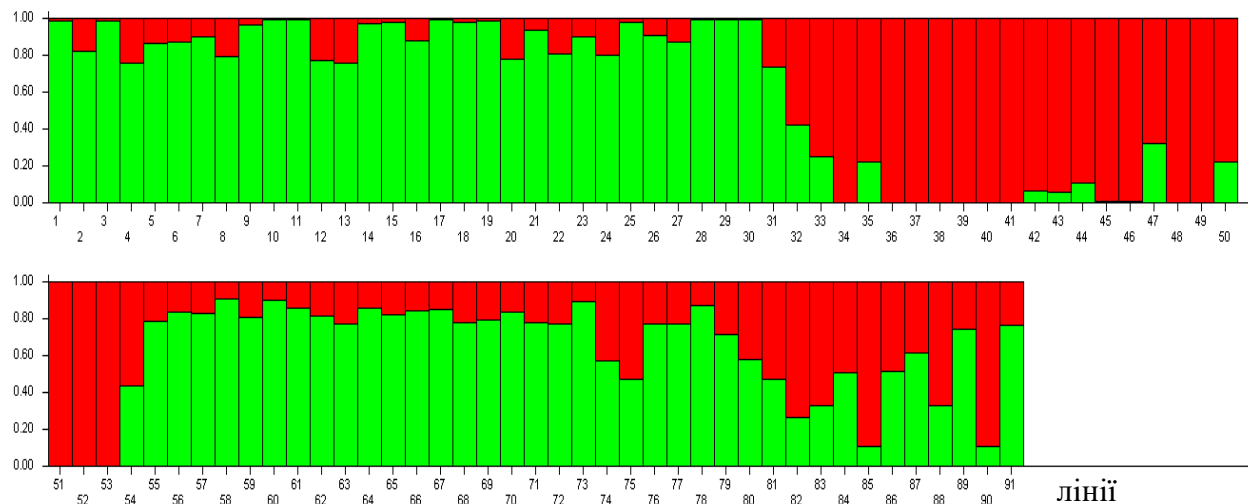


Рис. 3.4. Кількісний кластерний аналіз генетичної структури ліній кукурудзи за результатами SNP-генотипування (програма Structure, $k=2$)

Примітка. Кожен стовпчик відповідає одній лінії; частка кожної групи в генотипі лінії показана часткою забарвлення певним кольором: група 1 позначена червоним кольором, група 2 – зеленим кольором. Розподіл ліній за педігрі: 1-31 – лінії зародкової 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.

Всі проаналізовані лінії, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, увійшли до групи 2. Коефіцієнти приналежності Q цих ліній вкладаються в діапазон від 0,669 (Oh43) до 0,997 (Mo17, ДК534зСзМ, ДК633). Таким чином, досліджені нами лінії, які за родоводом визначаються як похідні від сорту Ланкастер, при аналізі генетичної структури за Structure відносяться до групи 2 з середнім коефіцієнтом приналежності $Q=0,889$.

Всі досліджені лінії, які ведуть свій родовід від сорту Айодент, відносилися до групи 1 з діапазоном Q від 0,601 (ДКД2725СВзМ) до 0,999 (ДК411М) і середнім значенням $Q=0,938$. Три лінії, які є представниками однойменних плазм A188, Chi31 та PLS61, відносилися до групи 2, але мали значення Q на середньому рівні, відповідно 0,711, 0,752 та 0,759. Всі лінії, які представляли зародкову плазму Лакон, було віднесено до групи 2, оскільки вони мали коефіцієнт приналежності до цієї групи більший за 0,6, а діапазон Q для цих ліній коливався від 0,681 (ДК3527) до 0,831 (ДК2) з середнім значенням 0,770. З 15 проаналізованих ліній плазми Рейд до групи 1 належала лише ДК3902 ($Q=0,611$), 12 ліній продемонстрували коефіцієнти приналежності до групи 2 від 0,668 (B14) до 0,810 (ДК2396) з середнім значенням 0,670, а 3 лінії неможливо було віднести до жодної з груп, оскільки обидва значення Q були меншими за 0,6. Зародкова плазма Мікс, до якої входили лінії змішаного родоводу, але неспоріднені з Ланкастер, була представлена 12 лініями. З них 6 належали до групи 1 з діапазоном Q від 0,603 (ДК4315СВ) до 0,989 (МС4169) і середнім значенням 0,638. Дві лінії цієї плазми входили до групи 2 – МС1294 ($Q=0,677$) та МС4456 ($Q=0,682$), а чотири – мали значення $Q<0,6$ і не були віднесені до жодної групи.

Порівняння середніх коефіцієнтів приналежності до групи 2 дозволяє констатувати, що цей показник достовірно вищий для ліній, які за педігрі віднесені до Ланкастер ($Q=0,889\pm0,119$), ніж для ліній інших плазм ($Q=0,390\pm0,103$). Таким чином, лінії плазми Ланкастер переважно мають набір алельних варіантів SNP-маркерів групи 2. Порівняння окремих плазм показує, що лінії плазми Айодент, які у повному складі потрапляють у групу

1 ($Q=0,938\pm0,102$), та лінії плазми Мікс (для групи 1 $Q=0,638\pm0,290$) достовірно відрізняються за середнім значенням коефіцієнтів приналежності від ліній Ланкастер (для групи 1 $Q=0,111\pm0,119$). При аналогічному способі порівняння ліній Ланкастер з лініями плазм A188, Chi31, PLS61, Лакон та Рейд достовірної різниці між групами 1 та 2 не виявлено. Тобто аналіз за Structure показує, що генетична структура ліній плазми Ланкастер за станом SNP-маркерів панелі BDI-III не є унікальною, однак статистично вона дозволяє виокремити їх на фоні ліній інших зародкових плазм. Значно чіткіше за алельним станом проаналізованих SNP-маркерів виділялася група ліній, яка за педігрі відноситься до плазми Айодент. Тобто отримані дані вказують, що даний набір SNP-маркерів добре підходить для відмежування ліній плазми Ланкастер від ліній плазм Айодент, Мікс, тоді як для диференціації ліній плазми Ланкастер та зародкових плазм A188, Chi31, PLS61, Лакон і Рейд необхідно дещо оптимізувати набір SNP-маркерів.

Отже, кількісний кластерний аналіз за Structure 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 зародкової плазми Ланкастер, на 100% входять до однієї і тієї ж групи – групи 2. За середнім коефіцієнтом приналежності до групи 2 лінії плазми Ланкастер достовірно відрізняються від ліній плазм Айодент та Мікс.

На наступному етапі був проведений однофакторний дисперсійний аналіз впливу фактора «група ліній» (градації фактора: 1) L-лінії; 2) NL-лінії) на розмір попарних генетичних SNP-дистанцій та показник генного різноманіття ліній шляхом порівняння ступеня варіювання між групами L- та NL-ліній та усередині цих двох груп (табл. 3.1-3.2).

Як видно з таблиць 3.1-3.2, для обох досліджених показників вплив фактора «група ліній» є достовірним ($F>F_{0,05}$), а середні квадрати відхилень від середнього арифметичного значення показника, які виникають за рахунок варіювання між групами, перевищують аналогічні середні квадрати в межах

Таблиця 3.1

Дисперсійний аналіз попарних генетичних SNP-дистанцій між лініями
кукурудзи

Джерело варіювання	<i>df</i>	Сума квад-ратів	Середній квадрат	F	P	$F_{0,05}$	$\eta^2_x \pm \Delta\eta^2_{x,0,05}$ *
Між групами L- та NL-ліній	1	2,953	2,953	231,67	7,50E-50	3,85	0,094±0,002
В межах груп L- та NL-ліній	2233	28,462	0,013				
Разом	2234	31,415					

Примітка. *Тут і далі η^2_x – показник сили впливу фактора, частка одиниці, $\eta^2_x \pm \Delta\eta^2_{x,0,05}$ – довірчий інтервал показника сили впливу фактора за рівня значущості 0,05, частка одиниці.

Таблиця 3.2

Дисперсійний аналіз за показником генного різноманіття ліній
кукурудзи

Джерело варіювання	<i>df</i>	Сума квад-ратів	Середній квадрат	F	P	$F_{0,05}$	$\eta^2_x \pm \Delta\eta^2_{x,0,05}$
Між групами L- та NL-ліній	1	0,0003	0,0003	20,54	1,81E-05	3,95	0,188±0,001
В межах груп L- та NL-ліній	89	0,0013	1,46E-05				
Разом	90	0,0016					

кожної з груп. Сила впливу фактора «група ліній» на розмір генетичних дистанцій склала $\eta^2_x=0,094\pm0,002$, а на показник генного різноманіття ліній – $\eta^2_x=0,188\pm0,001$. Тобто вплив організованого фактора, зокрема певної групи ліній, був суттєвим і склав частку від впливу всіх факторів, за дії яких варіює ознака, у 9,4% для одного і 18,8% для іншого показника. Відповідно 90,6% та 81,2% впливу забезпечували неорганізовані фактори, серед яких і різноманітність генотипів усередині кожної з груп.

Таким чином, результати принципового компонентного аналізу, якісного кластерного аналізу за методом повного зв'язку, аналізу генетичної структури ліній за програмою Structure та дисперсійного аналізу співпадають і підтверджують наявність серед проаналізованого масиву окремої групи ліній, склад якої співпадає з лініями, віднесеними за педігрі до зародкової плазми Ланкастер. Це дозволяє перейти до наступного етапу аналізу даних SNP-генотипування – ідентифікації алелів SNP-маркерів, специфічних для ліній плазми Ланкастер порівняно з лініями-представниками інших зародкових плазм.

3.3. Алельний стан SNP-маркерів, характерний для ліній кукурудзи плазми Ланкастер

Для безпосередньої ідентифікації SNP-маркерів, алельний стан яких є специфічним для плазми Ланкастер, ми використовували такі розрахункові показники, як частота мажорного алеля, частота мінорного алеля та частота однойменних алелів в групі L- та NL-ліній.

В таблиці 3.3 представлено кількість маркерів використаної панелі, які загалом диференціюють L- та NL-лінії на рівні визначених частот алелів.

Як видно з таблиці 3.3, жоден маркер не диференціює лінії на дві групи за частотою мажорного алеля на рівні $>0,90$ – $<0,10$. Чотири маркери дозволяють розрізнити ці дві групи в діапазоні частот $>0,80$ – $<0,20$, а зі

Таблиця 3.3

Здатність SNP-маркерів панелі BDI-III диференціювати масив
досліджених ліній кукурудзи

Частота мажорного алеля у NL-ліній	Частота однойменного алеля у L-ліній	Кількість SNP-маркерів панелі BDI-III
>0,90	<0,10	0
>0,80	<0,20	4
>0,75	<0,25	10
>0,70	<0,30	24
>0,65	<0,35	35
>0,60	<0,40	63
>0,55	<0,45	81

звуженням різниці в частотах до >0,55—<0,45 кількість диференціюючих маркерів зростає до 81.

Для подальшого проведення математичного аналізу за методом χ^2 та порівняння частот алелів SNP-маркерів між двома групами ліній необхідним є умовне визначення, яка група є вихідною, а яка похідною. Умовно вихідною групою ми вважали лінії, які за педігрі не відносяться до плазми Ланкастер (NL), а похідною – лінії плазми Ланкастер (L). За результатами SNP-генотипування відносно кожного маркера визначали достовірність порушення співвідношення частот мажорного і мінорного алелів між вихідною та похідною групами за методом χ^2 [374] за рівня значущості 0,001 та відбирали маркери з $\chi^2_{\text{факт.}} \geq \chi^2_{\text{табл.}}$. Для кожного маркера, за яким було встановлено достовірне порушення співвідношення частот алелів, визначали різницю між частотою мажорного алеля у вихідній групі ліній NL та частотою однойменного алеля у похідній групі L. Дана різниця позначена як «показник D» і наводиться за абсолютною величиною. В таблиці 3.4 представлено зміну частот алелів SNP-маркерів, які є мажорними у групі ліній NL, при переході до групи L за $D \geq 0,50$.

Таблиця 3.4

Зміна частот алелів SNP-маркерів у ліній кукурудзи плазми Ланкастер
порівняно з лініями інших плазм

№ зп	SNP- маркер*	Частота мажорного алеля у NL-ліній	Частота однойменного алеля у L-ліній	D	$\chi^2_{\text{факт.}}$	Рівень значу- щості
1	332АГ	A=0,84±0,17	A=0,10±0,20	0,74	41,5	$p \leq 0,001$
2	151АГ	Г=0,75±0,20	Г=0,06±0,16	0,69	34,4	$p \leq 0,001$
3	256АГ	Г=0,88±0,15	Г=0,22±0,27	0,66	32,9	$p \leq 0,001$
4	331АТ	A=0,76±0,20	A=0,10±0,20	0,66	30,9	$p \leq 0,001$
5	335АЦ	A=0,72±0,21	A=0,06±0,16	0,66	30,2	$p \leq 0,001$
6	185АЦ	A=0,68±0,22	A=0,03±0,11	0,65	30,3	$p \leq 0,001$
7	343АГ	Г=0,83±0,19	Г=0,19±0,28	0,64	26,0	$p \leq 0,001$
8	181АЦ	A=0,70±0,21	A=0,07±0,17	0,63	27,9	$p \leq 0,001$
9	288АЦ	Ц=0,81±0,18	Ц=0,19±0,26	0,62	28,0	$p \leq 0,001$
10	190АТ	T=0,85±0,16	T=0,23±0,28	0,62	28,2	$p \leq 0,001$
11	295АГ	A=0,76±0,21	A=0,16±0,24	0,60	25,3	$p \leq 0,001$
12	348АГ	Г=0,88±0,15	Г=0,28±0,29	0,60	26,5	$p \leq 0,001$
13	104ЦГ	Ц=0,91±0,13	Ц=0,32±0,31	0,59	32,3	$p \leq 0,001$
14	83ЦГ	Г=0,68±0,22	Г=0,10±0,20	0,58	24,7	$p \leq 0,001$
15	359АГ	A=0,67±0,22	A=0,09±0,19	0,58	23,5	$p \leq 0,001$
16	294АГ	Г=0,72±0,21	Г=0,16±0,25	0,56	21,9	$p \leq 0,001$
17	269АГ	A=0,57±0,23	A=0,03±0,11	0,54	21,0	$p \leq 0,001$
18	173ЦГ	Г=0,76±0,19	Г=0,22±0,28	0,54	20,6	$p \leq 0,001$
19	197АГ	A=0,70±0,21	A=0,17±0,25	0,53	20,1	$p \leq 0,001$
20	96АГ	Г=0,63±0,22	Г=0,10±0,20	0,53	21,0	$p \leq 0,001$
21	46АЦ	A=0,69±0,22	A=0,16±0,24	0,53	20,2	$p \leq 0,001$
22	198АГ	A=0,70±0,22	A=0,17±0,25	0,53	19,4	$p \leq 0,001$
23	240АГ	Г=0,81±0,18	Г=0,29±0,30	0,52	19,1	$p \leq 0,001$
24	333АТ	A=0,86±0,16	A=0,34±0,31	0,52	23,2	$p \leq 0,001$
25	40АЦ	Ц=0,71±0,21	Ц=0,19±0,26	0,51	18,6	$p \leq 0,001$
26	297АГ	Г=0,54±0,23	Г=0,03±0,11	0,51	21,6	$p \leq 0,001$
27	344АГ	Г=0,72±0,21	Г=0,22±0,27	0,50	17,8	$p \leq 0,001$
28	345АГ	Г=0,72±0,21	Г=0,22±0,27	0,50	17,8	$p \leq 0,001$
29	154АЦ	A=0,56±0,23	A=0,06±0,16	0,50	18,0	$p \leq 0,001$
30	274АГ	A=0,63±0,23	A=0,13±0,22	0,50	17,1	$p \leq 0,001$

Примітка. *Тут і далі представлено номер SNP-маркера панелі BDI-III та його альтернативні алелі; назви дезоксирибонуклеотидів подано за скороченими назвами азотистих основ: А – аденін, Т – тимін, Г – гуанін, Ц – цитозин; $\chi^2_{\text{табл.0,001}} = 10,83$.

Як видно з таблиці 3.4, частоти мажорних алелів в групі NL-ліній є високодостовірними, в той час як частоти однойменних алелів в групі ліній Ланкастер достовірно не відрізняються від нуля. Це означає, що мажорними алелями маркерів, наведених в таблиці 3.4, для групи ліній Ланкастер будуть альтернативні дезоксирибонуклеотиди кожного біалельного маркера.

Найбільша різниця між частотами однойменних алелів в двох групах ліній, на рівні $D=0,74$, була відмічена для маркера BDI-III-332. Для SNP-маркерів, представлених в таблиці 3.4, діапазон частот мажорних алелів в групі NL-ліній склав 0,54-0,91. У ліній плазми Ланкастер частоти однойменних алелів цих же маркерів дорівнювали 0,03-0,32, що робить їх мінорними, а відповідно частоти мажорних алелів даних маркерів складають 0,97-0,68. В діапазон $D=0,74-0,50$ загалом потрапляють 30 маркерів. Для групи ліній Ланкастер суттєво і стабільно відрізнятися від нуля частота алеля, який є мажорним в групі NL-ліній, починає при падінні значення D нижче 0,48.

На основі проведеного аналізу складено гаплотип ліній зародкової плазми Ланкастер за дезоксирибонуклеотидами мажорних алелів 30 маркерів, розподілених відповідно до їхньої локалізації у групах зчеплення (хромосомах) (табл. 3.5).

За результатами проведеного аналізу було також складено формулу алельного стану десяти маркерів з найбільшим значенням показника D (*top*-маркерів), найхарактерніших для Ланкастер. Так, специфічний набір алелів плазми Ланкастер, визначений за частотами мажорних алелів 10 *top*-SNP-маркерів в попарному порівнянні з лініями інших зародкових плазм, встановлено як BDI-III-332Г, BDI-III-151А, BDI-III-256А, BDI-III-331Т, BDI-III-335Ц, BDI-III-185Ц, BDI-III-343А, BDI-III-181Ц, BDI-III-288А та BDI-III-190А.

При аналізі стану SNP-маркерів використаної панелі нами було ідентифіковано маркери з рідкісними алелями, тобто алелями з низькою частотою зустрічальності ($MAF < 0,05$). В суцільному масиві проаналізованих

Таблиця 3.5

Гаплотип ліній кукурудзи плазми Ланкастер, визначений за результатами SNP-аналізу

Номер хромо-соми. біна	SNP-маркер панелі BDI-III	Алель, специфічний для ліній плазми Ланкастер	Номер хромо-соми. біна	SNP-маркер панелі BDI-III	Алель, специфічний для ліній плазми Ланкастер
1.11	40	A	7.02	269	Г
1.11	46	Ц	7.05	274	Г
2.07	83	Ц	8.01	288	A
3.01	96	A	8.03	294	A
3.03	104	Г	8.03	295	Г
4.05	151	A	8.03	297	A
4.06	154	Ц	9.04	331	T
4.09	173	Ц	9.04	332	Г
5.01	181	Ц	9.04	333	T
5.01	185	Ц	9.04	335	Ц
5.03	190	A	10.01	343	A
5.03	197	Г	10.01	344	A
5.03	198	Г	10.02	345	A
6.02	240	A	10.02	348	A
6.06	256	A	10.06	359	Г

Примітка. Наведено інформацію для перших 30 маркерів при ранжуванні за $D \geq 0,50$. Жирним шрифтом виділені перші 10 маркерів ($D=0,74-0,62$).

ліній маркери з $MAF < 0,05$ зустрічалися з частотою 7,8%. Якщо розглядати окремо по групах, то у Ланкастер ця частота була дещо більшою (6%), ніж в групі ліній неланкастерівських плазм (1,8%).

Окремо представляє інтерес розгляд маркерів, які дозволяють ідентифікувати пропущені та унікальні алелі. Пропущені алелі – це алелі, які зовсім відсутні в одній групі ліній, але зустрічаються у альтернативній групі, де вони виступають як унікальні. Фактично, маркери з пропущеними алелями в групі ліній, в якій вони виявляються, стають мономорфними. Унікальні алелі у протилежної групи ліній зустрічаються, як правило, з низькою частотою. В нашому дослідженні було ідентифіковано 16 SNP-

маркерів з пропущеними алелями в групі Ланкастер і, відповідно, унікальними для групи неланкастерівських ліній (табл. Б.7), середня частота яких склала 0,2067. Так, алель А за маркером 11АГ зовсім не реєструвався у групі ліній Ланкастер, в групі NL-ліній траплявся з частотою 0,0339 і був присутній в геномах ліній В73 і ДК2346. Алель А також був пропущеним в групі ліній Ланкастер для 7 інших маркерів, відповідно протилежна група ліній містила за такими маркерами алель А з частотами в діапазоні 0,1525-0,4068. Пропущений у ліній Ланкастер і унікальний для NL-ліній алель Ц виявлявся з частотою 0,3220 за маркером 267АЦ та з частотою 0,1356 за маркером 372ЦГ. Алель Г був унікальним у NL-ліній за 6 маркерами в діапазоні частот 0,0339-0,4211. Пропущених алелів Т не виявлено.

На наступному етапі ми використали результати ідентифікації алельного стану маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК для оцінки варіювання основних розрахункових SNP-показників та характеристики взаємовідносин ліній усередині зародкової плазми Ланкастер.

3.4. Оцінка варіювання та спорідненості ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер за SNP-маркерами

В таблиці 3.6 наведено оцінки варіювання основних показників, які характеризують одонуклеотидний поліморфізм ліній плазми Ланкастер порівняно з аналогічною інформацією для групи неланкастерівських ліній.

Загалом частоти мажорних алелів SNP-маркерів коливалися для L-ліній в діапазоні 0,5238-0,9688, а для NL-ліній – в ширших межах 0,5085-0,9821. Середня частота мажорного алеля в групі L-ліній достовірно перевищувала аналогічний показник у NL-ліній і була ближче до медіани потенційно можливого інтервалу значень (0,7500), тоді як у NL-ліній цей показник був зсунутий у бік менших частот. За коефіцієнтом варіації цієї ознаки достовірних відмінностей між двома групами ліній не зафіксовано.

Таблиця 3.6

Варіювання основних показників одонуклеотидного поліморфізму
ДНК у ліній кукурудзи

Характеристика		Група ліній	
		L	NL
Кількість досліджених ліній, шт.		31	60
Частота мажорного алеля, частка одиниці	Lim	0,5238÷0,9688	0,5085÷0,9821
	$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	0,7678±0,0159	0,6977±0,0143
	$V \pm \Delta_{0,05}, \%$	17,0±4,3	16,8±3,1
Показник генного різноманіття ліній, частка одиниці	Lim	0,1701÷0,1873	0,1725÷0,1901
	$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	0,1774±0,0015	0,1808±0,0009
	$V \pm \Delta_{0,05}, \%$	2,4±0,6	2,1±0,4
Показник зсуву генного різноманіття маркерів, частка одиниці	Lim	0÷0,5000	0÷0,5000
	$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	0,3045±0,0180	0,3866±0,0133
	$V \pm \Delta_{0,05}, \%$	51,0±12,8	29,6±5,5
PIC маркерів, частка одиниці	Lim	0÷0,3750	0÷0,3750
	$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	0,2462±0,0132	0,3053±0,0091
	$V \pm \Delta_{0,05}, \%$	46,4±11,6	25,6±4,7
Попарні генетичні дистанції, частка одиниці	Lim	0,0035÷0,5333	0,0316÷0,8000
	$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	0,3377±0,0099	0,4229±0,0061
	$V \pm \Delta_{0,05}, \%$	33,5±8,4	30,5±5,6
Спорідненість ліній, %	Lim	46,7÷99,7	20,0÷96,8
	$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	66,2±4,4	57,7±2,4
	$V \pm \Delta_{0,05}, \%$	33,5±8,4	30,5±5,6

Показник генного різноманіття ліній плазми Ланкастер коливався в межах 0,1701-0,1873, у NL-ліній – 0,1725-0,1901. Тобто цей показник в групах L-ліній та NL-ліній варіював в близькому діапазоні розміром відповідно 0,0172 та 0,0176, але його значення в групі L-ліній були достовірно менші, на рівні в середньому 0,1774, порівняно з групою NL-ліній, де він в середньому склав 0,1808. Подібні закономірності простежуються і відносно середнього значення показника зсуву генного різноманіття маркерів. Коефіцієнти варіації двох груп для показника генного різноманіття ліній були низькими і достовірно не розрізнялися. Варіабельність же показника зсуву генного різноманіття маркерів групи L-ліній суттєво, в 1,72 рази, була вищою, ніж у групи NL-ліній. Значення PIS використаних маркерів в обох групах ліній варіювало у максимально можливих межах. Звісно вищі значення PIS виявлено в більш різноманітній групі NL-ліній, а ось варіювання PIS в групі L-ліній суттєво, в 1,81 рази, було вищим, ніж у NL-ліній.

В групі ліній неланкастерівських плазм діапазон генетичних дистанцій був більшим (0,7684), ніж у L-ліній (0,5298), ліміти ширшими (0,0316-0,8000 проти 0,0035-0,5333), а середнє значення – достовірно вищим ($0,4229 \pm 0,0061$ проти $0,3377 \pm 0,0099$). Максимальна генетична дистанція в групі NL-ліній зафіксована між лініями B73 та ДКД2725СВЗМ, у L-ліній – між Oh43 та ДК8143. Коефіцієнти варіації даної ознаки у двох груп достовірно не розрізнялися. Генетична дистанція між двома групами, L-ліній та NL-ліній, була досить значною (0,4742). Спорідненість ліній Ланкастер між собою, була більшою, ніж між неланкастерівськими лініями.

Проведене порівняння варіювання за основними показниками одонуклеотидного поліморфізму ДНК у ліній кукурудзи очікувано свідчить про більше генетичне різноманіття групи ліній, де зібрані представники декількох, неланкастерівських плазм, але зазначає немалий рівень різноманіття і в групі ліній Ланкастер.

За розміром SNP-дистанцій між лініями Ланкастер було побудовано дендрограму генетичних взаємовідносин усередині цієї плазми методом повного зв'язку (рис. 3.5).

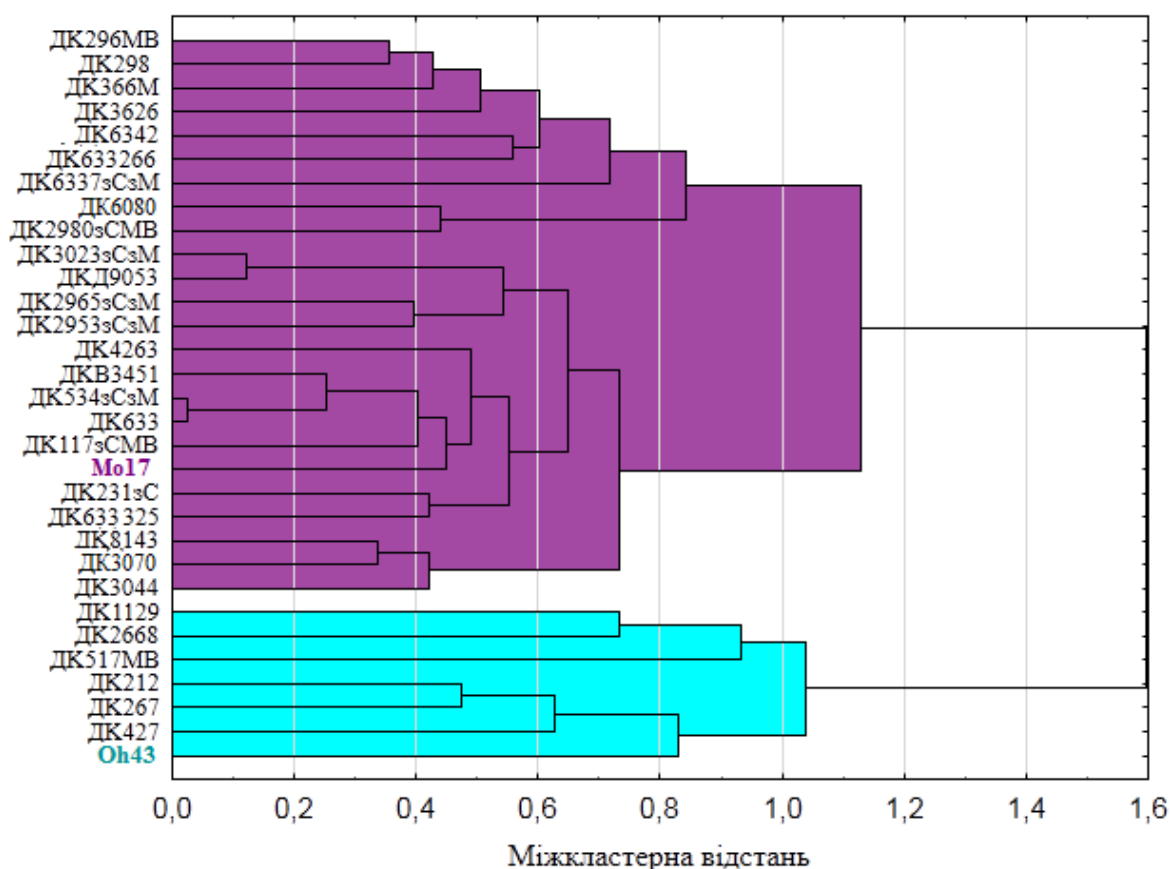


Рис. 3.5. Дендрограма генетичних взаємовідносин між лініями кукурудзи плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу, побудована за методом повного зв'язку

Як видно з рисунку 3.5, на дендрограмі виділяються два кластери, перший з яких (фіолетового кольору) об'єднує 23 лінії української селекції плазми Ланкастер та відому лінію Mo17 (77,4% від загальної кількості проаналізованих ліній), а другий – 6 ліній української селекції плазми Ланкастер та відому лінію Oh43 (22,6%). Дві з трьох, фенотипічно досить подібних ліній ДК267, ДК212 та ДК6080, які були відібрані з вихідної популяції, яка включала Oh43 (див. підрозділ 2.2), при кластеризації за SNP-даними увійшли саме до кластеру, спільного з Oh43 (ДК267, ДК212), а ДК6080 потрапила до кластеру з Mo17. Цей цікавий факт може свідчити про

те, що серед предків вихідних генотипів лінії ДК6080, окрім Oh43, могла бути і лінія Mo17, а комплекс саме її алельних варіантів маркерів був переданий у спадок до ДК6080. Лінії ДК633266 та ДК298, у родоводі яких присутні і Oh43, і Mo17 (див. підрозділ 2.2), входять до кластеру, спільного з Mo17, тобто саме від цієї лінії вони отримали більшу частку алельних варіантів маркерів, ніж від Oh43.

У таблиці 3.7 наведено спорідненість за даними SNP-аналізу ліній кукурудзи української селекції з типовими представниками плазми Ланкастер – лініями Mo17 та Oh43.

Як видно з таблиці 3.7, спорідненість ліній плазми Ланкастер української селекції з типовими представниками цієї плазми за результатами SNP-генотипування коливається у межах 50,2-85,3% для Mo17 та 46,7-63,5% для Oh43. Тобто алельний стан близько половини використаних однонуклеотидних маркерів у ліній плазми Ланкастер української селекції та у типових представників цієї плазми збігаються. Можна припустити, що ці алельні варіанти маркерних сайтів є більш стародавніми, передаються ще від вихідного сорту Ланкастер, а алельні варіанти решти маркерів привнесені в процесі селекції в Україні. Оскільки сучасні лінії кукурудзи Дніпровської селекційної програми створені на базі популяцій різної складності, із залученням в тому числі компонентів, які не віднесені до підплазм *Mo17* та *Oh43*, оцінка їхньої подібності за SNP-маркерами до предкових форм і між новітніми лініями дозволить розробити доцільну стратегію добору альтернативних батьківських форм для синтезу високогетерозисних гібридів F_1 .

Представляє інтерес розгляд питання про ступінь гетерозиготності простих (F_1) гібридів кукурудзи, визначену за алельним станом SNP-маркерів. На прикладі п'яти гібридів, які є високопродуктивними, входять до Реєстру сортів України [42] та широко впроваджені у виробництві, показано (табл. 3.8), що за цим способом визначення гетерозиготності гібридів коливається в межах 39,9-44,0% із середнім значенням 41,4%.

Таблиця 3.7

Спорідненість ліній кукурудзи плазми Ланкастер української селекції з
типовими лініями даної плазми Мо17 та Oh43

Лінія	Спорідненість з		Лінія	Спорідненість з	
	Мо17, %	Oh43, %		Мо17, %	Oh43, %
Мо17	100,0	52,6±5,9	ДК296МВ	68,1±5,5	52,3±5,9
ДК534зСзМ	85,3±4,2	50,5±5,9	ДК366М	67,4±5,6	52,6±5,9
ДК633	85,3±4,2	50,5±5,9	ДК6337зСзМ	67,4±5,6	50,9±5,9
ДК117зСМВ	83,9±4,4	51,6±5,9	ДК633266	66,0±5,6	48,8±5,9
ДКВ3451	83,2±4,4	51,6±5,9	ДК298	65,6±5,6	51,6±5,9
ДК3070	80,4±4,7	49,1±5,9	ДК517МВ	64,6±5,7	50,9±5,9
ДК8143	80,4±4,7	46,7±5,9	ДК2980зСМВ	64,2±5,7	58,3±5,9
ДК3044	80,0±4,7	53,3±5,9	ДК6342	64,2±5,7	56,5±5,9
ДК633325	79,7±4,8	52,3±5,9	ДК6080	62,8±5,7	59,0±5,8
ДК4263	79,3±4,8	52,6 ±5,9	ДК1129	62,1±5,8	54,7±5,9
ДКД9053	79,0±4,8	54,4±5,9	ДК2668	57,9±5,9	54,0±5,9
ДК3023зСзМ	77,2±5,0	53,0±5,9	ДК212	54,0±5,9	63,5±5,7
ДК2965зСзМ	76,5±5,0	49,1±5,9	ДК427	54,0±5,9	62,8±5,7
ДК2953зСзМ	76,1±5,1	47,7±5,9	Oh43	52,6±5,9	100,0
ДК231зС	74,7±5,2	47,7±5,9	ДК267	50,2±5,9	56,1±5,9
ДК3626	69,1±5,5	51,9±5,9			
Середня спорідненість з Мо17			70,4±5,4		
Середня спорідненість з Oh43			52,9±5,9		

Таблиця 3.8

Гетерозиготність простих (F_1) гібридів кукурудзи та їхніх батьківських ліній за алельним станом SNP-маркерів

Гібрид		Батьківські лінії			
Педігрі	Гетерозиготність, %	Лінія	Гетерозиготність, %	Лінія	Гетерозиготність, %
ДК744М×ДК2323МВ	41,3±5,2	ДК744М	1,1±1,1	ДК2323МВ	1,4±1,2
ДК721×ДК239МВ	41,5±5,2	ДК721	1,1±1,1	ДК239МВ	3,0±1,8
ДКВ3151М×ДКВ3451	44,0±5,3	ДКВ3151М	1,7±1,3	ДКВ3451	1,6±1,3
ДК772М×ДК6080МВ	39,9±5,2	ДК772М	0,8±1,0	ДК6080МВ	1,1±1,1
ДК772×МС2380	40,5±5,2	ДК772	1,4±1,3	МС2380	0,3±0,6
Середнє для гібридів	41,4±2,3	Середнє для ліній			1,4±0,4

Гомозиготність досліджених гібридів склала, відповідно, 56,0-60,1%. Лінії мали лише залишкову гетерозиготність, на рівні в середньому 1,4%, у половини з проаналізованих ліній цей показник достовірно не відрізнявся від нуля. Тобто досліджені лінії характеризувалися високим рівнем гомозиготності 98,3-99,7%.

Таким чином, SNP-аналіз десяти батьківських ліній кукурудзи та п'яти простих гібридів, що є високопродуктивними і широко впровадженими у виробництво, показав, що за SNP-маркерами значна частка материнського і батьківського геномів гібрида має однаковий алельний стан, а розрізняються алелі SNP-маркерів у гібрида лише для менш, ніж 50% SNP-маркерів. Тобто існує значний потенціал підвищення гетерозиготності простих гібридів, що дозволяє очікувати збільшення ступеня гетерозису відносно батьківських ліній.

3.5. SNP-характеристика ліній кукурудзи плазми Ланкастер, обраних для досліджень в культурі *in vitro*

В даному підрозділі представлено SNP-характеристику дев'яти ліній кукурудзи плазми Ланкастер (ДК633, ДК267, ДК212, ДК6080, ДК633266,

ДК298, ДК3070, ДК236 та ДК633325), обраних представниками даної плазми для подальших досліджень в культурі *in vitro* (розділ 4). SNP-генотипування ліній ДК420-1 та ДК675, які також були використані в розділі 4 як матеріал для досліджень, заплановано на пізніший термін.

Загалом, спорідненість даних ліній з лінією Мо17 склала 52,2-89,3%, з лінією Oh43 – 53,3-66,8% (див. табл. 3.7). Попарні SNP-дистанції між L-лініями, обраними для досліджень в культурі *in vitro*, і вихідними генотипами, які позначені в їхніх родоводах (див. підрозділ 2.2), наведено в таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

SNP-дистанції між сучасними лініями плазми Ланкастер, обраними для досліджень в культурі *in vitro*, та вихідними генотипами

Сучасна лінія плазми Ланкастер	Вихідні генотипи	SNP-дистанція	
		між лініями	частка одиниці
ДК633	Мо17	ДК633 та Мо17	0,1474
ДК267	Oh43	ДК267 та Oh43	0,4386
ДК212		ДК212 та Oh43	0,3649
ДК6080		ДК6080 та Oh43	0,4105
ДК633266	Мо17/Oh43	ДК633266 та Мо17	0,3404
		ДК633266 та Oh43	0,5123
ДК298		ДК298 та Мо17	0,3439
		ДК298 та Oh43	0,4842
ДК3070	Мо17/O2	ДК3070 та Мо17	0,1965
		ДК3070 та O2	—
ДК236	Мо17/F2	ДК236 та Мо17	0,4632
		ДК236 та F2	0,4230
ДК633325	Мо17/	ДК633325 та Мо17	0,2035
	Міндзенпуста	ДК633325 та Міндзенпуста	—

Як видно з таблиці 3.9, серед досліджених ліній групи Ланкастер найбільша генетична дистанція на рівні 0,4367 відзначена між ДК633266 та Oh43, а найменша – 0,1474 між ДК633 та Мо17. Лінії ДК633266 та ДК298, які мають у своєму родоводі і Мо17, і Oh43, ближчі до Мо17. Лінії ДК3070 та ДК633325, які містять у родоводі Мо17 з групи Ланкастер та представників інших плазм, зокрема плазм О2 та Міндзенпуста, за SNP-дистанціями також дуже близькі до Мо17. В цілому ж, лінії плазми Ланкастер, обрані для досліджень в культурі *in vitro*, мають генетичні дистанції з Мо17 в діапазоні від 0,1474 (ДК633) до 0,4982 (ДК267) з середнім значенням $0,3361 \pm 0,0964$, а з Oh43 – у діапазоні від 0,3649 до 0,5123 з середнім значенням $0,4600 \pm 0,0369$. Тобто вони дещо ближчі до Мо17, ніж до Oh43.

В наступних розділах (розділи 4, 5) при наданні клітинно- та генетично-інженерної характеристики плазми Ланкастер показники калусогенезу, регенерації ліній Ланкастер порівнюються з показниками ліній-стандартів. За такі стандарти було обрано широковідомі за високою калусогенною та регенераційною здатністю *in vitro* лінії A188, Chi31 та PLS61, які представляють однойменні типи зародкових плазм. У зв'язку з цим, ми визначили генетичні дистанції між дев'ятьма лініями плазми Ланкастер, обраними для досліджень *in vitro*, та цими лініями-стандартами (табл.3.10).

Як видно з таблиці 3.10, найбільші дистанції спостерігаються між обраними лініями плазми Ланкастер та PLS61, в той час як з A188 та Chi31 вони менші на 17,23 та 15,38% відповідно та достовірно не розрізняються між собою. За середніми значеннями такі SNP-дистанції є значно більшими, ніж між як такими дев'ятьма лініями Ланкастер ($0,3361 \pm 0,0964$). Цікаво, що лінії, обрані для культури *in vitro*, мають середню SNP-дистанцію з Oh43 на рівні $0,4600 \pm 0,0369$, що суттєво не відрізняється від їхніх середніх дистанцій з A188 та Chi31 (відповідно $0,4511 \pm 0,0250$ та $0,4612 \pm 0,0163$). Середня відстань ліній Ланкастер для культури *in vitro* з PLS61 ($0,5450 \pm 0,0126$) значно більша, ніж з Oh43 ($0,4600 \pm 0,0369$). Спорідненість ліній Ланкастер, обраних для подальших досліджень в культурі *in vitro*, до типових представників

Таблиця 3.10

SNP-дистанції між сучасними лініями плазми Ланкастер, обраними для досліджень в культурі *in vitro*, та лініями-стандартами A188, Chi31 та PLS61

Лінія плазми Ланкастер	SNP-дистанція між лінією плазми Ланкастер та		
	лінією A188, частка одиниці	лінією Chi31, частка одиниці	лінією PLS61, частка одиниці
ДК633	0,4807	0,4632	0,5228
ДК267	0,4211	0,4211	0,5439
ДК212	0,4105	0,4421	0,5439
ДК6080	0,4000	0,4632	0,5298
ДК633266	0,4842	0,4772	0,5544
ДК298	0,4456	0,4526	0,5474
ДК3070	0,4877	0,4982	0,5684
ДК236	0,4632	0,4702	0,5684
ДК633325	0,4667	0,4632	0,5263
$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$	0,4511 $\pm$ 0,0250	0,4612 $\pm$ 0,0163	0,5450 $\pm$ 0,0126
Спорідненість, Lim, %	51,2 $\div$ 60,0	50,2 $\div$ 57,9	43,2 $\div$ 47,7
Спорідненість, $\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$, %	54,9 $\pm$ 2,2	53,9 $\pm$ 1,4	45,5 $\pm$ 1,1

даної плазми – ліній Мо17 та Oh43 в середньому знаходиться на рівні відповідно 70,5% та 53,5%, а до ліній-стандартів A188, Chi31 та PLS61 у середньому на рівні відповідно 54,9%, 53,9% та 45,5%. Тобто обрані лінії більш споріднені з Мо17, їхня спорідненість з Oh43 менша, ніж з Мо17, знаходиться приблизно на однаковому рівні з A188, Chi31 та значно менша відносно PLS61.

У вигляді дендрограми взаємовідносини між лініями, які використані для характеристики плазми Ланкастер в культурі *in vitro*, типовими представниками цієї плазми Мо17 і Oh43 та лініями стандартами A188, Chi31 та PLS61, представлено на рисунку 3.6.

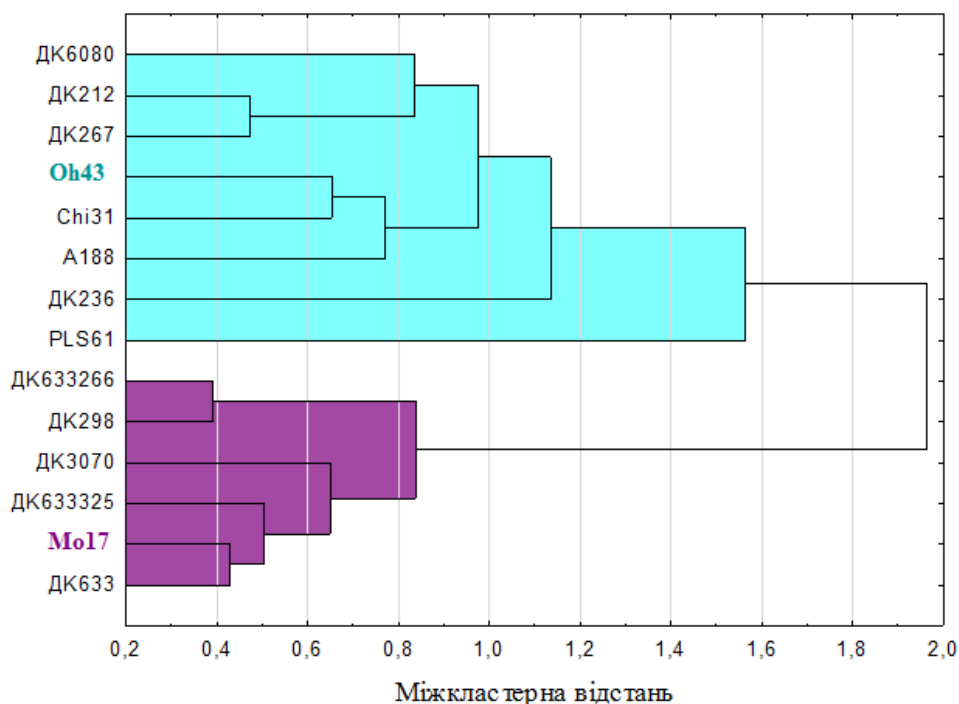


Рис. 3.6. Дендрограма генетичних взаємовідносин за результатами SNP-аналізу між лініями кукурудзи плазми Ланкастер, обраними для досліджень в культурі *in vitro*, лініями Mo17 і Oh43 та лініями-стандартами A188, Chi31 та PLS61 (метод повного зв'язку)

Як видно з рисунку 3.6, на дендрограмі виділяються два кластери: I (фіолетовий) – кластер, який містить п'ять з дев'яти ліній Ланкастер та лінію Mo17; II (бірюзовий) – кластер, який містить чотири з дев'яти ліній плазми Ланкастер, лінію Oh43 та лінії-стандарти з інших типів зародкових плазм A188, Chi31 та PLS61. Звертає увагу, що в кластері II лінія PLS61 розташовується осторонь і є найбільш віддаленою від решти ліній.

Таким чином, лінії кукурудзи DK633, DK267, DK212, DK6080, DK420-1, DK633266, DK298, DK3070, DK236 та DK633325 плазми Ланкастер, обрані для подальших біотехнологічних досліджень в культурі *in vitro*, мають високу спорідненість з типовими представниками даної зародкової плазми Mo17 та Oh43. Вони належать до обох підплазм даної плазми та за результатами SNP-аналізу можуть розглядатися як базові для всебічної характеристики даного типу зародкової плазми в культурі *in vitro*.

3.6. Обговорення

Для правомірного використання інформації, отриманої при SNP-генотипуванні необхідно, щоб використані маркери відповідали низці вимог при аналізі саме досліджуваної добірки зразків [285]. Так, частота пропущених даних за маркером i не повинна перевищувати 20%, маркери обираються лише біалельні, тому в досліджуваній добірці вони повинні проявляти диморфізм, PIC маркера бажано мати $>0,25$.

Середня гетерозиготність проаналізованих зразків в нашому дослідженні склала 1,25%, в середньому 0,0-0,4 гетерозиготних SNP-сайтів на одну лінію, що свідчить про високу, на рівні 98,75%, гомозиготність досліджених ліній. Ми виключали гетерозиготні SNP-локуси з аналізів і розрахунків. W. Wen et al. [375] показали, що гетерозиготність за SNP-маркерами коливається від 1% у ліній CIMMYT до 36% у місцевих американських популяцій. У проаналізованих поширених в Україні гібридів F_1 гетерозиготність за SNP-маркерами більша, складає в середньому 41,4%.

Спорідненість 79% проаналізованих ліній з CIMMYT-програм для східної та південної Африки в роботі K. Semagn et al. [340] знаходилася на рівні 5-50%, а 94% попарних генетичних дистанцій вкладалися в діапазон 0,3-0,4, причому більшість ліній автори вважають унікальними для цієї селекційної програми. Для 59% проаналізованих за SNP-панеллю 55K ліній кукурудзи помірного та тропічного поясів спорідненість знаходилася на рівні 0-0,5%, а для 25% ліній – на рівні 5-20%, тобто даний набір був складений із значно віддалених між собою в генетичному відношенні, різноманітних та навіть унікальних зразків [379]. Переважна більшість попарних SNP-генетичних дистанцій між проаналізованими нами лініями (54,8%) входять до інтервалу 0,4-0,5, найменша кількість дистанцій потрапляє в діапазон 0,8-0,9 – 0,02%. Дистанцій в діапазоні 0,9-1 не виявлено взагалі. В роботі В. Ю. Черчеля та ін. [145], показано, що для спорідненого генетичного матеріалу, сестринських ліній характерними є SNP-дистанції розміром до 0,35, а

дистанції більші за 0,35 забезпечують стійкий гетерозисний ефект у гібридів кукурудзи F_1 . Таким чином, серед дослідженого нами набору ліній можна обрати як споріднені, сестринські лінії, і неспоріднені лінії для гетерозисних програм.

Показник генного різноманіття для досліджених нами ліній Дніпровської селекційної програми знаходився в діапазоні 0,1701-0,1901. Це значно менше, ніж для популяцій CIMMYT (0,2669) і ліній з програми US-GEM для розширення зародкової плазми США (0,3891), які вміщують значні колекції ліній, в тому числі тропічні, азійські, південно-американські та інші [375]. Нижчі значення показника генного різноманіття ліній та його вузький діапазон в наших дослідженнях ми пов'язуємо зі специфічним набором проаналізованих ліній. Адже це лінії Дніпровської селекційної програми, створення яких проводилося в специфічних та суворих стосовно посухи і спеки умовах степової зони України, що призвело до концентрації певних алельних варіантів SNP-маркерів у збиток їхньому різноманіттю.

Таким чином, загальні характеристики проведеного нами SNP-генотипування відповідають встановленим вимогам та знаходяться на рівні, отриманому іншими авторами при сиквенуванні геномів ліній кукурудзи різного походження. Разом з тим, проведені дослідження засвідчують унікальність Дніпровської селекційної програми як сегменту загального генофонду світових генетичних ресурсів кукурудзи.

Проведене широкогеномне SNP-генотипування 91 лінії кукурудзи дозволило не тільки отримати їхні SNP-паспорти, що має практичне значення в сертифікації ліній, захисті авторських прав, селекційній практиці, але і використати інформацію про алельний стан маркерних сайтів для порівняльного аналізу зародкових плазм.

Широкогомний SNP-аналіз плазми Ланкастер у порівнянні з іншими плазмами раніше не проводився. В будь-якому випадку при генотипуванні 350-450 [340, 375, 376], 593 [379], 770 [285], 2815 [332] зразків за SNP-панелями незалежно від їхніх розмірів з'являється величезний обсяг інформації, аналіз якої підвладний лише спеціальним інструментам

математичного аналізу. В сучасній практиці прийнято застосовувати алгоритми принципового компонентного аналізу, аналізу генетичної структури популяцій за програмою Structure, різні алгоритми кластеризації, дисперсійного та інших видів біометричних аналізів. Комплексне використання цих алгоритмів дозволяє з усього масиву інформації стосовно алельного стану SNP-маркерів виділити групи генотипів, які мають подібність своїх членів усередині групи більшу, ніж з представниками інших груп. Такий комплексний підхід відкриває можливість проводити ієрархізацію усередині досліджуваних масивів даних, оцінювати ступінь генетичної мінливості усередині груп, що усе разом дозволяє зробити висновок про генетичні взаємовідносини та спорідненість досліджуваних генотипів. В нашому дослідженні результати принципового компонентного аналізу, якісного кластерного аналізу за методом повного зв'язку, аналізу генетичної структури ліній за програмою Structure та дисперсійного аналізу співпадають і підтверджують виокремленість серед проаналізованого масиву певної групи ліній. Лінії саме цієї групи за педігрі і відносяться до зародкової плазми Ланкастер. Маркери, які з високою частотою мають специфічний алельний стан саме в цій групі, було виділено як характерні для плазми Ланкастер. Потрапляння всіх досліджених ліній Дніпровської селекції, які за педігрі відносяться до Ланкастер, в один і той же кластер, до того ж спільний з типовими представниками цієї плазми – лініями Mo17 та Oh43, свідчить про вірне ведення облікових записів та дотримання стратегії гетерозисної моделі в продовж існування Дніпровської селекційної програми. Разом з тим, результати аналізу доводять значне генетичне різноманіття і у середині плазми Ланкастер, що вказує на її значний потенціал на території України, а також на еволюцію цього типу плазми з моменту виникнення і до тепер. Особливо це стосується групи ліній, більш близьких до Oh43, які складають окремий підкластер. Проведений аналіз генетичної структури масиву ліній кукурудзи з Дніпровської селекційної програми та інших програм виявився дещо глибшим, а розраховані коефіцієнти приналежності Q дозволили ідентифікувати в певних сайтах геному кожної лінії частку спільних алелів

не тільки серед всіх проаналізованих ліній, а і з предковими популяціями. Результати аналізу за Structure показують, що генетична структура ліній Ланкастер за станом SNP-маркерів не є на 100% унікальною, однак вона дозволяє з високою імовірністю диференціювати їх від ліній інших зародкових плазм. Отримані результати свідчать, що певна частка використаних SNP-маркерів має алелі, спільні для Ланкастер та інших зародкових плазм, які можуть походити від предкових форм, що існували ще до появи таких сортів як Ланкастер, Рейд, Айодент та інших.

PCA, Structure і алгоритми кластеризації неодмінно використовуються при аналізі результатів широкогеномного генотипування [202, 378, 391]. В роботах інших авторів, які, як правило, оцінюють спорідненість і групування світових генетичних ресурсів культурних рослин, спільне використання PCA, Structure, методів кластеризації та інших за результатами SNP-генотипування доводить генетичну дивергенцію перш за все генотипів кукурудзи помірного та тропічного поясів [378], розподіл кластерів за групами адаптації – Lowland Tropical, Subtropical, Highland Tropical [378] та групами, які відповідають історії селекції кукурудзи в CIMMYT [378], хоча такі результати не завжди підтверджуються при використанні інших SNP-панелей [340]. Треба також взяти до уваги, що лише сучасний період гетерозисної селекції характеризується інбридингом у вихідних популяціях в рамках однієї зародкової плазми, що є наслідком стратегії виробництва сучасних гібридів як гібридів саме F_1 , які поєднують дві лінії різних типів зародкової плазми. Проте у недалекому минулому в селекції і виробництві гібридної кукурудзи широко використовувалась модель трилінійних і подвійних міжлінійних гібридів [113]. Популяції, вихідні для інбридингу, формувалися із залученням одночасно різних типів зародкової плазми, що наразі не дозволяє при SNP-аналізі ліній, отриманих таким способом, провести чітке групування за спорідненістю. В сучасний період селекції така проблема зберігається для зразків тропічної кукурудзи, системна селекція якої ведеться лише з середини 80-х років XX сторіччя [378].

S. Mikić et al. [294] проаналізувавши 96 ліній кукурудзи помірного поясу Південно-Східної Європи за п'ятьма SSR-маркерами виділили шість кластерів, серед яких кластери, що містили лінії BSSS, Ланкастер, Айодент. Автори довели значне різноманіття ліній плазми Ланкастер і перспективність її використання в селекційному процесі, а також для асоціативного картування цільових ознак. S. D. Smith et al. [352] на основі генотипування 380 ліній Техаської селекційної програми за 766 SNP-маркерами, здійснили їхній поділ на групи, який співпадав з поділом за педігрі на групи BSSS, NSS, Айодент та тропічну. Разом з тим, K. Semagn et al. [340] не підтверджує зв'язок між результатами генотипування за 1065 SNP-маркерами 450 ліній кукурудзи та поділом на дві гетерозисні групи за комбінаційною здатністю, оціненою в діалельних та тестерних схрещуваннях. Автори пояснюють це впливом генотипу батьківських компонентів і тестеру на прояв такої фенотипової ознаки як комбінаційна здатність і її неспівпадіння з результатами кластеризації за молекулярно-генетичними маркерами.

В ході проведеної роботи нами ідентифіковано наступний алельний стан SNP-маркерів панелі BDI-III як специфічний саме для ліній плазми Ланкастер порівняно з лініями інших плазм (на рівні значущості 0,001): BDI-III-332Г, BDI-III-151А, BDI-III-256А, BDI-III-331Т, BDI-III-335Ц, BDI-III-185Ц, BDI-III-343А, BDI-III-181Ц, BDI-III-288А та BDI-III-190А. Тобто така одиниця внутрішньовидового поділу культурних рослин як зародкова плазма може мати свій характерний стан SNP-маркерів – специфічний алельний стан маркерних сайтів в молекулі ДНК, який достовірно відрізняє її геном від геномів представників інших типів зародкової плазми. З усієї панелі ми відібрали саме ці 10 *top*-SNP-маркерів, оскільки вони мають найбільшу різницю між частотою мажорного алеля в групі неланкастерівських ліній і частотою однойменного алеля в групі ліній Ланкастер. В. М. Prasanna [317] у своєму огляді, зокрема на основі робіт [252, 385], стверджує, що спільне використання SNP-гаплотипів як інформації про декілька SNPs усередині одного й того ж гена чи локуса, може бути більш корисним, ніж

використання в аналізі генетичного різноманіття SNP-алелів самих по собі. Ідентифіковані в нашому дослідженні 10 *top*-SNP-маркерів наведено залежно від їхнього розташування в групах зчеплення (хромосомах), тобто представлено у вигляді гаплотипу.

Х. Wu et al. [376], досліджуючи селекційні лінії Китаю, показали, що відстань, на якій відбувається порушення зчеплення (linkage disequilibrium, LD за [200]), для кукурудзи складає 391 kb. С. Xu et al. [379] визначили порушення зчеплення на відстані 100-150 kb для ліній помірного клімату та 400-450 kb для ліній тропічного клімату, а С. Riedelsheimer et al. [331] при аналізі ліній різного походження – як 500 kb. LD-відстань між двома специфічними SNPs в роботі Y. Lu et al. [285] склала 142 kb. М. С. Romay et al. [332] заключили, що відстань, на якій відбувається порушення зчеплення, значною мірою залежить від типу зародкової плазми та району геному, де розташовані маркери, що проявляють зчеплення.

Загалом, середня щільність маркерів панелі BDI-III – це 1 маркер на $5,36 \times 10^6$ п.н. [17, 120]. В нашій роботі тісно зчепленими маркерами вважали маркери, розташовані на одній хромосомі, відстань між якими менша за 5 сМ, тобто менша за 50-50000 нуклеотидів [17, 129, 311]. Серед 10 *top*-SNP-маркерів, специфічних для плазми Ланкастер, в тісному зчепленні між собою перебувають лише маркери BDI-III-335 та BDI-III-331, розташовані на хромосомі 9, в біні 9.04, на відстані 595 нуклеотидів. Інші 8 маркерів не є тісно зчепленими, хоча вони розподілені за групами зчеплення таким чином, що на хромосомах 5 і 9 розташовано по 3 маркери, а на решті хромосом – по одному.

Оскільки локалізація маркерів панелі BDI-III є відомою, хоча за угодою [199] з фірмою BioDiagnostics Inc. і не підлягає розголошу, ми перевірили, скориставшись базами Genome та Gene ресурсу NCBI [299, 300], в яких функціональних районах геному знаходяться перелічені вище маркери. З'ясувалося, що з означених маркерів лише BDI-III-288 знаходить усередині гена. Це ген rso081025 (неохарактеризований LOC100193028) з невідомою

функцією довжиною 13514 нуклеотидів, який є протеїнкодуєчим, розміщений на хромосомі 8, в біні 8.01 (ID:100193028). Інші дев'ять маркерів знаходяться в міжгенних ділянках, але деякі з них розташовані поблизу певних генів. Аналіз розташування десяти *top*-SNP-маркерів, характерних для ліній плазми Ланкастер, залежно від їхнього зчеплення з генами, локалізованими *upstream* та *downstream* відносно позиції маркера, показав, що на відстані 50-50000 нуклеотидів (5 сМ) від них розташовані шість локусів, функції яких поки не з'ясовані, та сім генів, три з яких позначені як модельні. Інші чотири гени, які розташовані на відстані менше 5 сМ від SNP-маркера, – це ген LOC100283148 (gibberellin 20 oxidase 2) (бін 4.05, *upstream* від маркера 151, ID:100283148), ген LOC100272380 (SNARE associated Golgi protein family: бін 9.04, *upstream* від маркера 332, ID:100272380), ген TRNAA-AGC (transfer RNA alanine, anticodon AGC: бін 5.01, *downstream* від маркера 181, ID:109940041) та ген pco112738(537) (Putative zinc transporter) (бін 10.01, *downstream* від маркера 343, ID:100191969). Тісне зчеплення означених маркерів з наведеними генами, які беруть участь у біосинтезі гібереліну, синтезі аланінової т-РНК, транспорті цинку та інших функціях, може буде використано у подальшому в MAS-селекції, якщо буде доведено, що певні алельні варіанти даних генів у генотипів плазми Ланкастер корелюють з алелями зазначених SNP-маркерів і альтернативним проявом певних фенотипових ознак. Проведене нами широкогеномне генотипування шляхом часткового секвенування великої кількості ліній, які походять з сучасної селекційної програми і можуть бути диференційовані та згруповані за будь-яким принципом, є важливим кроком на шляху до широкогеномного маркування ознак у кукурудзи, в тому числі господарсько цінних. Широкогеномне генотипування також дає можливість ознайомитися з плазмою Ланкастер тим дослідникам, які раніше працювали з іншими зародковими плазмами кукурудзи і не включали її в гетерозисні моделі, або працювали лише з модельними лініями, як це до недавнього часу було прийнято в інших галузях біотехнології, наприклад у клітинній та генетичній

інженерії. Перспективами використання широкогеномного генотипування за маркерами однонуклеотидного поліморфізму є підбір ліній кукурудзи, контрастних за тією чи іншою ознакою, та перехід до асоціативного картування. Така робота вже проводиться для кукурудзи [156, 171, 172, 286, 309, 379], але в недостатньому обсязі, без врахування специфічних алельних асоціацій у генотипів, адаптованих до умов різноманітних світових регіонів вирощування кукурудзи. Окремо це стосується ознак, які не є безпосередньо господарсько цінними, але є важливими для клітинно- та генетично-інженерних маніпуляцій в рамках конкретних типів зародкової плазми.

В проведеному нами дослідженні виявлено рідкісні алелі з $MAF < 0,05$, причому у Ланкастер вони зустрічалися з частотою 6%, а у неланкастерівської групи – лише 1,8%. Загалом, виявлення рідкісних алелів як однонуклеотидних, так і більших за розміром, як в міжгенних, так і в генних районах, є цікавим та корисним для розширення різноманіття вихідного селекційного матеріалу культурних рослин, особливо в умовах зміни клімату, появи нових патогенів, зростання попиту на функціональні продукти, продукти нового призначення тощо. Як відмічають J. M. Marita et al. [291], B. M. Prasanna [317], W. Wen et al. [375], ідентифікація методами широкогеномного генотипування основних наборів алелів маркерів різних типів та рідкісних алелів дуже важлива для збереження та розширення різноманіття генетичних ресурсів, які залучаються до селекційного процесу, та, з іншого боку, дозволяє виділити так звані «генералізовані алелі», які є типовими для різних типів зародкової плазми, груп адаптації, фенотипових груп за ознаками. В комерційних зародкових плазмах рідкісних алелів мало, але в світових колекціях генетичних ресурсів їх багато. Наприклад, в роботі M. C. Romay et al. [332] (681257 SNPs, 2815 ліній) більше половини SNP-алелів були рідкісними ($MAF < 0,05$). В роботі K. Semagn et al. [340] в масиві ліній з CIMMYT-програм для східної та південної Африки, які мали вузьку генетичну базу, 37,7% SNPs мали MAF на рівні 0,051-0,2. Більшість ліній автори вважають унікальними для цієї селекційної програми.

Саме рідкісні алелі зі значними ефектами на думку багатьох дослідників приймають значну участь у контролі кількісних ознак, пояснюють феномен «відсутності успадкування» (missing heritability). За такого явища значна частка генетичної мінливості не враховується при детекції за GWAS, коли певні рідкісні алелі приурочені до певних типів зародкової плазми кукурудзи, як наприклад, алель гена *crtRB1*, який забезпечує підвищення вмісту β -каротину в зерні кукурудзи через інгібування його переходу в β -криптоксантин та зеаксантин перш за все у представників плазми Лакон [71, 243, 313, 383]. Ідентифіковані в нашому дослідженні пропущені алелі в групі ліній Ланкастер та відповідні унікальні алелі ліній неланкастерівських плазм можуть бути використані як додаткові маркери ланкастерівського чи неланкастерівського походження генотипу. Доцільно також у майбутньому дослідити зв'язок унікальних алелів з фенотиповими особливостями певного типу зародкової плазми.

В проведеному дослідженні дисперсійний аналіз довів більшу ступінь варіювання між групами ліній Ланкастер та неланкастерівських плазм, ніж усередині цих двох груп. Однак сила впливу фактору «група ліній» склала лише 9,4% для розміру генетичних SNP-дистанцій та 18,8% для показника генного різноманіття ліній, що свідчить про значний, на рівні 90,6% та 81,2%, вплив неорганізованих факторів, серед яких і такий фактор, як варіювання послідовності нуклеотидів в геномах ліній і Ланкастер, і інших плазм. Так, спорідненість ліній за алельним станом SNP-маркерів усередині групи Ланкастер склала 66,23%, а у групі неланкастерівських ліній, куди увійшли генотипи декількох плазм, – 57,71%, що вказує не тільки на різницю між двома групами ліній, але і на значний потенціал різноманіття усередині Ланкастер. Аналогічний висновок про суттєве різноманіття ліній Ланкастер за SNP-маркерами можна зробити і за оцінками їхньої спорідненості з типовими представниками двох підплазм плазми Ланкастер – Mo17 та Oh43. З цими лініями у ліній плазми Ланкастер Дніпровської селекційної програми за алельним станом збігається лише певна частина маркерів (52,5-89,7% для

Mo17 та 48,2-66,8% для Oh43). Можна припустити, що алелі SNP-маркерів, які відрізняються у представників Ланкастер з Дніпровської селекційної програми від Mo17 та Oh43, виникли в результаті багатьох циклів відборів, рекомбіногенезу та залучення неспорідненого матеріалу при створенні українських ліній.

Проведене нами молекулярно-генетичне вивчення ліній плазми Ланкастер – лише перший етап в біотехнологічному дослідженні цієї плазми. Для всебічної характеристики реакції ліній плазми Ланкастер, зокрема за чутливістю в культурі *in vitro*, в клітинно- та генетично-інженерних маніпуляціях, нами було обрано дев'ять ліній цієї плазми та показано, що ступінь їхньої спорідненості за алельним станом маркерів одонуклеотидного поліморфізму до типових представників даної плазми – ліній Mo17 та Oh43 знаходиться на рівні відповідно 70,5% та 53,5%, а до ліній-стандартів високої чутливості при культивуванні *in vitro* A188, Chi31 та PLS61 у середньому відповідно 54,9%, 53,9% та 45,5%. Тобто обрані лінії більш споріднені до Mo17, їхня спорідненість з Oh43 менша та знаходиться приблизно на однаковому рівні з A188, Chi31 та значно менша відносно PLS61. Ці лінії ми використали як базові в клітинно- та генетично-інженерній характеристиці плазми Ланкастер.

Таким чином, на прикладі класичних та сучасних ліній складено молекулярно-генетичну частину біотехнологічної характеристики зародкової плазми Ланкастер кукурудзи, яка дозволяє використовувати специфічний алельний стан SNP-маркерів для характеристики, збереження біорізноманіття і практичного використання колекційних генетичних ресурсів та сучасних, перспективних селекційних зразків, їхнього групування та побудови внутрішньовидової класифікації *Zea mays*, ієрархизації генотипів, оцінки варіювання та прогнозування ступеня гетерозису, виявлення рідкісних, пропущених і унікальних алелів, а також в паспортизації і захисті авторських прав на сорти рослин. Безпосередньо в нашому дослідженні ця характеристика також дозволила підтвердити генетичну приналежність ліній,

використаних у клітинно- та генетично-інженерних дослідженнях в розділах 4 і 5, саме до плазми Ланкастер, а також показати ступінь спорідненості сучасних і класичних ліній Ланкастер та ліній, які є стандартами чутливості в культурі *in vitro*.

3.7. Висновки до розділу 3

В результаті проведеного генотипування 91 лінії кукурудзи за 384 SNP-маркерами панелі BDI-III, серед яких 29 сучасних ліній, які за педігрі відносяться до зародкової плазми Ланкастер, а також 60 ліній інших типів зародкової плазми, виявлено наступні характеристики SNP-маркерів та молекулярно-генетичні особливості ліній плазми Ланкастер:

1. Для суцільного набору досліджених ліній середня гомозиготність за результатами SNP-генотипування склала 98,75%. Частотою пропущених даних >20% характеризувалися шість використаних маркерів (1,6%). Частка диморфних маркерів в досліджуваному наборі ліній склала 99,3%, причому 80,6% з них характеризувалися частотою мінорного алеля >0,2, середній показник зсуву генного різноманіття маркерів – 0,2984, PIC – в середньому 0,3144. Частота мажорного алеля в дослідженому наборі ліній в середньому склала 0,7678, показник генного різноманіття ліній коливався в межах 0,1701-0,1873. Значення ключових показників знаходяться в межах, які дозволяють проводити аналіз даних SNP-генотипування.

2. Результати принципового компонентного аналізу, аналізу генетичної структури ліній за програмою Structure, якісного кластерного аналізу за методом повного зв'язку та дисперсійного аналізу співпадають і підтверджують наявність серед проаналізованого масиву окремої групи ліній, які за педігрі відносяться саме до зародкової плазми Ланкастер.

3. Специфічний набір алелів плазми Ланкастер, визначений за частотами мажорних алелів десяти *top*-SNP-маркерів в порівнянні з групою ліній інших типів зародкової плазми встановлено як BDI-III-332Г, BDI-III-151А, BDI-III-

256A, BDI-III-331T, BDI-III-335Ц, BDI-III-185Ц, BDI-III-343A, BDI-III-181Ц, BDI-III-288A та BDI-III-190A.

4. Зародкова плазма Ланкастер характеризується за результатами SNP-генотипування середніми значеннями частоти мажорного алеля на рівні $0,7678 \pm 0,0159$, показника генного різноманіття ліній – $0,1774 \pm 0,0015$. Середнє значення розміру генетичних SNP-дистанцій між лініями Ланкастер ($0,3377 \pm 0,0099$) свідчить про значне генетичне різноманіття усередині даної плазми за алельним станом маркерів одонуклеотидного поліморфізму.

5. Кластерний аналіз підтверджує наявність двох підкластерів усередині плазми Ланкастер, до одного з яких входить типовий представник підплазми *Mo17* – лінія Mo17, а до іншого – типовий представник підплазми *Oh43* – лінія Oh43. Спорідненість сучасних ліній плазми Ланкастер з типовими представниками цієї плазми за результатами SNP-генотипування коливається у межах 52,2-89,7% для Mo17 та 48,2-66,8% для Oh43.

6. За результатами SNP-генотипування встановлено, що лінії кукурудзи ДК633, ДК267, ДК212, ДК6080, ДК633266, ДК298, ДК3070, ДК236 та ДК633325, обрані як представники плазми Ланкастер для подальших біотехнологічних досліджень в культурі *in vitro*, належать до обох підплазм даної плазми, мають спорідненість з типовими представниками даної плазми Mo17 та Oh43 на рівні відповідно 54,0-85,3% і 48,8-63,5%, з лініями-стандартами високої тотипотентності в культурі *in vitro* A188, Chi31 і PLS61 на рівні відповідно 54,9, 53,9 та 45,5% та за результатами SNP-аналізу можуть розглядатися як базові для клітинно- і генетично-інженерної характеристики даного типу зародкової плазми.

7. SNP-паспорти ліній кукурудзи, результати кількісного аналізу генетичної структури та кластеризації як всього масиву проаналізованих ліній, так і окремо ліній плазми Ланкастер рекомендовано до використання в селекційному процесі цієї культури на етапі створення вихідних популяцій для інбридингу, а також в захисті авторських прав на лінії і гібриди F₁ кукурудзи.

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

Матеріали даного розділу представлено в публікаціях [18, 43, 59, 61, 64-67, 213] та методичних розробках [58, 60], які використовуються у селекційному процесі. На основі розрахованих SNP-дистанцій між дослідженими лініями кукурудзи у співавторстві створено і зареєстровано в Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні, гібрид кукурудзи Корунд [125] з часткою авторства 5%; подано заявку на винахід («Спосіб моніторингу вихідного селекційного матеріалу при створенні ліній кукурудзи») [80].

РОЗДІЛ 4

КЛІТИННО-ІНЖЕНЕРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ
ЛАНКАСТЕР У КУКУРУДЗИ

Метою роботи було вивчення особливостей калусогенезу зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи, зокрема генотипових особливостей індукції калусогенезу і субкультивування калусів, та регенерації рослин з калусної тканини *in vitro*. Оцінку ступеня тотипотентності генотипів Ланкастер проводили на прикладі 10 ліній ДК212, ДК236, ДК267, ДК298, ДК420-1, ДК633, ДК3070, ДК6080, ДК633266 та ДК633325 відносно ліній-стандартів А188, Chi31 і PLS61, відомих своєю потужною калусогенною та регенераційною здатністю [82, 110, 122, 146, 248]. Приналежність обраних ліній до плазми Ланкастер за результатами SNP-аналізу та ступінь їхньої спорідненості з типовими представниками цієї плазми Мо17 і Oh43, а також лініями-стандартами А188, Chi31 і PLS61 підтверджено і охарактеризовано у розділі 3. Походження ліній Ланкастер, залучених до клітинно-інженерних досліджень, за педігрі наведено у розділі 2 (див. підрозділ 2.2 і табл. 2.2).

Проаналізовано калусогенний та регенераційний потенціал гібридів F₁ між лініями Ланкастер та між лініями Ланкастер і лініями-стандартами. Оцінено ступінь варіювання здатності до калусогенезу і регенерації рослин у генотипів Ланкастер за зміни складу живильних середовищ. Оптимізовано виживаність рослин-регенерантів у ґрунті. Складено норми біотехнологічного процесу отримання калусної тканини та рослин-регенерантів у ліній Ланкастер.

4.1. Калусогенез в культурі *in vitro* у генотипів зародкової плазми Ланкастер

Утворення калусної тканини з незрілих зародків кукурудзи в культурі *in vitro* починається вже в перші два тижні після експлантації незрілих зародків

на середовище для індукції калусогенезу. До 30-ї доби культивування утворюються морфогенні та неморфогенні калуси. Серед морфогенних виділяють калуси I типу та калуси II типу [248]. Біотехнологічний інтерес представляють саме морфогенні калуси обох типів, показані нами на рисунку В.1 додатку В на прикладі ліній плазми Ланкастер ДК267 та ДК633. З 31-ї доби від експлантації зародків і впродовж наступних 30-240 діб і більше відбувається процес субкультивування калусної тканини II типу на середовищі, яке називається середовищем субкультивування (рис. В.2).

4.1.1. Генотипові особливості індукції калусогенезу та субкультивування у ліній та гібридів кукурудзи плазми Ланкастер

Нами було оцінено потенціал утворення морфогенних калусів, зокрема калусів I і II типу, та здатність до субкультивування у генотипів Ланкастер порівняно з лініями-стандартами.

Для індукції калусогенезу використовували живильне середовище N₆30 (див. табл. А.3 додатку А). Дослідження калусогенезу проводили у 2010-2012 рр., які розрізнялися за погодними умовами підчас вирощування донорних рослин. За [37, 70] 2010 р. характеризується як несприятливий, 2011 р. – як найбільш сприятливий, а 2012 р. – відносно сприятливий для росту і розвитку рослин кукурудзи.

Основні показники, які характеризують індукцію калусогенезу, детально за лініями плазми Ланкастер та лініями-стандартами протягом трьох років досліджень наведено в додатку В (табл. В.1-В.4). В таблиці 4.1 представлено узагальнену характеристику калусогенезу у ліній Ланкастер порівняно з лініями-стандартами.

Як видно з таблиці 4.1, за середніми значеннями досліджені показники в групі ліній Ланкастер були нижчими за аналогічні у ліній-стандартів. Виключення склала лише частота утворення калусів I типу у 2012 році, яка була неочікувано низькою у PLS61 (див. табл. В.3). Інтервали варіювання

Таблиця 4.1

Середні значення показників калусогенезу у ліній кукурудзи плазми
Ланкастер та ліній-стандартів

Генотипи	n*	2010 р.	2011р.	2012 р.	Середнє багаторічне
Загальна частота калусогенезу, %					
Лінії Ланкастер	10	56,6±7,3	92,4±2,6	91,1±0,8	80,1±1,6
Лінії-стандарти	3	91,3±1,3	97,0±1,9	96,3±2,5	96,2±1,3
Частота утворення морфогенних калусів, %					
Лінії Ланкастер	10	34,3±5,1	70,4±4,4	73,6±3,5	59,4±1,7
Лінії-стандарти	3	59,2±4,5	90,9±3,3	95,0±2,8	86,5±2,6
Частота утворення калусів I типу, %					
Лінії Ланкастер	10	12,4±3,3	7,8±1,3	30,9±5,0	25,7±1,7
Лінії-стандарти	3	19,7±3,7	16,2±2,5	5,0±2,8	12,2±1,5
Частота утворення калусів II типу, %					
Лінії Ланкастер	10	21,9±3,9	62,6±4,6	42,7±4,2	43,8±1,1
Лінії-стандарти	3	39,5±4,5	74,7±4,0	90,0±3,9	65,4±2,9

Примітка. *n – кількість досліджених ліній, шт.

показників були передбачувано значними усередині великої за обсягом групи Ланкастер. Так, як видно з таблиць В.1-В.4, загальна частота калусогенезу за окремими лініями Ланкастер коливалася у межах 0,0-100,0%, частота утворення морфогенних калусів – 0,0-98,5%, частота утворення калусів I типу – 0,0-96,2%, II типу – 0,0-94,4% залежно від генотипу та умов року. Найвищий рівень загальної частоти калусогенезу зафіксовано у ДК212 в 2011 р., частоти утворення морфогенних калусів – у ДК236 в 2012 р., частоти утворення калусів I типу – у ДК633266 в 2012 р., II типу – у ДК212 в 2011 р.

За середніми багаторічними значеннями рівень загальної частоти калусогенезу у ліній-стандартів А188, Chi31 та PLS61 (96,2%) був порівняним з аналогічним показником у ліній Ланкастер групи Mo17/Oh43

(97,0%), дещо вищим, ніж у ліній підплазми *Oh43* (92,3%) та значно вищим, ніж у ліній групи *Mo17mix* та підплазми *Mo17* (відповідно 63,0% та 48,5%). Частота утворення морфогенних калусів у ліній-стандартів (86,5%) була на однаковому рівні з лініями групи *Mo17/Oh43* (87,0%) та значно вищою, ніж у ліній підплазми *Oh43* (63,2%), групи *Mo17mix* (44,2%) та підплазми *Mo17* (34,1%). Частота утворення калусів I типу у ліній-стандартів була низькою (12,2%) через значення показника у 2012 році лише на рівні 5,0% (при варіюванні за роками 19,7–16,2–5,0%). В плазмі Ланкастер цей показник за середнім багаторічним значенням у ліній групи *Mo17/Oh43* був значно вищим (38,9%), а у ліній підплазми *Oh43* (17,6%), групи *Mo17mix* (6,1%) та підплазми *Mo17* (3,3%) знаходився приблизно на тому ж рівні, що і у ліній-стандартів. Частота утворення калусів II типу у ліній-стандартів склала 65,4%. В групі Ланкастер цей показник за середнім багаторічним значенням був нижчим у всіх підплазмах і групах, зокрема склав у *Mo17/Oh43* – 48,1 %, *Oh43* – 45,6%, *Mo17mix* – 38,1% та *Mo17* – 30,9%.

Таким чином, не дивлячись на те, що лінії плазми Ланкастер загалом мають дещо нижчий потенціал індукції калусогенезу, ніж лінії-стандарти, усередині Ланкастер спостерігається значне варіювання за калусогенною здатністю, причому середні рівні ознак, що її характеризують, збільшуються у напрямку *Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43* разом зі збільшенням спадкової різноманітності генетичного матеріалу.

Умови року також визначають здатність до калусогенезу через вплив на фізіологічний стан донорної рослини, з якої ізолюється качан з незрілими зародками, та самого незрілого зародка. Посуха, надмірне зволоження, надто високі або низькі температури спричиняють зміну фізіологічного стану донорної рослини та експлантів, зокрема впливають на ступінь і характер експресії генів, які контролюють інтенсивність калусогенезу [88, 135]. Результати двохфакторного дисперсійного аналізу варіювання показників калусогенезу досліджених ліній Ланкастер під впливом генотипу і умов року

та взаємодії цих двох факторів представлено в таблицях В.5-В.8 та в узагальненому вигляді в таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Сила впливу генотипу, умов року та їхньої взаємодії на індукцію калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер

Фактор впливу	Сила впливу ($\eta^2_{\text{х}} \pm \Delta\eta^2_{\text{х0,01}}$) фактора на, %			
	загальну частоту калусогенезу	частоту утворення		
		морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
Генотип	8,9±0,2	8,1±0,2	5,9±0,2	4,6±0,2
Умови року	0,2±0,1	2,3±0,1	5,9±0,2	10,4±0,04
Генотип × умови року	6,9±0,5	11,3±0,4	24,2±0,4	23,4±0,3

Як видно з таблиць В.5-В.8 та 4.2, вплив всіх досліджених факторів для всіх показників був достовірним на рівні значущості 0,01. Цікаво, що частка варіювання за організованими факторами в дисперсійному комплексі для «загальної частоти калусогенезу» була низькою (16,0%), але поступово збільшувалася з конкретизацією ознаки і склала для «частоти утворення морфогенних калусів» вже 21,7%, «частоти утворення калусів I типу» – 36,0%, «частоти утворення калусів II типу» – 38,4%. Генотип найбільше впливав на загальну частоту калусогенезу, але його контроль слабшав відносно утворення морфогенних калусів, зокрема калусів I і II типів.

Вплив умов року, навпроти, ставав суттєвішим для утворення калусів певного типу порівняно із індукцією загального калусогенезу. Сила впливу взаємодії генотипового та екологічного факторів також збільшувалася з конкретизацією ознаки і для індукції морфогенних калусів та їхніх окремих типів була вирішальною.

Однофакторний дисперсійний аналіз показав достовірний вплив умов року на всі показники індукції калусогенезу у більшості досліджених ліній (табл. В.9). Для характеристики реакції генотипу на змінні умови довкілля

використовують поняття стабільності та екологічної пластичності генотипу. Згідно з [72], стабільність характеризує здатність генотипу підтримувати певний фенотип у різних екологічних умовах за допомогою регуляторних механізмів. Для культури *in vitro* важливим є стабільне відтворення високих значень показників калусогенезу і одночасно якнайменша їхня залежність від умов року. У таблиці В.10 та на рисунку 4.1 представлено взаємозв'язок показників індукції калусогенезу та сили впливу умов року.

Як видно з рисунку 4.1а, для загальної частоти калусогенезу як стабільні, тобто такі, які мають високі значення показника за мінімального впливу умов року, можна визначити всі досліджені лінії окрім ДК633, ДК3070, ДК236 та ДК633325. Для частоти утворення морфогенних калусів (рис.4.1б) як стабільні ми виділяємо перш за все ДК633266, ДК298, Chi31, PLS61, а також ДК267, ДК212, ДК6080 та ДК420-1. За частотою утворення калусів І типу як стабільно демонструючи високі значення показника не можна визначити жодну лінію, оскільки навіть у ДК298, яка мала найбільшу частоту утворення калусів І типу (43,8%), був зависоким показник сили впливу умов року (28,7%) (рис.4.1в). За частотою утворення калусної тканини ІІ типу як стабільні виділяються ДК6080 та ДК420-1, а умовно стабільними можна вважати Chi31, а також ДК212, PLS61 і ДК298 (рис.4.1г).

Таким чином, найбільш стабільними за дії варіюючих умов року для одночасно загальної частоти калусогенезу, частоти утворення морфогенних калусів та частоти утворення калусів ІІ типу є лінії Ланкастер ДК298, ДК6080, ДК212, ДК420-1, одночасно за загальною частотою калусогенезу і частотою утворення морфогенних калусів – ДК633266 і ДК267.

Генотипові особливості індукції калусогенезу у гібридів F_1 між лініями Ланкастер та гібридів F_1 ліній Ланкастер з лініями-стандартами A188, Chi31 та PLS61 досліджували у 2011 р. В додатках представлено детальну характеристику калусогенезу у гібридів між лініями плазми Ланкастер (табл. В.11), гібридів ліній Ланкастер з лініями A188 (табл. В.12), Chi31(табл. В.13)

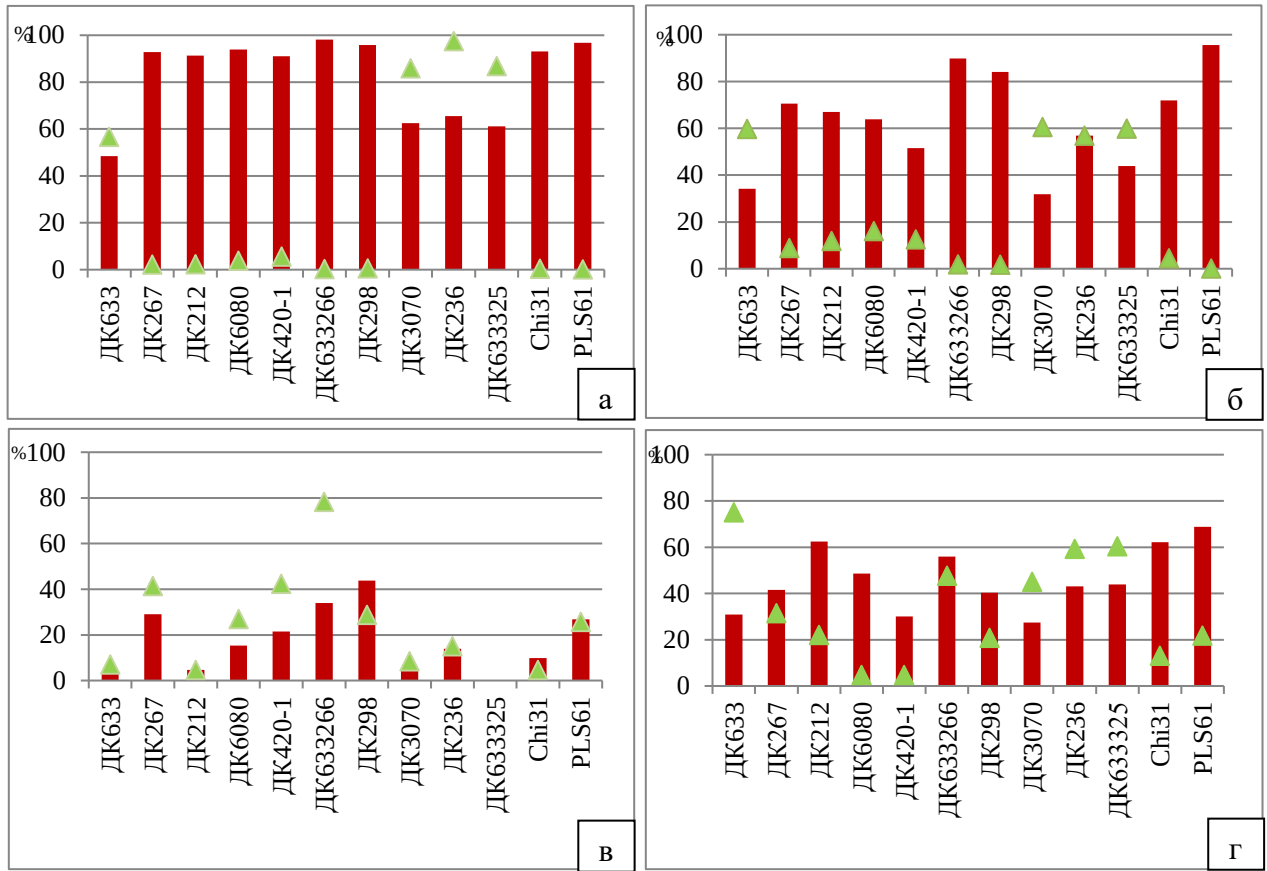


Рис. 4.1. Взаємозв'язок показників індукції калусогенезу та сили впливу умов року для загальної частоти калусогенезу (а), частоти утворення морфогенних калусів (б), частоти утворення калусів I типу (в) і частоти утворення калусів II типу (г) у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів. Червоними стовпчиками позначено рівень показників індукції калусогенезу (%), зеленими трикутниками – рівень сили впливу умов року (%)

та PLS61(табл. В.14). Всі досліджені гібриди ліній Ланкастер між собою та з лініями-стандартами утворювали морфогенні калуси, однак співвідношення їхніх типів залежало від генотипів батьківських ліній. Лише один з двох типів калусної тканини утворювали 19 гібридів з 21 проаналізованого між лініями Ланкастер (91%%), 4 гібриди з 6 між Ланкастер і Chi31 (68%%), 12 гібридів з 20 між Ланкастер і PLS61 (60%). Разом з тим, усі шість досліджених гібридів ліній Ланкастер з A188 сформували обидва типи калусів. В таблиці 4.3 наведено узагальнену характеристику калусогенезу гібридів між лініями Ланкастер та гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами порівняно з батьківськими лініями.

Як видно з таблиці 4.3, для частоти утворення калусів I типу виявляється істотне збільшення значень у гібридів порівняно з лініями, а для частоти утворення калусів II типу – навпаки, збільшення значень у ліній порівняно з гібридами. Тобто в наявності прояв позитивного гетерозису для першого та від'ємного гетерозису для другого показника. Зокрема, для ознаки «частота утворення калусів I типу» рівень істинного гетерозису складає відповідно 582% (L×L), 687% (L×A188), 967% (L×Chi31) і 154% (L×PLS61), а рівень гіпотетичного гетерозису 482% (L×L), 1274% (L×A188), 1833% (L×Chi31) і 165% (L×PLS61). За ознакою «частота утворення калусів II типу» рівень істинного гетерозису складає відповідно –55% (L×L), –46% (L×A188), –0,8% (L×Chi31) і –38% (L×PLS61), а рівень гіпотетичного гетерозису –45% (L×L), –45% (L×A188), –99% (L×Chi31) і –68% (L×PLS61).

Таким чином, узагальнений аналіз показує, що калусну тканину I типу плазми Ланкастер можна отримувати значно ефективніше з гібридів між лініями Ланкастер, ніж з окремих ліній. Ще краще використовувати гібриди ліній Ланкастер з лініями-стандартами високої калусогенної здатності, особливо з Chi31 та PLS61. Для отримання калусної тканини II типу плазми Ланкастер необхідно використовувати як окремі гібриди, перш за все L×A188 та L×PLS61, так і окремі лінії.

Таблиця 4.3

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

Генотипи	n*	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
			морфогенних калусів	калусів І типу	калусів ІІ типу
Гібриди					
L×L**	21	91,2±7,6	79,9±9,3	45,4±5,6	34,4±5,1
L×A188	6	97,2±2,2	95,8±4,0	53,6±8,1	42,2±6,9
L×Chi31	6	77,2±5,5	76,0±6,0	75,4±6,6	0,7±1,1
L×PLS61	20	95,5±2,2	92,6±4,2	74,7±5,3	17,9±2,6
Середнє	53	90,3±4,4	86,1±5,9	62,3±6,4	23,8±3,9
Лінії					
Лінії L	10	92,4±2,6	70,4±4,4	7,8±1,3	62,6±4,6
A188	1	98,7±2,7	92,0±6,3	0	92,0±6,3
Chi31	1	94,9±4,1	84,6±6,7	0	84,6±6,7
PLS61	1	97,3±2,4	96,2±2,8	48,6±7,4	47,5±7,4
Середнє	13	94,7±2,3	80,7±3,9	12,0±1,9	68,7±4,3

Примітка. Дослідження і для гібридів, і для ліній проведено одночасно у 2011 р., *n – кількість досліджених генотипів, шт., **L – лінії плазми Ланкастер.

Якщо розглядати окремі гібриди, то стосовно утворення калусів I типу серед гібридів Ланкастер найбільш чутливими, на рівні 88,2-97,3%, були прямі та зворотні комбінації ДК6080хДК267, ДК236хДК267 та ДК633266хДК212. В групі гібридів з A188 для отримання калусів I типу рекомендовано використовувати A188хДК420-1 (94,2%), з Chi31 – ДК3070хChi31 (100,0%), з PLS61 – ДК633хPLS61 (100,0%) та ДК633266хPLS61 (100,0%).

Для утворення калусів II типу серед гібридів між лініями Ланкастер найкращими були прямі та зворотні комбінації ДК212хДК6080, ДК6080хДК633325, ДК236хДК633325 (82,7-97,3%). В групі гібридів з A188 для отримання калусів II типу рекомендовано використовувати A188хДК298 (97,2%), з PLS61 – ДК298хPLS61 (91,6%). Гібриди з Chi31 для отримання калусів II типу використовувати не рекомендується.

Реципрокний ефект за інтенсивністю утворення калусної тканини I типу відмічено для гібридів між L-лініями, гібридів з Chi31, з PLS61 (по одній парі) та двох пар гібридів L-ліній з A188. У всіх випадках, за виключенням гібрида з PLS61, більші значення показників спостерігали при використанні як материнської лінії Ланкастер. Для частоти утворення калусної тканини II типу реципрокний ефект зафіксовано для трьох пар гібридів LxL та гібридів LxA188 і LxPLS61 (по дві пари). Для пар гібридів LxL і LxPLS61 значення показника були вищими, якщо за материнську використовували лінію, яка належить до підплазми Oh43. В групі LxA188 вищими були значення показника, коли за материнську обирали A188.

Калусна тканина II типу на середовищі субкультивування, яке за складом відповідало середовищу індукції калусогенезу (N₆₃₀, дослідження 2011 р.), на 60-у добу культивування у ліній Ланкастер була добре розвиненою. Це дозволило отримати найбільшу питому сирі масу калусів II типу у ліній групи *Mo17/Oh43* в середньому на рівні $247,1 \pm 36,70$ мг, підплазми *Oh43* – $67,38 \pm 11,25$ мг, групи *Mo17mix* – $51,3 \pm 6,3$ мг, а підплазми *Mo17* – $56,3 \pm 7,1$ мг. Питома сира маса калусів для лінії Chi31 склала $102,1 \pm 13,6$ мг. Отримані дані знову свідчать про суттєве перевищення генотипів зі змішаною спадковістю групи *Mo17/Oh43* над лінією-стандартом порівняно з іншими групами та підплазмами усередині Ланкастер.

4.1.2. Варіювання показників калусогенезу у представників плазми Ланкастер за зміни складу живильних середовищ

Вплив компонентів живильного середовища на індукцію калусогенезу та субкультивування у ліній кукурудзи плазми Ланкастер ми вивчали для з'ясування можливостей розширення норми реакції генотипів, збільшення варіювання та підвищення ефективності біотехнологічних заходів отримання калусної тканини відносно існуючої технології. Ефективність калусогенезу оцінювали за варіювання в середовищі для індукції калусогенезу складу мінеральної основи, концентрації сахарози та цефотаксиму. Ефективність субкультивування калусної тканини II типу оцінювали за варіювання концентрації цефотаксиму в середовищі індукції калусогенезу та сахарози і цефотаксиму в середовищі субкультивування.

Для оцінки впливу складу мінеральної основи середовища для індукції калусогенезу на ефективність калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер використовували середовища N₆30 та MS30 (див. табл.А.3) з мінеральними основами середовищ N₆ за [198] (контроль) та MS за [296], відповідно. Вплив мінеральної основи на індукцію калусогенезу у окремих ліній Ланкастер представлено в таблиці В.15. У ліній Ланкастер загальна частота калусогенезу та частота утворення морфогенних калусів незначно змінювалися із заміною традиційної мінеральної основи N₆ на MS. А ось на виникнення того чи іншого типу морфогенних калусів у різних ліній тип мінеральної основи впливав суттєво. Заміна солей N₆ на MS призвела до зниження частоти утворення калусів I типу у 5 з 8 ліній Ланкастер, а також PLS61 і тільки у однієї лінії, ДК3070, закінчилася суттєвим позитивним ефектом. Заміна солей на MS для калусної тканини II типу, навпаки, дала суттєвий позитивний ефект для 4 з 9 ліній, а негативний – лише для ДК633325. Таким чином, у ліній Ланкастер існують індивідуальні вимоги до мінеральної основи середовища індукції і їх треба враховувати в біотехнологічному процесі.

Для оцінки впливу сахарози на індукцію калусогенезу у ліній плазми Ланкастер використовували живильні середовища N₆30 з 30 г/л сахарози (контроль) та N₆60, в якому вміст сахарози був підвищений до 60 г/л (див. табл. А.3). Вплив сахарози на індукцію калусогенезу у ліній плазми Ланкастер та ліній-стандартів представлено в таблиці В.16 та на рисунку 4.2.

Як видно з таблиці В.16 та рисунку 4.2, у деяких ліній рівень загальної частоти калусогенезу та частоти утворення морфогенних калусів не залежав від концентрації сахарози у середовищі індукції (ДК212, ДК298, ДК236 і ДК633325 та лінії-стандарті), а у інших спостерігалася зміна рівня цих показників залежно від вмісту сахарози. Так, у ДК6080, ДК420-1 та ДК3070 рівень загальної частоти калусогенезу був вищим на середовищі для індукції калусогенезу з 30 г/л сахарози, а у ДК633 – з 60 г/л сахарози. У ДК267 та ДК6080 рівень частоти утворення морфогенних калусів був вищим при використанні 30 г/л сахарози, а у ДК633, ДК633266 та ДК3070 – 60 г/л сахарози. Частота утворення калусів І типу у досліджених ліній коливалася у межах 0,0-48,6% на середовищі N₆30 та 0,0-94,2% на N₆60 залежно від генотипу лінії. Рівень частоти утворення калусів І типу у більшості ліній плазми Ланкастер зростав з підвищенням концентрації сахарози з 30 г/л до 60 г/л в середньому з $7,6 \pm 1,3\%$ до $22,8 \pm 15\%$ (за діапазонами варіювання у ліній: від 0-19,6% при 30 г/л сахарози до 0-68,2% при 60 г/л сахарози). Виключенням були лінії ДК633, ДК267 та ДК236, у яких даний показник достовірно не змінювався за підвищення концентрації цієї речовини. У ліній-стандартів при підвищенні вмісту сахарози з 30 г/л до 60 г/л частота утворення калусів І типу збільшилася в середньому з $16,2 \pm 2,1\%$ до $48,1 \pm 2,5\%$ (за діапазонами варіювання у ліній: від 0-48,6% до 6,3-94,2%, відповідно). Частота утворення калусів ІІ типу у досліджених ліній коливалася у межах 4,1-94,4% для N₆30 та 1,0-96,8% для N₆60 і за середніми значеннями знижувалася у варіанті з 60 г/л сахарози порівняно з 30 г/л (у Ланкастер до $43,4 \pm 2,8\%$ проти $62,6 \pm 4,6\%$, у ліній-стандартів – до $44,5 \pm 8,2\%$ проти

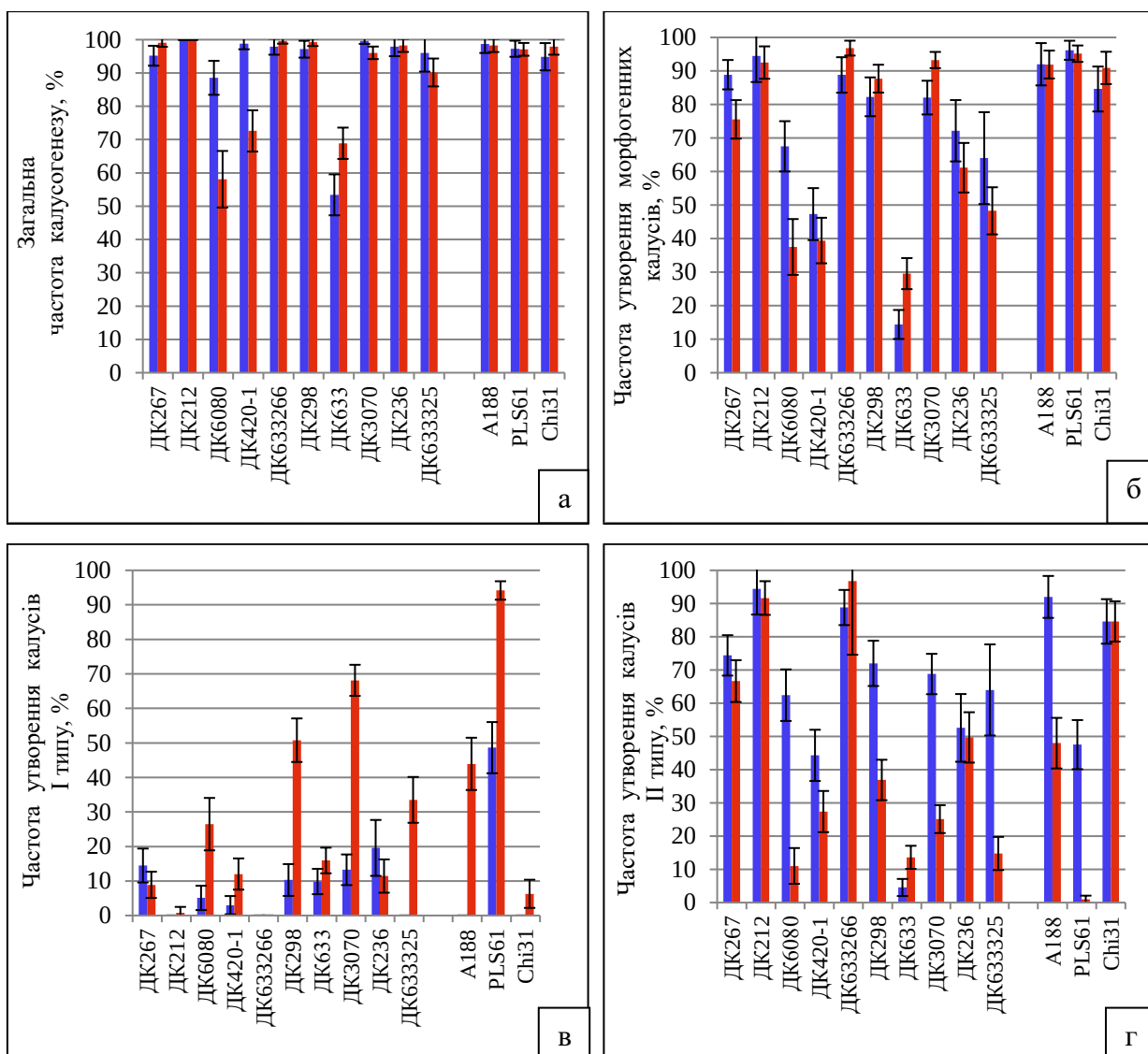


Рис. 4.2. Вплив сахарози (30 г/л – синій колір, 60 г/л – червоний колір) в середовищі індукції на загальну частоту калусогенезу (а), частоту утворення морфогенних калусів (б), частоту утворення калусів I типу (в) і частоту утворення калусів II типу (г) у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів

74,7±4,0%). Рівень частоти утворення калусів II типу у ДК6080, ДК420-1, ДК298, ДК633266, ДК3070 і ДК633325, а також А188 та PLS61 був більшим на N₆₃₀ і лише у ДК633 – на N₆₀. У ДК267, ДК212, Chi31 та ДК236 вміст сахарози у середовищі індукції не впливав на останній показник.

У таблиці 4.4 представлено значення питомої сирової маси калусів II типу, отриманих на 60-у добу культивування, на середовищах як індукції, так і субкультивування з 30 та 60 г/л сахарози у ліній плазми Ланкастер ДК420-1 і ДК298.

Як видно з таблиці 4.4, в процесі субкультивування калусів протягом 60 діб негативний ефект сахарози у концентрації 60 г/л на калуси II типу зменшується. Можна припустити, що відбувається адаптація калусної тканини до підвищеного вмісту сахарози, через що на 60-у добу культивування достовірної різниці за питомою масою калусів встановити не вдається.

Таблиця 4.4

Вплив сахарози на питому сирову масу калусів II типу на 60-у добу культивування у ліній плазми Ланкастер

Лінія	Питома сира маса калусів II типу, мг	
	30 г/л сахарози*	60 г/л сахарози*
ДК420-1	47,3 ± 6,8	37,9 ± 6,2
ДК298	150,0 ± 15,6	147,3 ± 29,2

Примітка. *Концентрація сахарози як в середовищі індукції, так і середовищі субкультивування.

Таким чином, сахароза при підвищенні концентрації в середовищі індукції калусогенезу з 30 до 60 г/л у ліній плазми Ланкастер і ліній-стандартів стимулює калусогенез I типу і інгібує калусогенез II типу. Разом з тим, рекомендовано брати до уваги генотипові особливості реакції окремих ліній плазми Ланкастер на вміст сахарози в середовищах індукції калусогенезу і субкультивування.

Для оцінки впливу цефотаксиму на індукцію калусогенезу на прикладі трьох ліній Ланкастер, A188 та PLS61 використовували живильне середовище N₆30 (контроль) з додаванням 150 або 300 мг/л цефотаксиму (відповідно середовища Цт150 та Цт300 за табл. А.3). Дані представлено в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Індукція калусогенезу у ліній кукурудзи за впливу цефотаксиму

Лінія	Цт, мг/л*	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
			морфоген- них калусів	калусів І типу	калусів ІІ типу
ДК212	0	100,0 ± 0,0	92,5 ± 4,8	0,8 ± 1,7	91,7 ± 5,1
	150	100,0 ± 0,0	32,6 ± 7,1	0	32,6 ± 7,1
	300	96,6 ± 2,9	78,0 ± 6,8	0	78,0 ± 6,8
ДК298	0	99,2 ± 1,1	87,7 ± 4,2	50,8 ± 6,3	36,9 ± 6,1
	150	99,0 ± 1,4	81,7 ± 5,5	26,4 ± 6,3	55,3 ± 7,1
	300	97,0 ± 2,4	84,1 ± 5,2	41,3 ± 7,0	42,8 ± 7,0
ДК633325	0	90,2 ± 4,2	48,3 ± 7,0	33,5 ± 6,6	14,8 ± 5,0
	150	92,9 ± 4,9	69,0 ± 8,7	8,8 ± 5,4	60,2 ± 9,3
	300	94,2 ± 4,3	59,5 ± 9,0	13,2 ± 6,2	46,3 ± 9,1
A188	0	98,3 ± 2,0	91,9 ± 4,2	43,9 ± 7,6	48,0 ± 7,6
	150	95,2 ± 4,2	93,3 ± 4,9	25,7 ± 8,6	67,6 ± 9,2
	300	99,1 ± 1,9	92,4 ± 5,2	22,9 ± 8,2	69,5 ± 9,0
PLS61	0	97,1 ± 1,9	95,2 ± 2,5	94,2 ± 2,7	1,0 ± 2,7
	150	100,0 ± 0,0	97,3 ± 3,9	30,1 ± 10,8	67,1 ± 11,1
	300	98,7 ± 2,7	93,3 ± 5,8	49,3 ± 11,6	44,0 ± 11,5

Примітка. *В середовищі для індукції калусогенезу.

Як видно з таблиці 4.5, цефотаксим суттєво не впливав на рівень загальної частоти калусогенезу у досліджених ліній. Рівень частоти утворення морфогенних калусів при використанні 150 мг/л цефотаксиму зростав лише у ДК633325 і суттєво зменшувався лише у ДК212 порівняно з

контрольним середовищем без цефотаксиму. Цефотаксим в концентрації 300 мг/л достовірно не впливав на утворення морфогенних калусів у всіх ліній за виключенням ДК212, де проявився його пригнічувальний ефект. Використання 150 та 300 мг/л цефотаксиму у всіх ліній провокувало зростання рівня частоти утворення калусів II типу за рахунок зменшення кількості калусів I типу. Лише у ДК212 зафіксовано зменшення кількості утворення калусів II типу за дії використаних концентрацій цефотаксиму.

Оцінка ефективності цефотаксиму в середовищах Цт150 та Цт300 і на стадії індукції калусогенезу, і на стадії субкультивування для збереження калусної тканини II типу (табл. 4.6) показала, що для PLS61 застосування цефотаксиму у середовищі для субкультивування дозволило запобігти втратам калусної тканини, пов'язаним з її старінням та переходом у неморфогенний стан, і зафіксувати достовірне зростання частоти збереження морфогенних калусів порівняно з контролем. У інших досліджених ліній достовірного впливу цефотаксиму на результати субкультивування не виявлено.

Таблиця 4.6

Збереження калусної тканини II типу у ліній кукурудзи за впливу
цефотаксиму (на 120-ту добу культивування)

Лінія	Цт, мг/л*	Частота збереження калусів II типу, %	Лінія	Цт, мг/л*	Частота збереження калусів II типу, %
ДК298	0	8,6 ± 4,2	А188	0	16,0 ± 8,5
	150	3,6 ± 2,6		150	26,7 ± 8,7
	300	13,4 ± 4,8		300	31,4 ± 9,1
ДК633325	0	8,0 ± 7,8	PLS6 1	0	18,0 ± 5,7
	150	4,4 ± 3,9		150	68,5 ± 11,0
	300	-		300	65,3 ± 11,1

Примітка. Контрольне середовище – N₆₃₀. *В середовищі індукції калусогенезу і середовищі субкультивування.

Стало бути, цефотаксим в концентраціях 150 і 300 мг/л в середовищі індукції калусогенезу загалом пригнічує утворення калусної тканини I типу та стимулює утворення калусної тканини II типу. Для PLS61 застосування цефотаксиму і в середовищі субкультивування дозволило суттєво підвищити частоту збереження калусів II типу.

Отже, модифікація складу середовища для індукції калусогенезу призводить до варіювання показників калусогенної здатності залежно від генотипу. Індивідуальна реакція досліджених ліній на зовнішній вплив ще раз вказує на суттєвість взаємодії генотип×середовище в розвитку досліджуваних ознак. З цієї причини необхідно враховувати індивідуальні вимоги до складу живильних середовищ індукції калусогенезу та субкультивування окремо для кожної лінії плазми Ланкастер.

Таким чином, проведене дослідження здатності до індукції та субкультивування калусів різних типів у ліній Ланкастер порівняно з лініями-стандартами показало, що обидві групи проявляють високу здатність до калусогенезу (в середньому по роках 60-100%) та характеризуються варіюванням показників калусогенезу за зміни складу живильних середовищ. Разом з тим, середні багаторічні спостереження зазначають зниження показників калусогенезу у ліній плазми Ланкастер порівняно з лініями-стандартами, зокрема показників загальної частоти калусогенезу ($80,1 \pm 1,6\%$ проти $96,2 \pm 1,3\%$), частоти утворення морфогенних калусів ($59,4 \pm 1,7\%$ проти $86,5 \pm 2,6\%$) та калусів II типу ($43,8 \pm 1,1\%$ проти $65,4 \pm 2,9\%$), а також підвищення показників частоти утворення калусів I типу ($25,7 \pm 1,7\%$ проти $12,2 \pm 1,5\%$).

4.2. Регенерація рослин в культурі *in vitro* у генотипів зародкової плазми Ланкастер

На етапі індукції регенерації ми дослідили загальний регенераційний потенціал та співвідношення типів морфогенезу у ліній плазми Ланкастер,

ліній-стандартів та їхніх гібридів для калусних тканин I і II типу, а також реакцію на оптимізацію умов культивування як *in vitro*, так і *ex vitro*.

4.2.1. Регенерація рослин плазми Ланкастер в умовах *in vitro* на середовищах для індукції регенерації

Характеристику індукції регенерації рослин з калусної тканини I типу проводили для тканини 30-добового віку, а з калусної тканини II типу – 60-добового віку. Середовищем для індукції калусогенезу та субкультивування в цьому експерименті у ліній слугувало середовище N₆30, у гібридів – N₆60 (див. табл. А.3), а для індукції регенерації рослин у всіх досліджених генотипів – середовище MS20, модифіковане за вмістом фізіологічно активних речовин (див. табл. А.4).

Оцінку регенерації проводили починаючи з 30-ї доби культивування на середовищі для індукції регенерації і до вичерпання регенераційного потенціалу. Регенерацію калусної тканини I та II типу гібрида ДК267хPLS61 показано на рисунку 4.3. В узагальненому вигляді показники індукції регенерації калусної тканини I типу у ліній Ланкастер, ліній-стандартів та їхніх гібридів наведено в таблицях 4.7-4.8. Детально інформацію стосовно регенерації окремо за генотипами та інтервалами спостережень представлено в таблицях В.17-В.21.

Як видно з даних таблиць В.17-В.21, у ліній плазми Ланкастер період регенерації з калусної тканини I типу тривав з 0-ї по 90-ту добу культивування на середовищі для індукції регенерації з піком виходу рослин на 31-60-ту добу від трансплантації. У ліній-стандартів регенерація починалася пізніше, переважно після 30-ї доби. Пік, як і у L-ліній, приходився на 31-60-ту добу, але виснажувався регенераційний потенціал ліній-стандартів пізніше, після 180-ї доби. Серед 10 досліджених ліній плазми Ланкастер регенерацію рослин отримано лише у п'ятох, а саме ДК298 (група *Mo17/Oh43*), ДК267, ДК6080, ДК420-1 (підплазма *Oh43*) та

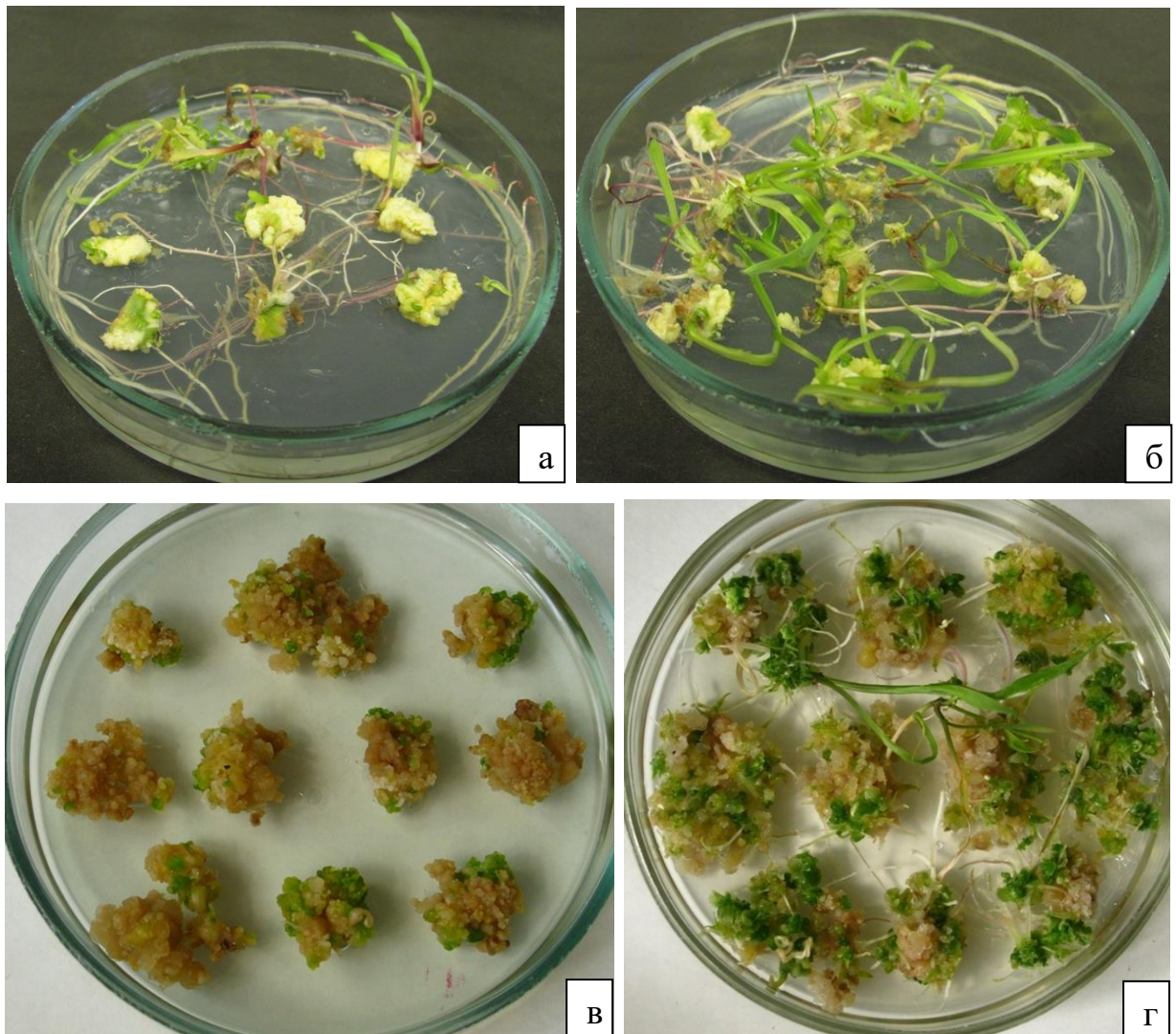


Рис. 4.3. Регенерація 30-добової калусної тканини І типу (а, б) та 240-добової калусної тканини ІІ типу (в, г) гібрида ДК267хPLS61 на 20-ту (а, в) та 50-ту (б, г) добу від трансплантації на середовище для індукції регенерації

Таблиця 4.7

Характеристика процесу індукції регенерації рослин з калусної тканини І типу у кукурудзи

Генотипи	1/2*	R/100Ca**	Частота морфогенезу, %	
			Органо-генез	Ембріодогенез
Лінії Ланкастер	242/60	24,8±5,6	60,0±12,8	40,0±12,8
Лінії-стандарти	199/308	154,8±13,1	86,0±4,0	14,0±4,0
Гібриди ліній Ланкастер з A188	117/79	67,5±8,7	93,4±5,5	6,6±5,5
Гібриди ліній Ланкастер з Chi31	61/10	16,4±9,6	80,0±26,7	20,0±26,7
Гібриди ліній Ланкастер з PLS61	367/203	55,3±5,2	87,2±4,7	12,8±4,7
Середнє для гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами	545/292	53,6±4,3	86,9±2,1	13,1±2,1

Примітка. Тут і далі *1 – кількість досліджених калусів, шт. 2 – кількість отриманих рослин-регенерантів, шт.; **R/100Ca – кількість рослин-регенерантів, отриманих на 100 калусів, шт./100 калусів.

ДК3070 (група *Mol7mix*), а також всіх трьох ліній-стандартів. У ліній ДК212, ДК633, ДК633266, ДК236 та ДК633325 регенерація рослин в культурі калусної тканини І отримана не була. Регенераційний потенціал чутливих ліній Ланкастер, як видно з таблиць 4.7 та В.17-В.18, складає лише 16,0% від потенціалу ліній-стандартів, однак дозволяє отримати з них регенеранти в середньому на рівні 24,8 шт./100 калусів. Найбільшою частотою регенерації за 180 діб культивування серед ліній Ланкастер володіла ДК267 (51,3 шт./100 калусів), а найменшою – ДК3070 (3,4 шт./100 калусів). Рівень частоти регенерації серед ліній-стандартів був найвищим у PLS61 (234,1 шт./100 калусів), для ліній A188 та Chi31 цей показник склав, відповідно, 76,9 та

Таблиця 4.8

Характеристика процесу індукції регенерації рослин *in vitro* з калусної тканини II типу у кукурудзи

Генотипи	1/2	R/100Ca	Частота морфогенезу, %	
			Органо-генез	Ембріодогенез
Лінії Ланкастер	150/6	4,0±3,2	33,3±42,2	66,7±42,2
Лінії-стандарти	262/108	41,2±6,1	94,4±4,4	5,6±4,4
Гібриди ліній Ланкастер з A188	54/17	31,5±12,8	29,4±22,8	70,6±22,8
Гібриди ліній Ланкастер з Chi31	61/19	31,1±12,0	57,9±23,3	42,1±23,3
Гібриди ліній Ланкастер з PLS61	262/124	47,3±6,2	90,3±5,3	9,7±5,3
Середнє для гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами	377/160	42,4±5,1	59,2±5,1	40,8±5,1

143,6 шт./100 калусів. В обох групах ліній спостерігалися обидва типи морфогенезу, що ведуть до регенерації, – і органогенез, і ембріодогенез (рис. 4.4-4.5). Для ліній Ланкастер частка рослин, що утворилися з калусів I типу шляхом органогенезу ($60,0 \pm 12,8\%$) і ембріогенезу ($40,0 \pm 12,8\%$), достовірно не розрізнялися, а у ліній-стандартів частота органогенезу в середньому була у 6,1 рази вища, ніж частота ембріодогенезу (для A188 – $80,0\%$ проти $20,0\%$; для Chi31 – $85,7\%$ проти $14,3\%$; для PLS61 – $88,0\%$ проти $12,0\%$).

З калусної тканини II типу рослини-регенеранти вдалося отримати лише у двох з 10 ліній плазми Ланкастер – ДК267 (2,7 шт./100 калусів) та ДК298 (8,0 шт./100 калусів), причому для ДК267 був характерний 100% органогенез (2 рослини-регенеранти), для ДК298 – 100% ембріодогенез (4 рослини-регенеранти). Рівень регенерації в 60-добовій культурі калусної тканини II

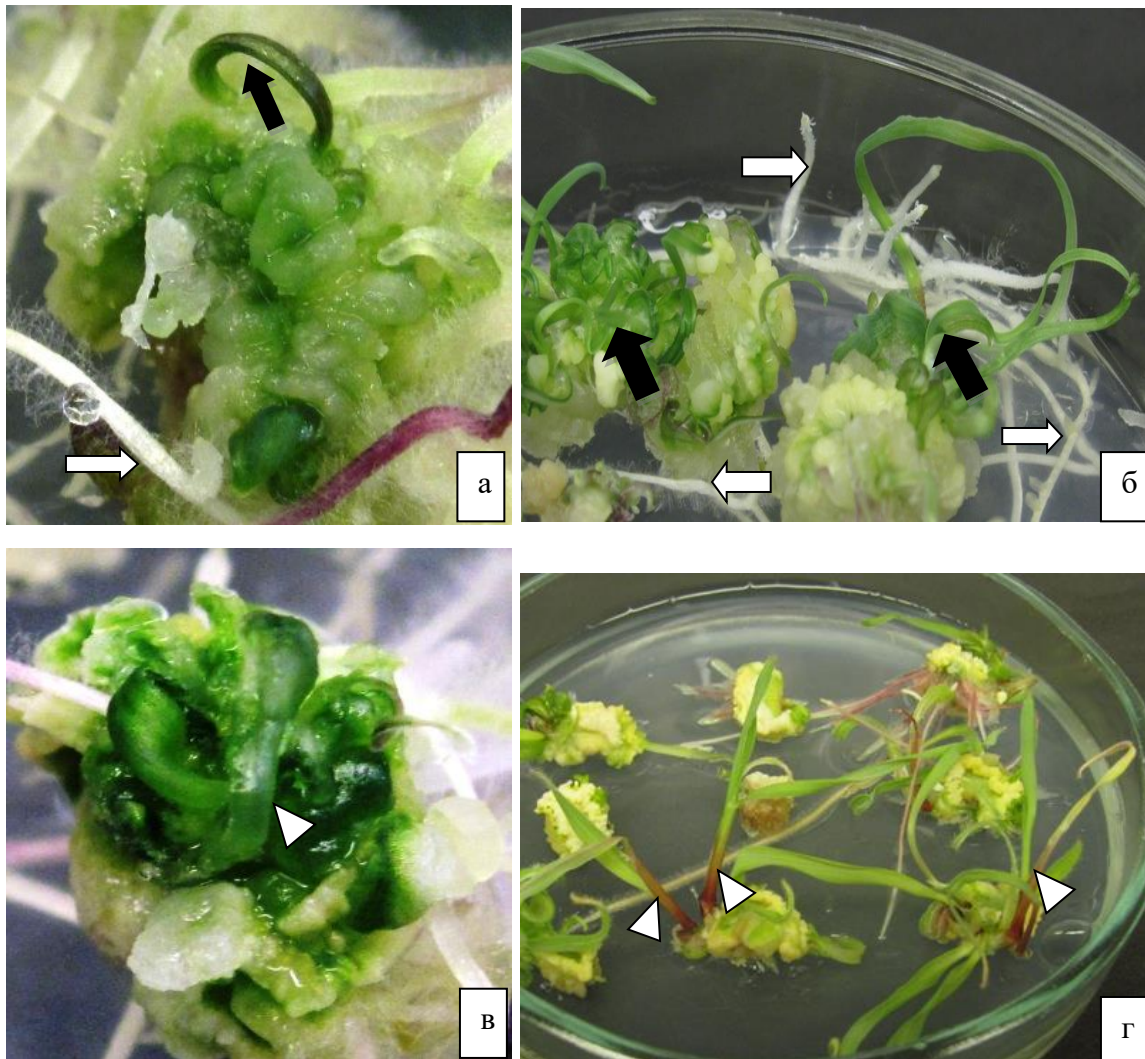


Рис. 4.4. Регенерація рослин шляхом органогенезу у кукурудзи: а-б – утворення на калусній тканині листкоподібних структур (чорні стрілки), корені (білі стрілки) розвиваються несполучено з ними; в-г – утворення рослин у вигляді пагонів (трикутники), у цих рослин корінці відсутні

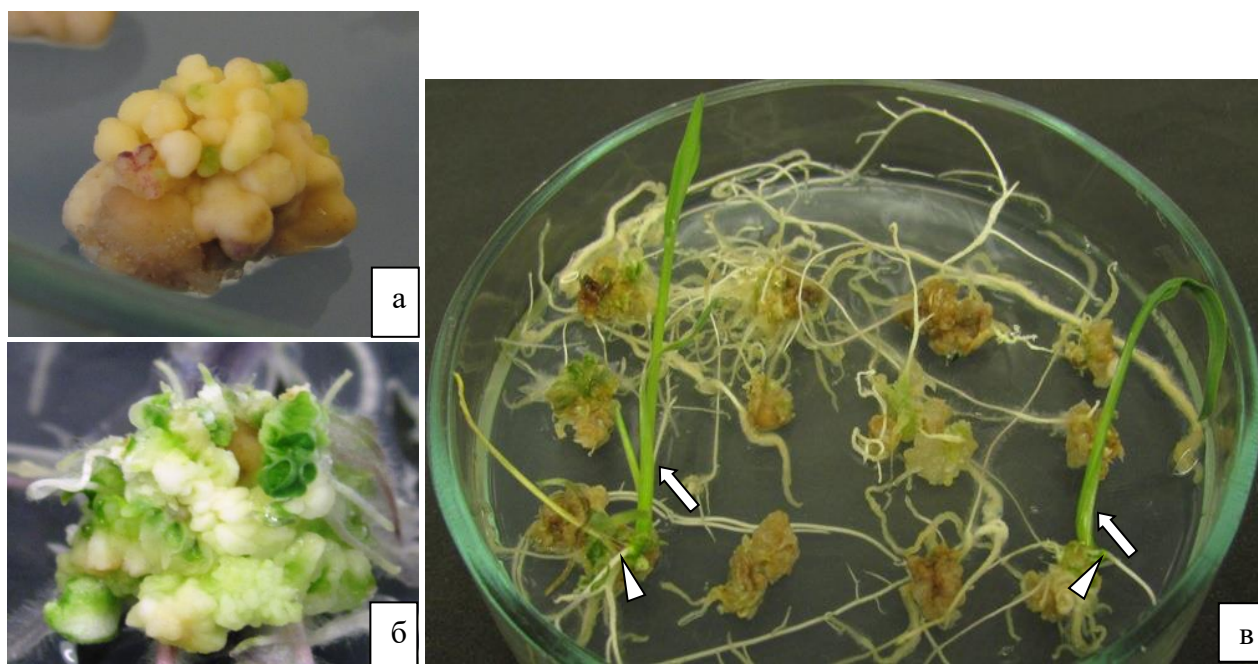


Рис. 4.5. Регенерація рослин шляхом ембріодогенезу у кукурудзи: а – розвиток ембріодів на середовищі для індукції калусогенезу; б – подальший розвиток ембріодів на середовищі для індукції регенерації; в – регенерація рослин шляхом ембріодогенезу: у проростка пагін (стрілка) і корінець (трикутник) розвиваються сполучено

типу найвищим серед ліній-стандартів був у PLS61 (82,9 шт./100 калусів), для A188 та Chi31 цей показник склав, відповідно, 14,4 та 10,3 шт./100 калусів. У ліній-стандартів, як і при регенерації з калусної тканини I типу, органогенез переважав над ембріодогенезом (відповідно, 94,1% проти 5,9% для A188, 75,0% проти 25,0% для Chi31 та 95,4% проти 4,5% для PLS61).

Регенераційний потенціал 53 гібридів між лініями Ланкастер та лініями-стандартами A188, Chi31 та PLS61 для калусної тканини I типу знаходився на рівні $53,6 \pm 4,3$ шт./100 калусів, а для калусної тканини II типу – на рівні $42,4 \pm 5,1$ шт./100 калусів (див. табл. 4.7-4.8). Частота регенерації гібридів була значно вищою, порівняно з лініями Ланкастер, як для калусів I типу (в 2,2 рази), так і для калусів II типу (в 10,6 рази). Найвища частота регенерації з калусів I типу спостерігалася у гібридів L×A188 ($67,5 \pm 8,7$ шт./100 калусів),

а II типу – у гібридів L×PLS61 ($47,3 \pm 6,2$ шт./100 калусів). Максимальну кількість рослин-регенерантів при регенерації з калусної тканини I типу – 138,5 шт./100 калусів відмічено у гібрида A188хДК298, а при регенерації з калусної тканини II типу – 428,6 шт./100 калусів у гібрида PLS61хДК267.

Отже, за співвідношенням типів морфогенезу калусній тканині у ліній Ланкастер достовірної різниці не виявлено, в той час як у ліній-стандартів переважав органогенез. Для гібридів між ланкастерівськими лініями і стандартами співвідношення типів морфогенезу залежало від генотипу лінії-стандарту, типу калусної тканини та тривалості періоду до трансплантації на середовище для індукції регенерації. Для калусної тканини I типу у всіх гібридів переважаним типом морфогенезу був органогенез. В 60-добовій калусній тканині II типу у гібридів Ланкастер з A188 переважав ембріодогенез, з Chi31 – частоти органогенезу та ембріодогенезу достовірно не розрізнялися, а у гібридів з PLS61 органогенез значно переважав ембріодогенез.

Тобто використання калусної тканини II типу 60-добового віку призводить у подальшому до підвищення виходу ембріодів у порівнянні з калусною тканиною I типу (30-добового віку). У молодій калусній тканині II типу гібридів між лініями Ланкастер та лініями-стандартами за зменшення кількості рослин-регенерантів, отриманих на 100 калусів, зростає частка рослин, отриманих шляхом ембріодогенезу, що підвищує їхню якість. Таким чином, для отримання більшої кількості рослин шляхом ембріодогенезу рекомендовано при створенні гібридів з лініями плазми Ланкастер залучати лінію A188 та використовувати калусну тканину II типу 60-добового віку.

Регенерація рослин з тривалосубкультивованої калусної тканини II типу (тканина 120-добового віку у ліній за індукції калусогенезу на середовищі N₆₃₀ та 90-добового віку у гібридів за індукції калусогенезу на середовищі N₆₆₀; індукція регенерації на модифікованому середовищі MS20, аналіз на 30-добу від трансплантації на середовище для індукції регенерації) у досліджених ліній плазми Ланкастер була відсутня або достовірно не

відрізнялася від нуля ($2,4 \pm 4,9$ у ДК267), або наближалася до нуля ($12,1 \pm 11,5$ у ДК298), і мала середнє значення $3,7 \pm 3,3$ шт./100 калусів. У ліній-стандартів регенераційний потенціал склав в середньому $27,7 \pm 4,6$ шт./100 калусів і був найвищим у PLS61 ($52,8 \pm 9,0$ шт./100 калусів). Регенерація ж рослин у гібридів кукурудзи ліній Ланкастер і ліній-стандартів знаходилася в середньому на рівні $12,3 \pm 2,5$ шт./100 калусів з найбільшим значенням у гібридів з Chi31 ($31,8 \pm 10,0$),

В таблиці 4.9 представлено вплив ІМК на регенерацію гібридів ліній Ланкастер та ліній-стандартів з тривалокультивованої калусної тканини II типу. Як видно з таблиці 4.9, як при додаванні 0,1 або 0,2 мг/л ІМК до середовища індукції регенерації MS20, так і в контрольному варіанті без ІМК загальна та ефективна частоти регенерації співпадали. При додаванні 0,1 мг/л ІМК до середовища регенерації дані показники зростали ($32,1 \pm 7,7\%$), порівняно з контролем без ІМК ($15,6 \pm 5,3\%$) та з 0,2 мг/л ІМК ($17,0 \pm 5,5\%$).

Таблиця 4.9

Вплив ІМК на регенерацію гібридів ліній Ланкастер та ліній-стандартів з тривалокультивованої калусної тканини II типу

Вміст ІМК у середовищі для індукції регенерації, мг/л	n*	R/100Ca	Частота регенерації, %	
			загальна	ефективна
0	186	$9,7 \pm 4,3$	$15,6 \pm 5,3$	$15,6 \pm 5,3$
0,1	334	$17,1 \pm 4,1$	$32,1 \pm 7,7$	$32,1 \pm 7,7$
0,2	186	$6,5 \pm 3,6$	$17,0 \pm 5,5$	$17,0 \pm 5,5$

Примітка. Вік калусної тканини на момент трансплантації на середовище для індукції регенерації – 90 діб; †, мг/л; *n – кількість культивованих калусів, шт.

В таблиці 4.10 представлено показники індукції регенерації з тривалокультивованої калусної тканини II типу на середовищі MS20+0,1 мг/л ІМК для розширеного кола гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами.

Як видно з таблиці 4.10, при використанні 90-добової калусної тканини II типу загальна та ефективна частоти регенерації співпадали у всіх досліджених гібридів, тобто кожний калус, який проявив здатність до

Таблиця 4.10

Регенерація тривалокультивованої калусної тканини II типу у гібридів ліній
Ланкастер і ліній-стандартів на середовищі індукції регенерації MS20
з 0,1 мг/л ІМК

Гібрид	n*	R/100Ca	Частота регенерації, %	
			загальна	ефективна
ДК633хА188	20	5,0± 10,0	5,0± 10,0	5,0± 10,0
А188хДК633	20	15,0±16,4	15,0±16,4	15,0±16,4
ДК633хChi31	28	25,0±16,7	39,3±18,8	39,3±18,8
Chi31хДК633	8	12,5±25,0	25,0±32,7	25,0±32,7
ДК3070хChi31	12	8,3±16,7	25,0±26,1	25,0±26,1
Chi31хДК3070	16	37,5±25,0	37,5±25,0	37,5±25,0
ДК236хChi31	16	68,8±23,9	75,0±22,4	75,0±22,4
Chi31хДК236	8	25,0±32,7	37,5±36,6	37,5±36,6
ДК267хPLS61	35	14,3±12,0	22,9±14,4	22,9±14,4
PLS61хДК267	69	18,8±9,5	34,8±11,6	34,8±11,6
ДК633хPLS61	15	13,3±18,2	33,3±25,2	33,3±25,2
PLS61хДК633	26	11,5±12,8	15,4±14,4	15,4±14,4
ДК236хPLS61	38	13,2±11,1	13,2±11,1	13,2±11,1
PLS61хДК236	23	4,3±8,7	4,4±8,7	4,4±8,7
Всього	334	19,5±4,3	32,1±7,7	32,1±7,7

Примітка. Вік калусної тканини на момент трансплантації на середовище для індукції регенерації – 90 діб. *n – кількість досліджених калусів, шт.

регенерації, формував пагони (у кількості 1-5 шт.), а не листкові структури, що значно полегшує наступний етап приживлення регенерантів у ґрунті. В співпадінні значень загальної та ефективної частоти регенерації у калусів II типу полягає їхня принципова відмінність від калусів I типу. Реципрокний ефект не спостерігався за жодним з досліджених показників.

Одним з напрямків застосування калусної тканини кукурудзи є селекція *in vitro*. Нами було проведено субкультивування *in vitro* калусної тканини ліній кукурудзи на середовищах з хлоридом натрію як з агентом, який моделює осмотичний стрес і засолонення [336]. Було встановлено, що на селективних середовищах ріст окремих калусів ліній кукурудзи плазми Ланкастер можливий. Дія 6 г/л хлориду натрію у середовищі для субкультивування уповільнює, але не зупиняє ріст калусної тканини. Вплив 30 г/л та 60 г/л цієї речовини повністю інгібує приріст сирової маси і діаметру калусів. Калуси, які були індуковані на середовищі з підвищеним вмістом сахарози (60 г/л), як в контролі, так і за дії 6 г/л NaCl виявляли більш активне зростання, ніж індуковані на фоні 30 г/л сахарози. Натрій хлорид при збільшенні концентрації у середовищі субкультивування спричиняв критичне накопичення хлорид-іонів та підвищення вмісту вільного L-проліну в калусній тканині. Ступінь надходження хлорид-іонів з живильного середовища у калусну тканину та їхній вихід при знятті хлоридного навантаження, а також ступінь збільшення рівня вільного L-проліну залежали від генотипових особливостей калусів, вмісту сахарози в середовищі індукції калусогенезу та концентрації натрію хлориду в середовищі субкультивування. Показано можливість отримання рослин-регенерантів ліній кукурудзи плазми Ланкастер при субкультивуванні калусної тканини за дії 6 г/л натрію хлориду [47, 55, 86, 118, 205, 206, 208, 209].

4.2.2. Оптимізація виживаності рослин-регенерантів у генотипів кукурудзи плазми Ланкастер у ґрунті

Отримання рослин-регенерантів кукурудзи на середовищі для індукції регенерації відбувається в чашках Петрі. Потім рослини пересаджують у біологічні склянки довжиною 20 см для розвитку пагона і кореневої системи (рис. 4.6). На наступному етапі проводять адаптацію рослин R_0 в ґрунті і вирощування в вегетаційних посудинах по повної стиглості насіння (рис. В.3).



Рис. 4.6. Укорінення та адаптація рослин-регенерантів кукурудзи у біологічних склянках

На цих перелічених етапах через низку обставин відбуваються втрати регенерантів, які складають до 80% від кількості вже отриманих рослин. Зокрема, втрати рослин-регенерантів пов'язані із загибеллю рослин при перенесенні з чашок Петрі до біологічних склянок, при культивуванні у біологічних склянках, при пересадці у ґрунт та із загибеллю рослин у ґрунті. Всього в ході виконання роботи на етапі *in vitro* нами було отримано

1645 рослин-регенерантів ліній і гібридів кукурудзи. Проаналізувавши причини, що призводять до втрат на кожному з етапів, ми провели комплексну оптимізацію техніки пересаджування і вирощування рослин-регенерантів генотипів Ланкастер.

З метою скорочення втрат рослин-регенерантів на етапі пересадки з чашок Петрі до біологічних склянок за багаточисельними спостереженнями рекомендовано зменшувати щільність попередньо субкультивованої калусної тканини з 20 до 10 калусів на чашку. Це дозволяє скорочувати масштаби механічного травмування рослин, яке є основною причиною їхньої загибелі на даному етапі вирощування.

Для зменшення втрат рослин-регенерантів на етапі вирощування у біологічних склянках рекомендовано вирощувати рослини до довжини кореневої системи не більше 20 см. Тривалість дорощування у біологічних склянках не повинна перевищувати 15-30 діб для запобігання замоканню рослин.

Для скорочення втрат рослин-регенерантів при перенесенні у ґрунт рекомендовано зменшувати вміст агару у середовищі для дорощування у біологічних склянках з 7 г/л до 5,5 г/л, що полегшує витяг кореневої системи із середовища та зменшує пошкодження корневих волосків рослин-регенерантів. Відзначено існування зв'язку між типом морфогенезу і загибеллю рослин при пересаді у ґрунт. Так, серед 37 рослин-регенерантів гібридів ліній плазми Ланкастер та A188, отриманих через ембріодогенез, при пересадці у ґрунт не загинуло жодної рослини. Разом з тим, у гібридів, за участю PLS61 та Chi31, у яких переважав органогенез, такі втрати рослин-регенерантів мали місце.

Для зменшення втрат рослин-регенерантів покоління R_0 на початкових стадіях вирощування у ґрунті і полегшення адаптації рослин ми дослідили ефективність низки заходів, серед яких зволоження ґрунту розчином макро- та мікросолей середовища MS, використання спеціальних «Таблеток для пророщування насіння», просочених живильними розчинами, зволоження

грунту розчином протигрибкового препарату «Ністатин» (ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна), зволоження ґрунту розчином препарату біогумату – продуктом переробки соняшникового лушпиння культурою черв'яків *Eisenia foetida*. З таких заходів ефективним виявився лише останній.

Відтак, укорінені на агаризованому живильному середовищі рослини-регенеранти R₀ висаджували у ґрунт, попередньо зволожений водним розчином біогумату (1:100) з розрахунку 250 мл розчину на 1 кг ґрунту, і закривали прозорими перфорованими склянками на 1-2 доби для збереження вологості, з наступним зволоженням рослин-регенерантів 2 рази на тиждень впродовж 3 тижнів з розрахунку 100 мл розчину біогумату на 1 кг ґрунту за одне зволоження. В таблиці 4.11 представлено приживаність у ґрунті рослин-регенерантів гібридів кукурудзи за участю ліній плазми Ланкастер та ліній-стандартів за зволоження біогуматом.

Таблиця 4.11

Вплив біогумату на приживаність рослин-регенерантів покоління R₀
кукурудзи у ґрунті

Бал*	Без біогумату (контроль)		З біогуматом	
	п	приживаність, %	п	приживаність, %
2	–	–	4	75,0±50,0
3	16	37,5±25,0	55	67,3±12,7
4	33	57,6±17,5	79	89,9±6,8
5	9	88,9±22,2	8	100,0±0,0
Всього	59	55,9±13,0	146	81,5±6,5

Примітка. *Бал розвитку рослин-регенерантів при перенесенні у ґрунт див. підрозділ 2.3; п – кількість рослин-регенерантів, висаджених у ґрунт, шт.

Як видно з таблиці 4.11, загалом біогумат значно підвищував приживаність регенерантів у ґрунті (на 25,6% порівняно з контролем), особливо для регенерантів з балом розвитку 3-5.

Результати комплексної оптимізації етапів дорощування рослин-регенерантів покоління R_0 та їхня адаптації при переведенні в умови *in vivo* представлено в таблиці 4.12.

Таблиця 4.12

Результати оптимізації етапів дорощування рослин-регенерантів R_0
кукурудзи

Етап дорощування рослин-регенерантів R_0	Втрати регенерантів, %		Зменшення втрат, %
	до оптимізації	після оптимізації	
Пересадка регенерантів з чашок Петрі до біологічних склянок	31,8±2,9	7,0±4,3	–78,0
Вирощування регенерантів у біологічних склянках	44,0±3,7	17,4±6,6	–60,5
Пересадка регенерантів з біологічних склянок у ґрунт	14,6±4,9	7,3±5,0	–50,0
Вирощування регенерантів у ґрунті на початкових стадіях	36,9±4,7	17,8±7,7	–51,8
Загальні втрати	79,3±2,5	41,6±8,3	–47,5

Як видно з таблиці 4.12, запроваджені заходи дозволили зменшити втрати рослин-регенерантів на окремих етапах на 50,0-78,0%. Загальні втрати рослин-регенерантів R_0 при переведенні в умови *in vivo* зменшилися з 79,3% до 41,6%. Загальна виживаність рослин-регенерантів від моменту їхнього утворення на середовищі для індукції регенерації до адаптації в умовах *in vivo* у ґрунті підвищилася з 20,7% до 58,5%, тобто на 182,6%. Таке суттєве підвищення є особливо важливим при дорощуванні генетично трансформованих рослин-регенерантів, соматоклонів та рослин-регенерантів, отриманих в результаті селекції *in vitro*, оскільки такі рослини, зазвичай, є слабкими, а витрати на їхнє отримання – вагомими.

Інформацію стосовно індивідуальної реакції досліджених представників плазми Ланкастер на культивування *in vitro* узагальнено у вигляді норм біотехнологічного процесу на етапах індукції морфогенної калусної тканини І і ІІ типів, індукції регенерації рослин та дорощування рослин-регенерантів у ґрунті *in vitro* (табл. В.22-В.26).

4.3. Обговорення

Дослідження українських ліній кукурудзи *in vitro* у площині поділу на основні зародкові плазми, вперше виконане О. Є. Абраїмовою [3], показало різноманіття тотипотентності генотипів кукурудзи як між різними зародковими плазмами, так і всередині плазм. Зокрема, фрагментарно виконаний аналіз *in vitro* ліній плазми Ланкастер продемонстрував їхнє варіювання і необхідність більш детального дослідження потенціалу плазми Ланкастер в культурі *in vitro*.

У нашому дослідженні ми розглядали лінії чотирьох підплазм і груп плазми Ланкастер: *Mo17*, *Oh43*, *Mo17/Oh43* та *Mo17mix*.

Гібридні групи (*Mo17/Oh43* та *Mo17mix*) мають вищий рівень показників калусогенезу, ніж лінійні підплазми (*Mo17* та *Oh43*), зокрема показники збільшуються у напрямку *Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43* разом з насиченням неспорідненим генетичним матеріалом. Інбредні лінії гібридних груп показують вищі показники калусогенезу, оскільки у своєму генотипі містять мікс алельних варіантів генів з різних гілок родоводу плазми Ланкастер або інших плазм. Результати варіювання за калусогенною здатністю усередині плазми Ланкастер співпадають з результатами, представленими в розділі 3, де було відмічено варіювання ліній плазми Ланкастер за SNP-маркерами та визначено два кластери приналежності ліній даної плазми – *Mo17* чи *Oh43*.

Селекційно перспективні лінії і гібриди не проходять спеціального відбору за культуральним відгуком *in vitro*, тому часто характеризуються

низькими рівнями калусогенезу і регенерації. Так, при дослідженні суданських селекційних генотипів *in vitro* рослини-регенеранти вдалося отримати у чотирьох з восьми суданських ліній і у двох з трьох сортів, причому чотири лінії зовсім не утворювали морфогенного калусу [307]. Залучення селекційно привабливих ліній до гібридів з лініями з високим регенераційним потенціалом частково вирішує таку проблему. При аналізі регенераційної здатності гібридів ліній плазми Ланкастер з лініями-стандартами спостерігається зростання кількості утворених рослин на 100 калусів, порівняно з лініями Ланкастер, що є проявом гетерозису. Схожа ситуація спостерігалася при дослідженні кенійських ліній, коли гібрид TH25 значно переважав регенераційну здатність своїх батьківських ліній TL22 і TL23, а лінія TL26, яка не утворювала ембріогенного калусу, успішно виступила батьківською для гібрида TH27, який проявив достатній регенераційний потенціал [186].

Визначальним фактором здатності до калусогенезу та регенерації в культурі *in vitro* є генотип експлантів, хоча на здатність до культурального відгуку впливає і низка зовнішніх факторів, зокрема компонентний склад живильного середовища, умови року вирощування донорних рослин. У нашому дослідженні середня за три роки загальна частота калусогенезу ліній кукурудзи плазми Ланкастер знаходилася у межах від 48,5% (ДК633) до 98,2% (ДК633266), частота утворення морфогенних калусів за такий же період коливалася у межах від 31,8% (ДК3070) до 89,9% (ДК633266) залежно від генотипу і року дослідження. Загальна частота калусогенезу для гібридів між лініями плазми Ланкастер знаходилася у діапазоні від 83,5% (ДК298хДК267) до 97,3% (ДК6080хДК212), частота утворення морфогенних калусів – від 24,0% (ДК633266хДК267) до 97,3% (ДК6080хДК212). Загальна частота калусогенезу та частота утворення морфогенних калусів для гібридів між лініями плазми Ланкастер та модельними лініями A188, Chi31 та PLS61 змінювалася від 37,5% (Chi31хДК236) до 100,0% у декількох гібридів. Отримані нами дані співпадають з даними інших авторів. Зокрема, у роботі

[341] показано, що загальна частота калусогенезу для чотирьох селекційно-перспективних танзанійських сортів кукурудзи коливалася у межах 43,3-92,7%, а максимальна частота утворення морфогенних калусів знаходилася на рівні 69,5%. У іншій роботі [250] відзначено, що загальна частота калусогенезу для зразка MU2092 знаходилася у межах 28,0-90,0% залежно від концентрації 2,4-Д, причому найбільше значення даного показника спостерігалось при використанні 4,0 мг/л даної речовини. У роботі [302] для двох вільнозапильних тропічних зразків та однієї лінії вказується на загальну частоту калусогенезу на рівні 45,6-85,6% та частоту утворення морфогенних калусів на рівні 16,4-59,7%. У роботі [245] відзначається, що всі 48 досліджених ліній володіли здатністю утворювати калус, але не всі утворювали ембріоїди.

В проведеному нами дослідженні при використанні для індукції калусогенезу середовищ з мінеральною основою N_6 та з мінеральною основою MS рівні загальної частоти калусогенезу були сумірні між собою (82,0-98,5% на N_6 та 76,0-100,0% на MS). Рівень частоти утворення морфогенних калусів у більшості досліджених ліній плазми Ланкастер не залежав від мінеральної основи індуктивного середовища, хоча у ДК420-1 та ДК633325 рівень частоти утворення морфогенних калусів на середовищі з мінеральною основою N_6 був вищий, аніж при використанні середовищ з мінеральною основою MS, а у ліній ДК267 та ДК6080 спостерігалася зворотна ситуація. У роботі [247], де також порівнювався вплив двох мінеральних основ, показано, що середовище N_6 , доповнене 2 мг/л диамби, провокувало вищу частоту утворення морфогенних калусів, а середовище MS, доповнене 1 мг/л 2,4-Д, – показувало вищу загальну частоту калусогенезу. Відомо [302], що загальна частота калусогенезу для досліджуваних генотипів кукурудзи залежно від генотипу мала вищий рівень на середовищі MS (84,4% проти 46,7% на N_6) або N_6 (83,9% проти 45,6% на MS). Таким чином, вплив мінеральної основи живильного середовища на

індукцію калусогенезу визначається індивідуальними особливостями генотипу експланта.

Цефотаксим середовища для індукції калусогенезу у нашому дослідженні проявив як стимулюючий та інгібуючий, так і нейтральний ефект (ДК298, PLS61 та A188) на частоту утворення морфогенних калусів. У лінії ДК633325 150 мг/л Цт сприяли утворенню морфогенного калусу на 69,0%, порівняно з 48,3% у контрольному варіанті досліду. У лінії ДК212 150 мг/л Цт забезпечили 32,6% утворення морфогенних калусів порівняно з контролем, де даний показник склав 92,5%. У лінії A188 достовірного впливу 150 мг/л цефотаксиму на частоту утворення морфогенних калусів не виявлено (93,3% проти 91,9% у контролі). Дані, отримані і у роботі [38], де також досліджувався вплив Цт на частоту утворення ембріогенного калусу для кукурудзи, зокрема для A188, співпадають з нашими результатами, адже 150 мг/л Цт забезпечили частоту утворення ембріогенного калусу на рівні 54,6% проти 52,6% у контролі. Оцінка впливу Цт на калусогенез *in vitro* є цікавою також у зв'язку з проведенням агробактеріальної трансформації, де він використовується для елімінації агробактерій як у кукурудзи [39], так і у інших культур [85].

В нашому дослідженні сахароза у різних концентраціях в середовищі індукції калусогенезу та субкультивування не впливала на частоту утворення морфогенних калусів (75,0% та 72,3% для 30 г/л та 60 г/л сахарози у середовищі індукції калусогенезу, відповідно), але впливала на співвідношення калусів I та II типів. Рівень частоти утворення калусів I типу у більшості ліній плазми Ланкастер та всіх ліній-стандартів зростав з підвищенням концентрації сахарози з 30 г/л до 60 г/л (в середньому з $7,8 \pm 1,3\%$ до $22,8 \pm 2,0\%$). Частота утворення калусів II типу у досліджених ліній за середніми значеннями знижувалася у варіанті з 60 г/л сахарози порівняно з 30 г/л (у Ланкастер до $43,4 \pm 2,8\%$ проти $62,6 \pm 4,6\%$, у ліній-стандартів – до $44,5 \pm 8,2\%$ проти $74,7 \pm 4,0\%$). Відомо, що сахароза при підвищенні концентрації у середовищі культивування сприяє утворенню

ембріодів, зокрема, існує практика, коли перед трансплантацією на середовище для індукції регенерації концентрацію сахарози у середовищі для субкультивування калусів збільшують з 30 г/л до 60 г/л на 2-3 тижні з метою провокування утворення ембріодів [177, 181].

Отримання рослин-регенерантів кукурудзи з культивованих калусів є важливим етапом біотехнологічного процесу. Як було відмічено раніше, морфогенез з подальшою регенерацією рослин *in vitro* за класифікацією Т. Б. Батигіної [13] може здійснюватися як шляхом органогенезу, тобто несполученого розвитку стеблової меристеми (гемогенезу) та кореневої системи (ризогенезу), так і шляхом соматичного ембріогенезу (ембріодогенезу), тобто розвитку асексуальної біполярної структури, яка за будовою відповідає зиготичному зародку і має спряжені точки росту стебла і кореня, а також сім'ядолі.

У нашому дослідженні кількість рослин-регенерантів з 30-добових калусів для ліній плазми Ланкастер знаходилася у межах $24,8 \pm 5,6$ шт./100 калусів, ліній-стандартів – $154,8 \pm 13,1$ шт./100 калусів, а середнє для гібридів ліній плазми Ланкастер з лініями-стандартами склало $53,6 \pm 4,3$ шт./100 калусів. Як було зазначено, знижена здатність до утворення рослин-регенерантів калусною тканиною ліній групи Ланкастер пояснюється тим, що ці лінії належать до комерційної зародкової плазми, яка не проходила спеціальний відбір на підвищену регенераційну здатність, як то використані модельні лінії інших плазм. У роботі [250] у генотипу кукурудзи MU2092 отримано 4,2 пагонів/калус, тобто 420 рослин/100 калусів при використанні 0,5 мг/л БАП у поєднанні з 0,5 мг/л кінетину, що є набагато вищим, ніж у нашому дослідженні з лініями кукурудзи. У роботі [295] отримано 55 рослин/100 калусів та 76 рослин/100 калусів для тропічних ліній кукурудзи та 58–99 рослин/100 калусів для їхніх гібридних комбінацій, що приблизно знаходиться на отриманому нами рівні. Для танзанійських вільнозапильних сортів кукурудзи відзначена частота регенерації на рівні 5,4–30,8 рослин/100 калусів залежно від компонентів

середовища для регенерації [341], що є меншим/сумірним, ніж у нашому дослідженні. Достатньо високі показники частоти регенерації були характерні для посухо- та хворобостійких високоврожайних іранських ліній Vog134 та Va35 (440 та 240 шт./100калусів, відповідно) [247].

Підбір оптимальних умов культивування *in vitro* для генотипів кукурудзи плазми Ланкастер дозволить доповнити біотехнологічну характеристику цієї плазми, ширше практично застосовувати її генотипи, зокрема у клітинній селекції і генетичній трансформації.

4.4. Висновки до розділу 4

В результаті проведених досліджень виявлено наступні основні особливості калусогенного і регенераційного потенціалу представників зародкової плазми Ланкастер у кукурудзи.

1. Генотипи зародкової плазми Ланкастер мають специфічні якісні та кількісні характеристики калусогенного та регенераційного потенціалу, які відрізняють їх від представників інших плазм кукурудзи, що необхідно враховувати в клітинно-інженерних дослідженнях.

2. Усередині плазми Ланкастер спостерігається значне варіювання за калусогенною здатністю. Середні рівні ознак загальної частоти калусогенезу, частоти утворення морфогенних калусів, зокрема I та II типів, пропорційно збільшуються в досліджених підплазмах і групах у напрямку $Mo17 \rightarrow Mo17mix \rightarrow Oh43 \rightarrow Mo17/Oh43$ разом з насиченням ліній неспорідненим генетичним матеріалом.

3. Лінії A188, Chi31 та PLS61 однойменних зародкових плазм не тільки володіють високою калусогенною та регенераційною здатністю, але і виступають як донори даних ознак в гібридах з лініями кукурудзи плазми Ланкастер.

4. Потенціал утворення калусної тканини I типу у ліній плазми Ланкастер низький ($7,8 \pm 1,3\%$), але він значно підвищується у гібридів F_1 між

ними ($45,4 \pm 5,6\%$). Високою частотою утворення калусної тканини I типу характеризуються гібриди ліній Ланкастер з лініями A188 ($53,6 \pm 8,1\%$), Chi31 ($75,4 \pm 6,6\%$) та PLS61 ($74,7 \pm 5,3\%$). Напроти, потенціал утворення калусної тканини II типу є 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 ($42,2 \pm 6,9\%$), з Chi31 ($0,7 \pm 1,1\%$) та PLS61 ($17,9 \pm 2,6\%$).

5. 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 відбувається при використанні як материнської лінії Ланкастер, окрім групи гібридів LxPLS61. Для калусної тканини II типу в групах гібридів LxL і LxPLS61 інтенсивність калусоутворення підвищується, якщо за материнську використовується лінія, яка належить до підплазми Oh43 плазми Ланкастер.

6. Суттєвий вплив на калусогенну здатність, зокрема утворення калусів I та II типу, у ліній плазми 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 $23,4 \pm 0,3\%$).

7. Лінії плазми Ланкастер, стабільно за роками продуктивні стосовно утворення калусів II типу, є нестабільними за утворенням калусів I типу.

8. Сахароза при підвищенні концентрації в середовищі індукції калусогенезу з 30 до 60 г/л у ліній плазми Ланкастер і ліній-стандартів в цілому стимулює калусогенез I типу та інгібує калусогенез II типу.

9. Цефотаксим в концентраціях 150 і 300 мг/л в середовищі індукції калусогенезу пригнічує утворення калусної тканини I типу та стимулює утворення калусної тканини II типу у ліній плазми Ланкастер.

10. Модифікація складу середовища для індукції калусогенезу, зокрема за складом мінеральної основи, вмістом сахарози і цефотаксиму, призводить до варіювання показників калусогенезу залежно від генотипу.

11. Регенераційна здатність ліній кукурудзи плазми Ланкастер визначається генотипом, віком та типом калусної тканини, а також складом живильних середовищ для індукції калусогенезу та індукції регенерації.

12. Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів, яка характеризує регенераційний потенціал ліній плазми Ланкастер, для 30-добової калусної тканини I типу знаходиться в межах 0-51,3 шт. (в середньому $24,8 \pm 5,6$ шт.), у ліній стандартів – 76,9-234,1 шт. (в середньому $154,8 \pm 13,1$ шт.), а у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами – в межах 8,3-138,5 шт. (в середньому $53,6 \pm 4,3$ шт.). Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів у ліній для 60-добової калусної тканини II типу знаходиться в межах 0-8,0 шт. (в середньому $4,0 \pm 3,2$ шт.), у ліній стандартів – 10,3-82,9 шт. (в середньому $41,2 \pm 6,1$ шт.), а у гібридів ліній Ланкастер з лініями-стандартами – в межах 8,9-428,6 шт. (в середньому $42,4 \pm 5,1$ шт.).

13. У ліній Ланкастер і гібридів між лініями Ланкастер та лініями-стандартами співвідношення типів морфогенезу залежить від генотипу та тривалості періоду культивування калусної тканини до трансплантації на регенераційне середовище.

14. Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів, яку вдається отримати з калусної тканини II типу (90-добової) у ліній Ланкастер є дуже низькою (0-12,1 шт., в середньому $3,7 \pm 3,3$ шт.), у ліній-стандартів цей показник є дещо вищим (12,0-52,8 шт., в середньому $27,7 \pm 4,6$), у гібридів – має проміжне значення (1,7-31,8 шт., в середньому $12,3 \pm 2,5$ шт.) Тривале культивування калусної тканини II типу призводить до зниження кількості рослин-регенерантів. Для калусної тканини II типу у всіх досліджених генотипів спостерігалось співпадіння значень загальної та ефективної регенерації, що принципово відрізняє її від калусної тканини I типу.

15. Ключовими для вирощування рослин-регенерантів покоління R_0 є приживаність та адаптація після перенесення з умов *in vitro* у ґрунт, які суттєво покращуються за зволоження ґрунту біогуматом.

16. Запроваджений комплекс заходів по догляду за регенерантами дозволив підвищити загальну виживаність рослин від моменту їхнього утворення на середовищі для індукції регенерації до адаптації у ґрунті в умовах *in vivo* з 20,7% до 58,5%.

17. 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.

18. 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.

19. Для інтенсифікації індукції калусогенезу I типу у ліній Ланкастер рекомендовано підвищення концентрації сахарози в середовищі індукції калусогенезу до 60 г/л сахарози.

20. Рекомендовано використання цефотаксиму в концентрації 150 мг/л для стимулювання утворення калусної тканини II типу у ліній Ланкастер.

21. Для отримання рослин-регенерантів з калусної тканини I типу рекомендовано використовувати гібриди F₁ ліній плазми Ланкастер та А188 і PLS61, з калусної тканини II типу – А188, Chi31 і PLS61.

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

23. Для отримання рослин-регенерантів з 90-добової калусної тканини II типу рекомендовано додавання до середовища для індукції регенерації MS20 0,1 мг/л індолилмасляної кислоти.

Матеріали розділу 4 представлено в публікаціях [5, 6, 28, 29, 44-46, 49-53, 56, 62, 63, 119, 121, 204, 207, 210- 212, 338] та двох отриманих патентах на корисні моделі [104, 105]. Результати дисертаційної роботи даного розділу використовуються в селекційних програмах ДУ ІЗК НААН (Додаток Д) та у навчальному процесі вищого навчального закладу під час викладання дисциплін «Біотехнологія рослин» з напрямку підготовки студентів «Біотехнологія» [131].

РОЗДІЛ 5

ГЕНЕТИЧНО-ІНЖЕНЕРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ
ЛАНКАСТЕР У КУКУРУДЗИ

Метою досліджень, результати яких представлені в даному розділі, була характеристика особливостей та ефективності генетичної трансформації зародкової плазми Ланкастер шляхом біолістичної обробки калусної тканини та отримання на основі вітчизняних генотипів Ланкастер рослин кукурудзи, трансгенних за чужорідними генами *uidA* та *bar*.

Для генетично-інженерної характеристики даного типу зародкової плазми нами досліджено можливість генетичної модифікації геному ліній і гібридів Ланкастер порівняно з іншими типами зародкової плазми. Зокрема, на етапі культури *in vitro* біолістично оброблену калусну тканину ліній і гібридів оцінено за транз'єнтною експресією гена *uidA* і наявністю гена *bar* за ПЛР, прослідковано вплив біолістичної обробки та селективного агента фосфінотрицину на калусогенез, регенерацію рослин та субкультивування калусної тканини. Розглянуто морфобіологічні особливості рослин-трансформантів в поколіннях від самозапилення, характер експресії гена *bar*.

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

Експерименти з генетичної трансформації кукурудзи вектором рАНС25, який містив чужорідні гени *uidA* та *bar*, виконувалися на базі Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України (згідно з Угодами про співробітництво та організацію взаємовідносин між ДУ Інститут зернових культур НААН України та Інститутом клітинної біології та генетичної інженерії НАН України №1 від 18.05.2012 р. та №2 від 21.05.2014 р.) за методикою, яку розгорнуто наведено в розділі 2. Як матеріал в дослідженнях з генетичної трансформації

використовували калуси I і II типу ліній кукурудзи плазми Ланкастер ДК267, ДК298, ДК633266, а також ліній ДК959 (плазма Лакон), RS15 (плазма Su₁) і PLS61 (плазма PLS61). Окрім ліній до генетичної трансформації були залучені прямі і зворотні гібриди F₁: ДК633266хPLS61, ДК959хPLS61, PLS61хКП7, ПРЖ5хКП7, ДК267хPLS61 і ДК959хДК232. Біолістичній обробці в ході 71 пострілу загалом було піддано калуси на щитках 2000 незрілих зародків (рис. Г.1 додатку Г), з них 1853 було залучено до подальшого культивування та спостережень.

Аналіз транз'єнтної експресії гена *uidA* в біолістично оброблених калусах кукурудзи II типу проводили для ліній Ланкастер ДК633266, ДК267, неланкастерівських ліній ДК959, PLS61 і RS15, прямих і зворотних гібридів PLS61хДК959, PLS61хДК633266, а також PLS61хКП7. Через чотири доби після біолістичної обробки за реакцією з β -глюкуронідазою в присутності субстрату X-gluc на калусах було виявлено блакитно-синє забарвлення, яке різнилось за інтенсивністю та площею калусу, яку воно займало (рис. 5.1а-в). Блакитне забарвлення в даній реакції, як доказ транз'єнтної експресії гена *uidA*, отримано і при пофарбуванні листків рослин, регенерованих з біолістично оброблених калусів (рис.5.1г-д). Загалом частота транз'єнтної експресії у ліній коливалася в діапазоні від 20% у ДК267 до 90% у PLS61 із середнім значенням 54,56%. Найвищий рівень транз'єнтної експресії гена *uidA* за 5-бальною шкалою зареєстровано у PLS61, середній рівень продемонстрували лінії RS15 і ДК959. Лінії Ланкастер ДК633266 та ДК267 виявили найслабкішу транз'єнтну експресію даного гена, відповідно 40% і 20% калусів цих ліній мали забарвлення інтенсивністю в 1 бал. Всі досліджені гібриди продемонстрували транз'єнтну експресію гена *uidA* на рівні 100% від кількості біолістично оброблених калусів, що свідчить про більшу компетентність гібридів F₁ до біолістичної трансформації порівняно з лініями. Інтенсивність забарвлення розрізнялася для різних гібридів: найбільша спостерігалася у PLS61хДК959 (66,7% калусів – 5 балів, 33,3% – 2 бали), середня у PLS61хКП7 (44,4% – 5 балів, 33,3% – 4 бали, 22,3% – 2

бали), PLS61×ДК633266 (35,7% – 5 балів, 42,9% – 4 бали, 14,3% – 3 бали, 7,1% – 2 бали), ДК633266×PLS61 (по 33,3% – 5, 4 та 2 бали), а найменша у ДК959×PLS61 (18,2% – 5 балів, 36,4% – 4 бали, 27,3% – 3 бали, 18,2% – 2 бали).

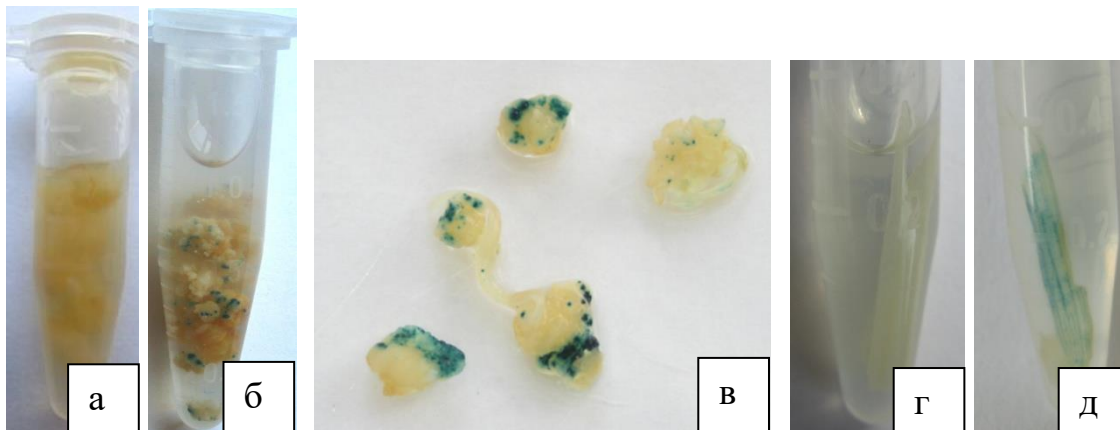


Рис. 5.1. Транзйєнтна експресія гена *uidA* у лїнії кукурудзи PLS61: а-в – калуси через 4 доби пїсля трансформації; г-д – листки рослин-регенерантів; а, г – без біолїстичної обробки, б, в, д – пїсля біолїстичної обробки

З калусів, які виявили транзйєнтну експресію гена *uidA* та стйїкїсть до фосфїнотрицину, при подальшому культивуваннї на селективних живильних середовищах була видїлена ДНК та проаналїзована методом ПЛР на наявнїсть гена *bar*. На рисунку 5.2 та в таблицї 5.1 показано результати ПЛР-аналїзу для калусної тканини II типу лїнії PLS61 та реципрокних гїбридів ДК959×PLS61 і PLS61×ДК633266. Ця тканина була вїдїбрана в процесї селекції на середовищі Б4+5 мг/л фосфїнотрицину протягом двох мїсяцїв пїсля біолїстичної обробки конструкцією з геном *bar*. Для 16 з 17 калусних лїній було показано наявнїсть фрагменту очїкуваного розмїру. Вїдсутнїсть очїкуваного амплїкону – маркера присутностї гена *bar* для одного зї зразкїв калусної тканини може бути пов'язана з низькою кїлькїстю трансформованих клїтин або химернїстю калусу.

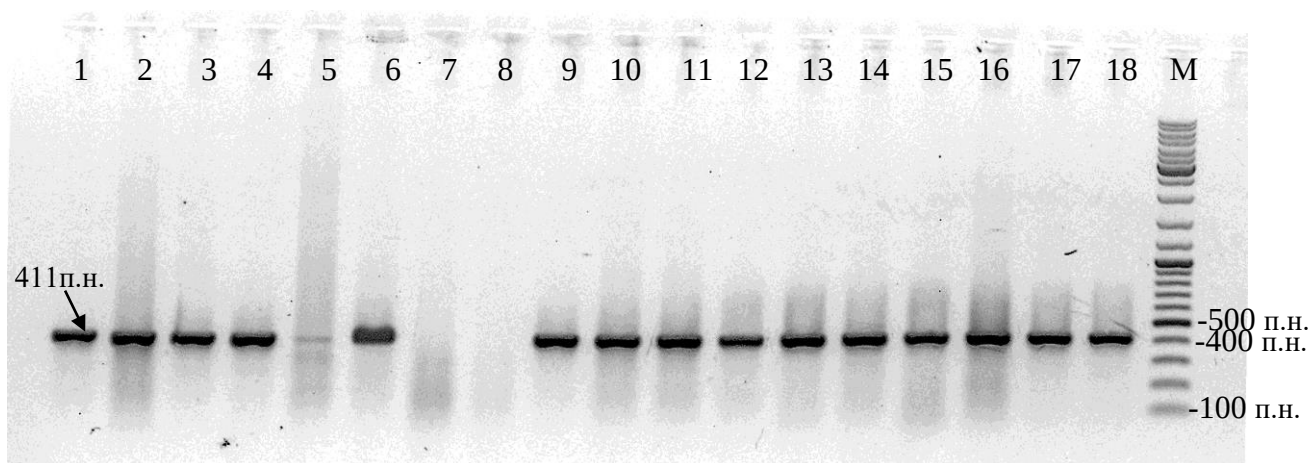


Рис. 5.2. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР на присутність гена *bar* для ДНК калусної тканини, підданої біолістичній трансформації та відселектованої на фоні 5 мг/л фосфінотрицину: 1-7, 9-18 – біолістично оброблені калуси: 1,3,10 – PLS61; 2,7,9 – ДК959×PLS61; 4-6,11,12 – PLS61×ДК959; 13 – PLS61×ДК633266; 14-18 – ДК633266×PLS61; 8 – негативний контроль: калус лінії PLS61, який не піддавався біолістичній обробці; М – маркер молекулярної маси DNALadderMix. Довжина очікуваного фрагменту – 411 п.н. Виконано спільно з Інститутом клітинної біології та генетичної інженерії НАН

Таблиця 5.1

Присутність гена *bar* в біолістично оброблених та відселектованих на фоні 5 мг/л фосфінотрицину калусній тканині кукурудзи

Генотип калусної тканини, підданої біолістичній обробці	Кількість проаналізованих зразків, шт.	Кількість <i>bar</i> -позитивних зразків	
		шт.	% від кількості проаналізованих зразків (ЧТ1)
PLS61	3	3	100
ДК959×PLS61	3	2	66,7
PLS61×ДК959	5	5	100
PLS61×ДК633266	1	1	100
ДК633266×PLS61	5	5	100
Всього	17	16	94,1±11,3

Таким чином, показано можливість трансформації калусної тканини кукурудзи шляхом біолістичної обробки, зокрема гібрида кукурудзи за участю лінії Ланкастер PLS61×ДК633266 та його зворотної комбінації. Представлені результати підтверджують успішність проходження генетичної трансформації та відборів на селективному середовищі для 94,1% калусів, протестованих методом ПЛР. Результативність біолістичної обробки продемонстрована для всіх п'яти задіяних в експерименті генотипів. Частота трансформації (ЧТ1), визначена як процентне відношення кількості *bar*-позитивних калусів до кількості біолістично оброблених та стійких до фосфінотрицину калусів, знаходилась в діапазоні 66,7-100% із середнім значенням $94,1 \pm 11,3\%$.

Біолістична обробка проводилася на 10-20-у добу культивування незрілих зародків, тобто у той період, коли калуси на щитках незрілих зародків тільки починали формуватися. У зв'язку з цим в таблиці 5.2 для лінії PLS61 та гібридів ПРЖ5×КП7, ДК267×PLS61 і ДК959×ДК232 представлено результати дослідження впливу біолістичної обробки та культивування на селективному середовищі Б2+10 мг/л фосфінотрицину на частоту утворення морфогенних калусів на 30-ту добу після біолістичної обробки. Оскільки між реципрокними гібридами не було виявлено достовірної різниці за досліджуваним показником, в таблиці 5.2 представлено його середні значення для реципроків.

Як видно з таблиці 5.2, в контрольному варіанті частота утворення морфогенних калусів загалом знаходилася на високому рівні (76,5-98,6%). Досліджені генотипи достовірно розрізнялися між собою за цим показником, лише між ДК267×PLS61 і ДК959×ДК232 та ДК959×ДК232 і PLS61 не виявлено достовірних різниць. Найбільшу здатність до морфогенного калусогенезу виявила лінія PLS61, найнижчу – гібрид розлусної кукурудзи ПРЖ5×КП7. У варіанті експерименту без біолістичної обробки, але на фоні 10 мг/л фосфінотрицину спостерігалось зниження частоти утворення морфогенних калусів у середньому на 31,2%. Достовірне зниження

Таблиця 5.2

Калусогенез у кукурудзи за дії біолістичної трансформації та селективного тиску фосфінотрицину

Генотип	Частота утворення морфогенних калусів на середовищах для індукції калусогенезу					
	контрольне середовище Б2, без біолістичної обробки		селективне середовище Б2+10 мг/л фосфінотрицину,			
			без біолістичної обробки		після біолістичної обробки (ЧТ2)	
	п*	%	п*	%	п**	%
ПРЖ5×КП7	140	76,5±7,3	100	33,0±11,0	372	23,5±4,4
ДК267×PLS61	140	90,0±5,1	90	82,2±8,1	346	87,2±3,6
ДК959×ДК232	80	98,0±3,1	50	40,0±13,9	173	62,1±7,4
PLS61	70	98,6±2,8	30	83,3±13,8	83	98,8±2,4
Середнє	430	90,8±2,8	270	59,6±6,0	974	67,9±3,0

Примітка. * – кількість культивованих незрілих зародків в стадії ініціації калусогенезу; ** – кількість підданих біолістичній обробці незрілих зародків в стадії ініціації калусогенезу; 30-та доба після біолістичної обробки (45 діб загального культивування).

досліджуваного цього показника зафіксовано для ПРЖ5×КП7 і ДК959×ДК232. У варіанті досліду після біолістичної обробки і культивування на селективному середовищі частота утворення морфогенних калусів у середньому за генотипами склала 67,9±3,0%, що достовірно менше, ніж в контрольному варіанті без біолістичної обробки і без дії селективного агента. При порівнянні частоти утворення морфогенних калусів у даному варіанті та у варіанті без біолістичної обробки, але за дії 10 мг/л фосфінотрицину достовірної різниці між ними не виявлено, хоча треба відмітити тенденцію до підвищення значень показника у варіанті з біолістичною обробкою. Оцінка ступеня інгібування калусогенезу за окремими генотипами показує, що по відношенню до контрольного варіанту без біолістичної обробки і без селективного тиску генетична трансформація з

використанням гена *bar* та селекція на фоні фосфінотрицину призводили до інгібування калусогенезу у ПРЖ5×КП7, ДК959×ДК232, проте для ДК267×PLS61 та PLS61 таке інгібування не виявлено. По відношенню до контрольного варіанту без біолістичної обробки, але за дії фосфінотрицину біолістична обробка конструкцією з геном *bar* призвела до підвищення показника лише у ДК959×ДК232 (на 22,1%). Загалом, у гібрида ДК267×PLS61, який містить лінію плазми Ланкастер ДК267, та у PLS61 частота утворення морфогенних калусів у всіх трьох варіантах досліджу знаходилася на однаковому, досить високому рівні.

Отже, частота утворення морфогенних калусів на фоні фосфінотрицину знижується залежно від генотипу на 7,8-58,0%. Можна припустити, що певний ступінь виживаності калусів за дії гербіциду пов'язаний з повільним надходженням токсичної речовини, а також з відсутністю процесу фотосинтезу у калусах, які культивувалися за умов темряви. Після біолістичної обробки конструкцією з геном стійкості до фосфінотрицину *bar* і культивування на селективному середовищі інтенсивність морфогенного калусогенезу знижується порівняно з контролем на 2,8-53,0%. Це не дозволяє стверджувати про суттєву позитивну відмінність від реакції на дію гербіциду нетрансформованих калусів. Лише для ДК959×ДК232 встановлено достовірний позитивний вплив біолістичної обробки конструкцією з геном *bar* на інтенсивність калусогенезу на фоні гербіциду, що свідчить про генотипову залежність реакції калусів на процедуру трансформації і селективний тиск. Частота трансформації (ЧТ2), розрахована як процентне відношення кількості фосфінотрицинстійких калусів до кількості біолістично оброблених калусів, які культивувалися на селективному середовищі з фосфінотрицином, серед досліджених генотипів варіювала в діапазоні 23,5-98,8% з середнім значенням 67,9%.

Отримані у всіх варіантах дослідження морфогенні калуси переносили на середовища для індукції регенерації рослин Б3 та Б3+5 мг/л фосфінотрицину і через 30 діб (75 діб загального культивування) оцінювали загальну частоту регенерації (рис.5.3, табл.5.3).

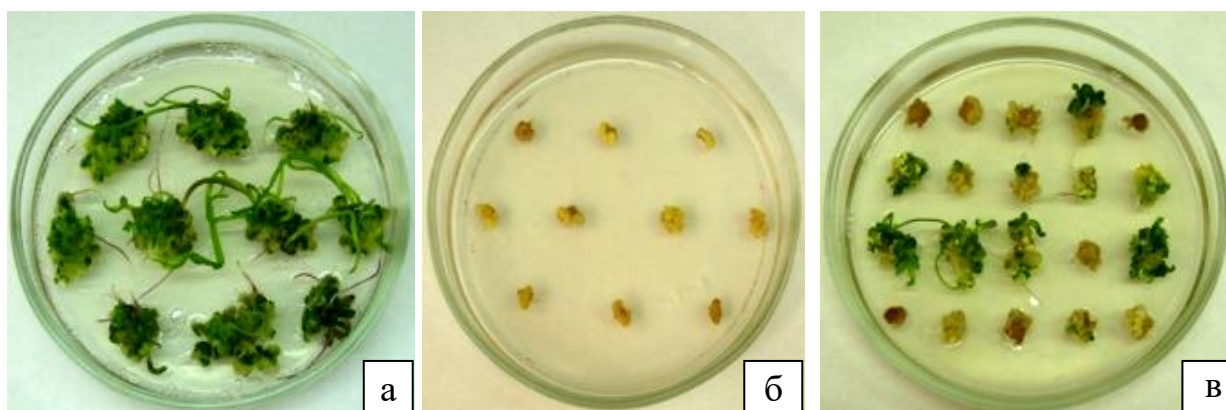


Рис. 5.3. Регенерація калусів гібрида ДК267×PLS61 після 30 діб вирощування на середовищі для індукції регенерації: а – інтактні калуси, на контрольному середовищі Б3 без селективного агента, б – інтактні калуси, на селективному середовищі Б3+5 мг/л фосфінотрицину, в – калуси після біолістичної трансформації за участю гена *bar* на селективному середовищі Б3+5 мг/л фосфінотрицину

Таблиця 5.3

Регенерація у кукурудзи за дії біолістичної трансформації та селективного тиску фосфінотрицину

Генотип	Загальна частота регенерації рослин на середовищах для індукції регенерації					
	контрольне середовище Б3, без біолістичної обробки		селективне середовище Б3+5 мг/л фосфінотрицину,			
			без біолістичної обробки		після біолістичної обробки	
	п	%	п	%	п	ЧТЗ, рослин/100 калусів
ПРЖ5×КП7	140	74,2±7,4	100	0	372	8,3±2,9
ДК267×PLS61	140	99,5±1,4	90	0	346	52,5±5,4
ДК959×ДК232	80	99,0±2,0	50	0	173	27,0±6,8
PLS61	70	98,6±2,9	30	0	83	27,7±9,9
Середнє	430	92,8±2,5	270	0	974	28,9±2,1

Примітка. п – кількість калусів, культивованих на середовищі для індукції регенерації.

Аналіз представлених на рисунку 5.3 та в таблиці 5.3 матеріалів показує, що для інтактних калусів загальна частота регенерації знаходилася в середньому на рівні 92,8%, а за генотипами варіювала в межах 74,2-99,5%. При культивуванні необроблених калусів на селективному середовищі з фосфінотрицином регенерація була повністю інгібована, на калусах всіх досліджених генотипів не утворилося жодної рослини. Зовсім інша ситуація спостерігалася у варіанті з культивуванням біолістично оброблених конструкцією з геном *bar* калусів на селективному регенераційному середовищі. В цьому варіанті регенерували в середньому 28,9% калусів (від 8,3 до 52,5 рослин/100 калусів).

Отримати рослини-регенеранти після трансформації калусної тканини та селекції на фоні фосфінотрицину вдалося у всіх задіяних в експерименті генотипів. Це свідчить про явний позитивний вплив генетичної трансформації з використанням гена *bar* на виживаність клітин калусів, причому даний ефект проявляється віддалено, після 60-ї доби культивування на фоні фосфінотрицину (30 діб на середовищі для індукції калусогенезу та 30 діб на середовищі для індукції регенерації). Гібрид ДК267×PLS61 за участю лінії плазми Ланкастер і лінія PLS61 показали високий рівень загальної частоти регенерації в контролі (відповідно 99,5% і 98,6%). Цей же гібрид виявив найбільшу по досліді загальну частоту регенерації у варіанті з біолістичною обробкою та культивуванням на фоні фосфінотрицину (52,5%), навіть більшу, ніж у PLS61 (27,7%). Частота трансформації (ЧТЗ), розрахована як кількість рослин-регенерантів T_0 , стійких до фосфінотрицину, отриманих на 100 біолістично оброблених і культивованих на селективному середовищі з фосфінотрицином калусів, варіювала серед досліджених генотипів в межах 8,3-52,5 рослин/100 калусів із середнім значенням $28,9 \pm 2,1$ рослин/100 калусів.

Таким чином, фосфінотрицин як селективний агент суттєво блокує життєдіяльність калусної тканини саме на регенераційному, а не калусогенному етапі *in vitro*. Позитивний вплив проведеної генетичної трансформації з використанням гена стійкості до фосфінотрицину *bar* проявився саме на середовищі для індукції регенерації, коли вдалося отримати загальну частоту регенерації рослин на рівні 8,3-52,5%, тоді як у варіанті без генетичної трансформації, але на селективному середовищі з гербіцидом вона дорівнювала нулю. Неповне відновлення регенерації у варіанті після біолістичної обробки та за тиску фосфінотрицину до значень для інтактних калусів можна пояснити тим, що не всі клітини в калусах через 30-60 діб культивування після трансформації є нащадками клітин, в яких відбулося успішне вбудовування гена *bar* в ядерний геном та його успадкування при клітинних поділах.

На рисунку 5.4 представлено рослини-регенеранти декількох генотипів кукурудзи, отримані з калусів, біолістично оброблених конструкцією рАНС25 з чужорідними генами *uidA* і *bar* та відселектованих на середовищах Б2+10 мг/л фосфінотрицину і Б3+5 мг/л фосфінотрицину.

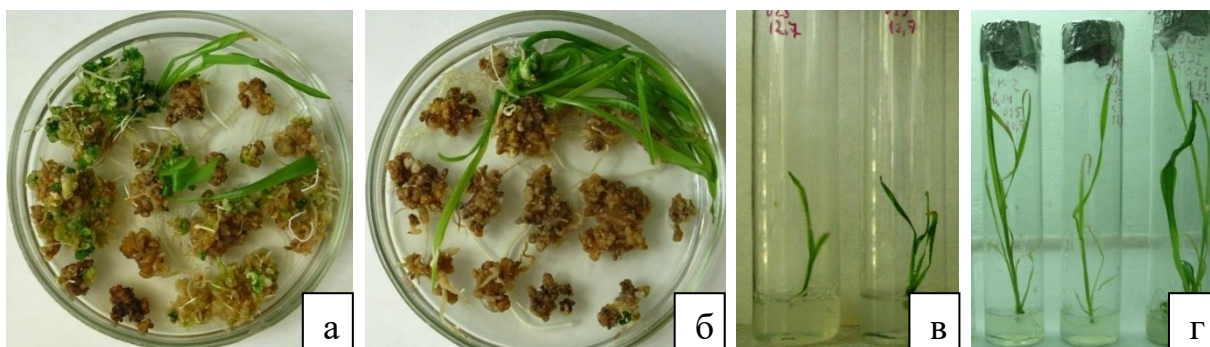


Рис. 5.4. Рослини-регенеранти з калусів кукурудзи, що були біолістично оброблені вектором рАНС25 з генами *uidA* і *bar* та відселектовані на калусогенному (Б2+10 мг/л фосфінотрицину) і регенераційному (Б3+5 мг/л фосфінотрицину) середовищах: ДК959 (а), RS15 (б), ДК633266×PLS61 (в), PLS61 (г)

В наступному експерименті досліджували вплив біолістичної обробки на питомий приріст маси калусів II типу ліній Ланкастер ДК298 та ДК633266. Аналіз вели через 90 діб після біолістичної обробки та культивування на контрольному середовищі Б4 або селективному середовищі Б4+5 мг/л фосфінотрицину. В таблиці 5.4 представлено динаміку приросту сирової маси калусної тканини II типу у наступних варіантах експерименту: №1 – калуси без біолістичної обробки, середовище Б4; №2 – калуси без біолістичної обробки, середовище Б4+5 мг/л фосфінотрицину, №3 – калуси після біолістичної обробки конструкцією з геном *bar*, середовище Б4, №4 – калуси після біолістичної обробки конструкцією з геном *bar*, середовище Б4+5 мг/л фосфінотрицину.

Таблиця 5.4

Вплив біолістичної трансформації та селективного тиску фосфінотрицину на питомий приріст маси калусів II типу (за 90 діб культивування після біолістичної обробки)

№ варіанту	Лінія ДК298		Лінія ДК633266	
	п	Питомий приріст сирової маси калусів II типу, мг	п	Питомий приріст сирової маси калусів II типу, мг
1	25	481,2 ± 176,2	29	282,0 ± 194,4
2	25	135,0 ± 31,5	29	52,7 ± 29,4
3	38	656,1 ± 138,5	38	555,8 ± 221,1
4	126	148,9 ± 23,2	107	112,4 ± 18,6

Примітка. 1 – калуси без біолістичної обробки, середовище Б4, 2 – калуси без біолістичної обробки, середовище Б4+5 мг/л фосфінотрицину, 3 – калуси після біолістичної обробки, середовище Б4, 4 – калуси після біолістичної обробки, середовище Б4+5 мг/л фосфінотрицину; п – кількість досліджених калусів.

Як видно з представлених даних, питомий приріст сирової маси калусів за 90 діб у лінії ДК298 був інтенсивнішим, ніж у ДК633266, однак для обох ліній характер росту мав спільні риси. Так, по відношенню до варіанті досліді №1 (без біолістичної обробки і без впливу фосфінотрицину) у варіанті №2 (без біолістичної обробки, за дії 5 мг/л фосфінотрицину)

спостерігалось суттєве уповільнення приросту сирої маси. У варіанті №3 (після біолістичної обробки, але без дії фосфінотрицину) відмічено тенденцію до навіть інтенсивнішого росту калусів, ніж в контрольному варіанті №1. Пояснити таку стимуляцію можна самою процедурою біолістичної трансформації, оскільки обстріл металевими кульками створює раневу поверхню тканини і потенційно може активізувати ростові процеси у відповідь на поранення. Приріст сирої маси калусів у варіанті №4 (після біолістичної обробки, культивування на фоні 5 мг/л фосфінотрицину) був очікувано нижчим, ніж у варіантах №1 і №3. Однак відносно варіанту №2 у варіанті №4 виявлено тенденцію до зростання питомого приросту сирої маси для ДК298, а для ДК633266 – достовірне збільшення такого приросту. Такі відмінності можна пояснити тим, що частина клітин калусів у варіанті № 4 є трансформованими геном стійкості до фосфінотрицину, тобто мають генетично обумовлену стійкість до цього негативного фактора культивування.

Отже, в результаті біолістичної трансформації калусної тканини генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер та інших вектором рАНС25 були отримані трансгенні калуси, а з них – рослини-регенеранти. Транз'єнтну експресію гена *uidA* виявили всі досліджені лінії і гібриди, відтак у гібридів її інтенсивність була значнішою. ПЛР-аналіз виявив $94,1 \pm 11,5\%$ *bar*-позитивних калусів серед всіх 5 проаналізованих генотипів, зокрема у реципрокних гібридів PLS61×ДК633266, які представляють плазму Ланкастер. Показано, що фосфінотрицин як селективний агент в середовищах для калусогенезу та регенерації має пролонговану дію, а його вплив суттєво блокує життєдіяльність калусної тканини кукурудзи на етапі регенерації з калусної тканини, а не на етапі калусогенезу. Тому за дії гербіциду фосфінотрицину саме на етапі регенерації рослин проявляється позитивний вплив проведеної генетичної трансформації з геном *bar*. Ріст тривалокультивованої калусної тканини після біолістичної обробки конструкцією з геном *bar* у ліній Ланкастер менше пригнічувався фосфінотрицином, ніж у інтактних калусів.

5.2. Результати вирощування та тестування рослин-трансформантів в поколіннях T₀-T₆

Отримані після генетичної трансформації рослини-регенеранти є рослинами покоління T₀. З середовища для індукції регенерації рослини T₀ висаджували в біологічні склянки на середовище для дорощування та укорінення B5. З біологічних склянок укорінені рослини пересаджували в пакети з ґрунтом, а потім у вегетаційні посудини і вирощувалися в умовах закритого ґрунту. Запилення та розмноження рослин покоління T₀ стикалося з великими труднощами через те, що цвітіння цих рослин завжди припадає на січень-лютий, коли неможливо створити оптимальні умови вирощування за температурою, інтенсивністю та спектром штучного освітлення. З цієї причини отримати насіння від рослин покоління T₀ вдалося лише для двох вихідних генотипів – PLS61×ДК633266 та PLS61. Надалі, умовно, ми будемо називати рослини, які регенеровані з калусної тканини після її біолістичної обробки, та їхнє потомство рослинами-трансформантами. Загальні схеми отримання і комплексного дослідження рослин-трансформантів в поколіннях T₀-T₆ представлено в додатках на рисунках Г.2-Г.3 та в таблицях Г.1-Г.2.

Як видно з таблиць Г.1-Г.2, для розгорнутого вивчення в посткультуральний період використовували рослини поколінь T₀-T₆, отримані за генетичної трансформації вихідного гібрида PLS61×ДК633266, який як батьківську містив лінію плазми Ланкастер ДК633266. Насіння від двох рослин-трансформантів PLS61, запилених пилом гібрида ДК377×Chi31 в T₀ та самозапилених в T₁, до розгорнутого вивчення в наступних поколіннях задіяне не було і зберігається для подальших досліджень.

5.2.1. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів в поколіннях T₂-T₃

Рослина T₀, регенерована з калусної тканини гібрида PLS61×ДК633266, біолістично обробленої конструкцією з чужорідним геном *bar*, була запилена

пилком лінії Ланкастер ДК633266 (самозапилення трансформанта було неможливе через відсутність у нього фертильного пилку) (див. табл. Г.1). В результаті було отримано 40 насінин із зародками покоління T_1 , генотип яких $T_1:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]$. Частину насіння T_1 було висіяно у ґрунт вегетаційних посудин. На рослинах T_1 отримано насіння від самозапилення із зародками T_2 генотипу $T_2:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]1сз$, де 1сз – номер самозапилення (2079 шт.). В наступних поколіннях, тобто на рослинах T_2 - T_6 , насіння отримували тільки шляхом самозапилення. Генотипи зародків цього насіння і рослин, які формувалися при його проростанні, відповідно становили $T_{3-6}:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]2-5сз$.

Для вирощування поколінь T_2 - T_6 висівали по 25 і більше рослин на покоління. Самозапилювали в кожному поколінні по 5 і більше рослин.

Для рослин-трансформантів поколінь T_2 і T_3 зазначених вище генотипів вивчали ріст та розвиток за чотирма варіантами досліду:

№1 – контрольні рослини, які не є потомками генетично трансформованих рослин; необроблені гербіцидом «Баста»TM;

№2 – контрольні рослини, які не є потомками генетично трансформованих рослин; оброблені гербіцидом «Баста»TM;

№3 – рослини-трансформанти (потомки рослин-регенерантів з біолістично обробленої геном *bar* калусної тканини); необроблені гербіцидом «Баста»TM;

№4 – рослини-трансформанти (потомки рослин-регенерантів з біолістично обробленої геном *bar* калусної тканини); оброблені гербіцидом «Баста»TM.

У варіантах 1 і 2 використовували рослини-сомаклони покоління R_2 генотипу $(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266$, отримані в лабораторії біотехнології ДУ ІЗК НААН при культивуванні не підданої біолістичній обробці калусної тканини гібрида $PLS61 \times ДК633266$. Обробку рослин відповідних варіантів гербіцидом «Баста»TM в концентрації 1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин проводили у фазі сходів. Досліджували ріст і розвиток 8 окремих сімей T_2 і 8 окремих сімей T_3 , висіяних кожна на окремій

ділянці. Дослідження за цим експериментом для рослин R₂, T₂ та T₃ проводили одночасно, в однакових ґрунтово-кліматичних умовах закритого ґрунту у 2014 році. В таблиці 5.5 наведено схожість насіння піддослідних рослин за чотирма варіантами експерименту. Дані, представлені в таблиці 5.5, стосуються стану рослин на момент появи сходів, тобто до обробки гербіцидом варіантів 2 і 4.

Таблиця 5.5

Схожість насіння рослин-трансформантів поколінь T₂ і T₃ та контрольних рослин в умовах ґрунту (вихідний генотип PLS61×ДК633266)

Рослини	Варіант*/покоління		Висіяно насіння на ділянці, шт.	Схожість, %*
Нетрансформовані (контроль)	1	R ₂	35	77,1±14,4
	2	R ₂	35	74,3±15,0
Трансформовані (дослід)	3	T ₂	32	75,0±15,6
		T ₃	50	50,0±14,3
	4	T ₂	309	52,4±5,7
		T ₃	341	28,2±4,9

Примітка. *тут і далі варіант 1, 2 – рослини-сомаклони, 3, 4 – рослини-трансформанти за геном *bar*.

Виходячи з представлених в таблиці 5.5 даних, можна оцінити вплив біолістичної обробки, умов вирощування рослин поколінь T₀-T₂ на схожість насіння із зародками відповідно другого та третього поколінь трансформантів. Так, у порівнянні з рослинами, які не були трансформовані, а отримані з насіння сомаклонів, трансформанти мали значно меншу схожість, причому в T₃ вона знижувалася навіть у порівнянні з T₂. Якщо аналізувати за окремими сім'ями, то схожість в поколінні T₂ була більш вирівняна, але між сім'ями вона варіювала у діапазоні 17,2-67,6%. В поколінні T₃ схожість насіння варіювала між сім'ями в ширшому діапазоні 0-73,5%, причому насіння двох сімей не зійшло. Причинами зниження схожості в поколіннях трансформантів може бути накопичення чужорідних генів, а також той факт, що сім'ї варіюють за довжиною вегетаційного періоду та

частина насіння попереднього покоління в умовах закритого ґрунту не встигає дозріти в повній мірі.

В додатках на рисунку Г.4 для вище описаних варіантів дослідів представлено реакцію рослин на обробку гербіцидом «Баста»TM (34 доби після появи сходів та 20 діб після обробки дослідних ділянок гербіцидом). Видно, що нетрансформовані рослини-сомаклони покоління R₂ без обробки гербіцидом (рис. Г.4а) неушкоджені та мають здоровий вигляд, а такі ж рослини після обробки гербіцидом повністю загинули (рис. Г.4б). Рослини-трансформанти за геном *bar* покоління T₂ у варіанті після обробки гербіцидом (рис. Г.4в) виглядають стійкими та умовно стійкими з різним ступенем пошкодження. На рисунку Г.5а-б представлено нетрансформовані (контрольні) рослини-сомаклони покоління R₂ вихідного генотипу PLS61×ДК633266 (ліві рядки) та рослини-трансформанти за геном *bar* покоління T₃ того ж вихідного генотипу PLS61×ДК633266 (праві рядки) до та після обробки гербіцидом «Баста»TM. Як видно з рисунка, у віці 14 діб від появи сходів, до обробки гербіцидом, рослини і в контрольному, і в дослідному варіанті однаково розвинені, хоча схожість як соматиків R₂, так і рослин-трансформантів T₃ дещо знижена (див. рис. Г.5а). У варіанті після обробки гербіцидом (рис. Г.5б) нетрансформовані рослини-сомаклони R₂ повністю загинули (лівий рядок), а рослини-трансформанти T₃ загалом вижили (правий рядок), хоча демонструють різний ступінь стійкості до гербіциду.

В таблиці 5.6 наведено підсумкові дані стосовно середньої виживаності рослин кукурудзи на 20-ту добу після обробки гербіцидом «Баста»TM (34-а доба від появи сходів) та вплив на неї біолістичної обробки конструкцією з геном *bar*.

Таблиця 5.6

Середня виживаність рослин-трансформантів кукурудзи в поколіннях T_2 та T_3 у ґрунті за дії гербіциду «Баста»TM (вихідний генотип PLS61×ДК633266)

Рослини	Варіант/ покоління		n	Середня виживаність рослин-трансформантів			
				на 20-ту добу після обробки гербіцидом,			на кінець вегетаційного періоду,
				частота, %	середній бал*	бал 4-5, %†	частота, %
Нетрансформовані (контроль)	1	R ₂	27	100	5,0	100	100
	2	R ₂	26	0	0	0	0
Трансформовані (дослід)	3	T ₂	24	100	5,0	100	100
		T ₃	25	100	4,0	72,0±18,0	100
	4	T ₂	162	64,5±8,2	1,8	19,8±6,3	46,4±8,5
		T ₃	96	80,0±9,5	3,3	30,2±9,4	67,6±11,2

Примітка. n – кількість досліджених рослин, шт.; * – тут і далі за 5-бальною шкалою: 0 балів – загибель рослин, 5 балів – максимальна виживаність, † – процентне відношення кількості рослин з балом виживаності 4-5 до кількості рослин, оброблених гербіцидом.

Як видно з таблиці 5.6, найвищий бал середньої виживаності при оцінці за 5-бальною шкалою мали 100% контрольних рослин – нетрансформованих, необроблених гербіцидом (варіант 1) та трансформованих, але не оброблених гербіцидом в поколінні T_2 (варіант 3). Варіант 3 в поколінні T_3 мав 4-бальну оцінку виживаності для 72 % рослин на ділянці, що скоріше за все пов'язано з якістю насіння покоління T_3 . Рослини у варіанті дослід 2, тобто нетрансформовані рослини, оброблені гербіцидом, загинули протягом тижня після обробки. У варіанті дослід 4, тобто серед рослин трансформованих та оброблених гербіцидом, виживаність на рівні 4-5 балів мали 19,8% рослин T_2 та 30,2% рослин T_3 .

Загалом, середній бал виживаності для рослин T_2 коливався в діапазоні 1,3-2, а частка рослин на кожній ділянці, які стійко переносили вплив

гербіциду, тобто мали бал виживаності 4-5, коливалася в діапазоні 6,7-52,4%. Для рослин T_3 після обробки гербіцидом середній бал виживаності дещо збільшився, знаходився в діапазоні 1,5-4,3 бали. Збільшилася і частка рослин в поколінні T_3 , яка після обробки гербіцидом мала виживаність на рівні 4-5 балів – 8,0-84,6%. Найбільшу кількість рослин з виживаністю 4-5 балів, 84,6%, показала сім'я №27, що свідчить про успішний добір на селективному фоні у попередніх поколіннях та вірогідне накопичення трансгена в геномі рослин в двох циклах гомозиготації шляхом самозапилення. Насіння сім'ї №27 від самозапилення, яка пройшла відбір на селективному фоні у ґрунті, було використано в наступному році для вирощування покоління T_4 .

Кількісна оцінка рослин за виживаністю протягом всього вегетаційного періоду показала, що в контрольних варіантах досліду 1 та 3 (без обробки гербіцидом) протягом вегетаційного періоду зберігаються всі рослини на ділянці. В контрольному варіанті 2, де вирощувалися нетрансформовані рослини, після обробки гербіцидом спостерігалася загибель всіх рослин. Для варіанту 4 за дії гербіциду через 20 діб після обробки виживали 64,5% рослин покоління T_2 та дещо більше – 80,0% рослин T_3 . Післядії гербіциду проявлялася не тільки в загибелі рослин до 20-ї доби після обробки, а і у пригніченні розвитку протягом всього вегетаційного періоду. Так, сумарно за вегетаційний період серед оброблених гербіцидом рослин в поколінні T_2 виживаність склала 46,4%, тобто загинуло 53,6% рослин, а в поколінні T_3 – 67,6%, тобто загинуло лише 32,4% рослин.

В таблиці 5.7 показано результати фенологічних спостережень за ознаками тривалості міжфазних періодів «сходи-цвітіння волотей» та «сходи-цвітіння качанів» у досліджуваних варіантів. Ці ознаки є важливими для співпадиння квітування чоловічих та жіночих суцвіть у часі та можливості самозапилення або гібридизації.

Таблиця 5.7

Вплив біолістичної обробки конструкцією з геном *bar* та обробки гербіцидом «Баста»TM на тривалість міжфазних періодів «сходи-цвітіння волотей» та «сходи-цвітіння качанів» у рослин-трансформантів кукурудзи поколінь T₂ і T₃ (вихідний генотип PLS61×ДК633266)

Рослини	Варіант/ покоління		n	Тривалість міжфазних періодів «сходи-цвітіння			
				волотей»,		качанів»,	
				діб	V, %	діб	V, %
Нетрансформовані (контроль)	1	R ₂	10	51,9±0,6	2,1	52,9±0,7	2,6
	2	R ₂	-	-	-	-	-
Трансформовані (дослід)	3	T ₂	24	53,5±1,6	5,9	55,0±1,9	6,9
		T ₃	25	59,3±2,1	7,1	61,4±2,1	6,9
	4	T ₂	72	64,2±2,1	6,3	67,2±3,1	9,1
		T ₃	49	63,5±3,5	11,0	66,2±4,0	11,9

Примітка. n – кількість досліджених рослин, шт. Рослини варіанту 2, нетрансформовані і оброблені гербіцидом «Баста»TM (1 г/л у перерахунку на фосфіотрицин), загинули протягом тижня після обробки у фазі сходів; V, % – коефіцієнт варіації.

Як видно з таблиці 5.7, у рослин-трансформантів поколінь T₂ і T₃, які були оброблені гербіцидом (варіант 4), збільшився термін від сходів до цвітіння волотей та качанів порівняно з нетрансформованим та необробленим контролем (варіант 1) та трансформованим необробленим контролем (варіант 3). У варіанті 4 між рослинами покоління T₂ і, особливо, T₃ спостерігалася підвищена варіабельність за досліджуваними ознаками, що призвело до зростання відповідних коефіцієнтів варіації і опосередковано свідчить про розщеплення усередині популяції рослин T₂ і T₃ при інбридингу. Розрив в термінах цвітіння волотей і качанів в поколіннях R₂, T₂ та T₃ в цілому по досліді складав 1-5 діб. У рослин варіанту 4 в обох поколіннях тривалість розриву (відповідно 3,0±1,5 і 2,7±1,0 діб) достовірно

збільшилася по відношенню до нетрансформованого, необробленого контролю (варіант 1: $1,0 \pm 0,5$ діб) та виявила тенденцію до збільшення порівняно з трансформованими необробленими гербіцидом рослинами (відповідно в T_2 $1,5 \pm 0,8$ діб та T_3 $2,1 \pm 1,0$ діб).

Дослідження висоти рослин показало, що покоління T_2 мало пригнічений ріст і достовірно меншу висоту у рослин, трансформованих і підданих обробці гербіцидом (варіант 4: $111,2 \pm 13,7$ см), ніж нетрансформований необроблений контроль (варіант 1: $160,8 \pm 2,4$ см) та трансформовані необроблені гербіцидом рослини (варіант 3: $155,2 \pm 10,4$ см). В поколінні T_3 відмічено зменшення висоти рослин (варіант 4: $114,5 \pm 10,9$ см) порівняно з нетрансформованими необробленими рослинами (варіант 1: $160,8 \pm 2,4$ см), але вплив гербіцидної обробки на висоту рослин порівняно з необробленими трансформантами (варіант 3: $125,3 \pm 8,4$ см) не встановлений. Спостереження за висотою рослин в даному експерименті виявило і такий цікавий факт, як достовірне зниження висоти рослин в поколінні T_3 ($125,3 \pm 8,4$ см) порівняно з поколінням T_2 у необроблених гербіцидом трансформантів у варіанті 3 ($155,2 \pm 10,4$ см) при майже однаковому коефіцієнті варіації (відповідно 13,2% і 13,3%). Таке зниження є закономірним результатом інбридингу і добре відоме в поколіннях рослин від самозапилення [20, 113, 361]. Разом з тим, аналогічне порівняння висоти рослин в поколіннях трансформантів T_2 і T_3 після дії гербіциду (варіант 4) показує відсутність суттєвої різниці у висоті рослин (відповідно $111,2 \pm 13,7$ і $114,5 \pm 10,9$ см) та підвищення коефіцієнту варіації (відповідно 24,4% і 18,7%). Тобто значніше варіювання ознаки на фоні стресу не дозволяє виявити зміну висоти рослин при інбридингу і відділити спадкове зниження висоти від адаптивної реакції на стрес.

Представлений аналіз морфобіологічних особливостей рослин-трансформантів не тільки дозволяє припустити поступове накопичення гена *bar* в поколіннях від самозапилення T_2 - T_3 , але і свідчить про явища, які зазвичай супроводжують інбридинг і підвищення гомозиготності – зниження

висоти рослин, розщеплення на окремі сім'ї, диференціацію сімей за морфологічними ознаками тощо.

Морфобіологічні особливості рослин поколінь T_4 - T_5 не досліджували. В T_6 за 2017 рік середні значення висоти рослин-трансформантів без гербіцидної обробки (варіант 3: $166,9 \pm 4,5$ см) та за гербіцидної обробки (варіант 4: $160,9 \pm 4,6$ см) достовірно не розрізнялися.

5.2.2. Молекулярно-генетичний аналіз рослин-трансформантів в поколіннях T_0 - T_2

Протягом періоду роботи з генетичної трансформації кукурудзи ми проводили ПЛР-аналіз на присутність гена *bar* для калусної тканини, підданої біолістичній обробці (див. рис. 5.2), отриманих з неї рослин-регенерантів T_0 та їхніх рослин-нащадків в поколіннях T_1 - T_2 . Довжина очікуваного фрагменту ампліфікації для детекції гена *bar* – 411 п.н. Кількість рослин в кожному поколінні, для яких була проведена ПЛР, визначалася технічними можливостями для ампліфікації і електрофорезу.

На рисунку 5.5а наведено результати визначення методом ПЛР наявності гена *bar* в ДНК батьківських ліній гібрида PLS61×ДК633266, використаного для генетичної трансформації. На рисунку 5.5б та в таблиці 5.8 представлено результати аналогічного аналізу для рослин-регенерантів покоління T_0 та рослин покоління T_1 . Для виділення ДНК використовували листки вегетуючих у ґрунті рослин, зібрані перед початком цвітіння.

З рисунку 5.5а видно, що в батьківських лініях вихідного гібрида PLS61×ДК633266 ген *bar* відсутній. Дві рослини покоління T_0 з генотипом T_0 (PLS61×ДК633266) та одна рослина T_0 з генотипом T_0 (ДК633266×PLS61), відібрані для аналізу (див. табл. 5.8), представляли собою рослини, регенеровані з біолістично обробленої калусної тканини, після селекції за дії фосфінотрицину на живильному середовищі в чашках Петрі. Сімнадцять проаналізованих рослин покоління T_1 були вирощені з насіння, отриманого

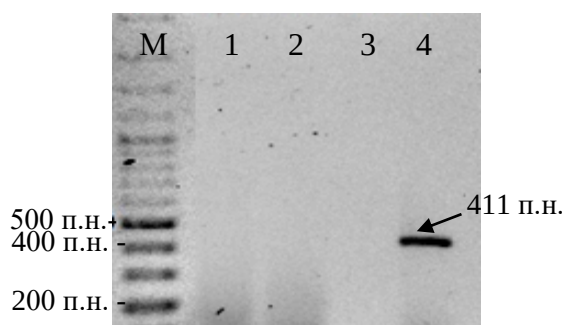


Рис. 5.5а. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР на присутність гена *bar* у батьківських ліній PLS61 і ДК633266 вихідного гібрида PLS61×ДК633266, використаного для біолістичної трансформації. М – маркер молекулярної маси з кроком 100 п.н.; 1 – лінія PLS61; 2 – лінія ДК633266; 3 – негативний контроль – вода; 4 – позитивний контроль – генетично трансформований тютюн. Довжина очікуваного фрагмента для гена *bar* – 411 п.н.

від запилення однієї рослини T_0 (PLS61×ДК633266) пилком лінії ДК633266 і мали, відповідно, генотип T_1 : T_0 (PLS61×ДК633266)×ДК633266. Дві інші проаналізовані рослини покоління T_1 були вирощені з насіння, отриманого від запилення однієї рослини T_0 (PLS61) пилком рослини ДК377×Chi31 і мали, відповідно, генотип T_1 : T_0 (PLS61)×(ДК377×Chi31). Як видно з представлених результатів, з трьох рослин покоління T_0 ген пошуку виявлено в однієї – рослини T_0 (PLS61×ДК633266). Серед рослин покоління T_1 для двох вихідних генотипів ампліфікований фрагмент знайдено у 89,5% проаналізованих рослин: 1) у 16 з 17 проаналізованих рослин T_1 генотипу T_0 (PLS61×ДК633266)×ДК633266, які були нащадками саме зазначеної вище *bar*-позитивної рослини T_0 (PLS61×ДК633266), запиленої пилком лінії ДК633266; 2) у однієї з двох проаналізованих рослин T_1 генотипу T_0 (PLS61)×(ДК377×Chi31), які були нащадками рослини T_0 (PLS61), запиленої пилком рослини ДК377×Chi31. Отримані дані свідчать про потрапляння трансгена з калусної тканини в рослини-регенеранти T_0 та його успадкування в T_1 .

Рослини покоління T_1 з генотипом T_0 (PLS61×ДК633266)×ДК633266, а саме рослини, представлені на рисунку 5.5б на доріжках № 2, 3, 5, 12, були

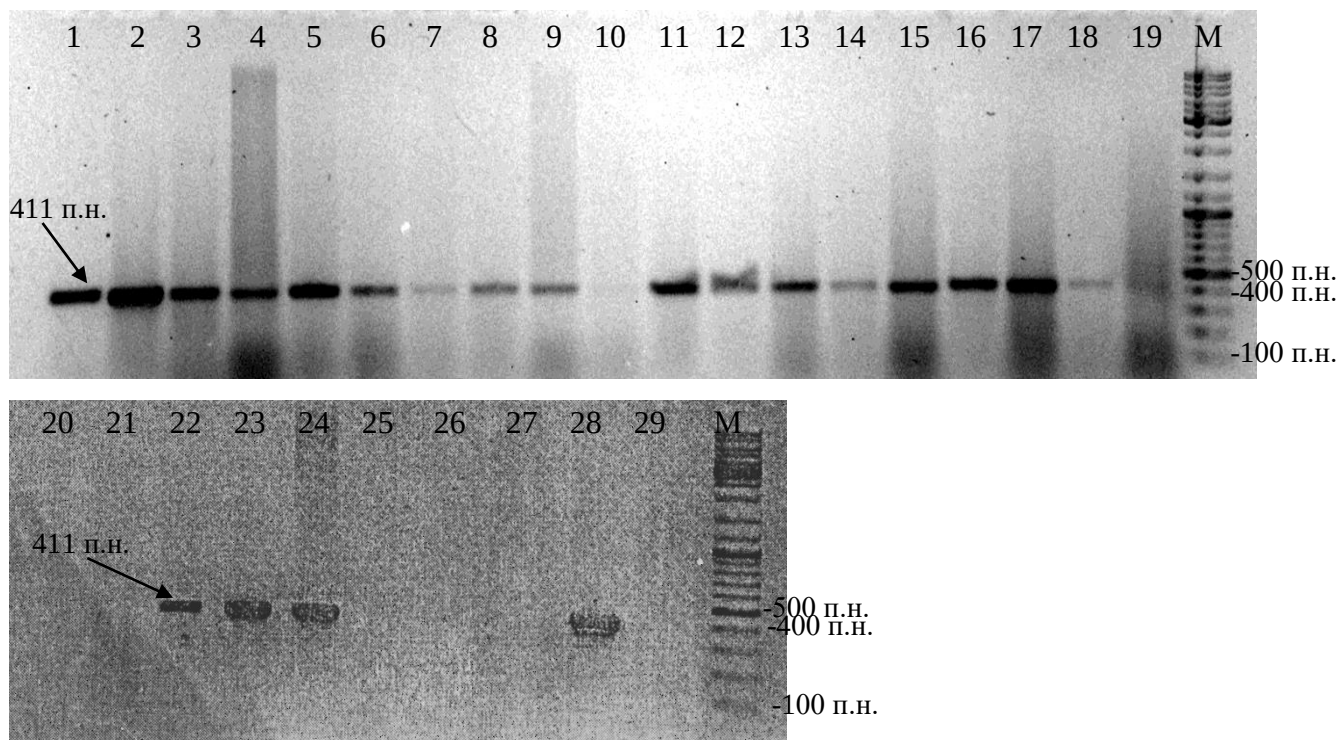


Рис. 5.56. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР ДНК рослин кукурудзи поколінь T_0 і T_1 на присутність гена *bar.1-13, 15-18* – покоління T_1 : [T_0 (PLS61×ДК633266)×ДК633266]; 14, 19 – покоління T_1 : [T_0 (PLS61)×(ДК377×Chi31)]; М – маркер молекулярної маси DNA LadderMix; 20, 24 – покоління T_0 (PLS61× ДК633266); 21 – покоління T_0 (ДК633266×PLS61); 22 – позитивний контроль: ДНК раніше трансформованої та дослідженої рослини кукурудзи генотипу T_0 (KC277×RS15); 23 – позитивний контроль: ДНК раніше трансформованої та дослідженої рослини генотипу T_0 (PLS61); 25 – ДНК нетрансформованої рослини лінії ДК959; 26 – негативний контроль: ДНК нетрансформованої рослини лінії PLS61; 27 – негативний контроль: ДНК нетрансформованого калусу лінії PLS61; 28 – позитивний контроль, ДНК трансформованої рослини ріпаку; 29 – негативний контроль: зразок не містить ДНК. Довжина очікуваного фрагмента – 411 п.н. Виконано спільно з Інститутом клітинної біології та генетичної інженерії НААН, відділ к.б.н. Б.В.Моргуна

Таблиця 5.8

Присутність гена *bar* в рослинах кукурудзи поколінь T₀ та T₁ за результатами ПЛР

Генотип досліджуваної рослини	Проаналі- зовано рослин, шт.	Кількість <i>bar</i> -позитивних рослин	
		шт.	% від кількості проаналізованих рослин
Рослини-регенеранти покоління T ₀			
T ₀ (PLS61×ДК633266)	2	1	50
T ₀ (ДК633266×PLS61)	1	0	0
Рослини покоління T ₁			
T ₀ (PLS61×ДК633266) ×ДК633266	17	16	94,1
T ₀ (PLS61)×(ДК377×Chi31)	2	1	50,0
Всього T ₀	3	1	33,3
Всього T ₁	19	17	89,5

самозапилені з отриманням насіння із зародками T₂. Вісім вирощених з цього насіння рослин T₂ були знов проаналізовані методом ПЛР. Це були рослини № 12/1 і 12/2 з варіанту дослідів 3 (див. підрозділ 5.1, після біолістичної трансформації, не піддавалися гербіцидній обробці) та рослини № 13/1, 13/2, 17/1, 17/2, 18/1, 18/3 з варіанту дослідів 4 (після біолістичної трансформації, піддавалися гербіцидній обробці).

Як референсний використовували ген алкогольдегідрогенези 1 кукурудзи (*adh1*) (очікуваний продукт ампліфікації 234 п.н.). Виконували як мультиплексну реакцію для двох праймерів, так і ампліфікацію окремо для генів *bar* і *adh1*. Відбір рослинного матеріалу для ПЛР проводився з листків вегетуючих у ґрунті рослин, перед початком цвітіння (рис.5.6, табл. 5.9). В таблиці 5.9 також наведено виживаність після обробки гербіцидом саме тих рослин T₂, для яких виконано ПЛР.

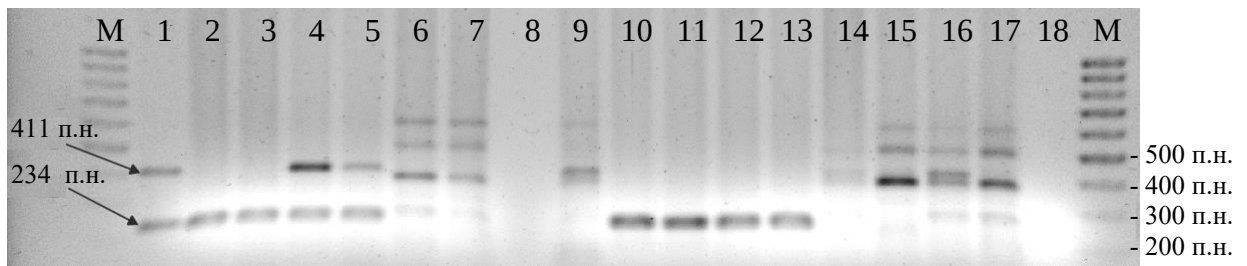


Рис.5.6а. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР ДНК рослин кукурудзи T_2 : $[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]1сз$ з праймерами до генів *bar* та *adh1*: М - маркер молекулярної маси з кроком 100 п.н.; 1-7,9-17 – рослини кукурудзи, біолістично оброблені конструкцією з геном *bar*; 1,2,6,10 – рослина №13/2; 3,7,11 – рослина №13/1; 4,12 – рослина №12/2; 5,9,13 – рослина №12/1; 8 – без внесення проби (без ДНК, без реактивів для ампліфікації); 14 – рослина №18/1; 15 – рослина №18/3; 16 – рослина №17/2; 17 – рослина №17/1; 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.

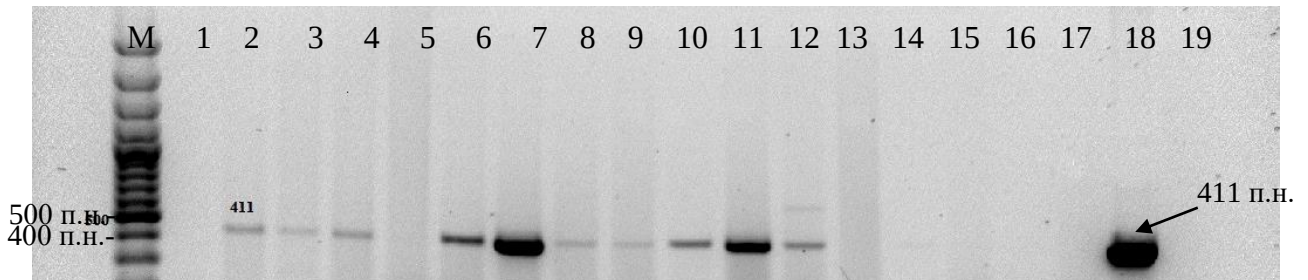


Рис.5.6б. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР ДНК рослин кукурудзи T_2 : $[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]1сз$ з праймерами до гена *bar*: М – маркер молекулярної маси з кроком 100 п.н.; 1,3-9,11,13 – T_2 , 2,10,12,14 – T_3 , 15-17 – негативний контроль (нетрансформовані рослини лінії PLS61), 18 – позитивний контроль (генетично трансформований тютюн); 19 – негативний контроль (нетрансформована рослина лінії ДК267). Рослини T_2 : 1 – рослина №16/1, 3 – рослина №19/1, 4 – рослина №20/1, 5 – рослина №19/2, 6 – рослина №20/2, 7 – рослина №17/1, 8 – рослина №17/2, 9 – рослина №14/2, 11 – рослина №14/1, 13 – рослина №13/2. Рослини T_3 : 2 – рослина №23/2, 10 – рослина №28/1, 12 – рослина №26/2, 14 – рослина №29/2

Таблиця 5.9

Присутність гена *bar* в рослинах кукурудзи покоління
 $T_2:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]1сз$ за результатами ПЛР

№ рослини	Кількість <i>bar</i> - позитивних рослин, шт.	Вжива- ність після обробки гербіцидом, бал*	№ рослини	Кількість <i>bar</i> - позитивних рослин, шт.	Вжива- ність після обробки гербіцидом, бал*
Варіант досліду № 3. Без обробки гербіцидом					
12/1	1	5	12/2	1	5
Всього				2	Середній бал 5
Варіант досліду № 4. Обробка гербіцидом у фазі сходів					
13/1	1	4	16/1	0	-
13/2	1	5	19/1	1	-
17/1	1	4	20/1	1	-
17/2	1	2	19/2	0	-
18/1	1	2	20/2	1	-
18/3	1	2	14/1	1	-
			14/2	1	-
Всього	6	Середній бал 3,2	Всього	5	-
Разом				13	-

Примітка.*Вживаність визначалася на 20-у добу після обробки гербіцидом «Баста»TM (1 г/л у перерахунку на фосфіотрицин), для варіанта № 3 обробку гербіцидом не проводили.

Як видно з даних, представлених на рисунку 5.6а, як в мультиплексній реакції, так і в реакції з праймерами лише до гена *adh1*, у всіх проаналізованих зразків виявлено очікуваний продукт ампліфікації в 234 п.н. Присутність гена *bar* також підтверджена у 13 з 15 проаналізованих рослин, що свідчить про його успадкування до покоління T_2 . *Bar*-позитивні рослини виявлено як при селекції на гербіцидному фоні, так і в потомстві, яке вирощувалося без селективного тиску. Звертає увагу, що виживаність *bar*-позитивних рослин після обробки гербіцидом не обов'язково складала максимальні 5 балів, деякі *bar*-позитивні за ПЛР рослини пригнічувалися гербіцидом.

Таким чином, в результаті проведення молекулярно-генетичного аналізу методом ПЛР підтверджено присутність гена *bar* в певній частці біолістично оброблених калусів кукурудзи, рослин-регенерантів T_0 та рослин поколінь від самозапилення T_1 і T_2 . В поколінні T_2 *bar*-позитивні рослини виявлено як при селекції на гербіцидному фоні, так і в потомстві, яке вирощувалося без селективного тиску. Виживаність *bar*-позитивних рослин після обробки гербіцидом не обов'язково складає максимальні 5 балів, деякі *bar*-позитивні рослини пригнічуються гербіцидом.

Підсумкову кількість *bar*-позитивних рослин в поколіннях T_0 - T_2 вихідного генотипу PLS61×ДК633266 за результатами ПЛР та за родоводом представлено в таблиці 5.10.

Як бачимо (табл. 5.10), в поколіннях T_1 - T_2 частка *bar*-позитивних рослин склала 87,6-89,5%, проте в цих поколіннях ми мали змогу проаналізувати невелику добірку рослин.

Розглянемо, як в тому ж поколінні T_2 та наступних поколіннях T_3 - T_6 після біолістичної трансформації вихідного генотипу PLS61×ДК633266 (табл. Г.1) у рослин-трансформантів проявлялася фенотипова ознака, яка визначається геном *bar*, тобто експресія цього гена, – виживаність сходів після обробки гербіцидом «Баста»TM (табл. 5.11).

Таблиця 5.10

Присутність гена *bar* в рослинах кукурудзи поколінь T₀-T₂ за результатами ПЛР

Генотип досліджуваної рослини	Проаналі- зовано рослин, шт.	Кількість <i>bar</i> - позитивних рослин	
		шт.	%
Покоління T ₀			
T ₀ (PLS61× ДК633266)	2	1	50
T ₀ (ДК633266×PLS61)	1	0	0
Покоління T ₁			
T ₁ : [T ₀ (PLS61×ДК633266)×ДК633266]	17	16	94,2
T ₁ : [T ₀ (PLS61)×(ДК377×Chi31)]	2	1	50,0
Покоління T ₂			
T ₂ : [T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]1сз	8	8	100,0
Всього			
T ₀	3	1	33,3
T ₁	19	17	89,5
T ₂ – 1сз	15	13	86,7

Примітка. сз – самозапилення.

Як бачимо з таблиці 5.11, кількість рослин, стійких до гербіцидної обробки, планомірно зростала від T₂ до T₆ як при аналізі на 20-добу від обробки гербіцидом за трьома проаналізованими показниками, так і на кінець вегетаційного періоду. Загалом, в T₆ частота виживаності на 20-добу від обробки гербіцидом сягнула 100%, хоча стан рослин оцінювався в середньому на 4 бали з 5 можливих, а кількість рослин з високим балом виживаності (4 і 5) склала 95,5%.

Отже, аналіз експресії гена *bar* у рослин-трансформантів і їхніх потомків підтвердив успадковуваність трансгена *bar* в поколіннях T₀-T₆ та поступове зростання виживаності рослин після обробки гербіцидом до 100%.

Таблиця 5.11

Виживаність на гербіцидному фоні рослин кукурудзи, отриманих в поколіннях від самозапилення T₂-T₆ після біолістичної трансформації вихідного генотипу кукурудзи PLS61×ДК633266

Покоління	Кількість рослин, оброблених гербіцидом «Баста»ТМ, шт.	На 20-добу від обробки гербіцидом,			На кінець вегетаційного періоду, частота виживаності, %
		частота виживаності, %	середній бал	частота рослин з балом 4-5, %*	
T ₂	162	64,5±8,2	1,8	19,8±6,3	46,4±8,5
T ₃	96	80,0±9,5	3,3	30,2±9,4	67,6±11,2
T ₄	-	-	-	-	-
T ₅	170	92,9±3,9	3,6	74,7±6,7	74,7±6,7
T ₆	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, у яких *bar*-позитивність в T₆ підтверджена за ПЛР. Отримані лінії передано до селекційних підрозділів ДУ ІЗК НААН, вони можуть використовуватися в селекційному процесі як батьківські форми для гетерозисних гербіцидостійких гібридів, а також як донори гена *bar*, здатні передавати його в схрещуваннях іншим лініям кукурудзи.

5.3.Обговорення

Вивчення всього комплексу питань, пов'язаних з реакцією на генетично-інженерні маніпуляції конкретних генотипів та зародкових плазм кукурудзи, є дуже актуальним, особливо для України, де роботи у цьому напрямку, зокрема зі злаками, проводяться у лімітованому обсязі. Враховуючі отримані

в нашому дослідженні дані та інформацію, яка міститься в літературі, представляє інтерес обговорення низки питань, серед яких використання в генетичній трансформації ліній чи гібридів F_1 , вплив процедури біолістичної обробки на калусоутворюючу та регенераційну здатність окремих генотипів та різних типів зародкової плазми кукурудзи, перспективність використання кожного з двох типів калусної тканини в генетично-інженерних дослідженнях, ефективність експрес-методів виявлення транз'єнтної експресії в калусах і регенерантах тощо. Потребує обговорення і накопичений матеріал стосовно показників росту та розвитку, стійкості до селективних агентів у рослин-трансформантів та успадкування трансгенів в поколіннях від самозапилення. Але, оскільки обсяг дисертаційної роботи лімітований, ми обрали для детального обговорення лише питання ефективності використання для генетичної трансформації ліній і гібридів F_1 та проблему експресії трансгенів, зокрема гена *bar*, в ряду поколінь.

Питання використання для генетичної трансформації ліній чи гібридів F_1 є актуальним в контексті розширення генетичної бази генетичної модифікації кукурудзи та інших перехреснозапильних сільськогосподарських культур. Зазвичай вважається, що генетичну модифікацію треба проводити, використовуючи як об'єкт інбредні лінії, оскільки в результаті ми можемо отримати лінію за генотипом сестринську вихідній, але яка буде містити трансген, що надає відомій лінії додаткові властивості. Термін отримання такої лінії включає вирощування, ідентифікацію за ПЛР трансгенної рослини та самозапилення не менш, ніж у 5-7 поколіннях, оскільки за розповсюдженими методиками ПЛР неможливо розрізнити рослини гомозиготні та гетерозиготні за трансгеном. Нещодавна, правда, з'явилася публікація, в якій намічається шлях до вирішення цієї проблеми [242]. Автори пропонують визначати гомо-/гетерозиготність індивідуальних рослин за трансгеном відповідно до виходу продукту ПЛР протягом логарифмічної фази ампліфікації у стандартній ПЛР і капілярному електрофорезі, однак, метод поки що не став рутинним. Використання ліній для генетичної

трансформації технологічно стикається з проблемою низької ефективності індукції калусогенезу, підтримання калусної тканини та регенерації рослин, особливо у ліній селекційно перспективних зародкових плазм, в тому числі, плазми Ланкастер (див. розділ 4). Разом з тим, однаковий термін часу буде витрачено на отримання гомозиготної трансгенної рослини, якщо для індукції калусогенезу використовувати незрілі зародки не ліній, а гібридів F_1 . Для цього краще за все в генотипі гібрида поєднувати лінію зародкової плазми, яка становить селекційну цінність, та лінію – донор високої калусогенної та регенераційної здатності. В розділі 4 було показано, що калусогенний та регенераційний потенціал гібридів між селекційно цінними лініями, зокрема лініями Ланкастер і лініями A188, Chi31 і PLS61, дозволяє отримувати калусний матеріал для генетичної трансформації будь-якого генотипу. При цьому підході для переведення в гомозиготний стан як трансгена, так і інших генів потрібні будуть ті ж 5-7 поколінь самозапилення. Можна також, розкласти на окремі гомозиготні лінії популяцію трансгенних рослин в поколіннях T_1 - T_2 методом матроклінної гаплоїдії з отриманням подвоєнних гаплоїдних ліній, що скоротить витрати часу на гомозиготацію матеріалу до одного-двох років [123]. Таким чином, застосування гібридних донорних незрілих зародків спеціально підібраних генотипів і калусів, що на них утворюються, як об'єктів для введення цільових генів, дозволить значно розширити коло генотипів кукурудзи, які можуть бути безпосередньо модифіковані.

Відомо, що для генетичної трансформації кукурудзи у світі широко використовують генотип Ні-ІІ, який був відібраний за беккросною схемою з гібрида A188×B73 [175, 227, 304, 371]. Ще в 1992 році в лабораторії професора С.Л. Armstrong було показано, що частота утворення ембріогенних калусів у лінії кукурудзи B73 різко підвищується за інтрогресії хромосомних сегментів лінії A188 при класичній беккросній селекції [176]. В цій роботі ембріогенних калус формували лише 0,2% незрілих зародків B73. Після схрещування A188×B73, шести беккросів на B73 з відборами в кожному

поколінні на підвищену частоту утворення калусів та чотирьох самозапилень середня частота утворення ембріогенних калусів сягнула 46%. RFLP-аналіз дозволив ідентифікувати сегменти геному A188, інтрогресовані в генотип B73. Один з них, розташований у довгому плечі хромосоми 9, був тісно пов'язаний із показниками ефективності ініціації морфогенного калусогенезу і регенерації рослин *in vitro*. Автори припускають, що у цій ділянці розташований головний ген (гени), відповідальний за калусогенез і регенерацію, інтрогресія якого в інші генотипи кукурудзи дозволить розширити коло чутливих генотипів. Саме таким чином і був отриманий генотип Ні-ІІ, який широко використовувався в успішних роботах з генної інженерії кукурудзи. Ці результати та описаний в тому числі і в нашому дослідженні факт різкого підвищення чутливості в культурі *in vitro* у гібридів першого покоління порівняно з лініями свідчить про переваги використання для безпосередньої біолістичної обробки саме гібридних генотипів, які несуть частку генетичного матеріалу як селекційно перспективних зародкових плазм, так і донорів високої чутливості *in vitro*.

Інше питання, яке ми виносимо на обговорення, це експресія трансгенів, зокрема гена *bar*, в ряду поколінь.

Загалом, успадкування трансгена *bar* може бути розглянуто, по-перше, за наявністю фрагмента ампліфікації довжиною 411 п.н. при ПЛР з відповідними праймерами у рослин-трансформантів та їхніх нащадків. По-друге, судити про наявність чи відсутність гена *bar* в геномі рослин-трансформантів опосередковано можна за появою фенотипу, який він контролює, – стійкості до гербіциду «Баста»TM у фазі сходів.

Розглянемо характер експресії гена *bar* в поколіннях від самозапилення, зокрема за стійкістю рослин до обробки гербіцидом «Баста»TM у фазі сходів, та його відповідність моделі однокопійного вбудовування та моногібридного успадкування. За прийнятою моделлю в поколіннях від самозапилення, які вирощуються на селективному фоні, частка стійких до гербіциду рослин повинна збільшуватися [19]. Саме це ми і спостерігали в нашому матеріалі

(див. табл. 5.11), коли кількість рослин, стійких до гербіцидної обробки, планомірно зростала від T_2 до T_6 як при аналізі на 20-добу від обробки гербіцидом за трьома проаналізованими показниками, так і на кінець вегетаційного періоду. Загалом, в T_6 частота виживаності на 20-добу від обробки гербіцидом сягнула 100%. Той факт, що стан рослин оцінювався в середньому на 4 бали з 5 можливих, а кількість рослин з високим балом виживаності (4 і 5) склала 95,5, а не 100% можна пояснити наступним: виживаність рослин на гербіцидному фоні за рахунок експресії гена *bar*, зокрема синтезу фермента фосфінотрицинацетилтрансферази, який він кодує, розщеплення за допомогою цього фермента діючої речовини гербіциду «Баста»TM фосфінотрицину – це складний, підданий впливу факторів оточуючого середовища та енергозалежний процес, який може забезпечити фенотипіювання норми (розвиток рослин без впливу гербіциду) з певним ступенем вірогідності.

Таким чином, аналіз експресії гена *bar* в поколіннях від самозапилення рослин-трансформантів в нашому дослідженні за характером експресії трансгена в T_3 - T_6 відповідає гіпотезі монокопійного вбудовування та моногібридної схеми успадкування. Характер експресії трансгена в T_2 призвів до меншої, ніж очікувалося за моногенною, моногібридною моделлю, кількості стійких до гербіциду рослин. Можна також припустити, що це було пов'язане з «мовчанням» трансгена *bar* у частини рослин в T_2 , що призвело до відсутності у них стійкості до гербіциду.

В літературі найчастіше застосовується теоретична модель успадкування трансгена за менделівською моногібридною схемою, де встроювання однієї копії трансгена в ДНК хазяйської клітини розглядається як домінантна ознака, а відсутність встроювання трансгена – як рецесивна ознака. Якщо співвідношення фенотипу, який визначає трансген, і вихідного фенотипу у рослин T_1 становить 3:1 або 15:1, то це свідчить про одну або дві інсерції трансгена та менделівське розщеплення [40]. В ряді робіт таке успадкування трансгенів за моногібридною схемою, проаналізоване за фенотиповим

проявом трансгена, доведено в експерименті для поколінь T_1 - T_3 . Так, О. В. Дубровна та ін. [75] при аналізі успадкування трансгенів в поколіннях T_1 - T_2 генетично-модифікованих рослин пшениці, що містять сторонні гени метаболізму проліну та маркерний ген *nptII*, встановили співвідношення стійкого і нестійкого до канаміцину фенотипів на рівні 3:1 та підтвердили отримані дані результатами ПЛР. Автори зробили висновок про інтеграцію трансгенів в один локус геному пшениці і його стабільне успадкування у наслідкових поколіннях. Інтегровані в геном ріпаку гени *nptII* і *bar* зберігали свою активність у поколіннях T_1 - T_3 [335]. У випадково обраній добірці рослин T_1 тютюну експресія і успадкування трансгена за менделівськими моно- і дигібридною схемами з однією інсерцією трансгена спостерігалися у 52,9% рослин, з двома інсерціями – у 20,6%, а з множинними інсерціями – у 18,7% рослин. Відхилення від менделівського успадкування виявили 5,9%, а втрату експресії – 1,9% рослин [40, 41]. Автори зазначають, що у кожній восьмій трансгенної рослини тютюну експресія трансгенів може бути нестабільною. Існує декілька явищ, які призводять до втрати експресії вбудованих генів, серед яких основними вважаються мутації, ковалентна модифікація та найбільш обговорювана в літературі РНК-інтерференція трансгенів. РНК-інтерференція є загальнобіологічним епігенетичним механізмом регуляції експресії генів. Вона полягає у інгібуванні експресії ділянки ДНК за допомогою комплементарних їй коротких дволанцюгових РНК на рівні транскрипції (транскрипційний сайленсинг) та трансляції (посттранскрипційний сайленсинг) [40]. Механізми інактивації трансгенів шляхом РНК-інтерференції вважаються проявом захисних механізмів рослини проти ураження вірусами, неконтрольованого поширення мобільних генетичних елементів та мають важливе еволюційне значення [282]. Вони описані у *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* і *Petunia hybrida* та деяких інших рослин. Однак, феномен інактивації трансгенів є важливим і з точки зору формування уявлень стосовно функціонування генів в рослинах і має бути дослідженим не тільки у модельних об'єктів, а і у поширених

сільськогосподарських культур, зокрема кукурудзи. Механізми РНК-інтерференції використовуються і для індукованого трансгенами мовчання власних генів або патогенів [270, 312]. Трансгенні рослини зі зміненою, нетиповою експресією трансгенів є важливими для виявлення механізмів, які лежать в основі їхнього функціонування [40].

5.4. Висновки до розділу 5

В результаті досліджень з біолістичної трансформації калусної тканини генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер вектором pАНС25 з чужорідними генами *uidA* та *bar* охарактеризовано особливості та ефективність генетичної трансформації, отримано трансгенні калуси, рослини-регенеранти покоління T₀ і потомство рослин-трансформантів поколінь T₁-T₆ від самозапилення. На основі вітчизняних генотипів плазми Ланкастер створено трансгенні лінії кукурудзи, стійкі до гербіциду «Баста»TM.

1. Транз'єнтну експресію гена *uidA* виявили всі досліджені лінії і гібриди кукурудзи. Частота транз'єнтної експресії гена *uidA* у проаналізованих ліній коливалася в межах 20-90% із середнім значенням 54,56%. У ліній зародкової плазми Ланкастер ДК633266 і ДК267 частота транз'єнтної експресії склала відповідно 40% і 20% з рівнем експресії в 1 бал. У всіх проаналізованих гібридів частота транз'єнтної експресії склала 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.

3. Фосфінотрицин як селективний агент в середовищах для індукції калусогенезу та регенерації має пролонговану дію, а його вплив суттєво блокує життєдіяльність калусної тканини кукурудзи не на етапі калусогенезу, а в період регенерації рослин. Позитивний вплив генетичної трансформації з

геном *bar* за стійкістю до фосфінотрицину вперше проявляється на етапі регенерації рослин.

4. 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 (ЧТ1) досягла 100%, для ДК267×PLS61 частота фосфінотрицинстійких калусів (ЧТ2) склала $87,2 \pm 3,6\%$, а частота фосфіностійких рослин-регенерантів T_0 (ЧТ3) – $52,5 \pm 5,4$ рослин/100 калусів.

5. За результатами ПЛР-аналізу ген *bar* відсутній у геномі батьківських ліній донорного гібрида PLS61×ДК633266. Вперше ген *bar* реєструється за ПЛР в калусній тканині, біолістично обробленій вектором з даним геном.

6. Ген *bar* присутній в рослинах покоління T_0 , регенерованих *in vitro* з калусної тканини, біолістично обробленої вектором з даним геном. Ген *bar* передається від рослин T_0 наступним поколінням T_1 - T_2 при статевому способі розмноження, зокрема при самозапиленні.

7. Ген *bar* в поколінні T_2 виявляється 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 забезпечує максимальну виживаність після обробки гербіцидом, деякі *bar*-позитивні рослини пригнічуються гербіцидом. В пізніх поколіннях від самозапилення зафіксовано зростання виживаності рослин після обробки гербіцидом до 100%.

8. В отриманому експериментальному матеріалі успадкування гена *bar* в поколіннях рослин-трансформантів відповідає гіпотезі монокопійного вбудовування та моногібридної схеми за характером експресії трансгена в T_3 - T_6 .

9. При інбридингу рослин-трансформантів відбуваються звичайні процеси розщеплення в популяціях на окремі сім'ї, зменшення абсолютних

значень морфобіологічних показників та варіювання морфобіологічних показників.

10. На основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер, зокрема гібрида PLS61×ДК633266, отримано 8 трансгенних, стійких до гербіциду «Баста»™ інбредних ліній. Отримані *bar*-трансгенні 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 ліній плазми Ланкастер та інших плазм шляхом схрещувань.

Матеріали розділу 5 представлено у [4, 7, 48, 54, 57, 98, 157]; за матеріалами розділу подано заявку на винахід [81].

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 І та ІІ типів, пропорційно збільшуються в досліджених підплазмах і групах у напрямку *Mo17*→*Mo17mix*→*Oh43*→*Mo17/Oh43* разом з насиченням неспорідненим генетичним матеріалом.

4. Потенціал утворення калусної тканини І 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 ІІ 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

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 A188 – A188×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 A188 – A188×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 A188 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_1 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 фосфінотрицину, а також як донори гена *bar* для поширення серед ліній плазми Ланкастер та інших плазм шляхом схрещувань.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абраимова О. Е., Деркач Е. В., Гончаров Ю. А., Черноусова Н. М., Сатарова Т. Н. Дифференцированный подход к использованию различных типов каллусной ткани у кукурузы. *Проблемы и перспективы исследований растительного мира: материалы Международной науч.-практ. конф. молодых учёных (Ялта, 13-16 мая 2014 г.)*. Ялта, 2014. С. 30.

2. Абраїмова О. Є. Біотехнологія отримання морфогенних калусів та рослин-регенерантів для генетично різнорідних форм кукурудзи (*Zea mays* L.): автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.20 / Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова. Одеса, 2013. 20 с.

3. Абраїмова О. Є. Біотехнологія отримання морфогенних калусів та рослин-регенерантів для генетично різнорідних форм кукурудзи (*Zea mays* L.): дис. канд. біол. наук: 03.00.20 / Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова. Одеса, 2013. 192 с.

4. Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Олійник Т. О., Сатарова Т. М. Проліферація калусної тканини кукурудзи під дією гербіцидного навантаження. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей V міжнародної наук.-техн. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених (Дніпропетровськ, 20–22 квіт. 2011 р.)*. Дніпропетровськ, 2011. С. 458.

5. Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Сатарова Т. М. Застосування фітогормонів в культурі *in vitro* у кукурудзи. *daRostim 2013. Фітогормони, гумінові речовини та інші біологічно активні сполуки для сільського господарства, здоров'я людини і охорони навколишнього середовища: матеріали доповідей IX Міжнародної конф. (Львів, 7–10 жовт. 2013 р.)*. Львів, 2013. С. 6.

6. Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Черчель В. Ю., Сатарова Т. М. Характеристика соматоклональних варіантів кукурудзи. *Стан і перспективи розвитку селекції та насінництва кукурудзи в умовах зміни клімату:*

матеріали Міжнародної наук.-практ. конф. (Харків, 7–9 лип. 2015 р.). Харків, 2015. С. 10–12.

7. 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 конференции* (Киев, 30 мая – 1 июня 2011 г.). Киев, 2011. С. 12.

8. Абраїмова О. Є., Піралов Г. Р., Сатарова Т. М. Біотехнологічна характеристика калусогенезу в культурі незрілих зародків кукурудзи під впливом абсцизової кислоти та 6-бензиламінопурину. *Вісник Дніпропетровського національного університету. Серія Біологія. Медицина*. 2010. № 18 (1). С. 3–8.

9. Агрополіт. Зерно на вагах – прогноз цін до кінця маркетингового року. URL: <https://agropolit.com/spetsproekty/248-zerno-na-vagah--prognoz-tsin-do-kintsya-marketingovogo-roku> (дата звернення 15.12.2017).

10. Акинина Г. Е., Дугарь Ю. Н., Попов В. Н. Статистический анализ генетических данных с использованием компьютерных программ Arlequin, Philyp, Clann, Structure. Харьков: Ин-т растениеводства им. В.Я.Юрьева, 2014. 100 с.

11. Андреев И. О., Спиридонова Е. В., Майданюк Д. Н., Кунах В. А. Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2009. №6 (242). С. 487–495.

12. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии. Горловка: Ліхтар, 2008. 248 с.

13. Батыгина Т. Б., Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю., Титова Г. Е., Сельдимирова О. А. От микроспоры – к сорту. Москва: Наука, 2010. 177 с.

14. Белоусов А. А., Замбриборщ И. С., Игнатова С. А. Изменение частоты андрогенеза в пыльниковой культуре путем рекуррентного отбора в популяциях кукурузы. *Цитология и генетика*. 1998. № 32 (6). С. 63–68.

15. Богульская С. В. Апробация агробактериальной трансформации методом *in planta* форм кукурузы. *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета*. 2014. № 4 (33). С. 13–16.

16. Богунова В. Г. Физиологическая и генетическая регуляция морфогенеза и регенерации кукурузы *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01 / Институт физиологии растений имени К. Л. Тимирязева РАН. Москва, 1993. 24 с.

17. Борисова В. В. Селекційні аспекти застосування SNP-аналізу у кукурудзи: дис. ... канд. с.-г. наук: 06.01.05 / ДУ Ін-т сільського господарства степової зони НААН. Дніпропетровськ, 2015. 231 с.

18. Борисова В. В., Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Черноусова Н. М., Сатарова Т. М. Характеристика репрезентативності маркерів одонуклеотидного поліморфізму ДНК в наборі ліній кукурудзи української селекції. *Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології: матеріали Міжнародної наук.-практ. конф. (Дніпропетровськ, 26–27 верес. 2013 р.)*. Харків, 2013. С. 16–17.

19. Бороевич С. Принципы и методы селекции растений. Москва: Колос, 1984. 344 с.

20. Бугайов В. Д., Васильківський С. П., Власенко В. А., Гірко В. С., Дзюбецький Б. В., Кириченко В. В. та ін. Спеціальна селекція польових культур: навч. посіб. / ред. М. Я. Молоцького. Біла Церква, 2010. 368 с.

21. Буреева Н. Н. Многомерный статистический анализ с использованием ППП «STATISTICA». Нижний Новгород: Образование, 2007. 112 с.

22. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. 270 с.

23. Василенко М. Ю. Отримання транспластомних рослин *Nicotiana bethamiana* із генами мікобактерії (*Mycobacterium tuberculosis*). *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2010. № 9. С. 224–229.

24. Вассер С. П., Дудка І. О., Єрмоленко В. І., Зерова М. Д., Єльченко А. Я. Російсько-український словник наукової термінології: Біологія. Хімія. Медицина. / ред. О. Д. Бельгардта ін. Київ: Наукова думка, 1996. 660 с.
25. Вербицкая Т. Г., Кожухова Н. Э., Гужва Д. И., Сиволап Ю. М., Соколов В. М. Дифференциация линий кукурузы при помощи молекулярных маркеров. *Кукуруза и сорго*. 1997. №6. С. 7–11.
26. Волкова Н. Е. Молекулярно-генетичні дослідження ядерного геному кукурудзи: монографія. Одеса: Астропринт, 2015. 120 с.
27. Волкова Н. Е., Соколов В. М. Технологія генотипування KASP™ та її використання в генетико-селекційних програмах (на прикладі кукурудзи). *Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин*. 2017. № 13 (2). С. 131–140.
28. Гармаш С. М., Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Сатарова Т. М. Вплив біогумату на адаптацію рослин у ґрунті після культивування *in vitro*. *Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє*: тези доповідей VIII Міжнародної наук.-практ. конф. (Київ, 19–22 лист. 2012 р.). Київ, 2012. С. 18–19.
29. Гармаш С. М., Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Сатарова Т. М. Розробка біотехнологічних заходів регуляції росту та розвитку сільськогосподарських культур. *Новітні досягнення біотехнології*: тези доповідей II Міжнародної наук.-практ. конф. (Київ, 24–25 жов. 2013 р.). Київ, 2013. С. 35–36.
30. Гриднева Н. М. Устойчивость линий кукурузы к стеблевым гнилям, ломкости стебля и пузырчатой головне. *Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы*. Краснодар: Майкоп РИПО «Адыгея», 1999. С. 65–71.
31. Грицак Л. Р., Мельник В. М., Конвалюк І. І., Кравець Н. Б., Мосула М. З., Дробик Н. М. Мікроклональне розмноження видів роду *Gentiana* L. флори України. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія*.

Тернопільські біологічні читання – Ternopil Bioscience. 2017. № 1 (68). С. 74–82.

32. Гродзинский Д. М., Симоненко Л. О., Годована М. П., Овсейчик С. В., Туровська Л. В., Яценко Н. О. та ін. Словник української біологічної термінології відп. ред. Гродзинский Д. М., Симоненко Л. О. Київ: КММ, 2012. 743 с.

33. Грушка Я. Монография о кукурузе. Москва: Колос, 1965. 384 с.

34. Гур'єва І. А., Рябчун В. К., Козубенко Л. В. та ін. Класифікатор-довідник виду *Zea mays* L. Харків: ІР ім. В. Я. Юр'єва, 1994. 73 с.

35. Гур'єва І. А., Рябчун В. К., Літун П. П. Методичні рекомендації для польового та лабораторного вивчення генетичних ресурсів кукурудзи. Харків: ІР, 2003. 43 с.

36. Гусак Ю. В. Комбінаційна здатність середньопізніх ліній кукурудзи плазми Ланкастер (С103). *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2011. № 1. С. 128–132.

37. Гусак Ю. В. Характеристика ліній групи ДК185/254 (плазма Ланкастер (Мо17) за господарсько-цінними ознаками. *Зрошуване землеробство: міжвід. тем. наук. зб.* 2012. Вип. 57. С. 208–213.

38. Данилова С. А., Долгих Ю. И. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима. *Физиология растений*. 2004. Т. 51, № 4. С. 621–625.

39. Данилова С. А., Кузнецов В. В., Долгих Ю. И. Новый эффективный метод генетической трансформации кукурузы с использованием агробактериального газона. *Физиология растений*. 2009. Т. 56, № 2. С. 285–290.

40. Дейнеко Е. В. Генетическая инженерия растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18, № 1. С. 125–137.

41. Дейнеко Е. В., Новоселя Т. В., Загорская А. А. Стабильность экспрессии и наследование гена *nptII* в популяции трансгенных растений табака. *Доклады АН*. 1999. Т. 369, № 3. С. 420–423.

42. Державний реєстр сортів рослин, придатних до поширення в Україні. Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України. 2016. 372 с.
43. Деркач Е. В., Абраимова 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.
44. Деркач Е. В., Абраимова О. Е., Сатарова Т. Н. Регенерационный потенциал гибридов кукурузы с участием линий А188, PLS61 и Chi31. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей IV Міжнародної наук.-техн. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених (Дніпропетровськ, 24–26 квіт. 2013 р.)*. Дніпропетровськ, 2013. С. 41.
45. Деркач Е. В., Абраимова 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 г.)*. Казань, 2013. С. 113–114.
46. Деркач К. В. Динаміка калусогенезу в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина*. 2012. Т. 3, № 1. С. 24–28.
47. Деркач К. В. Селекція в культурі *in vitro* на стійкість до хлоридного засолення генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Бюлетень ІСГСЗ*. 2012. № 2. С. 148–152.
48. 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: збірник тез Всеукраїнської наук. конф. молодих вчених (Одеса, 28–30 жовт. 2014 р.)*. Одеса, 2014. С. 74–76.
49. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Калусогенний потенціал ліній кукурудзи групи Ланкастер в умовах *in vitro*. *Вісник ДНУ. Серія Біологія. Екологія*. 2011. № 19 (1). С. 16–21.

50. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Вплив фізіологічно активних речовин на збереження морфогенності калусів кукурудзи за тривалого культивування *in vitro*. *Зрошуване землеробство: міжвід. тем. наук. зб.* Харків, 2013. Вип. 60. С. 89–92.

51. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Регуляція морфогенезу *in vitro* у ліній кукурудзи групи Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія Біологія. Екологія.* Дніпропетровськ, 2016. Т. 24, № 2. С. 253–257.

52. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Морфогенез *in vitro* у ліній кукурудзи гетерозисної групи Ланкастер. *Цитология и генетика.* 2017. Т. 51, № 1. С. 61–68.

53. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М., Молитва О. А., Калугина В. С., Панасенко М. Г., Печорна С. С. Оцінка здатності до прямої регенерації у ліній кукурудзи селекційної групи Ланкастер. *Вісник Дніпропетровського національного університету. Серія Біологія. Екологія.* Дніпропетровськ, 2013. Т. 21, № 2. С. 59–63.

54. 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.

55. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Степневська Я. В., Сатарова Т. М. Вплив хлориду натрію на калюсогенний і регенераційний потенціал ліній кукурудзи плазми Ланкастер. *Физиология и биохимия культурных растений.* 2013. Т. 45, № 1. С. 45–52.

56. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Черноусова Н. М., Сметанін В. Т., Сатарова Т. М. Оптимізація регенераційного потенціалу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології.* 2012. № 4. С. 465–470.

57. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Черчель В. Ю., Дзюбецький Б. В., Моргун Б. В., Нітовска І. О., Сатарова Т. М. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи. *Зернові культури*. 2017. Т. 1, № 2. С232–241.

58. Деркач К. В., Борисова В. В., Сатарова Т. М. Алельний стан SNP-маркерів ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер (методичні рекомендації). Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. 8 с.

59. 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 III конф. молодих учених* (Київ, 16–18 трав. 2017 р.). Київ, 2017. С. 38.

60. Деркач К. В., Борисова В. В., Сатарова Т. М. SNP-паспорти ліній та гібридів кукурудзи (в електронному вигляді). Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. 4 с.

61. 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.

62. Деркач К. В., Крупська Г. С., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М. Вплив складу живильного середовища на розвиток та проростання незрілих зародків кукурудзи в культурі *in vitro*. *Вісник ДНУ. Серія Біологія. Медицина*. 2011. Т. 1, № 2. С. 35–39.

63. Деркач К. В., Сатарова Т. М. Біотехнологічна характеристика калусогенезу реципрокних гібридів кукурудзи. *Хімія та сучасні технології: тези доповідей V Міжнародної наук.-техн. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених* (Дніпропетровськ, 20–22 квіт. 2011 р.). Дніпропетровськ, 2011. С. 473.

64. Деркач К. В., Сатарова В. В., Борисова В. В., Черчель В. Ю. Алельний стан SNP-маркерів, характерний для ліній кукурудзи плазми Ланкастер.

Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2017. Т. 15, № 1. С. 32–39.

65. 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. Т. 8, № 3. С. 343–348.

66. Деркач К. В., Сатарова Т. М., Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю. Оцінка гетерозиготності гібридів кукурудзи та їх вихідних ліній за результатами SNP-аналізу. *Наукове забезпечення інноваційного розвитку агропромислового комплексу в умовах змін клімату: Міжнародна наук.-практ. конф. молодих вчених і спеціалістів (Дніпро, 25–26 трав. 2017 р.)*. Дніпро, 2017. С. 30–31.

67. 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.

68. Дзюбецький Б. В., Боденко Н. А., Бондарь Т. М. Використання генетичної плазми кукурудзи Айодент у селекції вихідного матеріалу. *Вісник аграрної науки*. 2013. № 9. С. 32–35.

69. Дзюбецький Б. В., Боденко Н. А., Федько М. М., Гусак Ю. В. Створення середньопізніх гібридів кукурудзи на базі плазми Ланкастер (С103). *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2012. № 3. С. 8–11.

70. Дзюбецький Б. В., Бондарь Т. М. Комбінаційна здатність сімей S3 – S5, отриманих на базі подвійних сестринських гібридів кукурудзи генетичної плазми Айодент. *Селекція і насінництво: міжвід. тем. наук. зб.* 2014. Вип. 105. С. 16–22.

71. Дзюбецький Б. В., Сатарова Т. М., Черчель В. Ю., Дяченко Т. А., Гончаров Ю. О. Вміст каротиноїдів в зерні ліній кукурудзи. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2016. № 11. С. 18–23.

72. Димитров С. Г. Стабільність та пластичність сучасних гібридів соняшнику. *Збірник наукових праць ННЦ Інститут землеробства*. 2015. Вип. 3. С. 117–124.

73. Домашнев П. П., Дзюбецький Б. В., Костюченко В. И. Селекція кукурузи. Москва: Агропромиздат, 1992. 206 с.

74. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). Москва: Агропромиздат, 1985. 351 с.

75. Дубровна О. В., Бавол А. В., Воронова С. С., Гончарук О. М. Аналіз успадкування трансгенів у генетично-модифікованих рослин пшениці, що містять гени метаболізму проліну. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. Т. 19. С. 125–129.

76. Дубровна О. В., Горнчарук О. М., Великожон Л. Г. IRAP-аналіз генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. *Физиология растений и генетика*. 2017. Т. 49, № 2. С. 110–120.

77. Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів: закон України від 31.05.2007 р. № 1103-V. *Відомості Верховної Ради України*. 2007. № 35. Ст.484.

78. Замбріборщ І. С. Генетичне поліпшення сегрегуючих популяцій зі здатності до ембріогенезу *in vitro* у культурі пиляків та соматичних тканин кукурудзи: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15 / СГІ УААН. Одеса, 2002. 19 с.

79. Замбріборщ І. С., Шестопап О. Л., Бойко М. С., Доброва Г. О., Агафонова С. В. Ефективність андрогенезу *in vitro* в культурі пиляків сортів

та їхніх гібридів пшениці м'якої озимої різних генерацій. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 194–197.

80. Заявка на винахід № а 2016 04516 від 22.04.2016. Борисова В. В., Черчель В. Ю., Дзюбецький Б. В., Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Гончаров Ю. М. Спосіб моніторингу вихідного селекційного матеріалу при створенні ліній кукурудзи.

81. Заявка на винахід № а 2017 00622 від 23.01.2017. Абраїмова О. Є., Нітовська І. О., Моргун Б. В., Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю., Деркач К. В., Сатарова Т. М. Спосіб отримання трансгенних ліній кукурудзи.

82. Игнатова С. А., Белоусов А. А., Сидоренко Л. В. Генетические эффекты по признаку «образование эмбриогенного каллуса» в культуре соматических тканей кукурузы. *Методы биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений*: сборник науч. тр. Одесса: СГИ, 1992. С. 25–30.

83. Клімова О. Є., Аргунова К. В. Врожайність та адаптивна здатність гібридів цукрової кукурудзи на суходолі та при зрошенні в Степу України. *Бюлетень Інституту зернового господарства*. 2010. № 38. С. 92–96.

84. Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры в генетико-селекционных исследованиях кукурузы. *Цитология и генетика*. 2006. № 5. С. 69–80.

85. Комисаренко А. Г., Михальская С. И., Кочетов А. В., Тищенко Е. Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника. *Биотехнологія*. 2010. Т. 3, № 4. С. 67–74.

86. Конощук Ю. В., Ситало М. Ю., Деркач Е. В., Абраїмова О. Е., Сатарова Т. Н. Рост каллусной ткани кукурузы под влиянием хлорида. *Хімія та сучасні технології*: тези доповідей IV Міжнародної наук.-техн. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених (Дніпропетровськ, 24–26 квіт. 2013 р.). Дніпропетровськ, 2013. С. 42.

87. Кравець Н. Б., Мосула М. З., Дробик Н. М., Тулайдан Н. В., Четербок М. Б. Особливості вкорінення *in vitro* рослин деяких видів роду *Carlina* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 215–220.
88. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
89. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Київ: Наукова думка, 2005. 272 с.
90. Лакин Г. Ф. Биометрия. Москва: Высшая школа, 1990. 352 с.
91. Лашина М. В. Селекційні аспекти моделювання гібридів кукурудзи для умов зрошення півдня України. *Зрошуване землеробство*: міжвід. тем. наук. зб. 2010. Вип. 53. С. 429–437.
92. Лебідь Є. М., Циков В. С., Пащенко Ю. М., Шевченко М. С., Кирпа М. Я., Пащенко Н. О. та ін. Методика проведення польових дослідів з кукурудзою. Дніпропетровськ: Інститут зернового господарства УААН, 2008. 27 с.
93. Лутова Л. А., Павлова З. Б., Иванова М. М. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений. *Генетика*. 1998. Т. 34, № 2. С. 165–182.
94. Мамонтова Е. М., Великов В. А., Волохина И. В., Чумаков М. И. Трансформация *in planta* растений кукурузы. *Генетика*. 2010. Т. 46, № 4. С. 568–571.
95. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник. – Київ: Поліграфконсалдинг. 2003. 520 с.
96. Михальская И. С., Адаменко Н. И., Моргун Б. В., Кочетов А. В., Тищенко Е. Н. Компетентность к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сегментов побега элитных инбредных линий кукурузы. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 3. С. 98–104.

97. Міністерство аграрної політики та продовольства України / У 2016/2017 МР експорт зернових зріс майже на 5 млн тонн. URL: <http://www.minagro.gov.ua/node/24226>.

98. 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.

99. Молоцький М. Я., Васильківський С. П., Князюк В. І., Власенко В. А. Селекція і насінництво сільськогосподарських рослин. Київ: Вища освіта, 2006. 463 с.

100. Моргун Б. В. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. Т. 48, № 4. С. 324–343.

101. Мусяка В. К. Влияние элистима и других регуляторов на рост и морфогенез изолированных тканей кукурузы. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1998. Т. 30, №4. С. 258–263.

102. Нітовська І. О., Абраїмова О. Є., Сатарова Т. М., Шаховський А. М., Моргун Б. В. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. Т. 15. С. 112–117.

103. Нітовська І. О., Комарницький І. К., Моргун Б. В. Селекція на гліфосаті трансгенних калусних ліній кукурудзи генотипів, районованих в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017. Т. 20. С. 237–242.

104. Спосіб експлантації незрілих зародків кукурудзи *in vitro*: пат. 58347 Україна, А01Н 4/00. Абраїмова О. Є., Піралов Г. Р., Деркач К. В., Сатарова Т. М.; заявл. 20.09.2010; опубл. 11.04.2011. Бюл. 7.

105. Спосіб адаптації рослин-регенерантів кукурудзи у ґрунті: пат. 73966 Україна, А01Н 4/00. Деркач К. В., Абраїмова О. Є., Гармаш С. М., Сатарова Т. М.; заявл. 23.12.2010; опубл. 10.10.2012, Бюл. 19.

106. Пащенко Ю. М., Борисов В. М., Шишкіна О. Ю. Адаптивні і ресурсозбережні технології вирощування гібридів кукурудзи. Дніпропетровськ: Артпрес, 2009. 224 с.

107. Пиралов Г. Р. Каллусогенез в культуре незрелых зародышей регенерантов кукурузы R₀. *Цитология и генетика*. 1995. Т. 29, № 6. С. 22–26.

108. Пиралов Г. Р., Абраимова О. Е. Влияние биологических особенностей исходного материала и состава питательных сред на калусогенез и регенерацию в культуре незрелых зародышей кукурузы. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1997. Т. 29, № 1. С. 44–50.

109. Пиралов Г. Р., Абраимова О. Е. Особенности роста и дифференциации длительно пассивируемой каллусной культуры линии кукурузы ДК675. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2000. Т. 35, № 5. С. 372–376.

110. Пиралов Г. Р., Абраимова О. Е. Культура ткани некоторых генотипов кукурузы зарубежной селекции. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Київ, 2008. Т. 5. С. 309–313.

111. Пиралов Г. Р., Байдак Л. А., Абраимова О. Е. Влияние нитрата серебра на калусогенез и регенерацию растений в культуре незрелых зародышей кукурузы. *Физиология и биохимия культурных растений*. 1994. Т. 26. № 6 (153). С. 567–572.

112. Плохинский Н. А. Биометрия. Москва: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.

113. Рябчун Н. І., Єльніков М. І., Звягін А. Ф., Голік В. С., Голік О. В., Діденко С. Ю. та ін. Спеціальна селекція і насінництво польових культур: навч. посіб. / ред. В. В. Кириченко Харків: ІР ім. В. Я. Юр'єва, 2010. 462 с.

114. Сатарова Т. Н. Перенос чужеродных генов и наследование при генетической трансформации у кукурузы. *Цитология и генетика*. 2001. Т. 35, № 2. С. 60–65.

115. Сатарова Т. М. Андро́генез та ембріокультура у кукурудзи *in vitro*: дис. д-ра біол. наук: 03.00.20 / Інститут зернового господарства. Дніпропетровськ, 2002. 537 с.

116. Сатарова Т. М. Структурна організація геному кукурудзи. *Вісник аграрної науки*. 2016. № 11. С. 48–52.

117. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин: навчальний посібник. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.

118. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Деркач К. В. Використання калусних тканин кукурудзи у селекції *in vitro* на стійкість до абіотичних факторів. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони*. 2013. № 3 С. 16–19.

119. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Деркач К. В. Біотехнологія отримання морфогенних калусів та регенерованих рослин для генетично різнорідних форм кукурудзи. *Сільськогосподарська біотехнологія: теоретичні розробки і впровадження в селекцію рослин*: збірник наук. праць. Одеса: Астропринт, 2016. С. 132–138.

120. Сатарова Т. М., Борисова В. В., Черчель В. Ю., Деркач К. В., Абраїмова О. Є. Генетичні дистанції ліній кукурудзи та їх цитостерильних аналогів за поліморфізмом SNP-маркерів. *Селекція і насінництво*: міжвід. тем. нау. зб. Харків, 2013. Вип. 103. С. 124–135.

121. Сатарова Т. М., Деркач К. В., Абраїмова О. Є. Оцінка реципрокного ефекту в культурі *in vitro* у генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. *Бюлетень Інституту зернового господарства*. 2011. № 40. С. 20–24.

122. Сатарова Т. М., Піралов Г. Р., Боденко Н. А., Абраїмова О. Є. Калусогенез у ліній кукурудзи на фоні ауксинового навантаження. *Бюлетень Інституту зернового господарства*. Дніпропетровськ. 2010. №38. С. 55– 60.

123. Сатарова Т. Н., Черчель В. Ю., Черенков А. В. Кукуруза: биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии: монографія. Днепропетровск: Новая идеология, 2013. 552 с.

124. Сахно Л. О., Комарницький І. К., Кучук М. В. Отримання рослин ріпаку (*Brassica napus* L.) зі стійкістю до гербіцидів на основі гліфосату і

глюкофозинату. *Доповіді Національної академії наук України*. 2015. № 9. С. 84–90.

125. Свідоцтво № 150421. ДН Корунд, кукурудза звичайна – *Zea mays* L., Заявка № 12004133, Автор(и): Дзюбецький Б. В., Ільченко Л. А., Рябченко Е. М., Гайдаш О. Л., Федоренко Е. М., Черчель В. Ю., Боденко Н. А., Федько М. М., Деркач К. В. Київ: Державна ветеринарна та фітосанітарна служба України, 2015. 367 с.

126. Семенюк И. В., Чеботарь С. В., Рыбалка А. И., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетический анализ селекционных линий мягкой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа. *Цитология и генетика*. 2011. Т. 45, № 5. С. 17–22.

127. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Асыка Ю. В. Исследование генетических взаимоотношений у линий кукурузы при помощи RAPD и зеинов. *Цитология и генетика*. 1997. Т. 31, № 1. С. 16–20.

128. Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Вареник Б. Ф. Идентификация инбредных линий кукурузы с помощью произвольно праймированной ПЦР и SSR-ПЦР. *Доклады RACH*. 1999. № 6. С. 3–6.

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

130. Сидоренко Л. В. Генотипові особливості морфогенезу в культурі соматичних тканин кукурудзи: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15. Одеса, 1993. – 21 с.

131. Сметанін В. Т., Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Деркач К. В., Сировнєв Г. І., Гейсун А. А. Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Біотехнологія рослин та тварин» для студентів напряму «Біотехнологія» усіх форм навчання. Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. 28 с.

132. Соколов В. М., Вареник Б. Ф., Пилюгин А. С., Гужва Д. В. Селекционная оценка элитных самоопыленных линий кукурузы из основных

гетерозисных групп зародышевой плазмы. Генетика, селекция и технология возделывания кукурузы. – Краснодар: Майкоп РИПО Адыгея, 1999. С. 92–96.

133. Столяренко В. С., Самошкин А. А., Бондарь П. С. Продуктивность самоопыленных линий кукурузы в зависимости от источников освещения. *Селекция и семеноводство*. 1991. № 3. 6–9.

134. Струнин Д. Е., Абраимова О. Е., Пэрри Л., Тищенко Е. Н. Компетентность к агробактериальной трансформации каллусных культур, полученных из незрелых зародышей и апикальных меристем побегов инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.). *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2008. Т. 6. С. 150–156.

135. Танчик С. Стресові періоди та продуктивність кукурудзи. *Пропозиція* (Спецвипуск). Кукурудза: від насіння до прибутку. 2016. С. 24–26.

136. Тищенко Е. Н., Сакало В. Д., Матвеева А. Ю., Курчий В. М., Моргун Б. В. Активность инвертазы растений кукурузы, инфицированных *in planta* штамом *Agrobacterium tumefaciens* GV2260, содержащим плазмиду pCB002. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2011. Т. 43, № 5. С. 384–391.

137. Тищенко Е. Н., Сакало В. Д., Матвеева А. Ю., Курчий В. М., Моргун Б. В., Кочетов А. В. Метаболизм сахарозы на ранних этапах онтогенеза кукурузы (*Zea mays* L.), трансформированной *in planta* обезоруженными штаммами *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnologia acta*. 2011. №3. С. 64–73.

138. Файт В. І., Погребнюк О. О., Стельмах А. Ф. Ідентифікація та ефекти алелів гена Vrd2 за господарсько цінними ознаками пшениці в умовах Південного Степу України. *Вісник аграрної науки*. 2017. № 6. С. 41–47.

139. Федько М. М. Результаты второго цикла рекуррентного добору в популяції кукурудзи (*Zea mays* L.) спорідненої з геноплазмою Lancaster Oh43. *Бюлетень Інституту сільського господарства степової зони НААН України*. 2012. №2. С. 55–60.

140. Филев Д. С., Циков В. С., Золотов В. И. Методические рекомендации по проведению полевых опытов с кукурузой. 1980. 54 с.
141. Циков В. С. Кукуруза: технология, гибриды, семена. Днепропетровск: Зоря, 2003. 296 с.
142. Черевченко Т. М., Лаврентьева А. Н., Иванников Р. В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – Київ: Наукова думка, 2008. 560 с.
143. Черенков А. В., Черчель В. Ю., Шевченко М. С., Федоренко М. С., Боденко Н. А., Дзюбецький Б. В. та ін. Каталог сортів та гібридів ДУ Інститут сільського господарства степової зони НААН України : науково-методичні рекомендації. 2016. 112 с.
144. Черчель В. Ю., Гайдаш О. Л. Оцінка адаптивної здатності та екологічної стабільності скоростиглих гібридів кукурудзи (*Zea mays* L.) в контрастних умовах випробування. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2016. №3. С. 18–25.
145. Черчель В. Ю., Дзюбецький Б. В., Борисова В. В., Сатарова Т. М. Оцінка різних типів гібридів кукурудзи за генетичними дистанціями та ступенем гетерозису. *Вісник аграрної науки*. 2013. № 8. С. 33–37.
146. Чеченева Т. Н. Культура *in vitro* в селекции кукурузы с целью улучшения белкового состава зерновых. *Биотехнология*. 1997. № 6. С. 24–29.
147. Чеченева Т. Н. Изменчивость *in vitro* у кукурузы, индуцированная 1,4-бис-диазоацетилбутаном. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2001. Т. 33. № 6. С. 480–484.
148. Чеченева Т. Н. Соматоклональная изменчивость в культуре *in vitro* и среди растений-регенерантов кукурузы. *Науковий вісник Луганського національного аграрного університету. Серія Біологічні науки*. 2009. № 1. С. 205–211.
149. Чеченева Т. Н., Труханов В. А. Побеговый морфогенез и соматический эмбриогенез в культуре ткани кукурузы. *Экспериментальная генетика растений*. Київ, 1989. С. 120–128.

150. Чеченева Т. Н., Труханов В. А. Повышение регенерационной способности у инбредных линий кукурузы *in vitro*. *Цитология и генетика*. 1997. Т. 31. № 2. С. 36–40.
151. Чеченева Т. М., Семерунь О. С. Морфогенетичні особливості середньоранніх інбредних ліній кукурудзи (*Zea mays* L.). *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування*. 2009. Вип. 134, № 3. С. 255–261.
152. Шестопал О. Л., Замбріборщ І. С., Ігнатова С. О., Мазур З. О. Дослідження морфогенетичної активності мікроспор *in vitro* в культурі пиляків жита. *Scientific Journal "ScienceRise"*. 2015. № 3/1 (8). С. 7–11.
153. Шестопал О. Л., Ігнатова С. О., Замбріборщ І. С., Зеленіна Г. А. Методи культури *in vitro* для сучасної селекції пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та ячменю (*Hordeum vulgare* L.). Збірник наукових праць СГП-НЦНС. 2015. Вип. 25 (65). С. 160–173.
154. Abdi H., Williams L. J. Principal component analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews. *Computational Statistics*. 2010. P. 459.
155. Abdin U. K. M. Z., Kamaluddin A. A. Plant Biotechnology: Principles and Applications. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2017. 394 p.
156. Abdurakhmonov I. Y, Abdukarimov A. Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *Int J Plant Genomics*. 2008. P. 574927.
157. Abraimova O. E., Satarova T. M., Morgun B. V., Nitovska I. O., Derkach K. V., Cherenkov A. V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. 57th Annual Maize Genetics Conference (Pheasant Run, St. Charles, Illinois, USA, 12-15 March 2015), 2015. P. 140.
158. Acreage of genetically modified (GM) corn in the United States from 2013 to 2016 (in million hectares). URL: <https://www.statista.com/statistics/263292/acreage-of-genetically-modified-crops-worldwide>.

159. Adebayo M. A., Menkir A., Gedil M., Blay E., Gracen V., Danquah E. et al. Diversity assessment of drought tolerant exotic and adapted maize (*Zea mays* L.) inbred lines with microsatellite markers. *J. Crop Sci. Biotech.*, 2015. Vol. 18, No 3, P. 147–154.
160. Aguado-Santacruz G. A., García-Moya E., Aguilar-Acuña J. L., Moreno-Gómez B., Solís-Moya E., Preciado-Ortiz E. R. et al. *In vitro* plant regeneration from quality protein maize (QPM). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 2007. No 43. P. 215–224.
161. Akinyosoye S. T., Adetumbi J. A., Amusa O. D. Effect of seed size on *in vitro* seed germination, seedling growth, embryogenic callus induction and plantlet regeneration from embryo of maize (*Zea mays* L.). *Nigerian Journal of Genetics*, 2015. Vol. 18, No 2. P. 1–7.
162. Al-Abed D., Madasamy P., Talla R., Goldman S., Rudrabhatla S. Genetic engineering of maize with the Arabidopsis DREB1A/CBF3 gene using split-seed explants. *Crop Sci.* 2008. Vol. 47. P. 2390–2402.
163. Ali F., Ahsan M., Saeed N. A., Ahmed M., Ali Q., Kanwal N. et al. Establishment and optimization of callus-to-plant regeneration system using mature and immature embryos of maize (*Zea mays*). *Int. J. of Agric.&Biol.* 2014. Vol. 16. P. 111–117.
164. Altman A., Hasegawa P. M. Plant biotechnology and agriculture. Amsterdam: Elsevier Inc., 2012. 624 p.
165. Aluru M., Xu Y., Guo R., Wang Z., Li S., White W. et al. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Bot*, 2008, Vol. 59, No 13, P. 3551–3562.
166. Anami S. E., Mgtutu A. J., Taracha C., Machuka J. Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2010. No 102. P. 285–295.
167. Ananiev E. V., Phillips R. L., Rines H. W. A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome

knobs mega- transposons? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 10785–10790.

168. Ananiev E. V., Phillips R. L., Rines H. W. Chromosome- specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. Vol. 95. P. 13073–13078.

169. Ananiev E. V., Phillips R. L., Rines H. W. Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics*. 1998. Vol. 149. P. 2025–2037.

170. Ananiev E. V., Wu C., Chamberlin M. A., Svtashev S., Schwartz C., Gordon-Kamm W. et al. Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.). *Chromosoma*. 2009. Vol. 118. P. 157–177.

171. Andersen J. R., Schrag T., Melchinger A. E., Zein I., Lübberstedt T. Validation of *Dwarf8* polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005. Vol. 111, No 2. P. 206–217.

172. Andersen J.R., Zein I., Wenzel G. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a Phenylalanine Ammonia-Lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theoretical and Applied Genetics*. 2007. Vol. 114, No 2. P. 307–319.

173. Armstrong C. L., Green C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta*. 1985. Vol. 164. P. 207–214.

174. Armstrong C. L., Green C. E., Phillips R. L., Stucker R. E. Genetic control of plant regeneration from maize tissue cultures. *Maize Genetics Cooperation. News Letter*. 1985. Vol. 59. P. 92–93.

175. Armstrong C. L., Parker G. B., Pershing J. C., Brown S. M., Sanders P. R., Duncan D. R. et al. Field evaluation of European corn border control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Sci*. 1995. Vol. 35, No 2. P. 550–557.

176. Armstrong C. L., Romero-Severson J., Hodges T. K. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 1992. Vol. 84, No 5-6. P. 755–762.
177. Azad M. A. K., Rahman W. Md., Arifuzzaman Md., Hasanuzzaman M. D., Talukder A. I., Saha R. K. Callus induction and plant regeneration from immature kernel of maize inbred line. *Journal of Chemical, Biological and Physical Science.* 2015. Vol. 5, No 4. P. 4149–4161.
178. Barber W. T., Zhang W., Win H., Varala K. K., Dorweiler J. E., Hudson M. E. et al. Repeat associated small RNAs vary among parents and following hybridization in maize. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012. Vol. 109, No 26. P. 10444–10449.
179. Baudino S., Hansen S., Brettschneider R. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family 2001. *Planta.* 2001. Vol. 213. P. 1–10.
180. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature.* 2004. No 431(7006). P. 356–363.
181. Bedada L. T., Seth M., Runo S. M., Tefera W., Jesse M. Regenerability of elite tropical maize (*Zea mays* L.) inbred lines using immature zygotic embryo explants. *Afr. j. biotechnol.* 2012. Vol. 11, No 8. P. 598–605.
182. Bedoya C. A., Dreisigacker S., Hearne S., Franco J., Mir C., Prasanna B. M et al. Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS One.* 2017. Vol. 12, No 4. P. 1–36.
183. Benevenuto R. F., Agapito-Tenfen S. Z., Vilperte V., Wikmark O.-G., van Rensburg P. J., Nodari R. O. Molecular responses of genetically modified maize to abiotic stresses as determined through proteomic and metabolomic analyses. *PLoS One.* 2017. Vol. 12, No 2. P. 1–23.
184. Bennetzen J. L., Hake E. S. A. Handbook of maize. Genetic and genomics. New York: Springer Science, 2009, 797 p.

185. Bicar E. H., Woodman-Clikeman W., Sangtong V., Peterson J. M., Yang S. S. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. *Trans. Res.* 2008. Vol. 17. P. 59–71.
186. Binott J. J., Songa J. M., Ininda J., Njagi E. M., Machuka J. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*. 2008. Vol. 7, No 8. P. 981–987.
187. Biodiagnostics, Inc. www.biodiagnostics.net.
188. Botstein D. R., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980. Vol. 32. P. 314–331.
189. Brereton R. G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical plant. Wiley, Chichester, UK, 2003. 489 p.
190. Brereton R.G. Applied Chemometrics for Scientists. Wiley, Chichester, UK, 2007. 379 p.
191. Bronsema F. B. F., Van Oostveen W. J. F., Van Lammeren A. A. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2001. No 65. P. 45–56.
192. Cao M., Sato S. J. , Behrens M. , Jiang W. Z. , Clemente T. E., Weeks D. P. Genetic engineering of maize (*Zea mays*) for high-level tolerance to treatment with the herbicide dicamba. *J. Agric. Food Chem.* 2011. Vol. 59, No 11. P. 5830–5834.
193. Carvalho C., Bohorova N., Bordallo P., Abreu L. L., Valicente F. H., Bressan W. et al. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports*. 1997. Vol. 17. P. 73-76.
194. Chen J., Shrestha R., Ding J., Zheng H., Mu C., Wu J., Mahuku G. Genome-Wide Association Study and QTL Mapping Reveal Genomic Loci Associated with Fusarium Ear Rot Resistance in Tropical Maize Germplasm. *G3 (Bethesda)*. 2016. Vol. 6, No 12. P. 3803–3815.

195. Chen Q., Song J., Du W. P., Xu L. Y., Jiang Y., Zhang J., Xiang X. L., Yu G. R. Identification, Mapping, and Molecular Marker Development for Rgsr 8.1: A New Quantitative Trait Locus Conferring Resistance to Gibberella Stalk Rot in Maize (*Zea mays* L.). *Front Plant Sci.* 2017. Vol. 8. P. 1355.
196. Ching A., Caldwell K., Jung M., Dolan M., Smith O. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics.* 2002. Vol. 3. P. 19.
197. Christensen A. H., Quail P. H. Ubiquitin promotor-based vectors for high-level expression of selectable abd or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research.* 1996. Vol. 5. P. 213–218.
198. Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci. Sinica.* 1975. Vol. 18. P. 659–668.
199. Confidentiality agreement between BioDiagnostics Inc. (USA) and Company Mais (Ukraine). 2010. Vol. 1. P. 23.
200. Croucher P. J. P. Linkage disequilibrium. Wiley Online Library. 2013.
201. Danson J. W., Lagat M., Mbogori M. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic type II callus. *African journal of biotechnology.* 2006. Vol. 5, No 23. P. 2367–2370.
202. Dao A., Sanou J., Mitchell S. E., Gracen V., Danquah E. Y. Genetic diversity among INERA maize inbred lines with single nucleotide polymorphism (SNP) markers and their relationship with CIMMYT, IITA, and temperate lines. *BMC Genet.* 2014. Vol. 25, No 15. P. 127.
203. De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V. et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 1987. Vol. 6. P. 2513–2518.
204. 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 21st – 23rd 2016). Odessa, 2016. P. 18.

205. Derkach K. V., Abraimova O. E., Dzubetskij B. V., Cherchel V. Ju., Satarova T. M. Influence of chloride load on the L-proline amount of maize callus tissue. *55th Annual Maize Genetics Conference*. USA, Illinois, Pheasant Run St.Charles, 14-17 March, 2013. P. 285.

206. Derkach K. V., Abraimova O. E., Dzubetskij B. V., Cherchel V. Ju., Sitalo M. Ju., Konoschuk Ju. V. et al. L-proline amount in callus tissues of Lancaster maize inbred lines under chloride load. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2014. Vol. 87. P. 13–14.

207. Derkach K. V., Abraimova O. E., Satarova T. M. Dynamics of callusogenesis in Lancaster inbred lines. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2011. Vol. 85. P. 12–14.

208. Derkach K. V., Abraimova O. E., Satarova T. M. Influence of sodium chloride on maize callusogenesis. *54th Annual Maize Genetics Conference*. USA, Oregon, Portland, 15 – 18 March, 2012. P. 107.

209. Derkach K. V., Abraimova O. E., Satarova T. M. Callusogenesis in maize inbred DK212 under sodium chloride. *Maize Genetics Cooperation Newsletter*. 2013. Vol. 86. P. 13–14.

210. Derkach K. V., Abraimova O. E., Satarova T. M. Viability of maize *in vitro* regenerated plants hybrids in soil under artificial climate. *Bulletin Institute of Agriculture of Steppe Zone NAAS of Ukraine*. 2016. Vol. 10. P. 36–40.

211. 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. *58th Annual Maize Genetics Conference*. Florida, Jacksonville, Hyatt Regency, 17-20 March, 2016. P. 176.

212. Derkach K. V., Satarova T. M., Abraimova O. E. Influence of sucrose on *in vitro* callusogenesis of Lancaster inbred lines. *53rd Annual Maize Genetics Conference*. Program and Abstracts. USA, Illinois, St. Charles, Pheasant Run, 17-20 March, 2011. P. 103.

213. 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. Vol. 91. P. 1–6.

214. Drakakaki G., Marcel S., Glahn R. P., Lund E. K., Pariagh S., Fischer R., Christou P., Stöger E. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Molecular Biology*. 2005. Vol. 59. P. 869–880.

215. Duncan D. R., Williams M. E., Zehr B. E., Widholm J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta*. 1985. Vol. 165, No 3 P. 322–332.

216. Emons A. M. C., Kieft H. Somatic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg, 1995. P. 24–39.

217. Enoki H., Sato H., Koinuma K. SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan. *Theor Appl Genet*. 2002. Vol. 104. No 8. P. 1270–1277.

218. EU register of genetically modified food and feed. URL: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm.

219. Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics Society of America. *Genetics*. 2003. Vol. 164. P. 1567–1587.

220. Falush D., Stephens M., Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*. 2007. Vol. 7. P. 574–578.

221. Fan J. B., Gunderson K. L., Bibikova M., Yeakley J. M., Chen J., Wickham Garcia E. et al. Illumina universal bead arrays. *Methods Enzymol*. 2006. Vol. 410. P. 57–73.

222. Farfan I. D. B., De La Fuente G. N., Murray S. C., Isakeit T., Huang P. C., Warburton M. et al. Genome Wide Association Study for Drought, Aflatoxin

Resistance, and Important Agronomic Traits of Maize Hybrids in the Sub-Tropics. Lukens L, ed. *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10, No 2. e0117737.

223. Fawad A., Muhammad A., Kanwal N. A. Q., Niazi N. K. Crop improvement through conventional and non-conventional breeding approaches for grain yield and quality traits in *Zea mays*. *Life Science Journal*. 2015. Vol. 12, No 4. P. 38–50.

224. Finer J. J., Vain P., Jones M. W., McMullen M. D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep*. 1992. Vol. 11. P. 323–328.

225. Food safety – from the farm to the fork : EU register of genetically modified food and feed. URL: http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm.

226. Frame B. R., Drayton P. R., Bagnall S. V., Lewnau C. J., Bullock W. P., Wilson H. M. et al. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant J*. 1994. Vol. 6, No 6. P. 941–948.

227. Frame B. R., Main M., Schick R., Wang K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. *Methods Mol. Biol*. 2011. Vol. 710. P. 327–341.

228. Frame B. R., Zhang H., Cocciolone S. M., Sidorenko L. V., Dietrich C. R., Pegg S. E. et al. Production of transgenic maize from bombarded type II callus: Effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. *In vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. 2000. Vol. 36. P. 21–29.

229. Frascaroli E., Schrag T.A., Melchinger A.E. Genetic diversity analysis of elite European maize (*Zea mays* L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs *Theoretical and applied genetics*. 2013. Vol. 126, No 1. P. 133–141.

230. Frizzi A., Huang S., Gilbertson L. A., Armstrong T. A., Luethy M. H., Malvar T. M. Modifying lysine biosynthesis and catabolism in corn with a single bifunctional expression / silencing transgene cassette. *Plant Biotechnology Journal*. 2008. Vol. 6, No 1. P. 13–21.

231. Fromm M. E., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J., Klein T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biotechnol.* 1990. Vol. 8. P. 833–839.

232. Fukunaga K., Hill J., Vigouroux Y., Matsuoka Y., Sanchez J. G., Liu K. et al. Genetic diversity and population structure of Teosinte. *Genetics*. 2005. Vol. 169. P. 2241–2254.

233. Gahlawat S., Salar R., Siwach P., Duhan J., Kumar S., Kaur P. Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments. *Springer Nature Singapore Pte Ltd.* 2017. P. 390.

234. Galili G., Shaul O., Perl A., Karchi H. Synthesis and accumulation of the essential amino acids lysine and threonine in seeds. *Seed Development and Germination*. NY: Marcel Dekker, 1994. P. 811–831.

235. Gallais A., Bordes J. The use of doubled haploids in recurrent selection and hybrid development in maize. *Crop Sci.* 2007. Vol. 47. P. 190–201.

236. Ganai M. W., Durstewitz G., Polley A., Bérard A., Buckler E. S., Charcosset A. et al. A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. e28334.

237. Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M., Thorpe T. A. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture *in vitro*. *Cellular & Developmental Biology Plant*. 1996. Vol. 32. P. 272–289.

238. Ge F., Hu H., Huang X., Zhang Y., Wang Y., Li Z. et al. Metabolomic and Proteomic Analysis of Maize Embryonic Callus induced from immature embryo. *Scientific Reports*. 2017. No 7. P. 1004–1038.

239. Ge F., Huang X., Hu H., Zhang Y., Li Z., Zou C. et al. Endogenous small interfering RNAs associated with maize embryonic callus formation. *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, No 7. P.1778-1798.

240. Geetha S., Suganthan R.N., Prasanthi P. *In vitro* regeneration of Indian maize (*Zea mays* L.) inbred lines through immature embryo derived somatic

embryogenesis. *Journal of Applied and Natural Sciences*. 2015. Vol. 4, No 1. P. 1–12.

241. Gemperline P. Practical Guide To Chemometrics. *Taylor & Francis*. 2006. P. 520.

242. Geng L., Deng D. D., Wubben M. J., Jenkins N. J., McCarty C. J. Jr., Abdurakhmomedov I. A high-throughput standard PCR-based genotyping method for determining transgene zygosity in segregating plant populations. *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8. P. 1252-1267.

243. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat. Rev. Genet.* 2012. Vol. 13. P. 135–145.

244. GM approval database. URL: www.isaaa.org.

245. González G. A., Pacheco M. G., Décima Oneto C., Etchart V. J., Kandus M. V., Salerno J. C. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in Argentinean maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 15, No 1. P. 1–15.

246. Gore M. A., Chia J-M., Elshire R. J., Sun Q., Ersoz E. S., Hurwitz B. L. et al. A first-generation haplotype map of maize. *Science*. 2009. Vol. 326. P. 1115–1117.

247. Gorji A. H., Zolnoori M., Jamasbi A., Zolnoori Z. *In vitro* plant generation of tropical maize genotypes. *International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology*. 2011. No 16. P. 52–59.

248. Green C. E., Phillips H. L. Plant regeneration from tissues cultures of maize. *Crop Science*. 1975. Vol. 15, No 5. P. 417–421.

249. Guruprasad M., Sridevi T. V., Udaya Sri A. P. P., Kumar M. S. Plant regeneration through callus initiation from mature and immature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Internat. J. Multidisciplinary. Advanced Research Trends*. 2015. Vol. 2, No 1. P. 195–202.

250. Guruprasad M., Sridevi T. V., Vijayakumari G., Kumar M. S. Plant regeneration through callus initiation from mature and immature embryos of maize

(*Zea mays* L.). *Indian journal Agricultural Research*. 2016. Vol. 50, No 2. P. 135–138.

251. Hallauer A. R., Carena M. J., Filho J. B. M. Quantitative genetics in maize breeding. New York: Springer, 2010. 663 p.

252. Hamblin M. T., Warburton M. L., Buckler E. S. Empirical comparison of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PLoS ONE*. 2007. Vol. 2, No 12. P. 1367.

253. Hansen G., Chilton M.-D. «Agrolistic» transformation of plant cells: Integration of T-strands generated *in planta*. *Plant Biology*. 1996. Vol. 93. P. 14978–14983.

254. Hansen G., Wright M. S. Recent advances in the transformation of plants. *Trends in plant science*. 1999. Vol. 4, No 6. P. 226–231.

255. Hayano-Kanashiro C., Martínez de la Vega O., Reyes-Valdés M. H. Pons-Hernández J.-L., Hernández-Godinez F., Alfaro-Laguna E. et al. An SSR-based approach incorporating a novel algorithm for identification of rare maize genotypes facilitates criteria for landrace conservation in Mexico. *Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 7, No 6. P. 1680–1690.

256. Henry R. J. Molecular Markers in Plants. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK., 2012. 197 p.

257. Hodges T. K., Kamo K. K., Becwar M. R., Schroll S. Regeneration of maize. *Biothechnology in Plant Science*. Academic Press, Orlando, Fra. 1985. P. 15–33.

258. Hong J. K., Park K. J., Lee G. S., Kim D. Y., Kim J. K., Lee S. B., Suh E. J., Lee Y. H. Callus induction and plant regeneration from immature zygotic embryos of various maize genotypes (*Zea mays* L.). *J Plant Biotechnol*. 2017. Vol. 44. P. 49–55.

259. Hood E. E., Love R., Lane J., Bray J., Drees C., Hood K. R. et al. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. *Plant Biotechnology Journal*. 2007. Vol. 5, No 6. P. 709–719.

260. Huang S. S., Adams W. R., Zhou Q., Malloy K. P., Voyles D. A., Anthony J. et al. Improving nutritional quality of maize proteins by expressing sense and antisense zein genes. *J. Agricultural and Food Chemistry*. 2004. Vol. 52, No 7. P. 1958–1964.

261. illumina GolGate® Genotyping Assay for VeraCode® Manual Protocol. URL: http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/5cdc02d3-024d-43b5-b1aa8e22390fa5a/goldengate_gt_for_veracode_man_euc_11312755_reva.pdf.

262. illumina^a® URL: <http://www.illumina.com>.

263. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. Agrobacterium-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*. 2007. Vol. 2. P. 1614–1621.

264. Ishida Y., Saito H., Ohta S., Heie Y., Komari T., Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotech.* 1996. Vol. 14. P. 745–750.

265. Jan S. A., Shinwari Z. K., Shah S. H., Ahmad N. In-planta transformation: recent advances. *Romanian Biotechnological Letters*. 2016. Vol. 21, No 1. P. 11085–11091.

266. Jefferson R. A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1987. Vol. 5. P. 387–405.

267. Jia X. X., Zhang J. W., Wang H. N., Kong W. P. Efficient maize (*Zea mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro*. *Maydica*. 2008. Vol. 53. P. 239–248.

268. Jiang G. L. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants, Plant Breeding from Laboratories to Fields. USA: InTech. 2013. P. 45–83.

269. Jiménez-Galindo J. C., Ordás B., Butrón A., Samayoa L. F., Malvar R. A. QTL Mapping for Yield and Resistance against Mediterranean Corn Borer in Maize. *Front Plant Sci*. 2017. Vol. 8. P. 698.

270. Jin Y., Guo H. S. Transgene-induced gene silencing in plants. *Methods Mol. Biol.* 2015. No 1287. P. 105–117.

271. Johnson K. D., Campbell L. A., Lepping M.D., Rule D. M. Field Trial Performance of Herculex XTRA (Cry34Ab1/Cry35Ab1) and SmartStax (Cry34Ab1/Cry35Ab1 + Cry3Bb1) Hybrids and Soil Insecticides Against Western and Northern Corn Rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ Entomol.* 2017. Vol.110, No 3. P. 1062–1069.
272. Karaman S., Cunnick J., Wang K. Expression of the cholera toxin B subunit (CT-B) in maize seeds and a combined mucosal treatment against cholera and traveler's diarrhea. *Plant Cell Rep.* 2012. Vol. 31, No 3. P. 527–537.
273. Kasai M., Matsumura H., Yoshida K., Terauchi R., Taneda A., Kanazawa A. Deep sequencing uncovers commonality in small RNA profiles between transgene-induced and naturally occurring RNA silencing of chalcone synthase-A gene in petunia. *BMC Genomics.* 2013. Vol. 14. P. 63.
274. Kikkert J. R. The Biolistic® PDS-1000/He device. *Plant cell, tissue and organ culture.* 1993. No 33. P. 221–226.
275. Kim S. G., Lee J.-S., Shin S., Bae H. H., Kim J.-T., Son B.-Y., Baek S.-B. Developing PCR-based SNP markers for distinguishing Korean waxy corn F₁ hybrids. *Plant Breed. Biotech.* 2016. No 4 (3). P. 315–323.
276. Ko W. R., Sa K. J., Roy N. S., Choi H.-J., Lee J. K. Analysis of the genetic diversity of super sweet corn inbred lines using SSR and SSAP markers. *Genetics and Molecular Research.* 2016. Vol. 15, No 1. P. 1–13.
277. Kuchuk N. V. Cell genetic engineering: Transmission genetics of plants. *Cytol. Genet.* 2017. Vol. 51. P. 103–107.
278. Lee H., Zhang Z. J. Agrobacterium-mediated transformation of maize (*Zea mays*) immature embryos. *Methods Mol Biol.* 2014. No 1099. P. 273–80.
279. Li T., Chen J., Qiu S., Zhang Y., Wang P., Yang L. et al. Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. *PLoS One.* 2012. Vol. 7, No 8. P. e43451.
280. Lightfoot D. A., Mungur R., Ameziane R., Young B. G. Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate

dehydrogenase gene (gdhA) of E.coli. *Euphytica*. 2007. Vol. 156, N 1-2. P. 103–116.

281. Liu W. G., Wang Y. P., Zhang Z. J., Wang M., Liu Q. X., Liu H. W. et al. Generation and characterization of caprine chymosin in corn seed. *Protein Expr Purif*. 2017. Vol. 135. P. 78–82.

282. Liu Y., El-Kassaby Y.A. Global analysis of small RNA dynamics during seed development of *Picea glauca* and *Arabidopsis thaliana* populations reveals insights of their evolutionary trajectories. *Front Plant Sci*. 2017. Vol. 8. P. 1719.

283. Lu C., Vasil V., Vasil I. K. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theor. appl. genet*. 1983. No 66. P. 285–289.

284. Lu H., Bernardo R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. *Theor. Appl. Genet*. 2001. Vol. 103. P. 613–617.

285. Lu Y., Yan J., Guimarães C. T., Taba S., Hao Z., Gao S. et al. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms. *Theor. Appl. Genet*. 2009. Vol. 120. P. 93–115.

286. Lübberstedt T., Zein I., Andersen J. R., Wenzel G., Krütfeldt B., Eder J. et al. Development and application of functional markers in maize. *Euphytica*. 2005. Vol. 146 (1-2). P. 101–108.

287. Luo M., Zhao Y., Zhang R., Xing J. Duan M., Li J. et al. Mapping of a major QTL for salt tolerance of mature field-grown maize plants based on SNP markers. *BMC Plant Biol*. 2017. Vol. 17, No 1. P. 140.

288. Ma L., Sun Q., Zhou Y., Wu C., Zhang C. Study on the relationship between inheritance and immature embryo culturing capacity of maize inbreds. *Journal of molecular cell biology*. 2007. Vol. 40, No 2. P. 164–172.

289. MaizeGDB / Maize Genetics and Genomics Database. URL: <http://www.maizegdb.org>.

290. Malini N., Ananadakumar C.R., Hariramakrishnan S. Regeneration of Indian maize genotypes (*Zea mays* L.) from immature embryo culture through

callus induction. *Journal of Applied and Natural Science*. 2015. Vol. 7, No 1. P. 131–137.

291. Marita J. M., Rodrigues J. M., Niehuis J. Development of an algorithm identifying maximally diverse core collections. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2000. Vol. 47. P. 515–526.

292. McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1950. Vol. 36. P. 344–355.

293. McClintock B. Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics*. 1953. Vol. 38. P. 579–599.

294. Mikić S., Kondić-špika A., Brbaklić L., Stanisavljević D., Čeran M., Trkulja D. et al. Molecular and phenotypic characterisation of diverse temperate maize inbred lines in Southeast Europe. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2017. Vol. 104, No 1. P. 31–40.

295. Muoma J., Ombori O., Machuka J. Improvement in inheritance of somatic embryogenesis and plantlet regeneration in tropical maize lines from friable callus. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 2011. Vol. 85. P. 1–2.

296. Murashige T., Skoog F. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

297. Nadeem M. A., Nawaz M. A., Shahid M. Q., Doğan Y., Comertpay G., Yıldız M. et al. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2017. P. 1–26.

298. Nahampun H. N., López-Arredondo D., Xu X., Herrera-Estrella L., Wang K. Assessment of ptxD gene as an alternative selectable marker for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. *Plant Cell Rep.* 2016. Vol. 35, No 5. P. 1121–32.

299. NCBI Gene: National center for biotechnology information. URL: www.ncbi.nih.gov/gene.

300. NCBI Genome: National center for biotechnology information. URL: www.ncbi.nih.gov/genome.

301. Neelakandan A. K., Wang K. Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep.* 2012. Vol. 31. P. 597–620.

302. Neondo J. O., Alakonya A. E., Matheka J., Masanga J. O., Kasili R. W. Transformation and regeneration protocol for two farmer preferred open pollinated tropical maize (*Zea mays*) varieties. *Journal of Plant Sciences.* 2016. Vol. 4, No4. P. 80–87.

303. Novak F. J., Daskalov S., Brunner H., Nesticky M., Afza R., Dolezelova M. et al. Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability Cauced by gamma radiation and tissue culture techniques. *Plant Breeding.* 1988. No 101. P. 66–79.

304. O’Kennedy M. M., Stark H. C., Dube N. Biolistic mediated transformation protocols for maize and pearl millet using pre-cultured immature zygotic embryos and embryogenic tissue. *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 710. P. 343–354.

305. Oduor R. O., Njagi E. N. M., Machuka J. S. *In vitro* regeneration of dryland Kenyan maize genotypes through somatic embryogenesis. *International journal of botany.* 2006. Vol. 2, No 2. P. 146–151.

306. Ombori O., Gitonga N. M., Machuka J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of tropical maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Biotechnology.* 2008. Vol. 7, No 2. P. 224–232.

307. Omer R. A., Ali A. M., Matheka J. M., Machuka J. Regeneration of Sudanese maize inbred lines and open pollinated varieties. *African journal of biotechnology.* 2008. Vol. 7, No 11. P. 1759–1764.

308. Ordas B., Malvar R. A., Santiago R., Butron A. QTL mapping for Mediterranean corn borer resistance in European flint germplasm using recombinant inbred lines. *BMC Genomics.* 2010. Vol. 11. P. 174.

309. Palaisa K. A., Morgante M., Williams M., Rafalski A. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *The Plant Cell.* 2003. Vol. 15, No 8. P. 1795–1806.

310. Pálincás Z., Kiss J., Zalai M., Szénási Á., Dorner Z., North, S. et al. Effects of genetically modified maize events expressing Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, and CP4 EPSPS proteins on arthropod complex food webs. *Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 7, No 7. P. 2286–2293.
311. Pan Q., Ali F., Yang X., Li J., Yan J. Exploring the genetic characteristics of two recombinant inbred line populations via high-density SNP markers in maize. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, No 12. P. 52777.
312. Panwar V., Jordan M., McCallum B., Bakkeren G. Host-induced silencing of essential genes in *Puccinia triticina* through transgenic expression of RNAi sequences reduces severity of leaf rust infection in wheat. *Plant Biotechnology J*. 2017. P. 12845.
313. Park J.-H., Gail M. H., Weinberg C. R., Carroll R. J., Chung C. C., Wang Z. et al. Distribution of allele frequencies and effect size and their interrelationships for common genetic susceptibility variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108. P. 18026–18031.
314. Peter B. J., Zhiwu Z., Dallas K. E., Terry C. M., Yogesh R., Edward B. S. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23, No 19. P. 2633–2635.
315. Petrillo C. P., Carneiro N. P., Purcino A. Á. C., Carvalho C. H. S., Alves J. D., Carniero A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. *Pesq. agropec. bras., Brasília*. 2008. Vol. 43, No 3. P. 371–378.
316. Phillips R. L., Somers D. A., Hibberd K. A. Cell/tissue culture and in vitro manipulation. *Corn and corn improvement*. 1988. P. 345–387.
317. Prasanna B. M. Diversity in global maize germplasm: characterization and utilization. *J Biosci*. 2012. Vol. 37, No 5. P. 843–55.
318. Prasanna B. M., Pixley K., Warburton M. L., Xie C. Molecular marker-assisted breeding options for maize improvement in Asia. *Mol Breeding*. 2010. Vol. 26. P. 339–356.

319. Prioli L. M., da Silva W. J. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. *Rev. Brasil Genet.* 1989. Vol. 12, No 3. P. 553–566.

320. Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000. Vol. 155. P. 945–959.

321. Pritchard J. K., Wen X., Falush D., Wen X., Falush D. Documentation for *structure* software: Version 2.3. 2010: 38 from: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.

322. Qamar Z., Aaliyak K., Nasir I. A., Farooq A. M., Tabassum B., Ali Q. et al. An overview of genetic transformation of glyphosate resistant gene in *Zea mays*. *Nature and Science*. 2015. Vol. 13, No 3. P. 80–90.

323. Quan R., Shang M., Zhang H., Zhao Y., Zhang J. Improved chilling tolerance by transformation with betA gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize. *Plant Science*. 2004. Vol. 166. P. 141–149.

324. Rademacher T., Sack M., Arcalis E., Stadlmann J., Balzer S., Altmann F. et al. Recombinant antibody 2G12 produced in maize endosperm efficiently neutralizes HIV-1 and contains predominantly single-GlcNAc N-glycans. *Plant Biotechnology J.* 2008. Vol. 6, No 2. P. 189–201.

325. Rafiq M., Fatima T., Husnain T., Bashir K., Riazuddin S. Effect of different media on callus formation and regeneration of different genotypes of maize (*Zea mays* L.). *Plant tissue culture*. 2005. No 15 (1). P. 57–65.

326. Raji J. A., Frame B., Little D., Santoso T. J., Wang K. Agrobacterium- and Biolistic-Mediated Transformation of Maize B104 Inbred. *Methods Mol Biol.* 2018. Vol. 1676. P. 15–40.

327. Rakshit S., Rashid Z., Sekhar J. C., Fatma T., Dass S. Callus induction and whole plant regeneration in elite Caian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant cell organ culture*. 2010. No 100. P. 31–37.

328. Reif J. C., Melchinger A. E., Xia X. C., Warburton M. L., Hoisington D. A., Vasal S. K. et al. Use of SSRs for establishing heterotic groups in subtropical maize. *Theor Appl Genet.* 2003. Vol. 107, No 5. P. 947–57.

329. Revilla P., Rodríguez V. M., Ordás A., Rincet R., Charcosset A., Giauffret C. et al. Association mapping for cold tolerance in two large maize inbred panels. *BMC Plant Biol.* 2016. Vol. 16, No 1. P. 127.

330. Richard C., Osiru D. S., Mwala M. S., Lubberstedt T. Genetic diversity and heterotic grouping of the core set of southern African and temperate maize (*Zea mays* L.) Inbred lines using SNP markers. *Maydica*. 2016. No 61. P. 1–9.

331. Riedelsheimer C., Czedik-Eysenberg A., Grieder C., Lisec J., Technow F., Altmann T. et al. Genomic and metabolic prediction of complex heterotic traits in hybrid maize. *Nat. Genet.* 2012. Vol. 44. P. 217–220.

332. Romay M. C., Millard M. J., Glaubitz J. C., Peiffer J. A., Swarts K. L., Casstevens T. M. et al. Comprehensive genotyping of the USA national maize inbreds seed bank. *Genome Biol.* 2013. Vol. 14, No 6. P. 55.

333. Romero-Severson, J., Smith J. S. C., Ziegler J., Hauser J. L., Hookstra G. Pedigree analysis and haplotype sharing within diverse groups of *Zea mays* L. inbreds. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103. P. 567–574.

334. Sa K. J., Park J. Y., Park K. C., Lee J. K. Analysis of genetic mapping in a waxy/dent maize RIL population using SSR and SNP markers. *Genes Genom.* 2012. No 34. P. 157.

335. Sakhno L. A., Gocheva E. A., Komarnitsky I. K., Kuchuk N. V. Stable expression of the promoterless *bar* gene in transgenic rapeseed plants. *Cytol. Genet.* 2008. Vol. 42, No 1. P. 16–22.

336. Saputro T. B., Dianawati S., Sholihah N. F., Ermavitalin D. Genetic diversity of improved salt tolerant calli of maize (*Zea mays* L.) using RAPD. *AIP Conference Proceedings*. 2017. Vol. 1854. P. 1–8.

337. Sarcevic H., Pejic I., Baric M., Kozumplik V. Originality of M3S maize population and changes in allele frequencies revealed by SSR markers after two cycles of selfed progeny recurrent selection. *Euphytica*. 2008. No 161. P. 97–105.

338. Satarova T. N., Derkach E. V., Abraimova O. E., Dzubetskij B. V., Cherchel V. Yu., Goncharov Yu. A. Types of morphogenesis in callus tissue of

Lancaster maize group. *56th Annual Maize Genetics Conference*. China, Beijing, 13-16 March, 2014. P. 131.

339. Schnable P. S., Ware D., Fulton R. S., Stein J. C., Wei F., Pasternak S. et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*. 2009. Vol. 326 (5956). P. 1112–5.

340. Semagn K., Magorokosho C., Vivek B. S., Makumbi D., Beyene Y., Mugo S. et al. Molecular characterization of diverse CIMMYT maize inbred lines from eastern and southern Africa using single nucleotide polymorphic markers. *BMC Genomics*. 2012. Vol. 13. P. 113.

341. Seth M. S., Bedada L. T., Mneney E. E., Oduor R. O., Machuka J. S. *In vitro* regeneration of selected commercial Tanzanian open pollinated maize varieties. *Afr. J. Biotechnol.* 2012. Vol. 11, No 22. P. 6043–6049.

342. Shark K. B., Smith F. D., Harpending P. R., Rasmussen J. L., Sanford J. C. Biolistic transformation of procaryote, *Bacillus megaterium*. *Applied and environmental microbiology*. 1991. Vol. 57. No 5. P. 480–485.

343. Sharma S., Sandhu M. K., Kaur P., Kaur A., Gosal S. S. Factors affecting somatic embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cell & Tissue Research*. 2012. Vol. 12, No 1. P. 3103.

344. Shen Y., Jiang Z., Lu S., Lin H., Gao S., Peng H. et al. Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013. Vol. 441, No 2. P. 425–430.

345. Shen Y., Jiang Z., Yao X., Zhang Z., Lin H., Zhao M. et al. Genome expression profile analysis of the immature maize embryo during dedifferentiation. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, No 3. P. e32237.

346. Shohael A. M., Akanda M. A. L., Parvez S., Mahfuja S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryoderived callus of inbred mays (*Zea mays* L.). *Biotechnology*. 2003. Vol. 2, No 2. P. 154–161.

347. Shou H. X., Bordallo P., Fan J. B., Yeakley J. M., Bibikova M., Sheen J. et al. Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase enhances

freezing tolerance in transgenic maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101, No 9. P. 3298–3303.

348. Shou H. X., Bordallo P., Wang K. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.* 2004. Vol. 55, No 399. P. 1013–1019.

349. Šimic D., Ledencan T., Jambrovic A., Zdunic Z., Brkic J., Brkic A. et al. SNP and SSR marker analysis and mapping of a maize population. *Genetika*. 2009. Vol. 41, No 3. P. 237–246.

350. Smith C. W., Betran J., Runge E. C. A. Corn: Origin, History, Technology, and Production. Hoboken: New Jersey, 2004. 957 p.

351. Smith J. S. C., Chin E. C. L., Shu H., Smith O. S., Wall S. J., Senior M. L. et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 1997. Vol. 95. P. 163–173.

352. Smith S. Molecular Characterization of the Texas Maize Breeding Program. *Master's thesis, Texas A & M University*. 2015. Vol. 1969. P. 155–199.

353. Somma M., Querci M., Jermini M., Van den Eede G. Extraction and Purification of DNA. Session 4. In: Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms - User Manual European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg. 2006. P. 229.

354. Söngstad D. D., Armstrong C. L., Petersen W. L., Hairston B., Hinchee M. A. W. Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 1996. Vol. 32. P. 179–183.

355. Sun L., Wu Y., Zou H., Su S., Li S., Shan X. et al. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2012. Vol. 113, No 1. P. 103–119.

356. Svtashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J. K., Mark Sigan A. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 2016. Vol. 7. P. 1–7.

357. Tan Y., Tong Z., Yang Q., Sun Y., Jin X., Peng C. et al. Proteomic analysis of phytase transgenic and non-transgenic maize seeds. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, No 1. P. 1–11.

358. Thirunavukkarasu N., Sharma R., Singh N., Shiriga K., Mohan S., Mittal S. et al. Genomewide Expression and Functional Interactions of Genes under Drought Stress in Maize. *International Journal of Genomics*. 2017. P. 2568706.

359. Tishchenko O. M., Komisarenko A. G., Mykhalska S. I., Sergeeva L. E., Adamenko E. I., Morgun B. V. et al. Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using Lba4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytol. Genet.* 2014. Vol. 48. P. 218–226.

360. Tomes D. T., Smith O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 1985. Vol. 70, No 5. P. 505–509.

361. Troyer A. F. Temperate corn background, behavior, and breeding. CRC Press, 2000. 468 p.

362. Vain P., Yean H., Flament P. Enhancement of production and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant cell, tissue and organ culture*. 1989. No 18. P. 143–151.

363. Van Inghelandt D., Melchinger A.E., Lebreton C., Stich B. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics Theoretische Und Angewandte Genetik*. 2010. Vol. 120, No 7. P. 1289–1299.

364. Van Lammeren A. A. M. Developmental morphology and cytology of the young maize embryo (*Zea mays* L.). *Acta botanica neerlandica*. 1986. No 35 (3). P. 169–188.

365. Van Lammeren A. A. M. Observation on the structural development of immature maize embryos (*Zea mays* L.) during *in vitro* culture in the presence or absence of 2,4-D. *Acta botanica neerlandica*. 1988. No 37 (1). P. 49–61.

366. Varhaníková M., Uvackova L., Skultety L., Pretova A., Obert B., Hajdúch M. Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *Journal of Proteomics*. 2014. Vol. 104. P. 57–65.

367. Varshney R. K., Mahendar T., Aggarwal R. K., Börner A. Genic molecular markers in plants: development and applications. *Genomics-Assisted Crop Improvement*. 2007. Vol. 1. P. 13–29.

368. Vasil V., Vasil I. K., Lu C.-Y. Somatic embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (*Gramineae*). *Amer. J. Bot.* 1984. Vol. 71, No 1. P. 158–161.

369. Venkatramana P., Carison C., Blackstad M., Kaufman B. Development and characterization of single nucleotide polymorphism (SNP) panel for markers-assisted backcrossing in corn from: <http://www.biodiagnostics.net/wp-content/uploads/2012/07/singlenucleotide.pdf>.

370. Wan Y., Rocheford T. R., Widholm J. M. RFLP analysis to identify putative chromosomal regions involved in the anther culture response and callus formation of maize. *Theor. Appl. Genet.* 1992. Vol. 85. P. 360–365.

371. Wang K., Frame B. Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 526. P. 29–45.

372. Wang K., Frame B., Ishida Y., Komari T. Maize transformation: Handbook of maize. *Genetics and Genomics*. 2009. P. 609–639.

373. Wang Y., Fu S., Wen Y., Zhang Z., Xia Y., Liu Y. et al. Selection of maize inbred lines with high regeneration and susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Genet. Genomics*. 2007. Vol. 34, No 8. P. 749–755.

374. Welham S. J., Gezan S. A., Clark S. J., Mead A. Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression. CRC Press, Boca Raton. 2015. P. 608.

375. Wen W., Franco J., Chavez-Tovar V. H., Yan J., Taba S. Genetic characterization of a core set of a tropical maize race Tuxpeño for further use in maize improvement. *PLoS One*. 2012. Vol. 7, No 3. P. 32626.

376. Wu X., Li Y., Shi Y., Song Y., Wang T., Huang Y., Li Y. Fine genetic characterization of elite maize germplasm using high-throughput SNP genotyping. *Theor Appl Genet*. 2014. Vol. 127. P. 621.

377. Wu X. M., Kou S. J., Liu Y. L., Fang Y. N., Xu Q., Guo W. W. Genomewide analysis of small RNAs in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: microRNA- and siRNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. *Plant Biotechnol J*. 2015. Vol. 13, No 3. P. 383–394.

378. Wu Y., Vicente F.S., Huang K., Dhliwayo T., Costich E. D., Semagn K. et al. Molecular characterization of CIMMYT maize inbred lines with genotyping-by-sequencing SNPs. *Theor Appl Genet*. 2016. Vol. 129. P. 753–765.

379. Xu C., Ren Y., Jian Y., Guo Z., Zhang Y., Xie C. et al. Development of a maize 55 K SNP array with improved genome coverage for molecular breeding. *Mol Breed*. 2017. Vol. 37, No 3. P. 20.

380. Xu Z.-Q., Huang X., Feng C., Tian N., Xu D., Feng S.-Z. Multicellular genesis of leaf primordium was demonstrated via chimaeric transgenic plant of maize (*Zea mays* L.) regenerated from type II calli. *Molecular biology reports*. 2010. No 37. P. 3525–3531.

381. Yadava P., Abhishek A., Singh R., Singh R., Kaul T., Pattanayak A. et al. Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize. *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 1949.

382. Yalpani N., Altier D., Barry J., Kassa A., Nowatzki T. M., Sethi A. et al. An *Alcaligenes* strain emulates *Bacillus thuringiensis* producing a binary protein that kills corn rootworm through a mechanism similar to Cry34Ab1/Cry35Ab1. *Sci. Rep*. 2017. Vol. 7, No 1. P. 1–10.

383. Yan J., Kandianis C.B., Harjes C. E., Bai L., Kim E. H., Yang X. et al. Rare genetic variation at *Zea mays* crtRB1 increases beta-carotene in maize grain. *Nat. Genet*. 2010. Vol. 42. P. 322–327.

384. Yan J., Shah T., Warburton M. L., Buckler E. S., McMullen M. D., Crouch J. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS One*. 2009. No 4 (12). P. 1–15.
385. Yan J., Yang X., Shah T., Sánchez-Villeda H., Li J., Warburton M. et al. High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize. *Mol. Breeding*. 2010. Vol. 25. P. 441–451.
386. Yang S. Y., Moran D. L., Jia H. W., Bicar E. H., Lee M., Scott M. P. Expression of a synthetic porcine alpha-lactalbumin gene in the kernels of transgenic maize. *Transgenic Res*. 2002. Vol. 11, No 1. P. 11–20.
387. Yang X., Wang L., Yuan D., Lindsey K., Zhang X. Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J Exp Bot*. 2013. Vol. 64, No 6. P. 1521–1536.
388. Yemets A. I., Tanasienko I. V., Blume Ya. B. Progress in barley *in vitro* culture and genetic transformation. In: Barley: Production, Cultivation and Uses (Ed. Steven B. Elfson). New York: Nova Science Publishers, 2011. P. 1–36.
389. Zhang H. S., Li H. X., Wang H. Z., Luz G. M., Jeffers D., Wang G. F. et al. QTL mapping for resistance to SCMV in Chinese maize germplasm. *Maydica*. Vol. 48. P. 307–312.
390. Zhang X., Xia J., Lii Y. E., Barrera-Figueroa B. E., Zhou X., Gao S. et al. Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome Biol*. 2012. Vol. 13, No 3. P. 20.
391. Zhang X., Zhang H., Li L., Lan H., Ren Z., Liu D. et al. Characterizing the population structure and genetic diversity of maize breeding germplasm in Southwest China using genome-wide SNP markers. *BMC Genomics*. 2016. Vol. 17, No 1. P. 697.
392. Zhang X. L., Long Y., Ge F., Guan Z. R., Zhang X. X., Wang Y. L. et al. A genetic study of the regeneration capacity of embryonic callus from the maize immature embryo culture. *Yi Chuan*. 2017. Vol. 9, No 2. P. 143–155.

393. Zhong H., Elumalai S., Nalapalli S., Richbourg L., Prairie A., Bradley D. et al. Advances in Agrobacterium-mediated Maize Transformation. *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1676. P. 41–59.

394. Zhu C., Naqvi S., Breitenbach J., Sandmann G., Christou P., Capell T. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, No 47. P. 18232–18237.

395. Zong Y., Wang Y., Li C., Zhang R., Chen K., Ran Y. et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology.* 2017. Vol. 35, No 5. P. 438–440.

ДОДАТКИ

Додаток А
Додаткові матеріали до розділу 2

Таблиця А.1

Визначення і розрахунок показників репрезентативності та інформативності
SNP-маркерів за [188, 285]

Показник	Визначення
Частота пропущених даних за маркером i , %	Процентне відношення кількості ліній, за якими не вдалося визначити алельний стан маркера i , до загальної кількості ліній, для яких проводили визначення алельного стану маркера i . Коливається в межах 0-100%.
Частота мономорфних маркерів в даному наборі ліній, %	Процентне відношення кількості біалельних маркерів, які в даному наборі ліній виявили мономорфний стан, до загальної кількості біалельних маркерів, за якими проаналізовано даний набір ліній. Коливається в межах 0-100%.
Частота диморфних маркерів в даному наборі ліній, %	Процентне відношення кількості біалельних маркерів, які в даному наборі ліній виявили диморфний стан, до загальної кількості біалельних маркерів, за якими проаналізовано даний набір ліній. Коливається в межах 0-100%.
Частота мажорного алеля за маркером i в даному наборі ліній, частка одиниці	Відношення кількості ліній, в яких виявлено мажорний алельний стан за маркером i , до загальної кількості ліній, проаналізованих за маркером i . Коливається в межах 0,5-1,0.
Частота міnorного алеля за маркером i в даному наборі ліній (MAF), частка одиниці	Відношення кількості ліній, в яких виявлено міnorний алельний стан за маркером i , до загальної кількості ліній, проаналізованих за маркером i . Цей показник завжди менший за 0,5.
Показник зсуву генного різноманіття маркера i у даному наборі ліній, частка одиниці	Даний показник розраховували за формулою $1 - [(p_i^+)^2 + (p_i^-)^2]$, де p_i^+ та p_i^- – частоти альтернативного стану маркера i для набору ліній, проаналізованих за даним маркером. Даний показник змінюється в межах від 0 до 0,5.
Індекс інформативності маркера i у даному наборі ліній за обсягом поліморфізму, що виявляється (індекс інформативності маркера, PIC), частка одиниці	Даний показник розраховували за формулою $1 - [(p_i^+)^2 + (p_i^-)^2] - 1 \cdot 2 \cdot (p_i^+)^2 \cdot (p_i^-)^2$, де p_i^+ та p_i^- – частоти альтернативного стану маркера i для набору ліній, проаналізованих за даним маркером. Індекс інформативності маркера вказує на відносну цінність кожного маркера за обсягом поліморфізму, який за ним виявляється в даному наборі ліній. PIC SNP-маркерів змінюється від 0 до 0,375 на відміну від PIC SSR-маркерів, який варіює в ширшому діапазоні. При посиленні різноманіття набору ліній за маркером i індекс інформативності цього маркера збільшується і при наближенні розподілення частот мажорного і міnorного алелів до 0,5:0,5 досягає 0,375. Високим індексом інформативності маркера вважається $PIC > 0,25$.

Таблиця А.2

Визначення та розрахунок параметрів для характеристики ліній і гібридів
кукурудзи за SNP-маркерами за [188, 285]

Показник	Визначення
Гомозиготність лінії (гібрида), %	Процентне відношення кількості маркерів, що виявили гомозиготний алельний стан у лінії (гібрида) k , до загальної кількості маркерів, за якими проаналізовано лінію (гібрид) k . Коливається в межах 0-100%.
Гетерозиготність лінії (гібрида), %	Процентне відношення кількості маркерів, що виявили гетерозиготний алельний стан у лінії (гібрида) k , до загальної кількості маркерів, за якими проаналізовано лінію (гібрид) k . Коливається в межах 0-100%.
Показник генного різноманіття лінії, частка одиниці	Визначається за формулою $(n_A \cdot n_A - 1 + n_T \cdot n_T - 1 + n_G \cdot n_G - 1 + n_C \cdot n_C - 1) / (2N \cdot N - 1)$, де n_A – кількість маркерів, які в маркерному сайті містять аденін, n_T – кількість маркерів, які в маркерному сайті містять тимін, n_G – кількість маркерів, які в маркерному сайті містять гуанін, n_C – кількість маркерів, які в маркерному сайті містять цитозин, N – загальна кількість маркерів, за якими досліджено селекційний зразок k . Даний показник вказує на імовірність того, що два алеля, випадково обрані для лінії, що досліджується, будуть різними. Його значення коливаються від 0 до 0,5 і збільшуються при посиленні генного різноманіття лінії.
Попарні генетичні дистанції між лініями, частка одиниці	Відношення кількості SNP-маркерів, алельний стан яких розрізняється у двох ліній, до загальної кількості проаналізованих маркерів. Коливається в межах 0-1,0.
Спорідненість ліній, %	Процентне відношення кількості SNP-маркерів, алельний стан яких однаковий у двох ліній, до загальної кількості проаналізованих маркерів. Коливається в межах 0-100%.

Таблиця А.3

Вміст речовин у живильних середовищах, використаних в дослідженнях з індукції калусогенезу та субкультивування калусної тканини кукурудзи, мг/л

Речовина	Позначення середовища				
	N ₆ 30	N ₆ 60	MS30	Цт150	Цт300
Амоній азотнокислий	-	-	1650	-	-
Амоній сірчаноокислий	463	463	-	463	463
Калій азотнокислий	2830	2830	1900	2830	2830
Калій фосфорнокислий однозаміщений	400	400	170	400	400
Магній сірчаноокислий семиводний	185	185	370	185	185
Кальцій хлористий двоводний	166	166	440	166	166
Калій йодистий	0,80	0,80	0,83	0,80	0,80
Борна кислота	1,60	1,60	6,20	1,60	1,60
Марганець сірчаноокислий чотириводний	4,40	4,40	22,30	4,40	4,40
Цинк сірчаноокислий семиводний	1,50	1,50	8,60	1,50	1,50
Натрій молібденовокислий двоводний	-	-	0,25	-	-
Мідь сірчаноокисла п'ятиводна	-	-	0,025	-	-
Кобальт хлористий шестиводний	-	-	0,025	-	-
Залізо сірчаноокисле семиводне	27,80	27,80	27,80	27,80	27,80
Натрій етилендіамінтетраоцтовокислий двоводний	37,50	37,50	37,30	37,50	37,50
Тіамін солянокислий	1,0	1,0	0,1	1,0	1,0
Піридоксин солянокислий	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Гліцин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Гідролізат казеїну	100	100	100	100	100
Інозитол	100	100	100	100	100
L-пролін	690	690	690	690	690
Нітрат срібла	10	10	10	10	10
Сахароза	30 000	60 000	30 000	60 000	60 000
2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Абсцизова кислота	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Цефотаксим	-	-	-	150	300
Агар-агар	7000	7000	7000	7000	7000
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Таблиця А.4

Вміст речовин у живильних середовищах, використаних в дослідженнях з
регенерації та укорінення рослин-регенерантів кукурудзи, мг/л

Речовина	Позначення середовища				
	MS20	MS _{БАП}	MS _{ІМК}	MS _{ЦТ}	½ MS
Амоній азотнокислий	1650	1650	1650	1650	825
Калій азотнокислий	1900	1900	1900	1900	950
Калій фосфорнокислий однозаміщений	170	170	170	170	85
Магній сірчанокислий семиводний	370	370	370	370	185
Кальцій хлористий двоводний	440	440	440	440	220
Калій йодистий	0,83	0,83	0,83	0,83	0,415
Борна кислота	6,20	6,20	6,20	6,20	3,10
Марганець сірчанокислий чотириводний	22,30	22,30	22,30	22,30	11,15
Цинк сірчанокислий семиводний	8,60	8,60	8,60	8,60	4,30
Натрій молібденовокислий двоводний	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125
Мідь сірчанокисла п'ятиводна	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125
Кобальт хлористий шестиводний	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0125
Залізо сірчанокисле семиводне	27,80	27,80	27,80	27,80	13,90
Натрій етилендіамінтетраоцтовокислий двоводний	37,30	37,30	37,30	37,30	18,65
Тіамін солянокислий	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05
Піридоксин солянокислий	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
Гліцин	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Гідролізат казеїну	100	100	100	100	50
Інозитол	100	100	100	100	50
L-пролін	690	690	690	690	345
Сахароза	20 000	20 000	20 000	20 000	15 000
6-бензиламінопурин	-	0,1	-	-	-
Індолилмасляна кислота	-	-	0,1	-	-
Цефотаксим	-	-	-	150	-
Агар-агар	6000	6000	6000	6000	5500
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Таблиця А.5

Визначення та розрахунок показників калусогенезу і регенерації

Показник	Визначення
Загальна частота калусогенезу, %	Процентне відношення кількості зародків, які утворили калус на щитку, до загальної кількості культивованих зародків на 30-у добу від експлантації зародків.
Частота утворення морфогенних калусів, %	Процентне відношення кількості зародків, які утворили морфогенний калус, до загальної кількості культивованих зародків на 30-у добу від експлантації зародків.
Частота утворення калусів I типу, %	Процентне відношення кількості зародків, які утворили калуси I типу, до загальної кількості культивованих зародків на 30-у добу від експлантації зародків.
Частота утворення калусів II типу, %	Процентне відношення кількості зародків, які утворили калуси II типу, до загальної кількості культивованих зародків на 30-у добу від експлантації зародків.
Частота збереження калусів II типу, %	Процентне відношення кількості калусів, які зберегли морфогенність на 120-у добу субкультивування, до загальної кількості культивованих зародків.
Питома сира маса калусів II типу, мг	Відношення сирої маси (мг) всіх проаналізованих калусів, отриманих на 60-у добу субкультивування, до загальної кількості проаналізованих калусів.
Загальна частота регенерації, %	Процентне відношення кількості калусів, які характеризувалися будь-яким типом регенерації (утворення пагону, листкоподібних структур), до загальної кількості культивованих калусів на 30-у добу після трансплантації на середовище для регенерації.
Ефективна частота регенерації, %	Процентне відношення кількості калусів, які сформували 1-5 і більше пагонів (не листкоподібних структур), до загальної кількості культивованих калусів на 30-у добу після трансплантації на середовище для регенерації.
Частота органогенезу, %	Процентне відношення кількості рослин-регенерантів, які утворилися шляхом органогенезу, до загальної кількості отриманих рослин-регенерантів за весь період регенерації.
Частота ембріодогенезу, %	Процентне відношення кількості рослин-регенерантів, які утворилися шляхом ембріодогенезу, до загальної кількості отриманих рослин-регенерантів за весь період регенерації.
Кількість рослин-регенерантів на 100 калусів ($R/100Ca$), шт./100 калусів	Кількість отриманих рослин-регенерантів у перерахунку на 100 культивованих калусів за весь період регенерації.
Приживаність рослин-регенерантів у ґрунті, %	Процентне відношення кількості рослин-регенерантів R_0 , які прижилися у ґрунті, до загальної кількості висаджених у ґрунт рослин-регенерантів R_0 . Показник фіксується через 14 діб після перенесення рослин у ґрунт в умови <i>in vivo</i> .
Вживаність рослин-регенерантів, %	Процентне відношення кількості рослин-регенерантів R_0 , які завершили вегетацію, до загальної кількості рослин-регенерантів R_0 , отриманих у чашках Петрі. Показник фіксується після закінчення вегетації рослин R_0 .

Таблиця А.6

Вміст речовин у живильних середовищах, використаних в генетично-інженерних дослідженнях, мг/л

Речовина	Позначення середовища				
	Б1	Б2	Б3	Б4	Б5
Амоній азотнокислий	-	-	1650	-	1650
Амоній сірчаноокислий	463	463	-	463	—
Калій азотнокислий	2830	2830	1900	2830	1900
Калій фосфорнокислий однозаміщений	400	400	170	400	170
Магній сірчаноокислий семиводний	185	185	370	185	370
Кальцій хлористий двоводний	166	166	440	166	440
Калій йодистий	0,80	0,80	0,83	0,80	0,83
Борна кислота	1,60	1,60	6,20	1,60	6,20
Марганець сірчаноокислий чотириводний	4,40	4,40	22,30	4,40	22,30
Цинк сірчаноокислий семиводний	1,50	1,50	8,60	1,50	8,60
Натрій молібденовоокислий двоводний	-	-	0,25	-	0,25
Мідь сірчаноокисла п'ятиводна	-	-	0,025	-	0,025
Кобальт хлористий шестиводний	-	-	0,025	-	0,025
Залізо сірчаноокисле семиводне	27,80	27,80	27,80	27,80	27,80
Натрій етилендіамінтетраоцтовоокислий двоводний	37,50	37,50	37,30	37,50	37,30
Тіамін солянокислий	1,0	1,0	0,1	1,0	0,1
Піридоксин солянокислий	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Нікотинова кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Гліцин	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Гідролізат казеїну	100	-	-	-	-
Інозитол	100	100	-	100	50
L-пролін	690	300	300	300	345
Нітрат срібла	10	10	10	10	-
Сахароза	20 000	20 000	20 000	20 000	15 000
2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота	1,0	1,0	0,1	1,0	-
Абсцизова кислота	0,1	0,1	-	0,1	-
Дикамба	0,5	0,5	-	-	-
6-бензиламінопурин	-	-	0,1	-	-
Фосфінотрицин	-	10,0	5,0	-	-
Агар	7000	7000	6000	7000	5500
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

Таблиця А.7

Визначення та розрахунок показників генетичної трансформації у кукурудзи

Показник	Визначення
Частота транзійентної експресії гена <i>uidA</i> , %	Процентне відношення кількості калусів, які виявили блакитно-синє забарвлення за реакцією з β -глюкуронідазою в присутності субстрату X-gluc, до загальної кількості білістично оброблених калусів конструкцією з геном <i>uidA</i> . Рівень транзійентної експресії оцінювали за інтенсивністю забарвлення в балах від 1 до 5 (бал 1 – найменша інтенсивність, бал 5 – найбільша інтенсивність). Оцінку проводили на четверту добу після пофарбування за реакцією з β -глюкуронідазою в присутності субстрату X-gluc.
Частота трансформованих калусів (ЧТ1), %	Процентне відношення кількості <i>bar</i> -позитивних калусів до кількості білістично оброблених та стійких до фосфінотрицину калусів. Оцінку проводили через два місяці після обробки.
Частота фосфінотрицинстійких калусів (ЧТ2), %	Процентне відношення кількості фосфінотрицинстійких калусів до кількості білістично оброблених калусів, які культивувалися на селективному середовищі з фосфінотрицином. Оцінку проводили на 30-ту добу від білістичної обробки.
Частота фосфінотрицинстійких рослин-регенерантів T_0 (ЧТ3), рослин/100 калусів	Кількість рослин-регенерантів T_0 , стійких до фосфінотрицину, отриманих на 100 білістично оброблених і культивованих на селективному середовищі з фосфінотрицином калусів. Оцінку проводили на 30 добу культивування на середовищі ініціації регенерації (75 діб загального культивування).
Частота виживаності на гербіцидному фоні рослин, отриманих в поколіннях від самозапилення T_2 - T_6 після білістичної трансформації вихідного генотипу (ЧВ), %	Процентне відношення кількості, отриманих в поколіннях від самозапилення T_2 - T_6 після білістичної трансформації вихідного генотипу рослин, що вижили, до кількості рослин, оброблених гербіцидом «Баста» TM .

Додаток Б

Додаткові матеріали до розділу 3

Таблиця Б.1

SNP-паспорт лінії кукурудзи ДК2668

(Гомозиготність 99,2%, показник генного різноманіття 0,1675)

1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	TT	51	AA	99	GG	145	CC	191	GG	241	AA	288	AA	338	GG
2	AA	52	CC	100	GG	146	AA	192	GG	242	AA	289	AA	339	GG
3	AG	53	GG	101	AA	147	AA	195	GG	244	AA	290	CC	340	AA
4	GG	54	CC	102	GG	148	AA	196	AA	245	AA	291	AA	341	GG
5	AA	55	AA	103	TT	149	GG	197	GG	246	TT	292	AA	342	CC
6	GG	56	AA	104	CC	150	GG	198	GG	247	GG	293	CC	343	GG
7	GG	57	GG	105	GG	151	AA	199	AA	248	AA	294	AA	344	GG
8	AA	58	GG	106	GG	152	GG	200	AA	249	GG	295	GG	345	GG
9	AA	59	AA	107	GG	153	GG	201	AA	250	GG	296	AA	346	TT
11	GG	60	CC	108	CC	154	CC	202	AA	251	AA	297	AA	347	CC
12	CC	61	CC	109	GG	155	GG	203	AA	252	GG	298	AA	348	GG
13	GG	62	TT	110	CC	156	GG	204	CC	253	GG	299	CC	349	AA
15	GG	63	GG	111	CC	157	CC	205	GG	254	GG	300	AA	350	GG
16	AA	64	AA	112	AA	158	AA	206	AA	255	GG	301	CC	351	AA
17	GG	65	AA	113	TT	159	CC	207	AA	256	AA	302	GG	352	TT
18	AA	66	CC	114	AA	160	GG	208	AA	257	AA	304	AA	353	AA
19	GG	68	TT	115	GG	161	AA	209	AA	258	AA	305	AA	354	GG
20	GG	69	AA	116	AA	162	GG	210	AA	259	AA	306	AA	355	CC
21	GG	71	TT	117	AA	163	GG	211	TT	260	CC	308	GG	356	GG
22	CC	72	GG	118	AA	164	CC	212	AA	261	??	309	AA	357	AA
23	AA	73	CC	119	GG	165	AA	213	CC	262	GG	310	GG	358	GG
24	GG	74	CC	120	GG	166	AA	214	CC	263	GG	311	AA	359	GG
25	GG	75	GG	121	CC	167	CC	217C	GG	264	GG	312	GG	360	AA
26	AA	76	GG	122	GG	168	AA	218	AA	265	CC	313	AA	361	CC
27	AA	77	GG	123	GG	169	GG	219	GG	266	GG	314	GG	362	AA
28	AA	78	GG	124	CC	170	AA	220	GG	267	AA	315	AA	363	CC
29	GG	79	GG	125	GG	171	AA	221	GG	268	AA	316	CC	364	GG
30	AA	80	AA	126	GG	172	AA	222C	CC	269	GG	317	CC	365	AA
31	TT	81	AA	127	GG	173	GG	223	TT	270	CC	318	GG	366	AA
32	GG	82	AA	128	GG	174	GG	224	GG	271	CC	319	GG	367	AA
33	GG	83	GG	129	GG	175	GG	225	??	272	GG	320	GG	368	AG
34	TT	84	AA	130	GG	176	AA	226	AA	273	CC	321	GG	369	GG
35	GG	85	GG	131	CC	177	GG	227	AA	274	GG	322	GG	370	CC
36	AA	86	GG	132	AA	178	GG	228	CC	275	AA	323	GG	371	AA
37	GG	87	AA	133	CC	179	CC	229	GG	276	GG	324	GG	372	GG
39	AA	88	CC	134	GG	180	AA	230	GG	277	AA	325	AA	373	AA
40	AA	89	CC	135	CC	181	CC	231	AA	278	AA	326	GG	374	AA
41	CC	90	CC	136	CC	182	AA	232	AA	279	GG	327	CC	375	AA
42	CC	91	GG	137	GG	183	AA	233	AA	280	GG	328	AA	377	GG
43	AA	92	GG	138	CC	184	AA	234	AA	281	GG	329	AA	378	GG
44	AA	93	GG	139	GG	185	AA	235	CC	282	GG	331	TT	379	AA
45	AA	94	CC	140	GG	186	GG	236	AA	283	AA	332	GG	380	GG
46	CC	95	CC	141	CC	187	AA	237	GG	284	CC	333	AA	381	GG
47	GG	96	AA	142	GG	188	AA	238	AA	285	??	334	??	382	GG
48	AA	97	AA	143	CC	189	AA	239	AA	286	AG	335	CC	383	GG
49	AA	98	GG	144	AA	190	AA	240	GG	287	GG	337	AA	384	GG

Примітка. В заголовному рядку таблиці Б.1: 1 – номер SNP-маркера панелі BDI-III, 2 – алельний стан SNP-маркера в гомологічних сайтах гомологічних хромосом. Тут і далі назви дезоксирибонуклеотидів подаються за скороченими назвами азотистих основ: А (А) – аденін, Т (Т) – тимін, Г (Г) – гуанін, С (Ц) – цитозин, ? – відсутність сигналу.

Таблиця Б.2

Частоти мажорних і мінорних алелів SNP-маркерів у лінії кукурудзи, частка одиниці

Номер		Лінії плазми Ланкастер					Лінії неланкастерівських плазм				
		n	Частота алелів				n	Частота алелів			
хромосоми. біна	маркера		A	T	Ц	Г		A	T	Ц	Г
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.01	2	31	0,7742	—	0,2258	—	59	0,5593	—	0,4407	—
	3	28	0,8214	—	—	0,1786	55	0,8727	—	—	0,1273
	4	31	0,5806	—	—	0,4194	59	0,8814	—	—	0,1186
1.02	5	29	0,8621	—	—	0,1379	58	0,3621	—	—	0,6379
	6	28	0,1429	—	—	0,8571	58	0,6379	—	—	0,3621
1.03	7	31	0,0645	—	—	0,9355	57	0,3509	—	—	0,6491
1.04	11	31	—	—	—	1,000	60	0,0333	—	—	0,9667
	13	31	0,0968	—	—	0,9032	60	0,1500	—	—	0,8500
1.05	15	27	0,3704	—	—	0,6296	56	0,2679	—	—	0,7321
	16	29	0,7241	—	—	0,2759	58	0,3103	—	—	0,6897
1.06	18	31	1,0000	—	—	—	58	1,0000	—	—	—
	20	31	0,3226	—	—	0,6774	58	0,5000	—	—	0,5000
	21	31	0,9677	—	—	0,0323	58	0,7069	—	—	0,2931
1.07	23	30	0,9000	—	—	0,1000	57	0,8772	—	—	0,1225
1.08	25	31	—	—	0,7097	0,2903	59	—	—	0,4746	0,5254
	27	31	0,4516	—	—	0,5484	60	0,9000	—	—	0,1000
1.09	30	31	0,4516	—	—	0,5484	59	0,4237	—	—	0,5763
1.10	31	31	0,2258	0,7742	—	—	58	0,5345	0,4655	—	—
	32	31	—	—	—	1,0000	58	0,1897	—	—	0,8103
	34	30	0,2000	0,8000	—	—	59	0,5424	0,4576	—	—
1.11	35	22	0,6364	—	—	0,3636	59	0,1356	—	—	0,8644
	36	31	0,4516	—	0,5484	—	59	0,8814	—	0,1186	—
	37	31	0,5484	—	—	0,4516	59	0,1186	—	—	0,8814
	39	30	0,9000	—	—	0,1000	60	0,7167	—	—	0,2833
	40	30	0,8333	—	0,1667	—	59	0,2881	—	0,7119	—
	41	31	—	—	0,9355	0,0645	59	—	—	0,5932	0,4068
	42	31	—	—	0,9355	0,0645	59	—	—	0,5932	0,4068
	43	31	0,4516	—	—	0,5484	60	0,6500	—	—	0,3500
	46	31	0,1613	—	0,8387	—	56	0,6786	—	0,3214	—
	47	30	0,1333	—	—	0,8667	54	0,0741	—	—	0,9259
1.12	48	29	0,8276	—	—	0,1724	58	0,5172	—	—	0,4828
Кількість маркерів	31	—	26	2	7	24	—	28	2	7	24
Середнє	—	30,0	0,5346	0,7871	0,6229	0,4652	58,3	0,5057	0,4616	0,1050	0,4085
min	—	22	0,0645	0,7742	0,1667	0,0323	54	0,0333	0,4576	0,1186	0,1000
max	—	31	1,0000	0,8000	0,9355	1,0000	60	1,0000	0,4655	0,7119	0,9667
2.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2.01	51	31	0,7742	—	0,2258	—	59	0,8136	—	0,1864	—
	53	31	0,2258	—	—	0,7742	57	0,3333	—	—	0,6667
	54	31	—	—	1,0000	—	56	0,2857	—	0,7143	—
2.02	55	31	0,9032	—	0,0968	—	57	0,3860	—	0,6140	—
	56	29	0,1724	0,8276	—	—	59	0,6271	0,3729	—	—
	57	31	—	—	0,3226	0,6774	60	—	—	0,6167	0,3833
	58	31	—	—	0,3226	0,6774	60	—	—	0,6167	0,3833
	59	31	0,5806	—	—	0,4194	59	0,9322	—	—	0,0678

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	60	31	0,8065	–	0,1935	–	46	0,5000	–	0,5000	–
	61	31	0,8065	–	0,1935	–	46	0,5000	–	0,5000	–
	62	30	0,2000	0,8000	–	–	59	0,5085	0,4915	–	–
	63	25	0,2000	–	–	0,8000	58	0,4310	–	–	0,5690
2.03	64	30	0,8667	–	–	0,1333	58	0,4483	–	–	0,5517
	65	30	0,4333	0,5667	–	–	58	0,3621	0,6379	–	–
	66	31	–	–	0,9032	0,0968	58	–	–	0,5862	0,4138
2.04	68	30	0,6000	0,4000	–	–	59	0,3898	0,6102	–	–
	69	31	1,000	–	–	–	59	0,7627	–	–	0,2373
	73	30	0,6333	–	0,3667	–	58	0,5172	–	0,4828	–
	74	31	–	–	0,7742	0,2258	56	–	–	0,6607	0,3393
2.05	75	31	0,6452	–	–	0,3548	58	0,2414	–	–	0,7856
	76	30	0,8000	–	–	0,2000	56	0,5179	–	–	0,4821
	77	31	0,6129	–	–	0,3871	59	0,7288	–	–	0,2712
2.06	78	31	0,8387	–	–	0,1613	60	0,7667	–	–	0,2333
	79	31	0,8387	–	–	0,1613	60	0,7667	–	–	0,2333
	80	20	0,5500	–	0,4500	–	53	0,6604	–	0,3396	–
	81	30	0,2333	–	–	0,7667	59	0,4746	–	–	0,5254
	82	30	0,2333	–	–	0,7667	57	0,4561	–	–	0,5439
2.07	83	30	–	–	0,9333	0,0667	58	–	–	0,3103	0,6897
	86	29	0,6552	–	–	0,3448	58	0,3276	–	–	0,6724
	87	30	0,2333	–	0,7667	–	59	0,7119	–	0,2881	–
2.08	90	29	–	–	0,9655	0,0345	58	–	–	0,7069	0,2931
	91	31	0,0968	–	–	0,9032	59	0,5593	–	–	0,4407
	92	31	0,0968	–	–	0,9032	59	0,5593	–	–	0,4407
2.09	93	30	0,7333	–	–	0,2667	58	0,3793	–	–	0,6207
2.10	381	30	0,4667	–	–	0,5333	43	0,8140	–	–	0,1860
Кількість маркерів	35	–	28	4	14	22	–	29	4	14	23
Середнє	–	30,0	0,5442	0,6486	0,5367	0,4388	57,0	0,5435	0,5281	0,5088	0,4361
min	–	20	0,0968	0,4000	0,0968	0,0345	43	0,2414	0,3729	0,1864	0,0678
max	–	31	1,0000	0,8276	1,0000	0,9032	60	0,9322	0,6379	0,7143	0,7856
3.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3.01	96	30	0,9333	–	–	0,0667	58	0,3621	–	–	0,6379
	97	30	0,8667	0,1333	–	–	58	0,3448	0,6552	–	–
	98	31	0,0323	–	–	0,9677	60	0,0833	–	–	0,9167
	99	31	–	–	–	1,000	60	0,2833	–	–	0,7167
3.02	100	30	–	–	–	1,000	60	0,1667	–	–	0,8333
3.03	102	30	–	–	–	1,000	60	0,1500	–	–	0,8500
	103	31	0,7097	0,2903	–	–	57	0,3684	0,6316	–	–
	104	30	–	–	0,3000	0,7000	59	–	–	0,9153	0,0847
	105	30	0,0667	–	–	0,9333	57	0,5789	–	–	0,4211
3.04	106	17	0,8824	–	–	0,1176	52	0,6923	–	–	0,3077
	107	31	0,0645	–	–	0,9355	60	0,3667	–	–	0,6333
	108	28	–	–	0,0714	0,9286	56	–	–	0,2500	0,7500
	109	17	0,8824	–	–	0,1176	53	0,6981	–	–	0,3019
	110	30	0,8333	–	0,1667	–	60	0,5500	–	0,4500	–
	111	30	0,8333	–	0,1667	–	60	0,5500	–	0,4500	–
	112	27	0,2222	–	–	0,7778	58	0,6034	–	–	0,3966
	114	30	0,2000	–	0,8000	–	59	0,6102	–	0,3898	–

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3.05	116	31	0,8710	–	–	0,1290	58	0,6562	–	–	0,3448
3.06	119	30	0,2333	–	–	0,7667	59	0,1017	–	–	0,8983
	120	30	0,1000	–	–	0,9000	58	0,5345	–	–	0,4655
	121	31	0,1290	–	0,8710	–	59	0,3051	–	0,6949	–
3.07	122	31	–	–	–	1,000	60	0,5333	–	–	0,4667
	123	31	0,0323	–	–	0,9677	60	0,1667	–	–	0,8333
	124	31	–	–	1,000	–	60	–	–	0,8000	0,2000
	125	31	0,1290	–	–	0,8710	58	0,6379	–	–	0,3621
3.08	126	31	0,1290	–	–	0,8710	56	0,3393	–	–	0,6607
	127	31	0,7742	–	–	0,2258	59	0,2712	–	–	0,7288
3.09	128	29	0,2759	–	–	0,7241	58	0,3276	–	–	0,6724
	129	29	0,2759	–	–	0,7241	58	0,3276	–	–	0,6724
	130	28	0,7143	–	–	0,2857	58	0,6724	–	–	0,3276
3.10	132	31	0,5161	–	0,4839	–	60	0,8333	–	0,1667	–
Кількість маркерів	31	–	24	2	8	23	–	28	2	8	24
Середнє	–	29,3	0,4461	0,2118	0,4825	0,6961	58,3	0,4327	0,6434	0,5146	0,5618
min	–	17	0,0323	0,1333	0,0714	0,0667	52	0,0833	0,6316	0,1667	0,0847
max	–	31	0,9333	0,2903	1,0000	1,0000	60	0,8333	0,6552	0,9153	0,9167
4.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4.01	134	31	0,5806	–	–	0,4194	60	0,1000	–	–	0,9000
	135	31	–	–	0,2903	0,7097	60	–	–	0,7667	0,2333
	136	30	0,2667	–	0,7333	–	60	0,0667	–	0,9333	–
	138	23	–	–	0,3043	0,6957	57	–	–	0,1053	0,8947
	139	30	–	–	0,0667	0,9333	58	–	–	0,1207	0,8793
4.02	140	31	0,2258	–	–	0,7742	60	0,2167	–	–	0,7833
	141	29	–	–	0,3448	0,6552	58	–	–	0,3448	0,6552
	142	31	0,2258	–	–	0,7742	60	0,2167	–	–	0,7833
4.03	144	30	0,8667	0,1333	–	–	60	0,6833	0,3167	–	–
	145	31	0,2581	–	0,7419	–	59	0,7627	–	0,2373	–
4.04	147	31	0,6774	–	–	0,3226	58	0,7069	–	–	0,2931
	148	31	0,6774	–	–	0,3226	58	0,7069	–	–	0,2931
	149	31	0,9677	–	–	0,0323	60	0,9000	–	–	0,1000
	150	31	0,2581	–	–	0,7419	57	0,3509	–	–	0,6491
4.05	151	31	0,9677	–	–	0,0323	58	0,2414	–	–	0,7586
	152	30	0,2000	–	–	0,8000	58	0,3621	–	–	0,6379
	153	26	0,6538	–	–	0,3462	52	0,5577	–	–	0,4423
4.06	154	31	0,0323	–	0,9677	–	58	0,5690	–	0,4310	–
	155	31	0,2903	–	–	0,7097	58	0,3103	–	–	0,6897
	371	31	0,4839	–	–	0,5161	58	0,5172	–	–	0,4828
4.07	158	28	0,7500	0,2500	–	–	32	0,6563	0,3438	–	–
	384	30	–	–	–	1,0000	60	–	–	–	1,0000
4.08	160	30	0,0667	–	–	0,9333	58	0,3276	–	–	0,6724
	161	28	0,6786	–	–	0,3214	56	0,7679	–	–	0,2321
	162	30	0,7333	–	–	0,2667	60	0,6833	–	–	0,3167
	163	30	0,7333	–	–	0,2667	60	0,6833	–	–	0,3167
	164	31	–	–	0,9355	0,0645	59	–	–	0,7627	0,2373
	165	31	0,4194	–	–	0,5806	59	0,6271	–	–	0,3729
	166	31	0,4194	–	–	0,5806	59	0,6271	–	–	0,3729
	167	31	–	–	0,6774	0,3226	59	–	–	0,3898	0,6102

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4.08	168	31	0,2581	–	–	0,7419	58	0,4310	–	–	0,5690
4.09	169	31	0,7097	–	–	0,2903	58	0,5862	–	–	0,4138
	170	31	0,9032	–	–	0,0968	59	0,5932	–	–	0,4068
	171	31	0,8065	–	0,1935	–	59	0,5085	–	0,4915	–
	172	30	0,6333	–	0,3667	–	59	0,4915	–	0,5085	–
	173	30	–	–	0,7667	0,2333	60	–	–	0,2500	0,7500
4.10	174	31	0,6129	–	–	0,3871	58	0,7931	–	–	0,2069
	175	31	0,6129	–	–	0,3871	59	0,7797	–	–	0,2203
	176	31	0,9032	–	–	0,0968	60	0,8833	–	–	0,1167
Кількість маркерів	39	–	31	2	12	32	–	31	2	12	32
Середнє	–	30,2	0,5443	0,1917	0,5324	0,4798	57,9	117,3337	0,3303	0,4451	0,5091
min	–	23	0,0323	0,1333	0,0667	0,0323	32	0,0667	0,3167	0,1053	0,1000
max	–	31	0,9677	0,2500	0,9677	1,0000	60	3621,0000	0,3438	0,9333	1,0000
5.00	177	30	0,2000	–	–	0,8000	56	0,2679	–	–	0,7321
	178	30	0,2333	–	–	0,7667	57	0,2982	–	–	0,7018
	179	30	0,4000	–	0,6000	–	57	0,2807	–	0,7193	–
	180	31	0,1935	–	–	0,8065	59	0,2712	–	–	0,7288
5.01	181	29	0,0345	–	0,9655	–	58	0,7069	–	0,2931	–
	185	31	0,0323	–	0,9677	–	58	0,6724	–	0,3276	–
	186	31	0,1935	–	–	0,8065	59	0,2203	–	–	0,7797
5.02	187	30	0,7333	–	–	0,2667	60	0,8667	–	–	0,1333
	188	31	1,0000	–	–	–	58	0,5862	–	–	0,4138
	189	31	1,0000	–	–	–	59	0,9661	–	–	0,0339
5.03	190	30	0,8000	0,2000	–	–	60	0,1500	0,8500	–	–
	191	29	0,7931	–	–	0,2069	58	0,7069	–	–	0,2931
	192	31	0,2581	–	–	0,7419	58	0,7241	–	–	0,2759
	195	31	0,0323	–	–	0,9677	59	0,4915	–	–	0,5085
	197	29	0,1724	–	–	0,8276	58	0,6897	–	–	0,3103
	198	29	0,1724	–	–	0,8276	57	0,6842	–	–	0,3158
	201	31	1,0000	–	–	–	60	0,7833	–	–	0,2167
	202	30	0,2000	–	0,8000	–	59	0,4068	–	0,5932	–
	203	31	0,2258	–	0,7742	–	59	0,4068	–	0,5932	–
5.04	204	31	0,1613	–	0,8387	–	54	0,3519	–	0,6481	–
	205	31	0,5161	–	–	0,4839	58	0,3966	–	–	0,6034
	206	30	0,6333	0,3667	–	–	58	0,7759	0,2241	–	–
	207	30	0,6333	0,3667	–	–	58	0,7759	0,2241	–	–
	208	31	0,5161	–	–	0,4839	57	0,5614	–	–	0,4386
	209	31	0,5161	–	–	0,4839	57	0,5614	–	–	0,4386
	210	31	0,3226	–	–	0,6774	57	0,2982	–	–	0,7018
	211	31	0,5484	0,4516	–	–	55	0,5636	0,4364	–	–
	213	30	0,5667	–	–	0,4333	56	0,2321	–	–	0,7679
5.05	215	31	0,3548	–	0,6452	–	58	0,1724	–	0,8276	–
	216	31	0,3548	–	0,6452	–	58	0,1724	–	0,8276	–
	218	29	0,2069	–	–	0,7931	57	0,2281	–	–	0,7719
5.06	219	31	0,5806	–	–	0,4194	59	0,7797	–	–	0,2203
	221	30	0,4000	–	–	0,6000	60	0,5333	–	–	0,4667
5.07	223	30	0,6333	0,3667	–	–	58	0,4310	0,5690	–	–
	224	30	0,3667	–	–	0,6333	57	0,0351	–	–	0,9649
5.08	226	31	0,5806	–	–	0,4194	60	0,333	–	–	0,6667

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5.08	227	23	0,3478	—	—	0,6522	46	0,6087	—	—	0,3913
	375	30	0,2333	—	—	0,7667	58	0,3276	—	—	0,6724
5.09	230	31	0,0645	—	—	0,9355	60	0,5333	—	—	0,4667
Кількість маркерів	39	—	39	5	8	23	—	39	5	8	26
Середнє	—	30,2	0,4157	0,3503	0,7796	0,6435	57,7	0,4834	0,4607	0,6037	0,5006
min	—	23	0,0323	0,2000	0,6000	0,2069	46	0,0351	0,2241	0,2931	0,0339
max	—	31	1,0000	0,4516	0,9677	0,9677	60	0,9661	0,8500	0,8276	0,9649
6.00	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6.01	232	31	0,1613	—	—	0,8387	60	0,1167	—	—	0,8833
	233	30	0,8333	0,1667	—	—	57	0,5439	0,4561	—	—
6.01	237	29	0,0345	—	—	0,9655	56	0,4286	—	—	0,5714
	238	31	0,9032	—	—	0,0968	59	0,5932	—	—	0,4068
	239	31	0,1613	0,8387	—	—	60	0,2833	0,7167	—	—
	378	31	0,5806	—	—	0,4194	59	0,6780	—	—	0,3220
	379	31	0,4194	—	—	0,5806	59	0,3390	—	—	0,6610
6.02	240	30	0,7333	—	—	0,2667	58	0,1897	—	—	0,8103
6.03	245	30	1,0000	—	—	—	59	0,7797	—	0,2203	—
	246	30	0,1000	0,9000	—	—	59	0,1186	0,8814	—	—
6.04	380	31	0,5806	—	—	0,4194	59	0,7797	—	—	0,2203
6.05	248	31	1,0000	—	—	—	59	0,6949	—	—	0,3051
	249	31	0,0968	—	—	0,9032	58	0,5172	—	—	0,4828
	250	31	0,2258	—	—	0,7742	57	0,2807	—	—	0,7193
	251	31	0,8710	—	—	0,1290	60	0,9667	—	—	0,0333
	253	29	0,1379	—	—	0,8621	55	0,2909	—	—	0,7091
	254	29	0,1034	—	—	0,8966	55	0,2364	—	—	0,7636
	255	30	0,6667	—	—	0,3333	57	0,7368	—	—	0,2632
	256	31	0,8065	—	—	0,1935	60	0,1167	—	—	0,8833
6.07	257	31	0,4194	—	—	0,5806	59	0,4746	—	—	0,5254
	258	30	0,4000	—	—	0,6000	59	0,5932	—	—	0,4068
	259	31	0,4194	—	—	0,5806	59	0,4746	—	—	0,5254
6.08	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Кількість маркерів	22	—	22	3	0	17	—	22	3	1	18
Середнє	—	30,5	0,4843	0,6351	—	0,5553	58,3	0,4651	0,6847	0,2203	0,5274
min	—	29	0,0345	0,1667	—	0,0968	55	0,1167	0,4561	0,2203	0,0333
max	—	31	1,0000	0,9000	—	0,9655	60	0,9667	0,8814	0,2203	0,8833
7.00	262	30	0,1333	—	—	0,8667	58	0,0862	—	—	0,9138
7.01	263	31	—	—	0,3548	0,6452	59	—	—	0,6441	0,3559
	264	31	0,2258	—	—	0,7742	59	0,6441	—	—	0,3559
7.02	265	20	—	—	0,9500	0,0500	57	—	—	0,5614	0,4386
	266	31	—	—	—	1,0000	60	0,2167	—	—	0,7833
	267	31	1,0000	—	—	—	60	0,6833	—	0,3167	—
	268	31	1,0000	—	—	—	60	0,9667	—	—	0,0333
	269	31	0,0323	—	—	0,9677	57	0,5614	—	—	0,4386
7.03	270	31	0,5161	—	0,4839	—	58	0,3276	—	0,6724	—
	271	30	0,0333	—	0,9667	—	60	0,2500	—	0,7500	—
	272	26	0,4231	—	—	0,5769	53	0,5283	—	—	0,4717
7.04	273	31	—	—	0,4194	0,5806	59	—	—	0,9322	0,0678
7.05	274	30	0,1333	—	—	0,8667	57	0,6140	—	—	0,3860

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7.05	275	30	0,8000	–	–	0,2000	59	0,4407	–	–	0,5593
	278	31	0,5484	–	–	0,4516	59	0,6610	–	–	0,3390
	279	31	0,0968	–	–	0,9032	59	0,1864	–	–	0,8136
7.06	280	30	0,6667	–	–	0,3333	60	0,3667	–	–	0,6333
	370	30	–	–	0,4333	0,5667	59	–	–	0,7797	0,2203
Кількість маркерів	18	–	13	0	6	14	–	14	0	7	15
Середнє	–	29,8	0,4315	–	0,6014	0,6273	58,5	0,4667	–	0,6652	0,4540
min	–	20	0,0323	–	0,3548	0,0500	53	0,0862	–	0,3167	0,0333
max	–	31	1,0000	–	0,9667	1,0000	60	0,9667	–	0,9322	0,9138
8.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8.01	282	29	0,7931	–	–	0,2069	58	0,3793	–	–	0,6207
	283	30	0,2333	–	–	0,7667	59	0,6441	–	–	0,3559
	284	31	–	–	0,9355	0,0645	60	–	–	0,8500	0,1500
	285	29	0,7241	–	–	0,2759	39	0,7436	–	–	0,2564
	286	29	0,3103	–	–	0,6897	40	0,3500	–	–	0,6500
	288	31	0,8387	–	0,1613	–	59	0,1864	–	0,8136	–
8.02	290	31	–	–	0,4839	0,5161	59	–	–	0,8644	0,1356
	291	30	0,2667	–	0,7333	–	58	0,6207	–	0,3793	–
	292	28	0,8571	–	–	0,1429	59	0,7627	–	–	0,2373
8.03	293	31	0,0323	–	0,9677	–	58	0,1034	–	0,8966	–
	294	30	0,8667	–	–	0,1333	58	0,2759	–	–	0,7241
	295	31	0,1290	–	–	0,8710	54	0,7593	–	–	0,2407
	297	31	1,0000	–	–	–	58	0,4483	–	–	0,5517
	298	31	0,3548	–	–	0,6452	58	0,2759	–	–	0,7241
8.04	299	31	0,6452	–	0,3548	–	59	0,7797	–	0,2203	–
	300	31	0,3548	–	–	0,6452	59	0,2203	–	–	0,7797
	301	31	–	–	0,6452	0,3548	58	–	–	0,2241	0,7759
	302	31	0,9032	–	–	0,0968	58	0,6034	–	–	0,3966
8.05	304	31	0,5161	–	–	0,4839	59	0,2542	–	–	0,7458
	305	31	0,2581	–	–	0,7419	60	0,4833	–	–	0,5167
	306	31	0,2581	–	–	0,7419	60	0,4833	–	–	0,5167
8.06	308	31	–	–	0,4516	0,5484	59	–	–	0,1356	0,8644
	309	31	0,8710	–	–	0,1290	58	0,7759	–	–	0,2241
8.07	311	31	0,3548	–	–	0,6452	58	0,8103	–	–	0,1897
	312	30	0,0333	–	–	0,9667	58	0,2414	–	–	0,7586
8.08	313	29	0,4828	–	–	0,5172	59	0,3220	–	–	0,6780
	314	31	0,4194	–	–	0,5806	60	0,7500	–	–	0,2500
	315	29	0,4828	–	–	0,5172	59	0,3220	–	–	0,6780
8.09	316	31	0,0645	–	0,9355	–	60	0,1500	–	0,8500	–
	318	27	–	–	0,1111	0,8889	57	–	–	0,3158	0,6842
Кількість маркерів	30	–	25	0	10	24	–	25	0	10	25
Середнє	–	30,3	0,4820	–	0,5780	0,5071	57,3	0,4698	–	0,5550	0,5082
min	–	27	0,0323	–	0,1111	0,0645	39	0,1034	–	0,1356	0,1356
max	–	31	1,0000	–	0,9677	0,9667	60	0,8103	–	0,8966	0,8644
9.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9.01	319	31	0,1613	–	–	0,8387	60	0,5167	–	–	0,4833

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
9.01	320	31	–	–	0,4839	0,5161	59	–	–	0,3390	0,6610
	321	30	0,0667	–	–	0,9333	60	0,4000	–	–	0,6000
9.02	323	31	0,1290	–	–	0,8710	60	0,3833	–	–	0,6167
	324	31	0,6774	–	–	0,3226	60	0,4500	–	–	0,5500
	383	20	0,0500	–	–	0,9500	52	0,0577	–	–	0,9423
09.03	327	31	–	–	1,0000	–	60	0,1167	–	0,8833	–
	329	31	0,4839	–	–	0,5161	60	0,9167	–	–	0,0833
9.04	331	30	0,0667	0,9333	–	–	58	0,7586	0,2414	–	–
	332	30	0,0667	–	–	0,9333	58	0,8448	–	–	0,1552
	333	31	0,3226	0,6774	–	–	58	0,8621	0,1379	–	–
	334	29	0,9310	–	–	0,0690	41	0,1707	–	–	0,8293
	335	30	0,0333	–	0,9667	–	58	0,7241	–	0,2759	–
9.05	338	29	0,1379	–	–	0,8621	60	0,4333	–	–	0,5667
9.06	340	31	0,8710	–	–	0,1290	59	0,8644	–	–	0,1356
9.07	341	31	0,6774	–	–	0,3226	59	0,3729	–	–	0,6271
	342	31	–	–	1,0000	–	50	–	–	0,8400	0,1600
9.08	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Кількість маркерів	17	–	14	2	4	12	–	15	2	4	13
Середнє	–	29,9	0,3339	0,8054	0,8627	0,6053	57,2	0,5248	0,1897	0,5846	0,4931
min	–	20	0,0333	0,6774	0,4839	0,0690	41	0,0577	0,1379	0,2759	0,0833
max	–	31	0,9310	0,9333	1,0000	0,9500	60	0,9167	0,2414	0,8833	0,9423
10.00	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10.01	343	26	0,8077	–	–	0,1923	53	0,1887	–	–	0,8113
	344	31	0,8065	–	–	0,1935	58	0,2759	–	–	0,7241
10.02	345	31	0,8065	–	–	0,1935	58	0,2759	–	–	0,7241
	347	31	–	–	0,8065	0,1935	59	–	–	0,5254	0,4746
	348	31	0,7097	–	–	0,2903	58	0,1379	–	–	0,8621
10.03	349	30	0,9333	–	–	0,0667	59	0,8814	–	–	0,1186
	350	31	0,2581	–	–	0,7419	59	0,4576	–	–	0,5424
	351	31	0,9355	–	–	0,0645	60	0,8000	–	–	0,2000
	352	31	0,8065	0,1935	–	–	58	0,3793	0,6207	–	–
10.04	353	31	0,1935	–	–	0,8065	58	0,6207	–	–	0,3793
	355	31	0,7742	–	0,2258	–	59	0,4237	–	0,5763	–
	356	31	–	–	–	1,0000	60	0,4000	–	–	0,6000
	357	31	0,9355	–	–	0,0645	60	0,6167	–	–	0,3833
	358	30	0,6333	–	–	0,3667	60	0,3500	–	–	0,6500
10.05	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10.06	359	31	0,0645	–	–	0,9355	56	0,6786	–	–	0,3214
	360	31	0,9677	–	–	0,0323	59	0,7627	–	–	0,2373
	361	31	0,0645	–	0,9355	–	60	0,1500	–	0,8500	–
10.07	362	31	0,0645	–	–	0,9355	60	0,1500	–	–	0,8500
	364	30	–	–	0,2000	0,8000	60	–	–	0,3833	0,6167
	365	30	0,1667	–	–	0,8333	59	0,4068	–	–	0,5932
	366	28	0,7500	–	–	0,2500	58	0,4828	–	–	0,5172
	367	31	0,9355	–	–	0,0645	60	0,7500	–	–	0,2500
	372	31	–	–	–	1,0000	59	–	–	0,1356	0,8644
Кількість маркерів	23	–	19	1	4	20	–	20	1	5	20
Середнє	–	30,5	0,6112	0,1935	0,5420	0,4513	58,7	0,4594	0,6207	0,4941	0,5360
min	–	26	0,0645	0,1935	0,2000	0,0323	53	0,1379	0,6207	0,1356	0,1186
max	–	31	0,9677	0,1935	0,9355	1,0000	60	0,8814	0,6207	0,8500	0,8644

Примітка. n – кількість проаналізованих ліній; в таблиці жирним шрифтом показано частоту мажорного алеля, звичайним шрифтом – частоту мінорного алеля.

Таблиця Б.3

Попарні генетичні SNP-дистанції між лініями кукурудзи, частка одиниці

Лінія	ДК296 МВ	ДК1129	ДК2668	ДК3023 зСзМ	ДК3626	ДК6342	ДК2965 зСзМ	ДК4263	ДКД9053	ДКВ3451	ДК680 МВ	ДК8143	ДК517 МВ	ДК534 зСзМ	ДК117 зСМВ	ДК231зС
ДК296МВ	0	0,2491	0,4561	0,2982	0,2281	0,2526	0,2596	0,2912	0,3018	0,2246	0,3649	0,3825	0,4175	0,2351	0,2561	0,3263
ДК1129	0,2491	0	0,3965	0,4070	0,3439	0,3684	0,3439	0,3895	0,3895	0,3474	0,4070	0,4702	0,4561	0,3649	0,3509	0,4316
ДК2668	0,4561	0,3965	0	0,3895	0,4105	0,3895	0,3719	0,3930	0,3860	0,4140	0,4070	0,4596	0,4035	0,4281	0,4175	0,4316
ДК3023зСзМ	0,2982	0,4070	0,3895	0	0,3018	0,3474	0,2000	0,2526	0,0386	0,2105	0,3579	0,3298	0,3579	0,2140	0,2491	0,2246
ДК3626	0,2281	0,3439	0,4105	0,3018	0	0,2351	0,3228	0,2596	0,2842	0,2596	0,3719	0,3719	0,4035	0,2526	0,2772	0,2912
ДК6342	0,2526	0,3684	0,3895	0,3474	0,2351	0	0,3368	0,3193	0,3298	0,3193	0,4000	0,3930	0,4421	0,3228	0,2842	0,3825
ДК2965зСзМ	0,2596	0,3439	0,3719	0,2000	0,3228	0,3368	0	0,2947	0,2035	0,2456	0,4035	0,3333	0,3684	0,2456	0,2596	0,3053
ДК4263	0,2912	0,3895	0,3930	0,2526	0,2596	0,3193	0,2947	0	0,2421	0,1368	0,3123	0,2842	0,3930	0,1544	0,1930	0,2491
ДКД9053	0,3018	0,3895	0,3860	0,0386	0,2842	0,3298	0,2035	0,2421	0	0,2140	0,3544	0,3123	0,3544	0,2105	0,2491	0,2246
ДКВ3451	0,2246	0,3474	0,4140	0,2105	0,2596	0,3193	0,2456	0,1368	0,2140	0	0,3474	0,2737	0,3509	0,0807	0,1649	0,1860
ДК680МВ	0,3649	0,4070	0,4070	0,3579	0,3719	0,4000	0,4035	0,3123	0,3544	0,3474	0	0,3789	0,4596	0,3789	0,3649	0,3895
ДК8143	0,3825	0,4702	0,4596	0,3298	0,3719	0,3930	0,3333	0,2842	0,3123	0,2737	0,3789	0	0,4526	0,2456	0,2526	0,3088
ДК517МВ	0,4175	0,4561	0,4035	0,3579	0,4035	0,4421	0,3684	0,3930	0,3544	0,3509	0,4596	0,4526	0	0,3298	0,3789	0,3649
ДК534зСзМ	0,2351	0,3649	0,4281	0,2140	0,2526	0,3228	0,2456	0,1544	0,2105	0,0807	0,3789	0,2456	0,3298	0	0,1298	0,1579
ДК117зСМВ	0,2561	0,3509	0,4175	0,2491	0,2772	0,2842	0,2596	0,1930	0,2491	0,1649	0,3649	0,2526	0,3789	0,1298	0	0,2491
ДК231зС	0,3263	0,4316	0,4316	0,2246	0,2912	0,3825	0,3053	0,2491	0,2246	0,1860	0,3895	0,3088	0,3649	0,1579	0,2491	0
ДК6337зСзМ	0,3579	0,3965	0,3193	0,3193	0,3228	0,3825	0,3439	0,2667	0,3123	0,2491	0,3965	0,3719	0,4140	0,2140	0,3123	0,2667
ДК2953зСзМ	0,2877	0,3368	0,4035	0,2316	0,3263	0,3474	0,2211	0,3228	0,2491	0,2667	0,3895	0,3439	0,3509	0,2281	0,2281	0,3158
ДК366М	0,1895	0,3298	0,4561	0,3368	0,2456	0,2702	0,2842	0,2737	0,3474	0,2561	0,3860	0,3649	0,4456	0,2316	0,2421	0,2947
ДК3044	0,3754	0,4246	0,3965	0,3228	0,3930	0,4211	0,2947	0,2456	0,3123	0,2526	0,3860	0,2246	0,3719	0,2281	0,2386	0,3228
ДК633266МВ	0,2561	0,3789	0,4667	0,3579	0,2491	0,2877	0,3474	0,3298	0,3474	0,3053	0,4035	0,3860	0,3965	0,2351	0,2842	0,3158
ДК298зСзМ	0,1614	0,3263	0,4246	0,3333	0,2421	0,2842	0,2877	0,3193	0,3333	0,2842	0,3895	0,3509	0,4140	0,2246	0,2772	0,3053
ДК212МВ	0,4281	0,3825	0,3404	0,4070	0,3930	0,4035	0,4351	0,4632	0,3965	0,4737	0,4070	0,4561	0,4456	0,4211	0,4316	0,4491
ДК370МВ	0,3579	0,4421	0,4702	0,3123	0,3368	0,4000	0,3228	0,2456	0,2877	0,2491	0,3684	0,1544	0,4316	0,2140	0,2456	0,3088
ДК236СВ	0,4947	0,4211	0,4456	0,5123	0,4912	0,4772	0,4877	0,4667	0,4877	0,5018	0,4491	0,4667	0,5193	0,5088	0,4526	0,4842
ДК633325МВ	0,3228	0,4140	0,4105	0,2842	0,3088	0,3684	0,3158	0,2491	0,2842	0,1684	0,3860	0,2982	0,3719	0,1649	0,1895	0,2211
Мо17	0,3193	0,3789	0,4211	0,2281	0,3088	0,3579	0,2351	0,2070	0,2105	0,1684	0,3719	0,1965	0,3544	0,1474	0,1614	0,2526
Oh43	0,4772	0,4526	0,4596	0,4702	0,4807	0,4351	0,5088	0,4737	0,4561	0,4842	0,4105	0,5333	0,4912	0,4947	0,4842	0,5228
ДК633	0,2316	0,3614	0,4246	0,2140	0,2491	0,3228	0,2456	0,1509	0,2105	0,0772	0,3789	0,2456	0,3298	0,0035	0,1298	0,1614
ДК267МВ	0,4211	0,3684	0,2561	0,4702	0,3649	0,4175	0,4526	0,4421	0,4561	0,4702	0,3965	0,5228	0,4877	0,4737	0,4561	0,4667
ДК427	0,4351	0,4877	0,3930	0,4316	0,4070	0,4211	0,4842	0,3719	0,4175	0,4561	0,2596	0,4386	0,4842	0,4386	0,4105	0,4702
ДК2980зСМВ	0,2982	0,4000	0,4140	0,3439	0,3860	0,3860	0,3684	0,3474	0,3368	0,3579	0,1860	0,3719	0,4596	0,3298	0,3158	0,4035
ДК2061СВзМ	0,4281	0,4386	0,4000	0,4947	0,4281	0,4632	0,4737	0,4877	0,4982	0,4912	0,4596	0,5018	0,5123	0,4912	0,4877	0,4632
ДК2064СВзМ	0,3965	0,4070	0,4281	0,4561	0,4175	0,4596	0,4386	0,4667	0,4596	0,4561	0,4421	0,4877	0,4947	0,4667	0,4702	0,4456
ДК2579СВзМ	0,4526	0,4351	0,4140	0,4386	0,4596	0,4632	0,4421	0,4772	0,4351	0,4737	0,4491	0,4947	0,5053	0,4807	0,4912	0,4386
ДКД2725СВзМ	0,5439	0,6140	0,6281	0,6035	0,5965	0,5754	0,6070	0,5789	0,6000	0,6000	0,4947	0,6246	0,6982	0,6175	0,5895	0,6246
ДК3641	0,4351	0,4982	0,4842	0,5053	0,4175	0,4491	0,5053	0,4281	0,5018	0,4561	0,3649	0,4842	0,5719	0,4702	0,4596	0,4667
ДК7736	0,3930	0,4070	0,4175	0,4842	0,3579	0,4105	0,4596	0,4211	0,4807	0,4386	0,4175	0,4772	0,5158	0,4667	0,4456	0,4281
ДК2777	0,4281	0,4316	0,4456	0,5053	0,4351	0,4596	0,4807	0,4632	0,5018	0,4842	0,4316	0,4772	0,5228	0,4877	0,4737	0,4526
ДК3016	0,3965	0,4316	0,4140	0,5053	0,3719	0,3965	0,4491	0,4316	0,4877	0,4842	0,4105	0,4947	0,5509	0,4877	0,4351	0,4772
ДК257	0,4526	0,4175	0,4456	0,4807	0,4737	0,4561	0,4596	0,4702	0,4772	0,4842	0,4737	0,4807	0,5474	0,5088	0,4912	0,4561
ДК7443	0,4877	0,4947	0,4175	0,4982	0,4807	0,5018	0,4667	0,4912	0,4982	0,5158	0,4912	0,5053	0,5368	0,5228	0,5263	0,4982
ДК7446	0,3895	0,4351	0,4281	0,4877	0,3754	0,4175	0,4421	0,4351	0,4772	0,4842	0,4281	0,4947	0,5404	0,4877	0,4421	0,4772
ДК7431	0,3930	0,4456	0,4246	0,4877	0,3684	0,4140	0,4386	0,4140	0,4772	0,4596	0,3649	0,4561	0,5333	0,4632	0,4105	0,4737

ДК4074	0,4000	0,4211	0,4246	0,4807	0,3684	0,4316	0,4351	0,4316	0,4702	0,4561	0,4281	0,4526	0,5404	0,4596	0,4386	0,4456
ДК744М	0,4211	0,4386	0,4070	0,4561	0,3825	0,4351	0,4316	0,4351	0,4456	0,4596	0,4561	0,4491	0,5263	0,4667	0,4596	0,4526
ДК721	0,3930	0,4105	0,4386	0,4632	0,3754	0,4140	0,4491	0,4000	0,4667	0,4316	0,4526	0,4912	0,5088	0,4421	0,4456	0,4211
ДКВ3151М	0,4281	0,4246	0,4316	0,5298	0,4140	0,4456	0,5053	0,4912	0,5263	0,5158	0,4702	0,4947	0,5649	0,5193	0,4877	0,4877
ДК772М	0,3860	0,4000	0,4246	0,4772	0,3509	0,4070	0,4491	0,4175	0,4737	0,4316	0,4246	0,4877	0,5088	0,4596	0,4351	0,4211
ДК772	0,4070	0,4211	0,4316	0,4947	0,3719	0,4211	0,4702	0,4281	0,4912	0,4561	0,4351	0,5018	0,5193	0,4807	0,4596	0,4456
ДК710	0,4386	0,4386	0,4421	0,5263	0,4070	0,4526	0,4877	0,4737	0,5158	0,5053	0,4421	0,4772	0,5298	0,4491	0,4596	0,4632
ДК411М	0,4105	0,4175	0,4140	0,4912	0,3860	0,4316	0,4526	0,4421	0,4877	0,4667	0,4246	0,4596	0,5298	0,4632	0,4561	0,4281
ДК315СВ3М	0,4737	0,4877	0,4211	0,4632	0,4877	0,5123	0,4667	0,5193	0,4632	0,5193	0,4667	0,4947	0,4912	0,4877	0,5018	0,4807
ДК301СВ3М	0,4351	0,4456	0,4421	0,5333	0,4105	0,4632	0,4667	0,4702	0,5263	0,4877	0,4386	0,4596	0,5333	0,4491	0,4421	0,4526
ДК233МВ	0,4561	0,4982	0,4246	0,4281	0,4246	0,4737	0,4211	0,4877	0,4140	0,4877	0,4807	0,4702	0,4877	0,4877	0,4807	0,4386
ДК281МВ	0,4211	0,4772	0,4211	0,4491	0,3719	0,4316	0,4456	0,4105	0,4386	0,4316	0,3614	0,4386	0,5368	0,4456	0,4667	0,4421
МС1294	0,4526	0,4737	0,4035	0,3509	0,4526	0,4421	0,4000	0,4246	0,3684	0,4456	0,4281	0,4772	0,4772	0,4667	0,4246	0,4596
ДК2285СВ3М	0,4561	0,4140	0,4421	0,5053	0,4175	0,4456	0,4456	0,4491	0,5018	0,4772	0,4246	0,5018	0,5088	0,4912	0,4877	0,4632
ДК2831СВ	0,4175	0,4526	0,3825	0,4316	0,3789	0,4246	0,4211	0,3789	0,4421	0,4070	0,3754	0,4421	0,5123	0,4211	0,4596	0,4070
ДК3983	0,4737	0,4737	0,4632	0,4772	0,3719	0,4456	0,4807	0,4035	0,4596	0,4421	0,4526	0,4702	0,5474	0,4421	0,4211	0,4070
ДК4169	0,4246	0,4175	0,4316	0,5123	0,4000	0,4632	0,4702	0,4772	0,4947	0,4702	0,4807	0,4702	0,5333	0,4772	0,4596	0,4737
ДК5002СВ3М	0,4526	0,5088	0,4491	0,4912	0,4070	0,4211	0,4947	0,4316	0,4737	0,5018	0,3860	0,4737	0,5228	0,4877	0,4175	0,4702
МС4169	0,4140	0,4246	0,4386	0,4912	0,3789	0,4526	0,4702	0,4596	0,4772	0,4596	0,4561	0,4702	0,5228	0,4702	0,4491	0,4667
ДК4315СВ	0,4772	0,4632	0,4386	0,5404	0,4456	0,4596	0,5158	0,5228	0,5088	0,5544	0,4947	0,5368	0,5544	0,5474	0,5088	0,5719
МС4456	0,4632	0,4947	0,4807	0,4772	0,4667	0,4667	0,4912	0,5158	0,4667	0,4842	0,4561	0,4351	0,5053	0,4877	0,4842	0,4351
ДК4402	0,5193	0,5053	0,5193	0,5333	0,5193	0,4912	0,5684	0,5544	0,5368	0,5544	0,5404	0,5579	0,5825	0,5789	0,5298	0,5439
А188	0,4351	0,4912	0,3965	0,4246	0,4491	0,4421	0,4526	0,4456	0,4140	0,4421	0,4000	0,4386	0,4842	0,4807	0,4842	0,4596
СН131	0,4456	0,4351	0,4246	0,4105	0,4561	0,4561	0,4456	0,4386	0,4035	0,4421	0,4632	0,4877	0,4772	0,4632	0,4632	0,4456
РЛ561	0,5544	0,5123	0,5053	0,5404	0,5053	0,5509	0,5333	0,5018	0,5263	0,5193	0,5298	0,5509	0,5895	0,5228	0,5368	0,5053
ДК3527	0,4456	0,4632	0,4211	0,4491	0,4667	0,4737	0,4596	0,4877	0,4456	0,4772	0,4211	0,4421	0,5018	0,4947	0,4737	0,4842
F2	0,4632	0,5088	0,4281	0,4140	0,4912	0,4842	0,4596	0,4947	0,4140	0,4772	0,4737	0,4842	0,4386	0,4526	0,4491	0,3649
ДК270	0,4211	0,4421	0,4105	0,4105	0,4000	0,4316	0,4912	0,4596	0,4070	0,4561	0,4175	0,4947	0,4491	0,4491	0,3965	0,4456
ДК2723С	0,3860	0,4421	0,4386	0,3789	0,4140	0,4421	0,4596	0,4351	0,3895	0,4281	0,3684	0,4596	0,4596	0,4421	0,4070	0,3930
ДК273МВ	0,4000	0,4351	0,4596	0,4702	0,4351	0,4386	0,4667	0,4526	0,4421	0,4632	0,4316	0,4737	0,4842	0,4667	0,4000	0,4737
ДК2003С3М	0,4807	0,4912	0,4456	0,4070	0,4772	0,5193	0,4702	0,5123	0,4105	0,4667	0,4947	0,4912	0,4281	0,4281	0,4772	0,3754
ДК2	0,4632	0,4877	0,4596	0,4526	0,4632	0,5053	0,4316	0,4491	0,4561	0,4035	0,4421	0,3965	0,4737	0,3930	0,4632	0,4316
ДК8213	0,4842	0,4877	0,4596	0,4456	0,4491	0,4737	0,4842	0,5018	0,4281	0,4842	0,4667	0,5088	0,4772	0,4982	0,5368	0,4386
ВР731	0,4912	0,4947	0,4877	0,4947	0,4702	0,4947	0,5018	0,4912	0,4772	0,5228	0,5088	0,5368	0,5158	0,5123	0,5404	0,5228
ДК3902	0,4386	0,4526	0,3825	0,4526	0,4175	0,4807	0,4316	0,4526	0,4632	0,4526	0,4947	0,4386	0,4842	0,4526	0,4737	0,4561
ДК2346	0,5298	0,5088	0,5439	0,5018	0,5158	0,5614	0,4912	0,4667	0,4982	0,4772	0,4877	0,4737	0,5158	0,4947	0,5368	0,5404
ДК2396	0,4316	0,4351	0,4140	0,4105	0,4281	0,4632	0,4000	0,3930	0,4140	0,3649	0,3965	0,4035	0,4667	0,3965	0,4456	0,4035
ДК3642	0,5333	0,5158	0,5018	0,5825	0,5018	0,5684	0,5719	0,5509	0,5579	0,5649	0,5088	0,5860	0,5719	0,5789	0,6140	0,5368
ДК2323МВ	0,4456	0,4632	0,4000	0,4070	0,4351	0,4877	0,4070	0,4140	0,4105	0,3930	0,4316	0,3789	0,5053	0,4000	0,4561	0,4035
ДК239МВ	0,4632	0,4246	0,4070	0,4526	0,4596	0,4807	0,4491	0,4421	0,4421	0,4105	0,4140	0,4246	0,4772	0,4491	0,4526	0,4632
В73	0,6281	0,5719	0,5614	0,6772	0,6351	0,6351	0,6842	0,6421	0,6596	0,6667	0,6070	0,6140	0,6491	0,6737	0,6491	0,6246
В14	0,4982	0,5263	0,4877	0,4912	0,4912	0,5404	0,5649	0,5825	0,4737	0,5509	0,5333	0,5509	0,5439	0,5474	0,5509	0,5439
В37	0,4912	0,5018	0,4947	0,5193	0,5158	0,5193	0,5263	0,5404	0,5228	0,5158	0,5404	0,5649	0,5579	0,5263	0,5158	0,5158
ДК23773М	0,5088	0,5228	0,4632	0,4982	0,4912	0,5649	0,5298	0,5368	0,4947	0,5053	0,4947	0,4596	0,5158	0,4877	0,5298	0,4772
ДК377С	0,5158	0,5298	0,4982	0,5228	0,5228	0,5474	0,5789	0,5509	0,5228	0,5228	0,5193	0,4912	0,5614	0,5228	0,5614	0,4947
ДК3673С	0,4211	0,4596	0,4842	0,4491	0,4175	0,4246	0,4912	0,4912	0,4456	0,4667	0,4211	0,4702	0,4912	0,4316	0,4175	0,4386
ДК232МВ	0,5088	0,5088	0,4596	0,4737	0,4947	0,5649	0,4491	0,4982	0,4702	0,4596	0,5088	0,4456	0,4982	0,4421	0,5123	0,4421

Лінія	ДК6337 зСзМ	ДК2953 зСзМ	ДК366 М	ДК304 4	ДК633266 МВ	ДК298 зСзМ	ДК212 МВ	ДК370 МВ	ДК236 СВ	ДК633325 МВ	Мо17	Oh43	ДК633	ДК267 МВ	ДК427	ДК2980 зСМВ
ДК296МВ	0,3579	0,2877	0,1895	0,3754	0,2561	0,1614	0,4281	0,3579	0,4947	0,3228	0,3193	0,4772	0,2316	0,4211	0,4351	0,2982
ДК1129	0,3965	0,3368	0,3298	0,4246	0,3789	0,3263	0,3825	0,4421	0,4211	0,4140	0,3789	0,4526	0,3614	0,3684	0,4877	0,4000
ДК2668	0,3193	0,4035	0,4561	0,3965	0,4667	0,4246	0,3404	0,4702	0,4456	0,4105	0,4211	0,4596	0,4246	0,2561	0,3930	0,4140
ДК3023зСзМ	0,3193	0,2316	0,3368	0,3228	0,3579	0,3333	0,4070	0,3123	0,5123	0,2842	0,2281	0,4702	0,2140	0,4702	0,4316	0,3439
ДК3626	0,3228	0,3263	0,2456	0,3930	0,2491	0,2421	0,3930	0,3368	0,4912	0,3088	0,3088	0,4807	0,2491	0,3649	0,4070	0,3860
ДК6342	0,3825	0,3474	0,2702	0,4211	0,2877	0,2842	0,4035	0,4000	0,4772	0,3684	0,3579	0,4351	0,3228	0,4175	0,4211	0,3860
ДК2965зСзМ	0,3439	0,2211	0,2842	0,2947	0,3474	0,2877	0,4351	0,3228	0,4877	0,3158	0,2351	0,5088	0,2456	0,4526	0,4842	0,3684
ДК4263	0,2667	0,3228	0,2737	0,2456	0,3298	0,3193	0,4632	0,2456	0,4667	0,2491	0,2070	0,4737	0,1509	0,4421	0,3719	0,3474
ДКД9053	0,3123	0,2491	0,3474	0,3123	0,3474	0,3333	0,3965	0,2877	0,4877	0,2842	0,2105	0,4561	0,2105	0,4561	0,4175	0,3368
ДКВ3451	0,2491	0,2667	0,2561	0,2526	0,3053	0,2842	0,4737	0,2491	0,5018	0,1684	0,1684	0,4842	0,0772	0,4702	0,4561	0,3579
ДК680МВ	0,3965	0,3895	0,3860	0,3860	0,4035	0,3895	0,4070	0,3684	0,4491	0,3860	0,3719	0,4105	0,3789	0,3965	0,2596	0,1860
ДК8143	0,3719	0,3439	0,3649	0,2246	0,3860	0,3509	0,4561	0,1544	0,4667	0,2982	0,1965	0,5333	0,2456	0,5228	0,4386	0,3719
ДК517МВ	0,4140	0,3509	0,4456	0,3719	0,3965	0,4140	0,4456	0,4316	0,5193	0,3719	0,3544	0,4912	0,3298	0,4877	0,4842	0,4596
ДК534зСзМ	0,2140	0,2281	0,2316	0,2281	0,2351	0,2246	0,4211	0,2140	0,5088	0,1649	0,1474	0,4947	0,0035	0,4737	0,4386	0,3298
ДК117зСМВ	0,3123	0,2281	0,2421	0,2386	0,2842	0,2772	0,4316	0,2456	0,4526	0,1895	0,1614	0,4842	0,1298	0,4561	0,4105	0,3158
ДК231зС	0,2667	0,3158	0,2947	0,3228	0,3158	0,3053	0,4491	0,3088	0,4842	0,2211	0,2526	0,5228	0,1614	0,4667	0,4702	0,4035
ДК6337зСзМ	0	0,3614	0,3333	0,3298	0,3649	0,3088	0,3719	0,3544	0,5193	0,2982	0,3263	0,4912	0,2175	0,2772	0,3684	0,3509
ДК2953зСзМ	0,3614	0	0,2912	0,3158	0,3158	0,2877	0,4281	0,3193	0,4947	0,3088	0,2386	0,5228	0,2316	0,4421	0,4175	0,3298
ДК366М	0,3333	0,2912	0	0,3649	0,2632	0,1965	0,4281	0,3404	0,5193	0,3018	0,3263	0,4737	0,2351	0,4246	0,4702	0,3298
ДК3044	0,3298	0,3158	0,3649	0	0,3860	0,3684	0,4211	0,1789	0,5018	0,3018	0,2000	0,4667	0,2281	0,4491	0,4140	0,3719
ДК633266МВ	0,3649	0,3158	0,2632	0,3860	0	0,1509	0,4000	0,3509	0,5263	0,3439	0,3404	0,5123	0,2386	0,4316	0,4105	0,3368
ДК298зСзМ	0,3088	0,2877	0,1965	0,3684	0,1509	0	0,3895	0,3263	0,5088	0,3298	0,3439	0,4842	0,2281	0,3965	0,4140	0,2772
ДК212МВ	0,3719	0,4281	0,4281	0,4211	0,4000	0,3895	0	0,4386	0,4877	0,4456	0,4596	0,3649	0,4211	0,2175	0,3193	0,3649
ДК370МВ	0,3544	0,3193	0,3404	0,1789	0,3509	0,3263	0,4386	0	0,4982	0,2947	0,1965	0,5088	0,2140	0,5053	0,4491	0,3368
ДК236СВ	0,5193	0,4947	0,5193	0,5018	0,5263	0,5088	0,4877	0,4982	0	0,4772	0,4632	0,4491	0,5123	0,5228	0,4667	0,4877
ДК633325МВ	0,2982	0,3088	0,3018	0,3018	0,3439	0,3298	0,4456	0,2947	0,4772	0	0,2035	0,4772	0,1649	0,4526	0,4667	0,3930
Мо17	0,3263	0,2386	0,3263	0,2000	0,3404	0,3439	0,4596	0,1965	0,4632	0,2035	0	0,4737	0,1474	0,4982	0,4596	0,3579
Oh43	0,4912	0,5228	0,4737	0,4667	0,5123	0,4842	0,3649	0,5088	0,4491	0,4772	0,4737	0	0,4947	0,4386	0,3719	0,4175
ДК633	0,2175	0,2316	0,2351	0,2281	0,2386	0,2281	0,4211	0,2140	0,5123	0,1649	0,1474	0,4947	0	0,4702	0,4386	0,3298
ДК267МВ	0,2772	0,4421	0,4246	0,4491	0,4316	0,3965	0,2175	0,5053	0,5228	0,4526	0,4982	0,4386	0,4702	0	0,3193	0,3754
ДК427	0,3684	0,4175	0,4702	0,4140	0,4105	0,4140	0,3193	0,4491	0,4667	0,4667	0,4596	0,3719	0,4386	0,3193	0	0,2877
ДК2980зСМВ	0,3509	0,3298	0,3298	0,3719	0,3368	0,2772	0,3649	0,3368	0,4877	0,3930	0,3579	0,4175	0,3298	0,3754	0,2877	0
ДК2061СВзМ	0,4632	0,4807	0,4596	0,5053	0,4807	0,4351	0,4772	0,5193	0,3193	0,4526	0,5018	0,4912	0,4877	0,4596	0,5158	0,4877
ДК2064СВзМ	0,4526	0,4667	0,4491	0,4772	0,4702	0,4281	0,4772	0,4877	0,3544	0,4526	0,4702	0,4807	0,4667	0,4491	0,5158	0,4632
ДК2579СВзМ	0,4526	0,5088	0,4947	0,5123	0,5018	0,4632	0,4807	0,5263	0,4456	0,4877	0,4596	0,4807	0,4912	0,4912	0,5123	0,4877
ДКД2725СВзМ	0,6211	0,6175	0,5719	0,6281	0,6070	0,5719	0,6561	0,6105	0,6351	0,6105	0,6070	0,6526	0,6175	0,6281	0,6105	0,4667
ДК3641	0,4667	0,4596	0,4632	0,4912	0,4491	0,4211	0,4772	0,4842	0,4175	0,4491	0,4702	0,4982	0,4667	0,4561	0,4070	0,4421
ДК7736	0,3965	0,4491	0,4281	0,4772	0,4281	0,4035	0,4737	0,4737	0,3895	0,4421	0,4772	0,4982	0,4632	0,4140	0,4491	0,4632
ДК2777	0,4737	0,4912	0,4491	0,4947	0,4456	0,4035	0,5123	0,4877	0,3333	0,4456	0,4982	0,4772	0,4877	0,4702	0,5123	0,4772
ДК3016	0,4456	0,4456	0,4211	0,4877	0,4596	0,4175	0,4632	0,5123	0,3719	0,4421	0,5053	0,4526	0,4842	0,4140	0,3965	0,4491
ДК257	0,4737	0,5298	0,5053	0,5018	0,5404	0,4982	0,4526	0,5298	0,2246	0,4737	0,5123	0,4246	0,5053	0,4737	0,4772	0,5018
ДК7443	0,4842	0,4842	0,5123	0,4947	0,5158	0,5018	0,4877	0,5228	0,4070	0,4842	0,5088	0,5123	0,5193	0,4702	0,4842	0,4912
ДК7446	0,4737	0,4491	0,4281	0,4982	0,4491	0,4140	0,5018	0,4982	0,3509	0,4316	0,4947	0,4807	0,4842	0,4702	0,4351	0,4596
ДК7431	0,4421	0,4456	0,4140	0,4632	0,4667	0,4070	0,4807	0,4772	0,3509	0,4035	0,4737	0,4632	0,4596	0,4246	0,3930	0,4070
ДК4074	0,4386	0,4386	0,4175	0,4702	0,4702	0,4246	0,4667	0,4737	0,3825	0,4421	0,4807	0,5053	0,4561	0,4281	0,4632	0,4632
ДК744М	0,4596	0,4561	0,4456	0,4596	0,4667	0,4421	0,4772	0,4632	0,3614	0,4386	0,4702	0,5053	0,4632	0,4596	0,4947	0,4807

ДК721	0,4070	0,4737	0,4351	0,4982	0,4281	0,4105	0,4737	0,4702	0,3614	0,4386	0,4702	0,5053	0,4386	0,4421	0,4632	0,4842
ДКВ3151М	0,4912	0,4842	0,4491	0,5193	0,4807	0,4316	0,4596	0,5193	0,3614	0,4561	0,5333	0,4877	0,5158	0,4421	0,4807	0,4807
ДК772М	0,3895	0,4561	0,4246	0,4842	0,4211	0,4000	0,4807	0,4807	0,3825	0,4491	0,4842	0,5088	0,4561	0,4211	0,4596	0,4702
ДК772	0,4105	0,4667	0,4421	0,4982	0,4386	0,4175	0,4912	0,4982	0,3965	0,4632	0,4982	0,5158	0,4772	0,4316	0,4596	0,4772
ДК710	0,4386	0,4456	0,4386	0,4737	0,4246	0,4000	0,4456	0,4702	0,3404	0,4456	0,5053	0,4842	0,4526	0,4491	0,4491	0,4526
ДК411М	0,4281	0,4561	0,4140	0,4667	0,4526	0,4070	0,4632	0,4737	0,3158	0,4070	0,4772	0,4702	0,4667	0,4456	0,4596	0,4632
ДК315СВ3М	0,4596	0,4702	0,5263	0,4842	0,4772	0,4456	0,4596	0,5053	0,3649	0,5018	0,4982	0,4807	0,4877	0,4632	0,4877	0,4526
ДК301СВ3М	0,4175	0,4175	0,4281	0,4667	0,4526	0,3789	0,4491	0,4667	0,3649	0,4316	0,4947	0,4807	0,4526	0,4421	0,4316	0,4316
ДК233МВ	0,5053	0,4596	0,5018	0,4667	0,4596	0,4281	0,4667	0,4807	0,4632	0,4702	0,4351	0,4702	0,4877	0,4596	0,4947	0,4842
ДК281МВ	0,4421	0,4491	0,4175	0,4632	0,4246	0,4140	0,4526	0,4351	0,4807	0,4667	0,4632	0,5123	0,4421	0,4316	0,4456	0,4035
МС1294	0,4596	0,3965	0,4807	0,4386	0,4842	0,4632	0,4596	0,4737	0,4596	0,4421	0,4140	0,4246	0,4667	0,4386	0,4246	0,4596
ДК2285СВ3М	0,4807	0,4737	0,4667	0,4772	0,4807	0,4596	0,4982	0,4772	0,3789	0,4526	0,4842	0,4491	0,4912	0,4947	0,4491	0,5053
ДК2831СВ	0,4105	0,4386	0,4035	0,4596	0,4421	0,3965	0,4842	0,4596	0,4281	0,4386	0,4456	0,4842	0,4175	0,4281	0,4421	0,4316
ДК3983	0,4351	0,5018	0,4175	0,4456	0,4632	0,4561	0,4702	0,4702	0,4737	0,4316	0,4737	0,4667	0,4386	0,4421	0,4561	0,5018
ДК4169	0,4772	0,4596	0,4491	0,4912	0,4982	0,4351	0,4912	0,4842	0,3474	0,4140	0,4632	0,4807	0,4737	0,4842	0,5123	0,5158
ДК5002СВ3М	0,4807	0,4807	0,4456	0,4772	0,4667	0,4596	0,4526	0,5053	0,3895	0,4596	0,4807	0,4807	0,4877	0,4596	0,3404	0,4526
МС4169	0,4877	0,4491	0,4526	0,4947	0,4877	0,4386	0,5088	0,4877	0,3509	0,4035	0,4596	0,4877	0,4667	0,4912	0,5158	0,5123
ДК4315СВ	0,4877	0,5053	0,5158	0,5404	0,5368	0,4912	0,4877	0,5649	0,4386	0,5333	0,5123	0,4877	0,5474	0,4070	0,4281	0,4982
МС4456	0,4596	0,4877	0,4632	0,4807	0,4772	0,4561	0,4140	0,4526	0,4877	0,4491	0,4737	0,5158	0,4877	0,4632	0,4982	0,4947
ДК4402	0,5474	0,5965	0,5404	0,5860	0,5895	0,5649	0,4632	0,5614	0,4632	0,5474	0,5860	0,4632	0,5754	0,5123	0,5368	0,5860
А188	0,4105	0,4842	0,4772	0,4526	0,4842	0,4456	0,4105	0,4877	0,4632	0,4667	0,4526	0,4807	0,4807	0,4211	0,4281	0,4456
Chi31	0,4667	0,4912	0,4807	0,4211	0,4772	0,4526	0,4421	0,4982	0,4702	0,4632	0,4456	0,3825	0,4632	0,4211	0,4421	0,5018
PLS61	0,5263	0,5509	0,5404	0,5368	0,5544	0,5474	0,5439	0,5684	0,5684	0,5263	0,5368	0,5368	0,5228	0,5439	0,5298	0,5544
ДК3527	0,4596	0,4632	0,4947	0,4807	0,4807	0,4316	0,4456	0,4982	0,4772	0,4596	0,4807	0,4737	0,4912	0,4316	0,4281	0,4456
F2	0,4175	0,4737	0,5193	0,4632	0,4211	0,4140	0,4035	0,4912	0,4632	0,4386	0,4737	0,4596	0,4561	0,4140	0,4702	0,4456
ДК270	0,4070	0,4491	0,4667	0,4421	0,4000	0,4070	0,3649	0,4947	0,5228	0,4702	0,4702	0,3965	0,4456	0,3439	0,3298	0,4000
ДК2723С	0,4175	0,4491	0,4246	0,4561	0,4000	0,3789	0,4035	0,4737	0,4702	0,4561	0,4316	0,4175	0,4456	0,4035	0,3474	0,3930
ДК273МВ	0,4842	0,4772	0,4456	0,4491	0,4351	0,4035	0,4316	0,5193	0,4421	0,4702	0,4632	0,4246	0,4702	0,4316	0,4351	0,4246
ДК2003С3М	0,3895	0,4561	0,5088	0,4702	0,4351	0,4246	0,4211	0,4912	0,4561	0,4526	0,4596	0,4316	0,4316	0,4351	0,4632	0,4807
ДК2	0,4316	0,4000	0,4596	0,4000	0,4421	0,4351	0,4632	0,4246	0,5474	0,4316	0,3789	0,4912	0,3965	0,4491	0,4281	0,4526
ДК8213	0,4772	0,4912	0,4982	0,5123	0,5088	0,4947	0,4772	0,5439	0,4456	0,4982	0,4842	0,4421	0,4982	0,4912	0,4842	0,4982
ВР731	0,5439	0,4982	0,4877	0,5474	0,5193	0,5123	0,5088	0,5404	0,4456	0,5298	0,5193	0,4737	0,5123	0,5404	0,4947	0,5088
ДК3902	0,4596	0,4211	0,4702	0,4667	0,4737	0,4316	0,4807	0,4632	0,4702	0,4596	0,4351	0,4947	0,4491	0,4456	0,4702	0,5053
ДК2346	0,5368	0,5018	0,5193	0,4351	0,5825	0,5789	0,5263	0,4912	0,5263	0,4842	0,4561	0,5193	0,4912	0,5404	0,5298	0,5404
ДК2396	0,4175	0,3930	0,4351	0,4246	0,4561	0,4351	0,4807	0,4456	0,5088	0,4070	0,3509	0,4982	0,3930	0,4070	0,4316	0,4491
ДК3642	0,5614	0,5474	0,5719	0,5684	0,5825	0,5509	0,5825	0,6035	0,5193	0,5544	0,5649	0,5544	0,5754	0,5193	0,5544	0,5474
ДК2323МВ	0,4351	0,4105	0,4561	0,4351	0,4737	0,4281	0,5053	0,4140	0,4807	0,4246	0,3789	0,5018	0,3965	0,4456	0,4912	0,4561
ДК239МВ	0,4526	0,4351	0,4667	0,4456	0,4947	0,4667	0,4807	0,4737	0,4982	0,4140	0,4000	0,4807	0,4456	0,3895	0,4351	0,4807
В73	0,6421	0,6596	0,6491	0,6246	0,6772	0,6737	0,6281	0,6912	0,4632	0,6421	0,6772	0,5895	0,6772	0,5965	0,5860	0,6281
В14	0,5509	0,5088	0,5649	0,5825	0,5333	0,5368	0,4842	0,5789	0,5018	0,5333	0,5298	0,5193	0,5474	0,4912	0,4982	0,5158
В37	0,5123	0,4702	0,5018	0,5509	0,5789	0,5368	0,5298	0,6000	0,5193	0,5439	0,5123	0,5158	0,5263	0,4561	0,4912	0,5649
ДК23773М	0,4982	0,4912	0,5228	0,5263	0,5474	0,4772	0,4842	0,5158	0,4877	0,5088	0,4842	0,4912	0,4912	0,4702	0,4737	0,4912
ДК377С	0,5263	0,5368	0,5298	0,5719	0,5825	0,5333	0,5158	0,5789	0,4702	0,5123	0,5228	0,5018	0,5263	0,4842	0,5123	0,5404
ДК3673С	0,4175	0,4561	0,4456	0,4737	0,4281	0,4211	0,4421	0,4807	0,4877	0,4877	0,4596	0,4175	0,4351	0,4632	0,4070	0,4000
ДК232МВ	0,4772	0,4632	0,5018	0,4842	0,5158	0,4737	0,5474	0,4807	0,5333	0,4702	0,4281	0,5123	0,4456	0,5123	0,5614	0,5228

Лінія	ДК2061 СВзМ	ДК2064 СВзМ	ДК2579 СВзМ	ДКД2725 СВзМ	ДК3641	ДК7736	ДК2777	ДК3016	ДК257	ДК7443	ДК7446	ДК7431	ДК4074	ДК744М	ДК721	ДКВ3151М
ДК296МВ	0,4281	0,3965	0,4526	0,5439	0,4351	0,3930	0,4281	0,3965	0,4526	0,4877	0,3895	0,3930	0,4000	0,4211	0,3930	0,4281
ДК1129	0,4386	0,4070	0,4351	0,6140	0,4982	0,4070	0,4316	0,4316	0,4175	0,4947	0,4351	0,4456	0,4211	0,4386	0,4105	0,4246
ДК2668	0,4000	0,4281	0,4140	0,6281	0,4842	0,4175	0,4456	0,4140	0,4456	0,4175	0,4281	0,4246	0,4246	0,4070	0,4386	0,4316
ДК3023зСзМ	0,4947	0,4561	0,4386	0,6035	0,5053	0,4842	0,5053	0,5053	0,4807	0,4982	0,4877	0,4877	0,4807	0,4561	0,4632	0,5298
ДК3626	0,4281	0,4175	0,4596	0,5965	0,4175	0,3579	0,4351	0,3719	0,4737	0,4807	0,3754	0,3684	0,3684	0,3825	0,3754	0,4140
ДК6342	0,4632	0,4596	0,4632	0,5754	0,4491	0,4105	0,4596	0,3965	0,4561	0,5018	0,4175	0,4140	0,4316	0,4351	0,4140	0,4456
ДК2965зСзМ	0,4737	0,4386	0,4421	0,6070	0,5053	0,4596	0,4807	0,4491	0,4596	0,4667	0,4421	0,4386	0,4351	0,4316	0,4491	0,5053
ДК4263	0,4877	0,4667	0,4772	0,5789	0,4281	0,4211	0,4632	0,4316	0,4702	0,4912	0,4351	0,4140	0,4316	0,4351	0,4000	0,4912
ДКД9053	0,4982	0,4596	0,4351	0,6000	0,5018	0,4807	0,5018	0,4877	0,4772	0,4982	0,4772	0,4772	0,4702	0,4456	0,4667	0,5263
ДКВ3451	0,4912	0,4561	0,4737	0,6000	0,4561	0,4386	0,4842	0,4842	0,4842	0,5158	0,4842	0,4596	0,4561	0,4596	0,4316	0,5158
ДК680МВ	0,4596	0,4421	0,4491	0,4947	0,3649	0,4175	0,4316	0,4105	0,4737	0,4912	0,4281	0,3649	0,4281	0,4561	0,4526	0,4702
ДК8143	0,5018	0,4877	0,4947	0,6246	0,4842	0,4772	0,4772	0,4947	0,4807	0,5053	0,4947	0,4561	0,4526	0,4491	0,4912	0,4947
ДК517МВ	0,5123	0,4947	0,5053	0,6982	0,5719	0,5158	0,5228	0,5509	0,5474	0,5368	0,5404	0,5333	0,5404	0,5263	0,5088	0,5649
ДК534зСзМ	0,4912	0,4667	0,4807	0,6175	0,4702	0,4667	0,4877	0,4877	0,5088	0,5228	0,4877	0,4632	0,4596	0,4667	0,4421	0,5193
ДК117зСМВ	0,4877	0,4702	0,4912	0,5895	0,4596	0,4456	0,4737	0,4351	0,4912	0,5263	0,4421	0,4105	0,4386	0,4596	0,4456	0,4877
ДК231зС	0,4632	0,4456	0,4386	0,6246	0,4667	0,4281	0,4526	0,4772	0,4561	0,4982	0,4772	0,4737	0,4456	0,4526	0,4211	0,4877
ДК6337зСзМ	0,4632	0,4526	0,4526	0,6211	0,4667	0,3965	0,4737	0,4456	0,4737	0,4842	0,4737	0,4421	0,4386	0,4596	0,4070	0,4912
ДК2953зСзМ	0,4807	0,4667	0,5088	0,6175	0,4596	0,4491	0,4912	0,4456	0,5298	0,4842	0,4491	0,4456	0,4386	0,4561	0,4737	0,4842
ДК366М	0,4596	0,4491	0,4947	0,5719	0,4632	0,4281	0,4491	0,4211	0,5053	0,5123	0,4281	0,4140	0,4175	0,4456	0,4351	0,4491
ДК3044	0,5053	0,4772	0,5123	0,6281	0,4912	0,4772	0,4947	0,4877	0,5018	0,4947	0,4982	0,4632	0,4702	0,4596	0,4982	0,5193
ДК633266МВ	0,4807	0,4702	0,5018	0,6070	0,4491	0,4281	0,4456	0,4596	0,5404	0,5158	0,4491	0,4667	0,4702	0,4667	0,4281	0,4807
ДК298зСзМ	0,4351	0,4281	0,4632	0,5719	0,4211	0,4035	0,4035	0,4175	0,4982	0,5018	0,4140	0,4070	0,4246	0,4421	0,4105	0,4316
ДК212МВ	0,4772	0,4772	0,4807	0,6561	0,4772	0,4737	0,5123	0,4632	0,4526	0,4877	0,5018	0,4807	0,4667	0,4772	0,4737	0,4596
ДК370МВ	0,5193	0,4877	0,5263	0,6105	0,4842	0,4737	0,4877	0,5123	0,5298	0,5228	0,4982	0,4772	0,4737	0,4632	0,4702	0,5193
ДК236СВ	0,3193	0,3544	0,2526	0,6351	0,4175	0,3895	0,3333	0,3719	0,2246	0,4070	0,3509	0,3509	0,3825	0,3614	0,3614	0,3614
ДК63325МВ	0,4526	0,4526	0,4456	0,6105	0,4491	0,4421	0,4456	0,4421	0,4737	0,4842	0,4316	0,4035	0,4421	0,4386	0,4386	0,4561
Мо17	0,5018	0,4702	0,4877	0,6070	0,4702	0,4772	0,4982	0,5053	0,5123	0,5088	0,4947	0,4737	0,4807	0,4702	0,4702	0,5333
Oh43	0,4912	0,4807	0,4596	0,6526	0,4982	0,4982	0,4772	0,4526	0,4246	0,5123	0,4807	0,4632	0,5053	0,5053	0,5053	0,4877
ДК633	0,4877	0,4667	0,4807	0,6175	0,4667	0,4632	0,4877	0,4842	0,5053	0,5193	0,4842	0,4596	0,4561	0,4632	0,4386	0,5158
ДК267МВ	0,4596	0,4491	0,4912	0,6281	0,4561	0,4140	0,4702	0,4140	0,4737	0,4702	0,4702	0,4246	0,4281	0,4596	0,4421	0,4421
ДК427	0,5158	0,5158	0,5123	0,6105	0,4070	0,4491	0,5123	0,3965	0,4772	0,4842	0,4351	0,3930	0,4632	0,4947	0,4632	0,4807
ДК2980зСМВ	0,4877	0,4632	0,4877	0,4667	0,4421	0,4632	0,4772	0,4491	0,5018	0,4912	0,4596	0,4070	0,4632	0,4807	0,4842	0,4807
ДК2061СВзМ	0	0,1263	0,1614	0,5368	0,3544	0,2491	0,1579	0,2386	0,2211	0,2982	0,2561	0,2211	0,2561	0,2456	0,2386	0,2000
ДК2064СВзМ	0,1263	0	0,1544	0,5088	0,3368	0,1930	0,1439	0,2456	0,2526	0,3018	0,2316	0,2316	0,2175	0,2070	0,1825	0,1930
ДК2579СВзМ	0,1614	0,1544	0	0,5263	0,3368	0,2491	0,1684	0,2596	0,1193	0,2807	0,2456	0,2456	0,2351	0,2281	0,2105	0,2070
ДКД2725СВзМ	0,5368	0,5088	0,5263	0	0,5474	0,5018	0,4702	0,4947	0,5719	0,5614	0,5298	0,5018	0,5158	0,5333	0,5123	0,5123
ДК3641	0,3544	0,3368	0,3368	0,5474	0	0,2912	0,3228	0,2702	0,3754	0,4211	0,3228	0,2947	0,3228	0,3544	0,2947	0,2842
ДК7736	0,2491	0,1930	0,2491	0,5018	0,2912	0	0,1614	0,2000	0,3123	0,2947	0,1860	0,2140	0,2035	0,2000	0,0807	0,1860
ДК2777	0,1579	0,1439	0,1684	0,4702	0,3228	0,1614	0	0,2000	0,2667	0,3088	0,2211	0,2211	0,2211	0,2140	0,1895	0,1825
ДК3016	0,2386	0,2456	0,2596	0,4947	0,2702	0,2000	0,2000	0	0,2842	0,3088	0,1614	0,1088	0,1684	0,2140	0,2105	0,1474
ДК257	0,2211	0,2526	0,1193	0,5719	0,3754	0,3123	0,2667	0,2842	0	0,3263	0,3018	0,2807	0,2807	0,2842	0,2596	0,2561
ДК7443	0,2982	0,3018	0,2807	0,5614	0,4211	0,2947	0,3088	0,3088	0,3263	0	0,2421	0,2912	0,2140	0,1860	0,2702	0,2912
ДК7446	0,2561	0,2316	0,2456	0,5298	0,3228	0,1860	0,2211	0,1614	0,3018	0,2421	0	0,1404	0,1368	0,1053	0,1789	0,1754
ДК7431	0,2211	0,2316	0,2456	0,5018	0,2947	0,2140	0,2211	0,1088	0,2807	0,2912	0,1404	0	0,1439	0,1684	0,2070	0,1509

ДК4074	0,2561	0,2175	0,2351	0,5158	0,3228	0,2035	0,2211	0,1684	0,2807	0,2140	0,1368	0,1439	0	0,0807	0,1895	0,1719
ДК744М	0,2456	0,2070	0,2281	0,5333	0,3544	0,2000	0,2140	0,2140	0,2842	0,1860	0,1053	0,1684	0,0807	0	0,1649	0,1789
ДК721	0,2386	0,1825	0,2105	0,5123	0,2947	0,0807	0,1895	0,2105	0,2596	0,2702	0,1789	0,2070	0,1895	0,1649	0	0,1930
ДКВ3151М	0,2000	0,1930	0,2070	0,5123	0,2842	0,1860	0,1825	0,1474	0,2561	0,2912	0,1754	0,1509	0,1719	0,1789	0,1930	0
ДК772М	0,2596	0,2035	0,2456	0,5053	0,3053	0,0140	0,1754	0,2140	0,3053	0,3088	0,1860	0,2246	0,2000	0,1965	0,0807	0,2000
ДК772	0,2632	0,2105	0,2596	0,5088	0,3088	0,0316	0,1789	0,2105	0,3193	0,3053	0,1895	0,2211	0,2070	0,2035	0,0982	0,2000
ДК710	0,1895	0,1860	0,2140	0,5263	0,2982	0,1825	0,1825	0,1719	0,2702	0,3123	0,1825	0,1509	0,1684	0,1789	0,1860	0,1193
ДК411М	0,1474	0,1439	0,1649	0,4982	0,2912	0,1509	0,1404	0,1333	0,2246	0,2632	0,1474	0,1158	0,1333	0,1333	0,1439	0,0877
ДК315СВзМ	0,2246	0,2070	0,2211	0,5614	0,3719	0,3333	0,2281	0,3193	0,3088	0,3333	0,3088	0,2912	0,2842	0,2877	0,2982	0,3018
ДК301СВзМ	0,2070	0,2105	0,2316	0,5368	0,3088	0,2035	0,2000	0,1544	0,2877	0,3158	0,2035	0,1404	0,1649	0,1930	0,2140	0,1368
ДК233МВ	0,3754	0,3474	0,3754	0,5860	0,4737	0,3649	0,3860	0,4421	0,4211	0,3860	0,3965	0,4070	0,3965	0,3754	0,3614	0,4000
ДК281МВ	0,3544	0,3263	0,3719	0,5474	0,3368	0,3088	0,3263	0,3404	0,4281	0,4316	0,3509	0,3298	0,3754	0,3333	0,3123	0,3333
МС1294	0,4596	0,4561	0,4351	0,6386	0,4386	0,4246	0,4561	0,4667	0,4491	0,4175	0,4667	0,4561	0,4632	0,4561	0,4351	0,4702
ДК2285СВзМ	0,3053	0,2842	0,2982	0,5860	0,3404	0,2737	0,2877	0,2947	0,3544	0,3263	0,2561	0,2772	0,2877	0,2421	0,2526	0,2772
ДК2831СВ	0,3053	0,2702	0,3123	0,5474	0,3298	0,2667	0,2807	0,2877	0,3579	0,3684	0,2912	0,2772	0,2877	0,2702	0,2456	0,2596
ДК3983	0,4281	0,4035	0,4035	0,6105	0,4035	0,3684	0,4035	0,3614	0,3965	0,4070	0,3895	0,3684	0,3719	0,3579	0,3404	0,3474
ДК4169	0,2281	0,2281	0,2561	0,5579	0,3228	0,2386	0,2316	0,2281	0,2947	0,3123	0,2421	0,2211	0,2421	0,2421	0,2421	0,1965
ДК5002СВзМ	0,3228	0,3368	0,3368	0,5614	0,3439	0,3123	0,3298	0,2246	0,3684	0,3825	0,2667	0,2421	0,3193	0,3439	0,3263	0,2877
МС4169	0,2386	0,2211	0,2561	0,5579	0,3158	0,2246	0,2316	0,2351	0,3053	0,3193	0,2281	0,2140	0,2351	0,2281	0,2281	0,1965
ДК4315СВ	0,3965	0,3930	0,4140	0,6105	0,4456	0,3754	0,3614	0,3404	0,4246	0,4351	0,3579	0,3544	0,4070	0,4316	0,3860	0,3719
МС4456	0,4737	0,4491	0,4877	0,6947	0,4456	0,4667	0,4877	0,4947	0,4982	0,4632	0,4982	0,4947	0,4772	0,4667	0,4667	0,4912
ДК4402	0,4702	0,4456	0,4526	0,7193	0,4702	0,4421	0,4877	0,4632	0,4281	0,5158	0,4737	0,4807	0,4772	0,4737	0,4316	0,4596
А188	0,4596	0,4702	0,4772	0,6140	0,4737	0,4386	0,4561	0,4842	0,4737	0,4281	0,4772	0,4807	0,4596	0,4386	0,4667	0,4842
Сн131	0,4912	0,4807	0,4596	0,6737	0,5123	0,4667	0,4807	0,4842	0,4667	0,5018	0,5053	0,4737	0,4877	0,4912	0,4667	0,5158
PLS61	0,6105	0,6035	0,5684	0,7053	0,6281	0,5719	0,6140	0,5789	0,5614	0,5930	0,5614	0,5579	0,5474	0,5649	0,5614	0,5965
ДК3527	0,4842	0,4842	0,4982	0,6386	0,4035	0,4561	0,4596	0,4386	0,4947	0,5018	0,4807	0,4491	0,4772	0,4807	0,4737	0,4772
F2	0,4912	0,5088	0,4632	0,6877	0,5333	0,5053	0,5053	0,5263	0,4632	0,5018	0,5298	0,5263	0,5333	0,5228	0,5193	0,5088
ДК270	0,5193	0,5228	0,5053	0,6667	0,5158	0,4877	0,5123	0,4807	0,5053	0,4842	0,4842	0,4667	0,4912	0,5053	0,5053	0,5053
ДК272зС	0,4772	0,4807	0,4386	0,6175	0,4456	0,4491	0,4456	0,4561	0,4561	0,4667	0,4596	0,4351	0,4632	0,4772	0,4596	0,4982
ДК273МВ	0,4947	0,4912	0,4632	0,6456	0,5228	0,4632	0,4596	0,4702	0,4667	0,5053	0,4877	0,4491	0,4877	0,5193	0,4982	0,5193
ДК200зСзМ	0,4947	0,5053	0,4491	0,6947	0,5053	0,4596	0,4842	0,5368	0,4456	0,5018	0,5193	0,5298	0,5368	0,5053	0,4596	0,5193
ДК2	0,4982	0,4877	0,5193	0,6842	0,4632	0,4632	0,5123	0,5298	0,5298	0,4807	0,5263	0,4982	0,5018	0,5018	0,4772	0,5158
ДК8213	0,4386	0,4281	0,4000	0,6632	0,4982	0,4912	0,4667	0,4842	0,4316	0,4526	0,5053	0,4947	0,4877	0,4807	0,4842	0,5088
ВР731	0,5018	0,5018	0,5193	0,7404	0,5333	0,5789	0,5544	0,5544	0,5263	0,5649	0,5825	0,5579	0,5614	0,5649	0,5544	0,5614
ДК3902	0,3614	0,3298	0,4105	0,6175	0,4386	0,3544	0,3965	0,3614	0,4421	0,3789	0,3509	0,3298	0,3439	0,3333	0,3333	0,3193
ДК2346	0,5193	0,4877	0,5228	0,7123	0,5228	0,5053	0,5088	0,5544	0,5298	0,4842	0,5158	0,5123	0,5228	0,5053	0,5158	0,5333
ДК2396	0,4561	0,4421	0,4772	0,6421	0,4526	0,4175	0,4632	0,4947	0,4947	0,4456	0,4912	0,4561	0,4737	0,4667	0,4246	0,4807
ДК3642	0,4140	0,4316	0,4561	0,6737	0,4807	0,4491	0,4351	0,4632	0,5053	0,4912	0,4421	0,4316	0,4772	0,4456	0,4526	0,4421
ДК2323МВ	0,4667	0,4281	0,4491	0,6105	0,4526	0,4281	0,4386	0,4807	0,4982	0,4456	0,4912	0,4491	0,4667	0,4596	0,4175	0,4526
ДК239МВ	0,4386	0,4316	0,4491	0,6316	0,4667	0,4316	0,4526	0,4737	0,4632	0,4386	0,4877	0,4351	0,4842	0,4772	0,4561	0,4702
В73	0,5228	0,5614	0,5368	0,8000	0,6211	0,6105	0,5509	0,5860	0,4947	0,5895	0,5439	0,5439	0,5684	0,5474	0,6070	0,5544
В14	0,4632	0,4526	0,5088	0,7088	0,4982	0,5158	0,5123	0,5404	0,5123	0,5158	0,5404	0,5439	0,5474	0,5298	0,5158	0,5298
В37	0,5509	0,5474	0,5895	0,7579	0,5614	0,5474	0,5754	0,5684	0,5719	0,5193	0,5719	0,5439	0,5825	0,5649	0,5825	0,5649
ДК2377зМ	0,4632	0,4456	0,5088	0,6807	0,4912	0,4842	0,4702	0,5158	0,5088	0,4456	0,4877	0,4702	0,4912	0,4632	0,4807	0,4947
ДК377С	0,4877	0,4842	0,5123	0,7053	0,5368	0,5228	0,4877	0,5439	0,5088	0,4667	0,5053	0,4947	0,5263	0,4702	0,5228	0,5368
ДК367зС	0,4702	0,4526	0,4667	0,6526	0,4737	0,4632	0,4947	0,4561	0,4702	0,5158	0,4456	0,4596	0,4807	0,4772	0,4561	0,4912
ДК232МВ	0,4912	0,4807	0,4947	0,6702	0,5509	0,5088	0,4842	0,5404	0,5474	0,4982	0,5509	0,5158	0,5228	0,5123	0,5053	0,5088

Лінія	ДК772М	ДК772	ДК710	ДК411М	ДК315 СВзМ	ДК301 СВзМ	ДК233 МВ	ДК281 МВ	МС1294	ДК2285 СВзМ	ДК2831 СВ	ДК3983	ДК4169	ДК5002 СВзМ	МС4169
ДК296МВ	0,3860	0,4070	0,4386	0,4105	0,4737	0,4351	0,4561	0,4211	0,4526	0,4561	0,4175	0,4737	0,4246	0,4526	0,4140
ДК1129	0,4000	0,4211	0,4386	0,4175	0,4877	0,4456	0,4982	0,4772	0,4737	0,4140	0,4526	0,4737	0,4175	0,5088	0,4246
ДК2668	0,4246	0,4316	0,4421	0,4140	0,4211	0,4421	0,4246	0,4211	0,4035	0,4421	0,3825	0,4632	0,4316	0,4491	0,4386
ДК3023зСзМ	0,4772	0,4947	0,5263	0,4912	0,4632	0,5333	0,4281	0,4491	0,3509	0,5053	0,4316	0,4772	0,5123	0,4912	0,4912
ДК3626	0,3509	0,3719	0,4070	0,3860	0,4877	0,4105	0,4246	0,3719	0,4526	0,4175	0,3789	0,3719	0,4000	0,4070	0,3789
ДК6342	0,4070	0,4211	0,4526	0,4316	0,5123	0,4632	0,4737	0,4316	0,4421	0,4456	0,4246	0,4456	0,4632	0,4211	0,4526
ДК2965зСзМ	0,4491	0,4702	0,4877	0,4526	0,4667	0,4667	0,4211	0,4456	0,4000	0,4456	0,4211	0,4807	0,4702	0,4947	0,4702
ДК4263	0,4175	0,4281	0,4737	0,4421	0,5193	0,4702	0,4877	0,4105	0,4246	0,4491	0,3789	0,4035	0,4772	0,4316	0,4596
ДКД9053	0,4737	0,4912	0,5158	0,4877	0,4632	0,5263	0,4140	0,4386	0,3684	0,5018	0,4421	0,4596	0,4947	0,4737	0,4772
ДКВ3451	0,4316	0,4561	0,5053	0,4667	0,5193	0,4877	0,4877	0,4316	0,4456	0,4772	0,4070	0,4421	0,4702	0,5018	0,4596
ДК680МВ	0,4246	0,4351	0,4421	0,4246	0,4667	0,4386	0,4807	0,3614	0,4281	0,4246	0,3754	0,4526	0,4807	0,3860	0,4561
ДК8143	0,4877	0,5018	0,4772	0,4596	0,4947	0,4596	0,4702	0,4386	0,4772	0,5018	0,4421	0,4702	0,4702	0,4737	0,4702
ДК517МВ	0,5088	0,5193	0,5298	0,5298	0,4912	0,5333	0,4877	0,5368	0,4772	0,5088	0,5123	0,5474	0,5333	0,5228	0,5228
ДК534зСзМ	0,4596	0,4807	0,4491	0,4632	0,4877	0,4491	0,4877	0,4456	0,4667	0,4912	0,4211	0,4421	0,4772	0,4877	0,4702
ДК117зСМВ	0,4351	0,4596	0,4596	0,4561	0,5018	0,4421	0,4807	0,4667	0,4246	0,4877	0,4596	0,4211	0,4596	0,4175	0,4491
ДК231зС	0,4211	0,4456	0,4632	0,4281	0,4807	0,4526	0,4386	0,4421	0,4596	0,4632	0,4070	0,4070	0,4737	0,4702	0,4667
ДК6337зСзМ	0,3895	0,4105	0,4386	0,4281	0,4596	0,4175	0,5053	0,4421	0,4596	0,4807	0,4105	0,4351	0,4772	0,4807	0,4877
ДК2953зСзМ	0,4561	0,4667	0,4456	0,4561	0,4702	0,4175	0,4596	0,4491	0,3965	0,4737	0,4386	0,5018	0,4596	0,4807	0,4491
ДК366М	0,4246	0,4421	0,4386	0,4140	0,5263	0,4281	0,5018	0,4175	0,4807	0,4667	0,4035	0,4175	0,4491	0,4456	0,4526
ДК3044	0,4842	0,4982	0,4737	0,4667	0,4842	0,4667	0,4667	0,4632	0,4386	0,4772	0,4596	0,4456	0,4912	0,4772	0,4947
ДК633266МВ	0,4211	0,4386	0,4246	0,4526	0,4772	0,4526	0,4596	0,4246	0,4842	0,4807	0,4421	0,4632	0,4982	0,4667	0,4877
ДК298зСзМ	0,4000	0,4175	0,4000	0,4070	0,4456	0,3789	0,4281	0,4140	0,4632	0,4596	0,3965	0,4561	0,4351	0,4596	0,4386
ДК212МВ	0,4807	0,4912	0,4456	0,4632	0,4596	0,4491	0,4667	0,4526	0,4596	0,4982	0,4842	0,4702	0,4912	0,4526	0,5088
ДК370МВ	0,4807	0,4982	0,4702	0,4737	0,5053	0,4667	0,4807	0,4351	0,4737	0,4772	0,4596	0,4702	0,4842	0,5053	0,4877
ДК236СВ	0,3825	0,3965	0,3404	0,3158	0,3649	0,3649	0,4632	0,4807	0,4596	0,3789	0,4281	0,4737	0,3474	0,3895	0,3509
ДК633325МВ	0,4491	0,4632	0,4456	0,4070	0,5018	0,4316	0,4702	0,4667	0,4421	0,4526	0,4386	0,4316	0,4140	0,4596	0,4035
Мо17	0,4842	0,4982	0,5053	0,4772	0,4982	0,4947	0,4351	0,4632	0,4140	0,4842	0,4456	0,4737	0,4632	0,4807	0,4596
Об43	0,5088	0,5158	0,4842	0,4702	0,4807	0,4807	0,4702	0,5123	0,4246	0,4491	0,4842	0,4667	0,4807	0,4807	0,4877
ДК633	0,4561	0,4772	0,4526	0,4667	0,4877	0,4526	0,4877	0,4421	0,4667	0,4912	0,4175	0,4386	0,4737	0,4877	0,4667
ДК267МВ	0,4211	0,4316	0,4491	0,4456	0,4632	0,4421	0,4596	0,4316	0,4386	0,4947	0,4281	0,4421	0,4842	0,4596	0,4912
ДК427	0,4596	0,4596	0,4491	0,4596	0,4877	0,4316	0,4947	0,4456	0,4246	0,4491	0,4421	0,4561	0,5123	0,3404	0,5158
ДК2980зСМВ	0,4702	0,4772	0,4526	0,4632	0,4526	0,4316	0,4842	0,4035	0,4596	0,5053	0,4316	0,5018	0,5158	0,4526	0,5123
ДК2061СВзМ	0,2596	0,2632	0,1895	0,1474	0,2246	0,2070	0,3754	0,3544	0,4596	0,3053	0,3053	0,4281	0,2281	0,3228	0,2386
ДК2064СВзМ	0,2035	0,2105	0,1860	0,1439	0,2070	0,2105	0,3474	0,3263	0,4561	0,2842	0,2702	0,4035	0,2281	0,3368	0,2211
ДК2579СВзМ	0,2456	0,2596	0,2140	0,1649	0,2211	0,2316	0,3754	0,3719	0,4351	0,2982	0,3123	0,4035	0,2561	0,3368	0,2561
ДКД2725СВзМ	0,5053	0,5088	0,5263	0,4982	0,5614	0,5368	0,5860	0,5474	0,6386	0,5860	0,5474	0,6105	0,5579	0,5614	0,5579
ДК3641	0,3053	0,3088	0,2982	0,2912	0,3719	0,3088	0,4737	0,3368	0,4386	0,3404	0,3298	0,4035	0,3228	0,3439	0,3158
ДК7736	0,0140	0,0316	0,1825	0,1509	0,3333	0,2035	0,3649	0,3088	0,4246	0,2737	0,2667	0,3684	0,2386	0,3123	0,2246
ДК2777	0,1754	0,1789	0,1825	0,1404	0,2281	0,2000	0,3860	0,3263	0,4561	0,2877	0,2807	0,4035	0,2316	0,3298	0,2316
ДК3016	0,2140	0,2105	0,1719	0,1333	0,3193	0,1544	0,4421	0,3404	0,4667	0,2947	0,2877	0,3614	0,2281	0,2246	0,2351
ДК257	0,3053	0,3193	0,2702	0,2246	0,3088	0,2877	0,4211	0,4281	0,4491	0,3544	0,3579	0,3965	0,2947	0,3684	0,3053
ДК7443	0,3088	0,3053	0,3123	0,2632	0,3333	0,3158	0,3860	0,4316	0,4175	0,3263	0,3684	0,4070	0,3123	0,3825	0,3193
ДК7446	0,1860	0,1895	0,1825	0,1474	0,3088	0,2035	0,3965	0,3509	0,4667	0,2561	0,2912	0,3895	0,2421	0,2667	0,2281
ДК7431	0,2246	0,2211	0,1509	0,1158	0,2912	0,1404	0,4070	0,3298	0,4561	0,2772	0,2772	0,3684	0,2211	0,2421	0,2140

ДК4074	0,2000	0,2070	0,1684	0,1333	0,2842	0,1649	0,3965	0,3754	0,4632	0,2877	0,2877	0,3719	0,2421	0,3193	0,2351
ДК744М	0,1965	0,2035	0,1789	0,1333	0,2877	0,1930	0,3754	0,3333	0,4561	0,2421	0,2702	0,3579	0,2421	0,3439	0,2281
ДК721	0,0807	0,0982	0,1860	0,1439	0,2982	0,2140	0,3614	0,3123	0,4351	0,2526	0,2456	0,3404	0,2421	0,3263	0,2281
ДКВ3151М	0,2000	0,2000	0,1193	0,0877	0,3018	0,1368	0,4000	0,3333	0,4702	0,2772	0,2596	0,3474	0,1965	0,2877	0,1965
ДК772М	0	0,0386	0,1930	0,1614	0,3298	0,2140	0,3754	0,3193	0,4386	0,2737	0,2772	0,3684	0,2456	0,3263	0,2351
ДК772	0,0386	0	0,2000	0,1684	0,3474	0,2175	0,3825	0,3298	0,4211	0,2807	0,2842	0,3754	0,2667	0,3263	0,2526
ДК710	0,1930	0,2000	0	0,0526	0,2421	0,0702	0,4140	0,3368	0,4877	0,2807	0,2526	0,3754	0,1965	0,2877	0,2070
ДК411М	0,1614	0,1684	0,0526	0	0,2421	0,0737	0,3860	0,3123	0,4596	0,2386	0,2211	0,3474	0,1614	0,2596	0,1684
ДК315СВ3М	0,3298	0,3474	0,2421	0,2421	0	0,2491	0,3895	0,4246	0,4421	0,3684	0,3719	0,4947	0,3228	0,4211	0,3088
ДК301СВ3М	0,2140	0,2175	0,0702	0,0737	0,2491	0	0,4211	0,3614	0,4877	0,2772	0,2632	0,3930	0,2105	0,2877	0,2211
ДК233МВ	0,3754	0,3825	0,4140	0,3860	0,3895	0,4211	0	0,4316	0,3789	0,4105	0,4175	0,4596	0,4070	0,4561	0,3825
ДК281МВ	0,3193	0,3298	0,3368	0,3123	0,4246	0,3614	0,4316	0	0,4702	0,3719	0,1789	0,3649	0,4000	0,4035	0,3895
МС1294	0,4386	0,4211	0,4877	0,4596	0,4421	0,4877	0,3789	0,4702	0	0,4596	0,4702	0,4386	0,4667	0,4842	0,4386
ДК2285СВ3М	0,2737	0,2807	0,2807	0,2386	0,3684	0,2772	0,4105	0,3719	0,4596	0	0,3088	0,3544	0,2737	0,3684	0,2456
ДК2831СВ	0,2772	0,2842	0,2526	0,2211	0,3719	0,2632	0,4175	0,1789	0,4702	0,3088	0	0,3895	0,3263	0,3789	0,3263
ДК3983	0,3684	0,3754	0,3754	0,3474	0,4947	0,3930	0,4596	0,3649	0,4386	0,3544	0,3895	0	0,3789	0,4211	0,3684
ДК4169	0,2456	0,2667	0,1965	0,1614	0,3228	0,2105	0,4070	0,4000	0,4667	0,2737	0,3263	0,3789	0	0,3193	0,0561
ДК5002СВ3М	0,3263	0,3263	0,2877	0,2596	0,4211	0,2877	0,4561	0,4035	0,4842	0,3684	0,3789	0,4211	0,3193	0	0,3193
МС4169	0,2351	0,2526	0,2070	0,1684	0,3088	0,2211	0,3825	0,3895	0,4386	0,2456	0,3263	0,3684	0,0561	0,3193	0
ДК431СВ	0,3860	0,3895	0,4211	0,4000	0,4281	0,4386	0,4491	0,4561	0,4667	0,4351	0,4702	0,4807	0,3789	0,3368	0,3754
МС4456	0,4772	0,4877	0,4842	0,4772	0,4561	0,4842	0,4632	0,4596	0,4702	0,4772	0,4947	0,4737	0,4807	0,4842	0,4632
ДК4402	0,4386	0,4596	0,4596	0,4491	0,4912	0,4912	0,4982	0,5263	0,4737	0,4702	0,5088	0,4982	0,4035	0,4667	0,4070
А188	0,4456	0,4632	0,4982	0,4596	0,4386	0,4982	0,4351	0,4807	0,4175	0,4842	0,4947	0,5123	0,4491	0,4772	0,4456
Chi31	0,4772	0,4842	0,5193	0,4947	0,4667	0,5053	0,4246	0,5088	0,4105	0,4526	0,4737	0,4737	0,4807	0,5088	0,4456
PLS61	0,5684	0,5719	0,5825	0,5754	0,6140	0,5789	0,5579	0,5860	0,5333	0,5474	0,5719	0,5123	0,5754	0,5649	0,5649
ДК3527	0,4632	0,4772	0,4842	0,4632	0,4351	0,4842	0,4386	0,4000	0,4702	0,4175	0,4316	0,4842	0,4070	0,4807	0,4070
F2	0,4982	0,5228	0,5053	0,4947	0,4632	0,5193	0,4632	0,5088	0,4491	0,4982	0,5053	0,4877	0,5298	0,5123	0,5228
ДК270	0,4772	0,4982	0,4982	0,5123	0,4737	0,5053	0,4737	0,5123	0,4491	0,4667	0,5018	0,5088	0,4947	0,4561	0,4807
ДК2723С	0,4421	0,4596	0,4982	0,4702	0,4316	0,4912	0,4667	0,4491	0,4456	0,4526	0,4526	0,5228	0,4877	0,4211	0,4772
ДК273МВ	0,4561	0,4807	0,4877	0,4807	0,4737	0,5053	0,4702	0,4947	0,4421	0,4737	0,5298	0,4491	0,4281	0,4526	0,4386
ДК2003С3М	0,4526	0,4737	0,4912	0,4877	0,4737	0,4947	0,4596	0,5018	0,4947	0,4316	0,4877	0,5228	0,4842	0,5193	0,4807
ДК2	0,4702	0,4842	0,4667	0,4807	0,4912	0,4526	0,4000	0,4105	0,4421	0,4246	0,4000	0,5193	0,4596	0,5158	0,4877
ДК8213	0,4807	0,5018	0,5123	0,4737	0,4175	0,5088	0,4140	0,4912	0,4246	0,4246	0,5053	0,4842	0,4772	0,4561	0,4596
ВР731	0,5719	0,5930	0,5614	0,5439	0,5123	0,5754	0,5614	0,4982	0,4386	0,5123	0,4912	0,5123	0,5123	0,5263	0,5088
ДК3902	0,3649	0,3754	0,3228	0,2982	0,3965	0,3298	0,3193	0,4105	0,4316	0,3474	0,3368	0,4070	0,3228	0,4035	0,3158
ДК2346	0,5123	0,5228	0,5333	0,5053	0,4982	0,5579	0,5088	0,4842	0,5088	0,4912	0,5263	0,5123	0,4877	0,5298	0,4807
ДК2396	0,4246	0,4386	0,4842	0,4561	0,4772	0,4772	0,3193	0,3439	0,4035	0,3895	0,3368	0,4702	0,4351	0,4737	0,4351
ДК3642	0,4596	0,4702	0,4632	0,4491	0,4737	0,4772	0,4561	0,4807	0,4947	0,4070	0,4982	0,4772	0,4035	0,5018	0,3789
ДК2323МВ	0,4386	0,4421	0,4702	0,4526	0,4807	0,4737	0,2877	0,3544	0,4421	0,4070	0,3404	0,4211	0,4316	0,4982	0,4175
ДК239МВ	0,4386	0,4526	0,4947	0,4667	0,4702	0,4947	0,3684	0,4246	0,4000	0,4175	0,4246	0,4702	0,4035	0,4702	0,4175
В73	0,6035	0,6211	0,5649	0,5579	0,5439	0,5684	0,5860	0,5649	0,5684	0,5719	0,5439	0,5789	0,5579	0,5614	0,5579
В14	0,5228	0,5439	0,5439	0,5228	0,4947	0,5684	0,4561	0,4596	0,4456	0,5368	0,5123	0,5053	0,4842	0,4912	0,4667
В37	0,5544	0,5649	0,5895	0,5825	0,5825	0,5930	0,5228	0,5263	0,4561	0,5123	0,5404	0,5193	0,5193	0,5053	0,5158
ДК23773М	0,4912	0,4982	0,4912	0,4772	0,4526	0,4877	0,3895	0,4070	0,4667	0,4632	0,4211	0,4912	0,4351	0,5018	0,4351
ДК377С	0,5298	0,5368	0,5474	0,5228	0,5123	0,5474	0,4456	0,4667	0,4982	0,4877	0,5018	0,5088	0,4667	0,5193	0,4491
ДК3673С	0,4561	0,4737	0,4491	0,4807	0,4702	0,4737	0,4632	0,5123	0,4807	0,4491	0,4842	0,4877	0,4386	0,4351	0,4246
ДК232МВ	0,5193	0,5298	0,5228	0,5018	0,5088	0,5158	0,3544	0,4351	0,4947	0,4702	0,4105	0,5053	0,4842	0,5368	0,4982

Лінія	ДК4315 СВ	MC4456	ДК4402	A188	Chi31	PLS61	ДК3527	F2	ДК270	ДК272 зС	ДК273 МВ	ДК200 зСзМ	ДК2	ДК8213	BP731	ДК3902
ДК296МВ	0,4772	0,4632	0,5193	0,4351	0,4456	0,5544	0,4456	0,4632	0,4211	0,3860	0,4000	0,4807	0,4632	0,4842	0,4912	0,4386
ДК1129	0,4632	0,4947	0,5053	0,4912	0,4351	0,5123	0,4632	0,5088	0,4421	0,4421	0,4351	0,4912	0,4877	0,4877	0,4947	0,4526
ДК2668	0,4386	0,4807	0,5193	0,3965	0,4246	0,5053	0,4211	0,4281	0,4105	0,4386	0,4596	0,4456	0,4596	0,4596	0,4877	0,3825
ДК3023зСзМ	0,5404	0,4772	0,5333	0,4246	0,4105	0,5404	0,4491	0,4140	0,4105	0,3789	0,4702	0,4070	0,4526	0,4456	0,4947	0,4526
ДК3626	0,4456	0,4667	0,5193	0,4491	0,4561	0,5053	0,4667	0,4912	0,4000	0,4140	0,4351	0,4772	0,4632	0,4491	0,4702	0,4175
ДК6342	0,4596	0,4667	0,4912	0,4421	0,4561	0,5509	0,4737	0,4842	0,4316	0,4421	0,4386	0,5193	0,5053	0,4737	0,4947	0,4807
ДК2965зСзМ	0,5158	0,4912	0,5684	0,4526	0,4456	0,5333	0,4596	0,4596	0,4912	0,4596	0,4667	0,4702	0,4316	0,4842	0,5018	0,4316
ДК4263	0,5228	0,5158	0,5544	0,4456	0,4386	0,5018	0,4877	0,4947	0,4596	0,4351	0,4526	0,5123	0,4491	0,5018	0,4912	0,4526
ДКД9053	0,5088	0,4667	0,5368	0,4140	0,4035	0,5263	0,4456	0,4140	0,4070	0,3895	0,4421	0,4105	0,4561	0,4281	0,4772	0,4632
ДКВ3451	0,5544	0,4842	0,5544	0,4421	0,4421	0,5193	0,4772	0,4772	0,4561	0,4281	0,4632	0,4667	0,4035	0,4842	0,5228	0,4526
ДК680МВ	0,4947	0,4561	0,5404	0,4000	0,4632	0,5298	0,4211	0,4737	0,4175	0,3684	0,4316	0,4947	0,4421	0,4667	0,5088	0,4947
ДК8143	0,5368	0,4351	0,5579	0,4386	0,4877	0,5509	0,4421	0,4842	0,4947	0,4596	0,4737	0,4912	0,3965	0,5088	0,5368	0,4386
ДК517МВ	0,5544	0,5053	0,5825	0,4842	0,4772	0,5895	0,5018	0,4386	0,4491	0,4596	0,4842	0,4281	0,4737	0,4772	0,5158	0,4842
ДК534зСзМ	0,5474	0,4877	0,5789	0,4807	0,4632	0,5228	0,4947	0,4526	0,4491	0,4421	0,4667	0,4281	0,3930	0,4982	0,5123	0,4526
ДК117зСМВ	0,5088	0,4842	0,5298	0,4842	0,4632	0,5368	0,4737	0,4491	0,3965	0,4070	0,4000	0,4772	0,4632	0,5368	0,5404	0,4737
ДК231зС	0,5719	0,4351	0,5439	0,4596	0,4456	0,5053	0,4842	0,3649	0,4456	0,3930	0,4737	0,3754	0,4316	0,4386	0,5228	0,4561
ДК6337зСзМ	0,4877	0,4596	0,5474	0,4105	0,4667	0,5263	0,4596	0,4175	0,4070	0,4175	0,4842	0,3895	0,4316	0,4772	0,5439	0,4596
ДК2953зСзМ	0,5053	0,4877	0,5965	0,4842	0,4912	0,5509	0,4632	0,4737	0,4491	0,4491	0,4772	0,4561	0,4000	0,4912	0,4982	0,4211
ДК366М	0,5158	0,4632	0,5404	0,4772	0,4807	0,5404	0,4947	0,5193	0,4667	0,4246	0,4456	0,5088	0,4596	0,4982	0,4877	0,4702
ДК3044	0,5404	0,4807	0,5860	0,4526	0,4211	0,5368	0,4807	0,4632	0,4421	0,4561	0,4491	0,4702	0,4000	0,5123	0,5474	0,4667
ДК633266МВ	0,5368	0,4772	0,5895	0,4842	0,4772	0,5544	0,4807	0,4211	0,4000	0,4000	0,4351	0,4351	0,4421	0,5088	0,5193	0,4737
ДК298зСзМ	0,4912	0,4561	0,5649	0,4456	0,4526	0,5474	0,4316	0,4140	0,4070	0,3789	0,4035	0,4246	0,4351	0,4947	0,5123	0,4316
ДК212МВ	0,4877	0,4140	0,4632	0,4105	0,4421	0,5439	0,4456	0,4035	0,3649	0,4035	0,4316	0,4211	0,4632	0,4772	0,5088	0,4807
ДК370МВ	0,5649	0,4526	0,5614	0,4877	0,4982	0,5684	0,4982	0,4912	0,4947	0,4737	0,5193	0,4912	0,4246	0,5439	0,5404	0,4632
ДК236СВ	0,4386	0,4877	0,4632	0,4632	0,4702	0,5684	0,4772	0,4632	0,5228	0,4702	0,4421	0,4561	0,5474	0,4456	0,4456	0,4702
ДК633325МВ	0,5333	0,4491	0,5474	0,4667	0,4632	0,5263	0,4596	0,4386	0,4702	0,4561	0,4702	0,4526	0,4316	0,4982	0,5298	0,4596
Мо17	0,5123	0,4737	0,5860	0,4526	0,4456	0,5368	0,4807	0,4737	0,4702	0,4316	0,4632	0,4596	0,3789	0,4842	0,5193	0,4351
Oh43	0,4877	0,5158	0,4632	0,4807	0,3825	0,5368	0,4737	0,4596	0,3965	0,4175	0,4246	0,4316	0,4912	0,4421	0,4737	0,4947
ДК633	0,5474	0,4877	0,5754	0,4807	0,4632	0,5228	0,4912	0,4561	0,4456	0,4456	0,4702	0,4316	0,3965	0,4982	0,5123	0,4491
ДК267МВ	0,4070	0,4632	0,5123	0,4211	0,4211	0,5439	0,4316	0,4140	0,3439	0,4035	0,4316	0,4351	0,4491	0,4912	0,5404	0,4456
ДК427	0,4281	0,4982	0,5368	0,4281	0,4421	0,5298	0,4281	0,4702	0,3298	0,3474	0,4351	0,4632	0,4281	0,4842	0,4947	0,4702
ДК2980зСМВ	0,4982	0,4947	0,5860	0,4456	0,5018	0,5544	0,4456	0,4456	0,4000	0,3930	0,4246	0,4807	0,4526	0,4982	0,5088	0,5053
ДК2061СВзМ	0,3965	0,4737	0,4702	0,4596	0,4912	0,6105	0,4842	0,4912	0,5193	0,4772	0,4947	0,4947	0,4982	0,4386	0,5018	0,3614
ДК2064СВзМ	0,3930	0,4491	0,4456	0,4702	0,4807	0,6035	0,4842	0,5088	0,5228	0,4807	0,4912	0,5053	0,4877	0,4281	0,5018	0,3298
ДК2579СВзМ	0,4140	0,4877	0,4526	0,4772	0,4596	0,5684	0,4982	0,4632	0,5053	0,4386	0,4632	0,4491	0,5193	0,4000	0,5193	0,4105
ДКД12725СВзМ	0,6105	0,6947	0,7193	0,6140	0,6737	0,7053	0,6386	0,6877	0,6667	0,6175	0,6456	0,6947	0,6842	0,6632	0,7404	0,6175
ДК3641	0,4456	0,4456	0,4702	0,4737	0,5123	0,6281	0,4035	0,5333	0,5158	0,4456	0,5228	0,5053	0,4632	0,4982	0,5333	0,4386
ДК7736	0,3754	0,4667	0,4421	0,4386	0,4667	0,5719	0,4561	0,5053	0,4877	0,4491	0,4632	0,4596	0,4632	0,4912	0,5789	0,3544
ДК2777	0,3614	0,4877	0,4877	0,4561	0,4807	0,6140	0,4596	0,5053	0,5123	0,4456	0,4596	0,4842	0,5123	0,4667	0,5544	0,3965
ДК3016	0,3404	0,4947	0,4632	0,4842	0,4842	0,5789	0,4386	0,5263	0,4807	0,4561	0,4702	0,5368	0,5298	0,4842	0,5544	0,3614
ДК257	0,4246	0,4982	0,4281	0,4737	0,4667	0,5614	0,4947	0,4632	0,5053	0,4561	0,4667	0,4456	0,5298	0,4316	0,5263	0,4421
ДК7443	0,4351	0,4632	0,5158	0,4281	0,5018	0,5930	0,5018	0,5018	0,4842	0,4667	0,5053	0,5018	0,4807	0,4526	0,5649	0,3789
ДК7446	0,3579	0,4982	0,4737	0,4772	0,5053	0,5614	0,4807	0,5298	0,4842	0,4596	0,4877	0,5193	0,5263	0,5053	0,5825	0,3509
ДК7431	0,3544	0,4947	0,4807	0,4807	0,4737	0,5579	0,4491	0,5263	0,4667	0,4351	0,4491	0,5298	0,4982	0,4947	0,5579	0,3298

ДК4074	0,4070	0,4772	0,4772	0,4596	0,4877	0,5474	0,4772	0,5333	0,4912	0,4632	0,4877	0,5368	0,5018	0,4877	0,5614	0,3439
ДК744М	0,4316	0,4667	0,4737	0,4386	0,4912	0,5649	0,4807	0,5228	0,5053	0,4772	0,5193	0,5053	0,5018	0,4807	0,5649	0,3333
ДК721	0,3860	0,4667	0,4316	0,4667	0,4667	0,5614	0,4737	0,5193	0,5053	0,4596	0,4982	0,4596	0,4772	0,4842	0,5544	0,3333
ДКВ3151М	0,3719	0,4912	0,4596	0,4842	0,5158	0,5965	0,4772	0,5088	0,5053	0,4982	0,5193	0,5193	0,5158	0,5088	0,5614	0,3193
ДК772М	0,3860	0,4772	0,4386	0,4456	0,4772	0,5684	0,4632	0,4982	0,4772	0,4421	0,4561	0,4526	0,4702	0,4807	0,5719	0,3649
ДК772	0,3895	0,4877	0,4596	0,4632	0,4842	0,5719	0,4772	0,5228	0,4982	0,4596	0,4807	0,4737	0,4842	0,5018	0,5930	0,3754
ДК710	0,4211	0,4842	0,4596	0,4982	0,5193	0,5825	0,4842	0,5053	0,4982	0,4982	0,4877	0,4912	0,4667	0,5123	0,5614	0,3228
ДК411М	0,4000	0,4772	0,4491	0,4596	0,4947	0,5754	0,4632	0,4947	0,5123	0,4702	0,4807	0,4877	0,4807	0,4737	0,5439	0,2982
ДК315СВ3М	0,4281	0,4561	0,4912	0,4386	0,4667	0,6140	0,4351	0,4632	0,4737	0,4316	0,4737	0,4737	0,4912	0,4175	0,5123	0,3965
ДК301СВ3М	0,4386	0,4842	0,4912	0,4982	0,5053	0,5789	0,4842	0,5193	0,5053	0,4912	0,5053	0,4947	0,4526	0,5088	0,5754	0,3298
ДК233МВ	0,4491	0,4632	0,4982	0,4351	0,4246	0,5579	0,4386	0,4632	0,4737	0,4667	0,4702	0,4596	0,4000	0,4140	0,5614	0,3193
ДК281МВ	0,4561	0,4596	0,5263	0,4807	0,5088	0,5860	0,4000	0,5088	0,5123	0,4491	0,4947	0,5018	0,4105	0,4912	0,4982	0,4105
МС1294	0,4667	0,4702	0,4737	0,4175	0,4105	0,5333	0,4702	0,4491	0,4491	0,4456	0,4421	0,4947	0,4421	0,4246	0,4386	0,4316
ДК2285СВ3М	0,4351	0,4772	0,4702	0,4842	0,4526	0,5474	0,4175	0,4982	0,4667	0,4526	0,4737	0,4316	0,4246	0,4246	0,5123	0,3474
ДК2831СВ	0,4702	0,4947	0,5088	0,4947	0,4737	0,5719	0,4316	0,5053	0,5018	0,4526	0,5298	0,4877	0,4000	0,5053	0,4912	0,3368
ДК3983	0,4807	0,4737	0,4982	0,5123	0,4737	0,5123	0,4842	0,4877	0,5088	0,5228	0,4491	0,5228	0,5193	0,4842	0,5123	0,4070
ДК4169	0,3789	0,4807	0,4035	0,4491	0,4807	0,5754	0,4070	0,5298	0,4947	0,4877	0,4281	0,4842	0,4596	0,4772	0,5123	0,3228
ДК5002СВ3М	0,3368	0,4842	0,4667	0,4772	0,5088	0,5649	0,4807	0,5123	0,4561	0,4211	0,4526	0,5193	0,5158	0,4561	0,5263	0,4035
МС4169	0,3754	0,4632	0,4070	0,4456	0,4456	0,5649	0,4070	0,5228	0,4807	0,4772	0,4386	0,4807	0,4877	0,4596	0,5088	0,3158
ДК4315СВ	0	0,5193	0,5018	0,4807	0,5123	0,6281	0,4421	0,5649	0,5018	0,4947	0,5018	0,5018	0,4982	0,4912	0,4912	0,4351
МС4456	0,5193	0	0,3298	0,4456	0,4667	0,5860	0,4035	0,4140	0,4386	0,4281	0,5018	0,5053	0,5018	0,3965	0,4351	0,5053
ДК4402	0,5018	0,3298	0	0,4772	0,5158	0,5860	0,5228	0,5088	0,4912	0,5053	0,5158	0,5193	0,5579	0,4386	0,4456	0,4947
А188	0,4807	0,4456	0,4772	0	0,4211	0,5368	0,4351	0,4281	0,4632	0,4526	0,4737	0,4386	0,4982	0,3860	0,4877	0,5018
Сн31	0,5123	0,4667	0,5158	0,4211	0	0,3684	0,4316	0,4526	0,4246	0,4140	0,4070	0,4281	0,5053	0,4281	0,4772	0,4702
PLS61	0,6281	0,5860	0,5860	0,5368	0,3684	0	0,5930	0,5579	0,5439	0,5544	0,5088	0,5368	0,5789	0,5333	0,5368	0,5439
ДК3527	0,4421	0,4035	0,5228	0,4351	0,4316	0,5930	0	0,3930	0,3509	0,3158	0,3298	0,4281	0,4246	0,4947	0,4877	0,4281
F2	0,5649	0,4140	0,5088	0,4281	0,4526	0,5579	0,3930	0	0,3579	0,3368	0,4035	0,3123	0,4807	0,4456	0,5228	0,5018
ДК270	0,5018	0,4386	0,4912	0,4632	0,4246	0,5439	0,3509	0,3579	0	0,1474	0,2246	0,4070	0,4456	0,4526	0,5298	0,5228
ДК2723С	0,4947	0,4281	0,5053	0,4526	0,4140	0,5544	0,3158	0,3368	0,1474	0	0,2667	0,4000	0,4246	0,4421	0,5368	0,5018
ДК273МВ	0,5018	0,5018	0,5158	0,4737	0,4070	0,5088	0,3298	0,4035	0,2246	0,2667	0	0,4982	0,4702	0,4807	0,4772	0,5123
ДК2003С3М	0,5018	0,5053	0,5193	0,4386	0,4281	0,5368	0,4281	0,3123	0,4070	0,4000	0,4982	0	0,4175	0,4351	0,5509	0,4947
ДК2	0,4982	0,5018	0,5579	0,4982	0,5053	0,5789	0,4246	0,4807	0,4456	0,4246	0,4702	0,4175	0	0,4702	0,5228	0,3719
ДК8213	0,4912	0,3965	0,4386	0,3860	0,4281	0,5333	0,4947	0,4456	0,4526	0,4421	0,4807	0,4351	0,4702	0	0,4316	0,4526
ВР731	0,4912	0,4351	0,4456	0,4877	0,4772	0,5368	0,4877	0,5228	0,5298	0,5368	0,4772	0,5509	0,5228	0,4316	0	0,5018
ДК3902	0,4351	0,5053	0,4947	0,5018	0,4702	0,5439	0,4281	0,5018	0,5228	0,5018	0,5123	0,4947	0,3719	0,4526	0,5018	0
ДК2346	0,4737	0,4982	0,5123	0,5088	0,4737	0,5333	0,4842	0,5895	0,5789	0,5474	0,4947	0,5754	0,4281	0,4912	0,4877	0,4912
ДК2396	0,4596	0,4982	0,5544	0,4561	0,4702	0,5333	0,3860	0,4772	0,4561	0,4105	0,4632	0,4351	0,1123	0,4281	0,5053	0,3088
ДК3642	0,3544	0,4947	0,4351	0,5333	0,5649	0,5649	0,5298	0,5719	0,5754	0,5649	0,5474	0,5509	0,4877	0,4947	0,5018	0,4667
ДК2323МВ	0,4526	0,4912	0,5509	0,4842	0,4702	0,5579	0,3895	0,4947	0,4982	0,4667	0,4877	0,4386	0,2456	0,4351	0,5053	0,2772
ДК239МВ	0,4211	0,5088	0,5228	0,4561	0,4456	0,5719	0,3614	0,4702	0,3930	0,3509	0,3965	0,4351	0,2000	0,4316	0,5298	0,3860
В73	0,4632	0,5474	0,4982	0,5825	0,5614	0,5193	0,5719	0,5930	0,6246	0,6105	0,5439	0,6175	0,5930	0,5649	0,4246	0,5754
В14	0,4070	0,4351	0,4667	0,4386	0,5193	0,5825	0,4491	0,4877	0,5368	0,5263	0,5228	0,4982	0,5263	0,4035	0,2632	0,4667
В37	0,4316	0,4842	0,4702	0,5333	0,5193	0,6175	0,4947	0,5368	0,4667	0,5018	0,4526	0,5158	0,4351	0,4140	0,4526	0,4877
ДК23773М	0,4351	0,4772	0,5333	0,4947	0,4982	0,6140	0,4281	0,4702	0,4702	0,4561	0,4807	0,4526	0,2947	0,4667	0,4737	0,3649
ДК377С	0,4421	0,5158	0,5263	0,4702	0,5193	0,6140	0,4491	0,4947	0,4596	0,4351	0,4456	0,4561	0,3895	0,4386	0,4526	0,4491
ДК3673С	0,4281	0,4211	0,4070	0,5053	0,5298	0,5614	0,4316	0,4140	0,2912	0,3018	0,4140	0,4596	0,4175	0,4526	0,4702	0,4807
ДК232МВ	0,5193	0,5193	0,5860	0,5439	0,5193	0,6175	0,4526	0,4947	0,5158	0,5053	0,5053	0,4772	0,3018	0,4737	0,5474	0,3684

Лінія	ДК2346	ДК2396	ДК3642	ДК2323МВ	ДК239МВ	В73	В14	В37	ДК2377зМ	ДК377С	ДК367зС	ДК232МВ
ДК296МВ	0,5298	0,4316	0,5333	0,4456	0,4632	0,6281	0,4982	0,4912	0,5088	0,5158	0,4211	0,5088
ДК1129	0,5088	0,4351	0,5158	0,4632	0,4246	0,5719	0,5263	0,5018	0,5228	0,5298	0,4596	0,5088
ДК2668	0,5439	0,4140	0,5018	0,4000	0,4070	0,5614	0,4877	0,4947	0,4632	0,4982	0,4842	0,4596
ДК3023зСзМ	0,5018	0,4105	0,5825	0,4070	0,4526	0,6772	0,4912	0,5193	0,4982	0,5228	0,4491	0,4737
ДК3626	0,5158	0,4281	0,5018	0,4351	0,4596	0,6351	0,4912	0,5158	0,4912	0,5228	0,4175	0,4947
ДК6342	0,5614	0,4632	0,5684	0,4877	0,4807	0,6351	0,5404	0,5193	0,5649	0,5474	0,4246	0,5649
ДК2965зСзМ	0,4912	0,4000	0,5719	0,4070	0,4491	0,6842	0,5649	0,5263	0,5298	0,5789	0,4912	0,4491
ДК4263	0,4667	0,3930	0,5509	0,4140	0,4421	0,6421	0,5825	0,5404	0,5368	0,5509	0,4912	0,4982
ДКД9053	0,4982	0,4140	0,5579	0,4105	0,4421	0,6596	0,4737	0,5228	0,4947	0,5228	0,4456	0,4702
ДКВ3451	0,4772	0,3649	0,5649	0,3930	0,4105	0,6667	0,5509	0,5158	0,5053	0,5228	0,4667	0,4596
ДК680МВ	0,4877	0,3965	0,5088	0,4316	0,4140	0,6070	0,5333	0,5404	0,4947	0,5193	0,4211	0,5088
ДК8143	0,4737	0,4035	0,5860	0,3789	0,4246	0,6140	0,5509	0,5649	0,4596	0,4912	0,4702	0,4456
ДК517МВ	0,5158	0,4667	0,5719	0,5053	0,4772	0,6491	0,5439	0,5579	0,5158	0,5614	0,4912	0,4982
ДК534зСзМ	0,4947	0,3965	0,5789	0,4000	0,4491	0,6737	0,5474	0,5263	0,4877	0,5228	0,4316	0,4421
ДК117зСМВ	0,5368	0,4456	0,6140	0,4561	0,4526	0,6491	0,5509	0,5158	0,5298	0,5614	0,4175	0,5123
ДК231зС	0,5404	0,4035	0,5368	0,4035	0,4632	0,6246	0,5439	0,5158	0,4772	0,4947	0,4386	0,4421
ДК6337зСзМ	0,5368	0,4175	0,5614	0,4351	0,4526	0,6421	0,5509	0,5123	0,4982	0,5263	0,4175	0,4772
ДК2953зСзМ	0,5018	0,3930	0,5474	0,4105	0,4351	0,6596	0,5088	0,4702	0,4912	0,5368	0,4561	0,4632
ДК366М	0,5193	0,4351	0,5719	0,4561	0,4667	0,6491	0,5649	0,5018	0,5228	0,5298	0,4456	0,5018
ДК3044	0,4351	0,4246	0,5684	0,4351	0,4456	0,6246	0,5825	0,5509	0,5263	0,5719	0,4737	0,4842
ДК633266МВ	0,5825	0,4561	0,5825	0,4737	0,4947	0,6772	0,5333	0,5789	0,5474	0,5825	0,4281	0,5158
ДК298зСзМ	0,5789	0,4351	0,5509	0,4281	0,4667	0,6737	0,5368	0,5368	0,4772	0,5333	0,4211	0,4737
ДК212МВ	0,5263	0,4807	0,5825	0,5053	0,4807	0,6281	0,4842	0,5298	0,4842	0,5158	0,4421	0,5474
ДК370МВ	0,4912	0,4456	0,6035	0,4140	0,4737	0,6912	0,5789	0,6000	0,5158	0,5789	0,4807	0,4807
ДК236СВ	0,5263	0,5088	0,5193	0,4807	0,4982	0,4632	0,5018	0,5193	0,4877	0,4702	0,4877	0,5333
ДК633325МВ	0,4842	0,4070	0,5544	0,4246	0,4140	0,6421	0,5333	0,5439	0,5088	0,5123	0,4877	0,4702
Мо17	0,4561	0,3509	0,5649	0,3789	0,4000	0,6772	0,5298	0,5123	0,4842	0,5228	0,4596	0,4281
Oh43	0,5193	0,4982	0,5544	0,5018	0,4807	0,5895	0,5193	0,5158	0,4912	0,5018	0,4175	0,5123
ДК633	0,4912	0,3930	0,5754	0,3965	0,4456	0,6772	0,5474	0,5263	0,4912	0,5263	0,4351	0,4456
ДК267МВ	0,5404	0,4070	0,5193	0,4456	0,3895	0,5965	0,4912	0,4561	0,4702	0,4842	0,4632	0,5123
ДК427	0,5298	0,4316	0,5544	0,4912	0,4351	0,5860	0,4982	0,4912	0,4737	0,5123	0,4070	0,5614
ДК2980зСМВ	0,5404	0,4491	0,5474	0,4561	0,4807	0,6281	0,5158	0,5649	0,4912	0,5404	0,4000	0,5228
ДК2061СВзМ	0,5193	0,4561	0,4140	0,4667	0,4386	0,5228	0,4632	0,5509	0,4632	0,4877	0,4702	0,4912
ДК2064СВзМ	0,4877	0,4421	0,4316	0,4281	0,4316	0,5614	0,4526	0,5474	0,4456	0,4842	0,4526	0,4807
ДК2579СВзМ	0,5228	0,4772	0,4561	0,4491	0,4491	0,5368	0,5088	0,5895	0,5088	0,5123	0,4667	0,4947
ДКД2725СВзМ	0,7123	0,6421	0,6737	0,6105	0,6316	0,8000	0,7088	0,7579	0,6807	0,7053	0,6526	0,6702
ДК3641	0,5228	0,4526	0,4807	0,4526	0,4667	0,6211	0,4982	0,5614	0,4912	0,5368	0,4737	0,5509
ДК7736	0,5053	0,4175	0,4491	0,4281	0,4316	0,6105	0,5158	0,5474	0,4842	0,5228	0,4632	0,5088
ДК2777	0,5088	0,4632	0,4351	0,4386	0,4526	0,5509	0,5123	0,5754	0,4702	0,4877	0,4947	0,4842
ДК3016	0,5544	0,4947	0,4632	0,4807	0,4737	0,5860	0,5404	0,5684	0,5158	0,5439	0,4561	0,5404
ДК257	0,5298	0,4947	0,5053	0,4982	0,4632	0,4947	0,5123	0,5719	0,5088	0,5088	0,4702	0,5474
ДК7443	0,4842	0,4456	0,4912	0,4456	0,4386	0,5895	0,5158	0,5193	0,4456	0,4667	0,5158	0,4982
ДК7446	0,5158	0,4912	0,4421	0,4912	0,4877	0,5439	0,5404	0,5719	0,4877	0,5053	0,4456	0,5509
ДК7431	0,5123	0,4561	0,4316	0,4491	0,4351	0,5439	0,5439	0,5439	0,4702	0,4947	0,4596	0,5158
ДК4074	0,5228	0,4737	0,4772	0,4667	0,4842	0,5684	0,5474	0,5825	0,4912	0,5263	0,4807	0,5228

ДК744М	0,5053	0,4667	0,4456	0,4596	0,4772	0,5474	0,5298	0,5649	0,4632	0,4702	0,4772	0,5123
ДК721	0,5158	0,4246	0,4526	0,4175	0,4561	0,6070	0,5158	0,5825	0,4807	0,5228	0,4561	0,5053
ДКВ3151М	0,5333	0,4807	0,4421	0,4526	0,4702	0,5544	0,5298	0,5649	0,4947	0,5368	0,4912	0,5088
ДК772М	0,5123	0,4246	0,4596	0,4386	0,4386	0,6035	0,5228	0,5544	0,4912	0,5298	0,4561	0,5193
ДК772	0,5228	0,4386	0,4702	0,4421	0,4526	0,6211	0,5439	0,5649	0,4982	0,5368	0,4737	0,5298
ДК710	0,5333	0,4842	0,4632	0,4702	0,4947	0,5649	0,5439	0,5895	0,4912	0,5474	0,4491	0,5228
ДК411М	0,5053	0,4561	0,4491	0,4526	0,4667	0,5579	0,5228	0,5825	0,4772	0,5228	0,4807	0,5018
ДК315СВ3М	0,4982	0,4772	0,4737	0,4807	0,4702	0,5439	0,4947	0,5825	0,4526	0,5123	0,4702	0,5088
ДК301СВ3М	0,5579	0,4772	0,4772	0,4737	0,4947	0,5684	0,5684	0,5930	0,4877	0,5474	0,4737	0,5158
ДК233МВ	0,5088	0,3193	0,4561	0,2877	0,3684	0,5860	0,4561	0,5228	0,3895	0,4456	0,4632	0,3544
ДК281МВ	0,4842	0,3439	0,4807	0,3544	0,4246	0,5649	0,4596	0,5263	0,4070	0,4667	0,5123	0,4351
МС1294	0,5088	0,4035	0,4947	0,4421	0,4000	0,5684	0,4456	0,4561	0,4667	0,4982	0,4807	0,4947
ДК2285СВ3М	0,4912	0,3895	0,4070	0,4070	0,4175	0,5719	0,5368	0,5123	0,4632	0,4877	0,4491	0,4702
ДК2831СВ	0,5263	0,3368	0,4982	0,3404	0,4246	0,5439	0,5123	0,5404	0,4211	0,5018	0,4842	0,4105
ДК3983	0,5123	0,4702	0,4772	0,4211	0,4702	0,5789	0,5053	0,5193	0,4912	0,5088	0,4877	0,5053
ДК4169	0,4877	0,4351	0,4035	0,4316	0,4035	0,5579	0,4842	0,5193	0,4351	0,4667	0,4386	0,4842
ДК5002СВ3М	0,5298	0,4737	0,5018	0,4982	0,4702	0,5614	0,4912	0,5053	0,5018	0,5193	0,4351	0,5368
МС4169	0,4807	0,4351	0,3789	0,4175	0,4175	0,5579	0,4667	0,5158	0,4351	0,4491	0,4246	0,4982
ДК4315СВ	0,4737	0,4596	0,3544	0,4526	0,4211	0,4632	0,4070	0,4316	0,4351	0,4421	0,4281	0,5193
МС4456	0,4982	0,4982	0,4947	0,4912	0,5088	0,5474	0,4351	0,4842	0,4772	0,5158	0,4211	0,5193
ДК4402	0,5123	0,5544	0,4351	0,5509	0,5228	0,4982	0,4667	0,4702	0,5333	0,5263	0,4070	0,5860
А188	0,5088	0,4561	0,5333	0,4842	0,4561	0,5825	0,4386	0,5333	0,4947	0,4702	0,5053	0,5439
Chi31	0,4737	0,4702	0,5649	0,4702	0,4456	0,5614	0,5193	0,5193	0,4982	0,5193	0,5298	0,5193
PLS61	0,5333	0,5333	0,5649	0,5579	0,5719	0,5193	0,5825	0,6175	0,6140	0,6140	0,5614	0,6175
ДК3527	0,4842	0,3860	0,5298	0,3895	0,3614	0,5719	0,4491	0,4947	0,4281	0,4491	0,4316	0,4526
F2	0,5895	0,4772	0,5719	0,4947	0,4702	0,5930	0,4877	0,5368	0,4702	0,4947	0,4140	0,4947
ДК270	0,5789	0,4561	0,5754	0,4982	0,3930	0,6246	0,5368	0,4667	0,4702	0,4596	0,2912	0,5158
ДК2723С	0,5474	0,4105	0,5649	0,4667	0,3509	0,6105	0,5263	0,5018	0,4561	0,4351	0,3018	0,5053
ДК273МВ	0,4947	0,4632	0,5474	0,4877	0,3965	0,5439	0,5228	0,4526	0,4807	0,4456	0,4140	0,5053
ДК2003С3М	0,5754	0,4351	0,5509	0,4386	0,4351	0,6175	0,4982	0,5158	0,4526	0,4561	0,4596	0,4772
ДК2	0,4281	0,1123	0,4877	0,2456	0,2000	0,5930	0,5263	0,4351	0,2947	0,3895	0,4175	0,3018
ДК8213	0,4912	0,4281	0,4947	0,4351	0,4316	0,5649	0,4035	0,4140	0,4667	0,4386	0,4526	0,4737
ВР731	0,4877	0,5053	0,5018	0,5053	0,5298	0,4246	0,2632	0,4526	0,4737	0,4526	0,4702	0,5474
ДК3902	0,4912	0,3088	0,4667	0,2772	0,3860	0,5754	0,4667	0,4877	0,3649	0,4491	0,4807	0,3684
ДК2346	0	0,3860	0,4105	0,4386	0,4105	0,4702	0,4842	0,4421	0,4491	0,4491	0,5053	0,4737
ДК2396	0,3860	0	0,4351	0,1754	0,1649	0,5719	0,4877	0,3965	0,2772	0,3509	0,4491	0,2561
ДК3642	0,4105	0,4351	0	0,4386	0,4526	0,3123	0,4386	0,4105	0,4667	0,4211	0,4842	0,5158
ДК2323МВ	0,4386	0,1754	0,4386	0	0,2772	0,5579	0,4947	0,4000	0,3053	0,3649	0,4947	0,1965
ДК239МВ	0,4105	0,1649	0,4526	0,2772	0	0,5965	0,5018	0,4000	0,3368	0,3544	0,4140	0,3404
В73	0,4702	0,5719	0,3123	0,5579	0,5965	0	0,4035	0,4526	0,4877	0,4316	0,5368	0,6035
В14	0,4842	0,4877	0,4386	0,4947	0,5018	0,4035	0	0,4316	0,4140	0,3895	0,4456	0,5509
В37	0,4421	0,3965	0,4105	0,4000	0,4000	0,4526	0,4316	0	0,3474	0,2807	0,4456	0,4596
ДК23773М	0,4491	0,2772	0,4667	0,3053	0,3368	0,4877	0,4140	0,3474	0	0,1649	0,4351	0,3474
ДК377С	0,4491	0,3509	0,4211	0,3649	0,3544	0,4316	0,3895	0,2807	0,1649	0	0,4175	0,4140
ДК3673С	0,5053	0,4491	0,4842	0,4947	0,4140	0,5368	0,4456	0,4456	0,4351	0,4175	0	0,5298
ДК232МВ	0,4737	0,2561	0,5158	0,1965	0,3404	0,6035	0,5509	0,4596	0,3474	0,4140	0,5298	0

Таблиця Б.4

Показник генного різноманіття ліній кукурудзи за SNP-маркерами, частка одиниці

Лінія	Показник генного різноманіття	Лінія	Показник генного різноманіття
Лінії плазми Ланкастер			
ДК6342	0,1864	ДК633	0,1764
ДК3626	0,1833	ДК534зСзМ	0,1763
Oh43	0,1821	Мо17	0,1759
ДК8143	0,1816	ДКД9053	0,1754
ДК633266	0,1811	ДК212	0,1751
ДК2965	0,1810	ДК6080	0,1740
ДК3070	0,1808	ДК2668зСзМ	0,1738
ДК117	0,1791	ДКВ3451	0,1736
ДК3023зСзМ	0,1787	ДК3044	0,1734
ДК296МВ	0,1786	ДК231зСзМ	0,1722
ДК298	0,1784	ДК267	0,1718
ДК633325	0,1782	ДК4263	0,1713
ДК366М	0,1779	ДК6337	0,1703
ДК2953зСзМ	0,1771	ДК517МВ	0,1701
ДК1129	0,1769		
Lim		0,1701 ÷ 0,1864	
$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$		0,1771 ± 0,0014	
Лінії неланкастерівських плазм			
ДК2346	0,1901	МС4169	0,1809
ДК7446	0,1880	ДК7736	0,1808
ДК2285СВзМ	0,1879	F2	0,1808
ДК236СВ	0,1873	ДК721	0,1807
ВР731	0,1871	МС4456	0,1807
ДК744М	0,1868	ДК270	0,1804
ДК7443	0,1861	ДК367зС	0,1804
ДК2579СВзМ	0,1852	ДК772М	0,1803
ДК4402	0,1851	ДК301СВзМ	0,1802
ДК3642	0,1846	ДК2777	0,1800
ДК257	0,1839	ДКД2725СВзМ	0,1800
ДК2377зМ	0,1838	ДК4074	0,1799
ДК377С	0,1829	ДК272зС	0,1796
ДК3016	0,1828	ДК232МВ	0,1793
ДК411М	0,1827	ДК239МВ	0,1791
ДК7431	0,1825	МС1294	0,1787
ДК273МВ	0,1823	ДК3902	0,1786
ДК4169	0,1823	ДК2396	0,1780
ДКВ3151М	0,1823	ДК2064СВзМ	0,1776
ДК281МВ	0,1821	ДК315СВзМ	0,1774
ДК2061СВзМ	0,1821	Chi31	0,1770
В73	0,1818	ДК4315СВ	0,1769
ДК2	0,1818	ДК5002СВзМ	0,1768
В14	0,1817	ДК8213	0,1765
В37	0,1815	ДК3527	0,1757
ДК233МВ	0,1815	ДК2323МВ	0,1751
ДК772	0,1815	ДК3641	0,1740
ДК710	0,1813	А188	0,1729
ДК3983	0,1813	ДК200зСзМ	0,1729
ДК2831СВ	0,1811	PLS61	0,1725
Lim		0,1725 ÷ 0,1901	
$\bar{x} \pm \Delta_{0,05}$		0,1809 ± 0,0010	

Таблиця Б.5

Показник зсуву генного різноманіття SNP-маркерів (частка одиниці) та індекс інформативності SNP-маркерів (PIC) (частка одиниці) для досліджених наборів ліній кукурудзи

Номер хромосоми. біна. маркера	L-лінії		NL-лінії		Номер хромосоми. біна і маркера	L-лінії		NL-лінії	
	Показник зсуву генного різноманіття	PIC	Показник зсуву генного різноманіття	PIC		Показник зсуву генного різноманіття	PIC	Показник зсуву генного різноманіття	PIC
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.00.–	–	–	–	–	2.00.–	–	–	–	–
1.01.2	0,3496	0,2885	0,4930	0,3715	2.01.51	0,3496	0,2885	0,3034	0,2573
1.01.3	0,2934	0,2503	0,2221	0,1975	2.01.53	0,3496	0,2885	0,4444	0,3457
1.01.4	0,4870	0,3684	0,2091	0,1873	2.01.54	0,0000	0,0000	0,4082	0,3249
1.02.5	0,2378	0,2095	0,4620	0,3553	2.02.55	0,1748	0,1595	0,4740	0,3617
1.02.6	0,2449	0,2149	0,4620	0,3553	2.02.56	0,2854	0,2447	0,4677	0,3583
1.03.7	0,1207	0,1134	0,4555	0,3518	2.02.57	0,4370	0,3415	0,4728	0,3610
1.04.11	0,0000	0,0000	0,0644	0,0624	2.02.58	0,4370	0,3415	0,4728	0,3610
1.04.13	0,1748	0,1595	0,2550	0,2225	2.02.59	0,4870	0,3684	0,1264	0,1184
1.05.15	0,4664	0,3576	0,3922	0,3153	2.02.60	0,3122	0,2634	0,5000	0,3750
1.05.16	0,3995	0,3197	0,4281	0,3364	2.02.61	0,3122	0,2634	0,5000	0,3750
1.06.18	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2.02.62	0,3200	0,2688	0,4999	0,3749
1.06.20	0,4370	0,3415	0,5000	0,3750	2.02.63	0,3200	0,2688	0,4905	0,3702
1.06.21	0,0624	0,0605	0,4144	0,3285	2.03.64	0,2311	0,2044	0,4946	0,3723
1.07.23	0,1800	0,1638	0,2155	0,1922	2.03.65	0,4911	0,3705	0,4620	0,3553
1.08.25	0,4121	0,3272	0,4987	0,3744	2.03.66	0,1748	0,1595	0,4851	0,3675
1.08.27	0,4953	0,3726	0,1800	0,1638	2.04.68	0,4800	0,3648	0,4757	0,3626
1.09.30	0,4953	0,3726	0,4884	0,3691	2.04.69	0,0000	0,0000	0,3620	0,2965
1.10.31	0,3496	0,2885	0,4976	0,3738	2.04.73	0,4644	0,3566	0,4994	0,3747
1.10.32	0,0000	0,0000	0,3074	0,2601	2.04.74	0,3496	0,2885	0,4483	0,3478
1.10.34	0,3200	0,2688	0,4964	0,3732	2.05.75	0,4579	0,3530	0,3662	0,2992
1.11.35	0,4628	0,3557	0,2344	0,2069	2.05.76	0,3200	0,2688	0,4994	0,3747
1.11.36	0,4953	0,3726	0,2091	0,1873	2.05.77	0,4745	0,3619	0,3953	0,3172
1.11.37	0,4953	0,3726	0,2091	0,1873	2.06.78	0,2706	0,2340	0,3578	0,2938
1.11.39	0,1800	0,1638	0,4061	0,3236	2.06.79	0,2706	0,2340	0,3578	0,2938
1.11.40	0,2778	0,2392	0,4102	0,3261	2.06.80	0,4950	0,3725	0,4486	0,3480
1.11.41	0,1207	0,1134	0,4826	0,3662	2.06.81	0,3578	0,2938	0,4987	0,3744
1.11.42	0,1207	0,1134	0,4826	0,3662	2.06.82	0,3578	0,2938	0,4962	0,3731
1.11.43	0,4953	0,3726	0,4550	0,3515	2.07.83	0,1244	0,1167	0,4281	0,3364
1.11.46	0,2706	0,2340	0,4362	0,3411	2.07.86	0,4518	0,3498	0,4405	0,3435
1.11.47	0,2311	0,2044	0,1372	0,1278	2.07.87	0,3578	0,2938	0,4102	0,3261
1.12.48	0,2854	0,2447	0,4994	0,3747	2.08.90	0,0666	0,0644	0,4144	0,3285
–	–	–	–	–	2.08.91	0,1748	0,1595	0,4930	0,3715
–	–	–	–	–	2.08.92	0,1748	0,1595	0,4930	0,3715
–	–	–	–	–	2.09.93	0,3911	0,3146	0,4709	0,3600
–	–	–	–	–	2.10.381	0,4978	0,3739	0,3029	0,2570
Кількість маркерів	31	31	31	31	Кількість маркерів	35	35	35	35
Середнє	0,2891	0,2343	0,3550	0,2814	Середнє	0,3205	0,2596	0,4360	0,3380
min	0	0	0	0	min	0	0	0,1264	0,1184
max	0,4953	0,3726	0,5	0,375	max	0,4978	0,3739	0,5	0,375
3.00.–	–	–	–	–	4.00.–	–	–	–	–
3.01.96	0,1244	0,1167	0,4620	0,3553	4.01.134	0,4870	0,3684	0,1800	0,1638
3.01.97	0,2311	0,2044	0,4518	0,3498	4.01.135	0,4121	0,3272	0,3578	0,2938
3.01.98	0,0624	0,0605	0,1528	0,1411	4.01.136	0,3911	0,3146	0,1244	0,1167
3.01.99	0,0000	0,0000	0,4061	0,3236	4.01.138	0,4234	0,3338	0,1884	0,1706
3.02.100	0,0000	0,0000	0,2778	0,2392	4.01.139	0,1244	0,1167	0,2122	0,1897
3.03.102	0,0000	0,0000	0,2550	0,2225	4.02.140	0,3496	0,2885	0,3394	0,2818
3.03.103	0,4121	0,3272	0,4654	0,3571	4.02.141	0,4518	0,3498	0,4518	0,3498
3.03.104	0,4200	0,3318	0,1551	0,1431	4.02.142	0,3496	0,2885	0,3394	0,2818
3.03.105	0,1244	0,1167	0,4875	0,3687	4.03.144	0,2311	0,2044	0,4328	0,3391
3.04.106	0,2076	0,1861	0,4260	0,3353	4.03.145	0,3829	0,3096	0,3620	0,2965
3.04.107	0,1207	0,1134	0,4644	0,3566	4.04.147	0,4370	0,3415	0,4144	0,3285
3.04.108	0,1327	0,1239	0,3750	0,3047	4.04.148	0,4370	0,3415	0,4144	0,3285
3.04.109	0,2076	0,1861	0,4215	0,3327	4.04.149	0,0624	0,0605	0,1800	0,1638
3.04.110	0,2778	0,2392	0,4950	0,3725	4.04.150	0,3829	0,3096	0,4555	0,3518
3.04.111	0,2778	0,2392	0,4950	0,3725	4.05.151	0,0624	0,0605	0,3662	0,2992
3.04.112	0,3457	0,2859	0,4786	0,3641	4.05.152	0,3200	0,2688	0,4620	0,3553

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3.04.114	0,3200	0,2688	0,4757	0,3626	4.05.153	0,4527	0,3502	0,4933	0,3716
3.05.116	0,2248	0,1995	0,4518	0,3498	4.06.154	0,0624	0,0605	0,4905	0,3702
3.06.119	0,3578	0,2938	0,1827	0,1660	4.06.155	0,4121	0,3272	0,4281	0,3364
3.06.120	0,1800	0,1638	0,4976	0,3738	4.06.371	0,4995	0,3747	0,4994	0,3747
3.06.121	0,2248	0,1995	0,4240	0,3341	4.07.158	0,3750	0,3047	0,4512	0,3494
3.07.122	0,0000	0,0000	0,4978	0,3739	4.07.384	0,0000	0,0000	0,0000	0
3.07.123	0,0624	0,0605	0,2778	0,2392	4.08.160	0,1244	0,1167	0,4405	0,3435
3.07.124	0,0000	0,0000	0,3200	0,2688	4.08.161	0,4362	0,3411	0,3565	0,2930
3.07.125	0,2248	0,1995	0,4620	0,3553	4.08.162	0,3911	0,3146	0,4328	0,3391
3.08.126	0,2248	0,1995	0,4483	0,3478	4.08.163	0,3911	0,3146	0,4328	0,3391
3.08.127	0,3496	0,2885	0,3953	0,3172	4.08.164	0,1207	0,1134	0,3620	0,2965
3.09.128	0,3995	0,3197	0,4405	0,3435	4.08.165	0,4870	0,3684	0,4677	0,3583
3.09.129	0,3995	0,3197	0,4405	0,3435	4.08.166	0,4870	0,3684	0,4677	0,3583
3.09.130	0,4082	0,3249	0,4405	0,3435	4.08.167	0,4370	0,3415	0,4757	0,3626
3.10.132	0,4995	0,3747	0,2778	0,2392	4.08.168	0,3829	0,3096	0,4905	0,3702
–	–	–	–	–	4.09.169	0,4121	0,3272	0,4851	0,3675
–	–	–	–	–	4.09.170	0,1748	0,1595	0,4826	0,3662
–	–	–	–	–	4.09.171	0,3122	0,2634	0,4999	0,3749
–	–	–	–	–	4.09.172	0,4644	0,3566	0,4999	0,3749
–	–	–	–	–	4.09.173	0,3578	0,2938	0,3750	0,3047
–	–	–	–	–	4.10.174	0,4745	0,3619	0,3282	0,2743
–	–	–	–	–	4.10.175	0,4745	0,3619	0,3436	0,2846
–	–	–	–	–	4.10.176	0,1748	0,1595	0,2061	0,1849
Кількість маркерів	31	31	31	31	Кількість маркерів	39	39	39	39
Середнє	0,2200	0,1852	0,3968	0,3128	Середнє	0,3387	0,2711	0,3792	0,3001
min	0	0	0,1528	0,1411	min	0	0	0	0
max	0,4995	0,3747	0,4978	0,3739	max	0,4995	0,3747	0,4999	0,3749
5.00.177	0,3200	0,2688	0,3922	0,3153	6.00.–	–	–	–	–
5.00.178	0,3578	0,2938	0,4186	0,3310	6.01.232	0,2706	0,2340	0,2061	0,1849
5.00.179	0,4800	0,3648	0,4038	0,3223	6.01.233	0,2778	0,2392	0,4962	0,3731
5.00.180	0,3122	0,2634	0,3953	0,3172	6.01.237	0,0666	0,0644	0,4898	0,3698
5.01.181	0,0666	0,0644	0,4144	0,3285	6.01.238	0,1748	0,1595	0,4826	0,3662
5.01.185	0,0624	0,0605	0,4405	0,3435	6.01.239	0,2706	0,2340	0,4061	0,3236
5.01.186	0,3122	0,2634	0,3436	0,2846	6.01.378	0,4870	0,3684	0,4367	0,3413
5.02.187	0,3911	0,3146	0,2311	0,2044	6.01.379	0,4870	0,3684	0,4481	0,3477
5.02.188	0,0000	0,0000	0,4851	0,3675	6.02.240	0,3911	0,3146	0,3074	0,2601
5.02.189	0,0000	0,0000	0,0655	0,0634	6.03.245	0,0000	0,0000	0,3436	0,2846
5.03.190	0,3200	0,2688	0,2550	0,2225	6.03.246	0,1800	0,1638	0,2091	0,1873
5.03.191	0,3282	0,2743	0,4144	0,3285	6.04.380	0,4870	0,3684	0,3436	0,2846
5.03.192	0,3829	0,3096	0,3995	0,3197	6.05.248	0,0000	0,0000	0,4240	0,3341
5.03.195	0,0624	0,0605	0,4999	0,3749	6.05.249	0,1748	0,1595	0,4994	0,3747
5.03.197	0,2854	0,2447	0,4281	0,3364	6.05.250	0,3496	0,2885	0,4038	0,3223
5.03.198	0,2854	0,2447	0,4321	0,3388	6.05.251	0,2248	0,1995	0,0644	0,0624
5.03.201	0,0000	0,0000	0,3394	0,2818	6.05.253	0,2378	0,2095	0,4126	0,3275
5.03.202	0,3200	0,2688	0,4826	0,3662	6.05.254	0,1855	0,1683	0,3610	0,2958
5.03.203	0,3496	0,2885	0,4826	0,3662	6.05.255	0,4444	0,3457	0,3878	0,3126
5.04.204	0,2706	0,2340	0,4561	0,3521	6.05.256	0,3122	0,2634	0,2061	0,1849
5.04.205	0,4995	0,3747	0,4786	0,3641	6.07.257	0,4870	0,3684	0,4987	0,3744
5.04.206	0,4644	0,3566	0,3478	0,2873	6.07.258	0,4800	0,3648	0,4826	0,3662
5.04.207	0,4644	0,3566	0,3478	0,2873	6.07.259	0,4870	0,3684	0,4987	0,3744
5.04.208	0,4995	0,3747	0,4925	0,3712	6.08.–	–	–	–	–
5.04.209	0,4995	0,3747	0,4925	0,3712	–	–	–	–	–
5.04.210	0,4370	0,3415	0,4186	0,3310	–	–	–	–	–
5.04.211	0,4953	0,3726	0,4919	0,3709	–	–	–	–	–
5.04.213	0,4911	0,3705	0,3565	0,2930	–	–	–	–	–
5.05.215	0,4579	0,3530	0,2854	0,2447	–	–	–	–	–
5.05.216	0,4579	0,3530	0,2854	0,2447	–	–	–	–	–
5.05.218	0,3282	0,2743	0,3521	0,2901	–	–	–	–	–
5.06.219	0,4870	0,3684	0,3436	0,2846	–	–	–	–	–
5.06.221	0,4800	0,3648	0,4978	0,3739	–	–	–	–	–
5.07.223	0,4644	0,3566	0,4905	0,3702	–	–	–	–	–
5.07.224	0,4644	0,3566	0,0677	0,0654	–	–	–	–	–
5.08.226	0,4870	0,3684	0,4444	0,3457	–	–	–	–	–
5.08.227	0,4537	0,3508	0,4764	0,3629	–	–	–	–	–
5.08.375	0,3578	0,2938	0,4405	0,3435	–	–	–	–	–
5.09.230	0,1207	0,1134	0,4978	0,3739	–	–	–	–	–
Кількість маркерів	39	39	39	39	Кількість маркерів	22	22	22	22
Середнє	0,3414	0,2708	0,3946	0,3112	Середнє	0,2943	0,2387	0,3822	0,3024
min	0	0	0,0655	0,0634	min	0	0	0,0644	0,0624
max	0,4995	0,3747	0,4999	0,3749	max	0,487	0,3684	0,4994	0,3747
7.00.262	0,2311	0,2044	0,1576	0,1451	8.00.–	–	–	–	–

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7.01.263	0,4579	0,3530	0,4585	0,3534	8.01.282	0,3282	0,2743	0,4709	0,3600
7.01.264	0,3496	0,2885	0,4585	0,3534	8.01.283	0,3578	0,2938	0,4585	0,3534
7.02.265	0,0950	0,0905	0,4925	0,3712	8.01.284	0,1207	0,1134	0,2550	0,2225
7.02.266	0,0000	0,0000	0,3394	0,2818	8.01.285	0,3995	0,3197	0,3813	0,3086
7.02.267	0,0000	0,0000	0,4328	0,3391	8.01.286	0,4281	0,3364	0,4550	0,3515
7.02.268	0,0000	0,0000	0,0644	0,0624	8.01.288	0,2706	0,2340	0,3034	0,2573
7.02.269	0,0624	0,0605	0,4925	0,3712	8.02.290	0,4995	0,3747	0,2344	0,2069
7.03.270	0,4995	0,3747	0,4405	0,3435	8.02.291	0,3911	0,3146	0,4709	0,3600
7.03.271	0,0644	0,0624	0,3750	0,3047	8.02.292	0,2449	0,2149	0,3620	0,2965
7.03.272	0,4882	0,3690	0,4984	0,3742	8.03.293	0,0624	0,0605	0,1855	0,1683
7.04.273	0,4870	0,3684	0,1264	0,1184	8.03.294	0,2311	0,2044	0,3995	0,3197
7.05.274	0,2311	0,2044	0,4740	0,3617	8.03.295	0,2248	0,1995	0,3656	0,2987
7.05.275	0,3200	0,2688	0,4930	0,3715	8.03.297	0,0000	0,0000	0,4946	0,3723
7.05.278	0,4953	0,3726	0,4481	0,3477	8.03.298	0,4579	0,3530	0,3995	0,3197
7.05.279	0,1748	0,1595	0,3034	0,2573	8.04.299	0,4579	0,3530	0,3436	0,2846
7.06.280	0,4444	0,3457	0,4644	0,3566	8.04.300	0,4579	0,3530	0,3436	0,2846
7.06.370	0,4911	0,3705	0,3436	0,2846	8.04.301	0,4579	0,3530	0,3478	0,2873
–	–	–	–	–	8.04.302	0,1748	0,1595	0,4786	0,3641
–	–	–	–	–	8.05.304	0,4995	0,3747	0,3792	0,3073
–	–	–	–	–	8.05.305	0,3829	0,3096	0,4994	0,3747
–	–	–	–	–	8.05.306	0,3829	0,3096	0,4994	0,3747
–	–	–	–	–	8.06.308	0,4953	0,3726	0,2344	0,2069
–	–	–	–	–	8.06.309	0,2248	0,1995	0,3478	0,2873
–	–	–	–	–	8.07.311	0,4579	0,3530	0,3074	0,2601
–	–	–	–	–	8.07.312	0,0644	0,0624	0,3662	0,2992
–	–	–	–	–	8.08.313	0,4994	0,3747	0,4367	0,3413
–	–	–	–	–	8.08.314	0,4870	0,3684	0,3750	0,3047
–	–	–	–	–	8.08.315	0,4994	0,3747	0,4367	0,3413
–	–	–	–	–	8.09.316	0,1207	0,1134	0,2550	0,2225
–	–	–	–	–	8.09.318	0,1975	0,1780	0,4321	0,3388
Кількість маркерів	18	18	18	18	Кількість маркерів	30	30	30	30
Середнє	0,2718	0,2163	0,3813	0,2999	Середнє	0,3292	0,2634	0,3773	0,3025
min	0	0	0,0644	0,0624	min	0	0	0,1855	0,1683
max	0,4995	0,3747	0,4984	0,3742	max	0,4995	0,3747	0,4994	0,3747
9.00.–	–	–	–	–	10.00.–	–	–	–	–
9.01.319	0,2706	0,2340	0,4994	0,3747	10.01.343	0,3107	0,2624	0,3062	0,2593
9.01.320	0,4995	0,3747	0,4481	0,3477	10.01.344	0,3122	0,2634	0,3995	0,3197
9.01.321	0,1244	0,1167	0,4800	0,3648	10.02.345	0,3122	0,2634	0,3995	0,3197
9.02.323	0,2248	0,1995	0,4728	0,3610	10.02.347	0,3122	0,2634	0,4987	0,3744
9.02.324	0,4370	0,3415	0,4950	0,3725	10.02.348	0,4121	0,3272	0,2378	0,2095
9.02.383	0,0950	0,0905	0,1087	0,1028	10.03.349	0,1244	0,1167	0,2091	0,1873
9.03.327	0,0000	0,0000	0,2061	0,1849	10.03.350	0,3829	0,3096	0,4964	0,3732
9.03.329	0,4995	0,3747	0,1528	0,1411	10.03.351	0,1207	0,1134	0,3200	0,2688
9.04.331	0,1244	0,1167	0,3662	0,2992	10.03.352	0,3122	0,2634	0,4709	0,3600
9.04.332	0,1244	0,1167	0,2622	0,2278	10.04.353	0,3122	0,2634	0,4709	0,3600
9.04.333	0,4370	0,3415	0,2378	0,2095	10.04.355	0,3496	0,2885	0,4884	0,3691
9.04.334	0,1284	0,1202	0,2832	0,2431	10.04.356	0,0000	0,0000	0,4800	0,3648
9.04.335	0,0644	0,0624	0,3995	0,3197	10.04.357	0,1207	0,1134	0,4728	0,3610
9.05.338	0,2378	0,2095	0,4911	0,3705	10.04.358	0,4644	0,3566	0,4550	0,3515
9.06.340	0,2248	0,1995	0,2344	0,2069	10.05.–	–	–	–	–
9.07.341	0,4370	0,3415	0,4677	0,3583	10.06.359	0,1207	0,1134	0,4362	0,3411
9.07.342	0,0000	0,0000	0,2688	0,2327	10.06.360	0,0624	0,0605	0,3620	0,2965
9.08.–	–	–	–	–	10.06.361	0,1207	0,1134	0,2550	0,2225
–	–	–	–	–	10.07.362	0,1207	0,1134	0,2550	0,2225
–	–	–	–	–	10.07.364	0,3200	0,2688	0,4728	0,3610
–	–	–	–	–	10.07.365	0,2778	0,2392	0,4826	0,3662
–	–	–	–	–	10.07.366	0,3750	0,3047	0,4994	0,3747
–	–	–	–	–	10.07.367	0,1207	0,1134	0,3750	0,3047
–	–	–	–	–	10.07.372	0,0000	0,0000	0,2344	0,2069
Кількість маркерів	17	17	17	17	Кількість маркерів	23	23	23	23
Середнє	0,2311	0,1906	0,3455	0,2775	Середнє	0,2332	0,1970	0,3947	0,3119
min	0	0	0,1087	0,1028	min	0	0	0,2091	0,1873
max	0,4995	0,3747	0,4994	0,3747	max	0,4644	0,3566	0,4994	0,3747

Таблиця Б.6

Коефіцієнти приналежності Q для ліній кукурудзи, розраховані за результатами SNP-генотипування (Structure, при $k=2$)

№ зп	Лінія	Група 1	Група 2	№ зп	Лінія	Група 1	Група 2
Лінії плазми Ланкастер за педігрі (L)							
1	ДК117зСМВ	0,008	0,992	17	ДК3023зСзМ	0,004	0,996
2	ДК212	0,237	0,763	18	ДК3044	0,022	0,978
3	ДК231зС	0,013	0,987	19	ДК3070	0,009	0,991
4	ДК267	0,302	0,698	20	ДК3626	0,219	0,781
5	ДК296МВ	0,135	0,865	21	ДК4263	0,055	0,945
6	ДК298	0,127	0,873	22	ДК6080	0,223	0,777
7	ДК366М	0,079	0,921	23	ДК6337зСзМ	0,120	0,880
8	ДК427	0,264	0,736	24	ДК6342	0,210	0,790
9	ДК517МВ	0,071	0,929	25	ДК8143	0,038	0,962
10	ДК534зСзМ	0,003	0,997	26	ДК633266	0,069	0,931
11	ДК633	0,003	0,997	27	ДК633325	0,124	0,876
12	ДК1129	0,273	0,727	28	ДКВ3451	0,005	0,995
13	ДК2668	0,304	0,696	29	ДКД9053	0,004	0,996
14	ДК2953зСзМ	0,036	0,964	30	Мо17	0,003	0,997
15	ДК2965зСзМ	0,018	0,982	31	Oh43	0,331	0,669
16	ДК2980зСМВ	0,137	0,863				
Середнє для L-ліній						0,111±0,119	0,889±0,119
Лінії, неспоріднені з плазмою Ланкастер за педігрі (NL)							
Лінії плазми Айодент							
32	ДК236СВ	0,684	0,316	44	ДК2579СВзМ	0,984	0,016
33	ДК257	0,857	0,143	45	ДК2777	0,997	0,003
34	ДК301СВзМ	0,998	0,002	46	ДК3016	0,995	0,005
35	ДК315СВзМ	0,893	0,107	47	ДК3641	0,742	0,258
36	ДК411М	0,999	0,001	48	ДК4074	0,997	0,003
37	ДК710	0,998	0,002	49	ДК7431	0,996	0,004
38	ДК721	0,997	0,003	50	ДК7443	0,877	0,123
39	ДК744М	0,996	0,004	51	ДК7446	0,997	0,003
40	ДК772	0,997	0,003	52	ДК7736	0,997	0,003
41	ДК772М	0,997	0,003	53	ДКВ3151М	0,998	0,002
42	ДК2061СВзМ	0,991	0,009	54	ДКД2725СВзМ	0,601	0,399
43	ДК2064СВзМ	0,990	0,010				
Середнє						0,938	0,062
Лінії плазм А188, Chi31, PLS61							
55	A188	0,289	0,711	57	PLS61	0,241	0,759
56	Chi31	0,248	0,752				
Середнє						0,259	0,741
Лінії плазми Лакон							
58	ДК2	0,169	0,831	62	ДК273МВ	0,267	0,733
59	ДК200зСзМ	0,261	0,739	63	ДК3527	0,319	0,681
60	ДК270	0,170	0,830	64	F2	0,208	0,792
61	ДК272зС	0,215	0,785				
Середнє						0,230	0,770
Лінії плазми Рейд							
65	ВР731	0,257	0,743	73	ДК2396	0,190	0,810
66	ДК232МВ	0,250	0,750	74	ДК3642	0,546	0,454
67	ДК239МВ	0,250	0,750	75	ДК3902	0,611	0,389
68	ДК367зС	0,299	0,701	76	ДК8213	0,327	0,673
69	ДК377С	0,321	0,679	77	В14	0,332	0,668
70	ДК2323МВ	0,254	0,746	78	В37	0,235	0,765
71	ДК2346	0,317	0,683	79	В73	0,419	0,581
72	ДК2377зМ	0,343	0,657				
Середнє						0,330	0,670
Лінії плазми Мікс, неспоріднені з Ланкастер							
80	ДК233МВ	0,504	0,496	86	ДК4315СВ	0,603	0,397
81	ДК281МВ	0,584	0,416	87	ДК4402	0,496	0,504
82	ДК2285СВзМ	0,823	0,177	88	ДК5002СВзМ	0,751	0,249
83	ДК2831СВ	0,724	0,276	89	МС1294	0,323	0,677
84	ДК3983	0,558	0,442	90	МС4169	0,989	0,011
85	ДК4169	0,987	0,013	91	МС4456	0,318	0,682
Середнє						0,638	0,362
Середнє для NL-ліній						0,610±0,103	0,390±0,103

Таблиця Б.7

Пропущені та унікальні алелі SNP-маркерів у ліній кукурудзи

Алель	SNP-маркер	Частота алеля в групі	
		ліній Ланкастер (пропущеного)	NL-ліній (унікального)
А	11АГ*	0	0,0339
	32АЦ	0	0,1930
	54АЦ	0	0,2909
	99АГ	0	0,2881
	100АГ	0	0,1695
	102АГ	0	0,1525
	266АГ	0	0,2203
	356АГ	0	0,4068
Ц	267АЦ	0	0,3220
	372ЦГ	0	0,1356
Г	69АГ	0	0,2414
	124ЦГ	0	0,2034
	188АГ	0	0,4211
	189АГ	0	0,0345
	268АГ	0	0,0339
	342ЦГ	0	0,1633
Т	—	—	—

Примітка. *Наведено номер маркера панелі BDI-III та його альтернативні алелі.

Додаток В
Додаткові матеріали до розділу 4

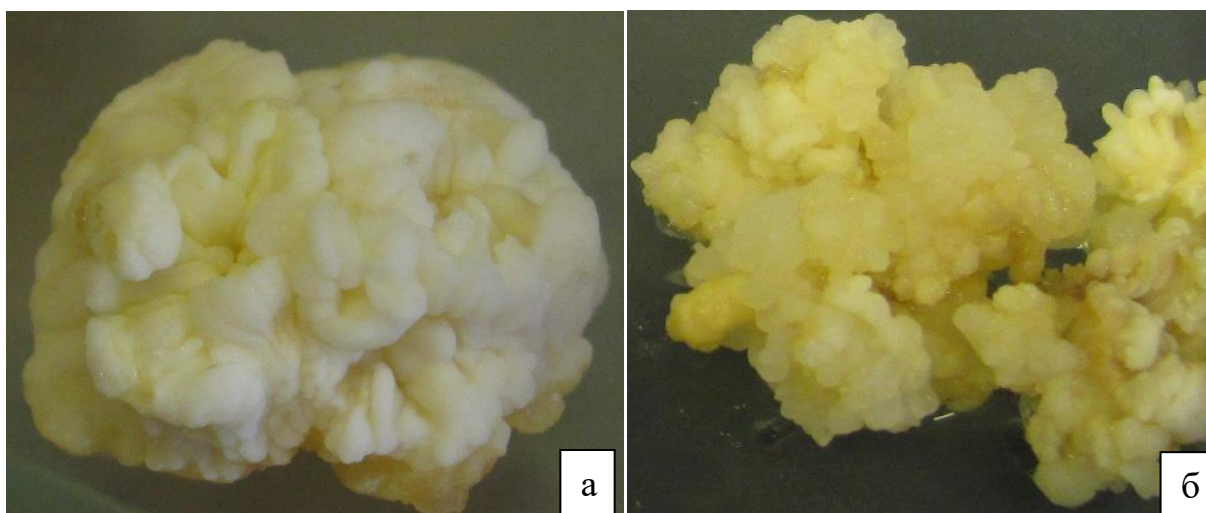


Рис. В.1. Морфогенні калуси кукурудзи: а – калус I типу (лінія ДК267), б – калус II типу (лінія ДК633)



Рис. В.2. Субкультивовані калуси II типу лінії кукурудзи ДК633266 на 60-ту добу від експлантації незрілих зародків

Таблиця В.1

Індукція загального калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів

Лінія	Загальна частота калусогенезу, %			
	2010 рік	2011 рік	2012 рік	Середнє за три роки
Лінії плазми Ланкастер				
ДК633	0	53,4 ± 6,2	92,0 ± 5,5	48,5 ± 2,7
ДК267	87,6 ± 3,1	95,2 ± 3,0	95,5 ± 1,8	92,8 ± 1,6
ДК212	91,0 ± 3,5	100,0 ± 0,0	82,9 ± 8,4	91,3 ± 3,0
ДК6080	98,9 ± 1,5	88,5 ± 5,1	94,2 ± 4,6	93,9 ± 2,4
ДК420-1	92,5 ± 3,8	98,8 ± 1,7	82,0 ± 7,7	91,1 ± 2,9
ДК633266	99,0 ± 1,0	97,9 ± 2,4	97,7 ± 2,6	98,2 ± 1,2
ДК298	96,8 ± 0,9	97,1 ± 2,5	93,6 ± 4,1	95,8 ± 1,6
ДК3070	0	99,6 ± 0,9	87,8 ± 5,0	62,5 ± 1,7
ДК236	0	97,9 ± 2,9	98,5 ± 2,1	65,5 ± 1,2
ДК633325	0	96,0 ± 5,6	87,2 ± 5,8	61,1 ± 2,7
Лінії-стандарти				
A188	–	98,7 ± 2,7	–	98,7 ± 2,7
Chi31	91,3 ± 1,3	94,9 ± 4,1	–	93,1 ± 2,2
PLS61	–	97,3 ± 2,4	96,3 ± 2,5	96,8 ± 1,7

Таблиця В.2

Індукція морфогенного калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів

Лінія	Частота утворення морфогенних калусів, %			
	2010 рік	2011 рік	2012 рік	Середнє за три роки
Лінії плазми Ланкастер				
ДК633	0	14,4 ± 4,3	88,0 ± 6,5	34,1 ± 2,6
ДК267	71,5 ± 4,3	88,9 ± 4,4	51,3 ± 4,4	70,5 ± 2,5
ДК212	40,7 ± 6,0	94,4 ± 7,7	65,9 ± 10,5	67,0 ± 4,8
ДК6080	37,6 ± 7,1	67,5 ± 7,5	86,4 ± 6,8	63,9 ± 4,1
ДК420-1	30,2 ± 6,5	47,3 ± 7,8	77,0 ± 8,5	51,5 ± 4,4
ДК633266	84,6 ± 3,7	88,8 ± 5,3	96,2 ± 3,4	89,9 ± 2,4
ДК298	78,5 ± 4,3	82,3 ± 5,8	91,5 ± 4,7	84,1 ± 2,9
ДК3070	0	82,1 ± 5,0	13,4 ± 5,2	31,8 ± 2,4
ДК236	0	72,2 ± 9,2	98,5 ± 2,1	56,9 ± 3,1
ДК633325	0	64,0 ± 13,7	67,7 ± 8,1	43,9 ± 5,3
Лінії-стандарти				
A188	–	92,0 ± 6,3	–	92,0 ± 6,3
Chi31	59,2 ± 4,5	84,6 ± 6,7	–	71,9 ± 4,0
PLS61	–	96,2 ± 2,8	95,0 ± 2,8	95,6 ± 2,0

Таблиця В.3

Індукція калусогенезу І типу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів

Лінія	Частота утворення калусів І типу, %			
	2010 рік	2011 рік	2012 рік	Середнє за три роки
Лінії плазми Ланкастер				
ДК633	0	9,9 ± 3,7	0	3,3 ± 1,2
ДК267	67,9 ± 4,4	14,5 ± 4,9	4,5 ± 1,8	29,0 ± 2,3
ДК212	13,8 ± 4,2	0	0	4,6 ± 1,4
ДК6080	0	5,1 ± 3,5	40,8 ± 9,7	15,3 ± 3,5
ДК420-1	2,5 ± 2,2	3,0 ± 2,7	59,0 ± 9,9	21,5 ± 3,5
ДК633266	5,5 ± 2,3	0	96,2 ± 3,4	33,9 ± 1,4
ДК298	34,7 ± 4,9	10,3 ± 4,6	86,5 ± 5,8	43,8 ± 3,0
ДК3070	0	13,3 ± 4,4	0	4,4 ± 1,5
ДК236	0	19,6 ± 8,1	22,0 ± 7,2	13,9 ± 3,6
ДК633325	0	0	0	0
Лінії-стандарт				
A188	–	0	–	0
Chi31	19,7 ± 3,7	0	–	9,8 ± 1,8
PLS61	–	48,6 ± 7,4	5,0 ± 2,8	26,8 ± 4,0

Таблиця В.4

Індукція калусогенезу ІІ типу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів

Лінія	Частота утворення калусів ІІ типу, %			
	2010 рік	2011 рік	2012 рік	Середнє за три роки
Лінії плазми Ланкастер				
ДК633	0	4,6 ± 2,6	88,0 ± 6,5	30,9 ± 2,3
ДК267	3,5 ± 1,7	74,4 ± 6,1	46,8 ± 4,4	41,6 ± 2,6
ДК212	26,9 ± 5,4	94,4 ± 7,7	65,9 ± 10,5	62,4 ± 4,7
ДК6080	37,6 ± 7,1	62,4 ± 7,8	45,6 ± 9,9	48,6 ± 4,8
ДК420-1	27,6 ± 6,4	44,3 ± 7,7	18,0 ± 7,7	30,0 ± 4,2
ДК633266	79,1 ± 4,2	88,8 ± 5,3	0	56,0 ± 2,2
ДК298	43,8 ± 5,2	72,0 ± 6,8	5,0 ± 3,7	40,3 ± 3,1
ДК3070	0	68,8 ± 6,1	13,4 ± 5,2	27,4 ± 2,7
ДК236	0	52,6 ± 10,2	76,5 ± 7,4	43,0 ± 4,2
ДК633325	0	64,0 ± 13,7	67,7 ± 8,1	43,9 ± 5,3
Лінії-стандарт				
A188	–	92,0 ± 6,3	–	92,0 ± 6,3
Chi31	39,5 ± 4,5	84,6 ± 6,7	–	62,1 ± 4,0
PLS61	–	47,5 ± 7,4	90,0 ± 3,9	68,8 ± 4,2

Таблиця В.5

Двофакторний дисперсійний аналіз загальної частоти калусогенезу у ліній кукурудзи
плазми Ланкастер (генотип × умови року)

Джерело варіювання	<i>df</i>	Сума квадратів	Середній квадрат	$F_{\text{факт.}}$	<i>P</i>	$F_{0,01}$	$\eta^2_{x \pm \Delta \eta^2_{x_{0,01}}}$
Генотип	9	53,445	5,938	78,0	$8,18 \cdot 10^{-138}$	2,4	$8,92 \pm 0,22$
Умови року	2	0,979	0,489	6,4	0,0016	4,6	$0,16 \pm 0,05$
Генотип х умови року	18	41,064	2,281	29,9	$1,17 \cdot 10^{-98}$	1,6	$6,85 \pm 0,46$
Випадкові відхилення	6612	503,732	0,076	-	-	-	84,07
Разом	6641	599,220	0,090	-	-	-	-

Таблиця В.6

Двофакторний дисперсійний аналіз частоти утворення морфогенних калусів у ліній
кукурудзи плазми Ланкастер (генотип × умови року)

Джерело варіювання	<i>df</i>	Сума квадратів	Середній квадрат	$F_{\text{факт.}}$	<i>P</i>	$F_{0,01}$	$\eta^2_{x \pm \Delta \eta^2_{x_{0,01}}}$
Генотип	9	126,114	14,013	76,0	$2,56 \cdot 10^{-134}$	2,4	$8,09 \pm 0,22$
Умови року	2	35,927	17,964	97,4	$2,12 \cdot 10^{-42}$	4,6	$2,30 \pm 0,05$
Генотип х умови року	18	176,835	9,824	53,3	$1,05 \cdot 10^{-178}$	1,6	$11,34 \pm 0,42$
Випадкові відхилення	6612	1219,895	0,184	-	-	-	78,27
Разом	6641	1558,771	0,235	-	-	-	-

Таблиця В.7

Двофакторний дисперсійний аналіз частоти утворення калусів І типу у ліній кукурудзи
плазми Ланкастер (генотип × умови року)

Джерело варіювання	<i>df</i>	Сума квадратів	Середній квадрат	$F_{\text{факт.}}$	<i>P</i>	$F_{0,01}$	$\eta^2_{x \pm \Delta \eta^2_{x_{0,01}}}$
Генотип	9	79,385	8,821	67,8	$5,85 \cdot 10^{-120}$	2,4	$5,90 \pm 0,17$
Умови року	2	79,443	39,722	305,3	$1,50 \cdot 10^{-127}$	4,6	$5,91 \pm 0,17$
Генотип х умови року	18	325,312	18,073	138,9	$2,22 \cdot 10^{-421}$	1,6	$24,20 \pm 0,35$
Випадкові відхилення	6612	860,249	0,130	-	-	-	63,99
Разом	6641	1344,390	-	-	-	-	-

Таблиця В.8

Двофакторний дисперсійний аналіз частоти утворення калусів II типу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер (генотип x умови року)

Джерело варіювання	<i>df</i>	Сума квадратів	Середній квадрат	$F_{\text{факт.}}$	<i>P</i>	$F_{0,01}$	$\eta^2_{\text{х}} \pm \Delta \eta^2_{\text{х},0,01}$
Генотип	9	68,935	7,659	54,8	$9,64 \cdot 10^{-97}$	2,4	$4,59 \pm 0,17$
Умови року	2	156,746	78,373	560,3	$1,62 \cdot 10^{-225}$	4,6	$10,43 \pm 0,04$
Генотип x умови року	18	352,419	19,579	134,0	$1,96 \cdot 10^{-423}$	1,6	$23,44 \pm 0,33$
Випадкові відхилення	6612	924,837	0,140	-	-	-	61,54
Разом	6641	1502,938	0,226	-	-	-	-

Таблиця В.9

Однофакторний дисперсійний аналіз впливу умов року на показники калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів (наведено $F_{\text{факт}}$)

Лінія	Загаль- на частота калусо- генезу	Частота утворення			Лінія	Загаль- на частота калусо- генезу	Частота утворення		
		морфо- генних калусів	калусів І типу	калусів ІІ типу			морфо- генних калусів	калусів І типу	калусів ІІ типу
Лінії плазми Ланкастер									
ДК633	543,86*	619,75*	31,24*	1252,66*	ДК633266	0,71	6,23*	1176,56*	297,60*
ДК267	12,29*	56,60*	413,31*	268,87*	ДК298	1,68	5,96*	137,67*	90,15*
ДК212	4,57*†	25,82*	9,38*	54,30*	ДК3070	1815,72*	457,22*	27,73*	243,53*
ДК6080	8,63*	42,63*	81,38*	11,11*	ДК236	12465,36*	1864,02*	59,07*	488,95*
ДК420-1	13,37*	33,45*	169,75*	11,75*	ДК633325	2339,37*	532,84*	—	542,04*
Лінії-стандарти									
Chi31	1,60	27,52*	28,54*	87,36*	PLS61	0,33	0,33	145,71*	117,20*

Примітка. *Вплив фактора достовірний на рівні значущості 0,01. *†Вплив фактору достовірний на рівні значущості 0,05. Для L-ліній число ступенів свободи факторіальне (міжгрупове) = 2, випадкове (внутрішньо групове) = 383-1169; $F_{0,05}=3,0$, $F_{0,01}=4,7$. Для NL-ліній число ступенів свободи факторіальне (міжгрупове) = 1, випадкове (внутрішньо групове) = 421-588, $F_{0,05}=3,9$, $F_{0,01}=6,7$.

Таблиця В.10

Сила впливу умов року на ступінь прояву ознак, що характеризують індукцію калусогенезу у ліній кукурудзи плазми Ланкастер та ліній-стандартів, %

Лінія	«Загальна частота калусогенезу»	«Частота утворення морфогенних калусів»	«Частота утворення калусів I типу»	«Частота утворення калусів II типу»
Лінії плазми Ланкастер				
ДК633	56,6 ± 0,2	59,8 ± 0,2	7,0 ± 0,4	75,0 ± 0,1
ДК267	2,1 ± 0,3	8,8 ± 0,3	41,4 ± 0,2	31,5 ± 0,2
ДК212	2,3 ± 1,0	11,9 ± 0,9	4,7 ± 1,0	22,1 ± 0,8
ДК6080	3,8 ± 0,9	16,1 ± 0,8	26,9 ± 0,7	4,8 ± 0,9
ДК420-1	5,5 ± 0,8	12,6 ± 0,8	42,3 ± 0,5	4,8 ± 0,8
ДК633266	0,2 ± 0,6	1,9 ± 0,6	78,3 ± 0,1	47,7 ± 0,3
ДК298	0,5 ± 0,6	1,7 ± 0,6	28,7 ± 0,4	20,8 ± 0,5
ДК3070	85,9 ± 0,1	60,5 ± 0,3	8,5 ± 0,6	45,0 ± 0,4
ДК236	97,4 ± 0,02	84,8 ± 0,1	15,0 ± 0,5	59,3 ± 0,2
ДК633325	86,8 ± 0,1	59,9 ± 0,2	0	60,3 ± 0,2
Ліній-стандарти				
A188	—	—	—	—
Chi31	0,3 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,6 ± 0,3	12,9 ± 0,3
PLS61	0,1 ± 0,5	0,1 ± 0,5	25,7 ± 0,4	21,8 ± 0,4

Таблиця В.11

Рівень ознак, які характеризують індукцію калусогенезу в культурі *in vitro*, у гібридів кукурудзи між лініями плазми Ланкастер

Гібрид	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
		морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
ДК267×ДК6080	93,3 ± 5,8	93,3 ± 5,8	93,3 ± 5,8	0
ДК6080×ДК267	97,3 ± 3,8	97,3 ± 3,8	97,3 ± 3,7	0
ДК420-1×ДК6080	85,4 ± 10,3	64,6 ± 14,0	64,6 ± 14,0	0
ДК6080×ДК420-1	85,7 ± 15,7	85,7 ± 15,7	85,7 ± 15,7	0
ДК212×ДК6080	88,7 ± 7,6	85,9 ± 8,3	0	85,9 ± 8,3
ДК6080×ДК212	97,3 ± 3,8	97,3 ± 3,8	0	97,3 ± 3,8
ДК633266×ДК298	88,9 ± 9,5	84,4 ± 10,9	84,4 ± 10,9	0
ДК212×ДК633266	90,6 ± 10,5	25,0 ± 15,6	0	25,0 ± 15,6
ДК633266×ДК212	90,9 ± 7,8	90,9 ± 7,8	90,9 ± 7,8	0
ДК267×ДК633266	96,4 ± 5,0	58,9 ± 13,3	0	58,9 ± 13,3
ДК633266×ДК267	96,0 ± 4,6	24,0 ± 9,9	0	24,0 ± 9,9
ДК267×ДК298	94,7 ± 5,2	92,0 ± 6,3	40,0 ± 11,4	52,0 ± 11,6
ДК298×ДК267	83,5 ± 8,4	78,5 ± 9,3	51,9 ± 11,3	26,6 ± 10,0
ДК420-1×ДК298	89,8 ± 8,7	85,7 ± 10,1	85,7 ± 10,1	0
ДК298×ДК420-1	93,6 ± 7,2	80,9 ± 11,6	80,9 ± 11,6	0
ДК267×ДК236	92,2 ± 7,6	88,2 ± 9,1	88,2 ± 9,1	0
ДК236×ДК267	94,3 ± 5,6	91,4 ± 6,7	91,4 ± 6,7	0
ДК6080×ДК633325	88,0 ± 9,3	88,0 ± 9,3	0	88,0 ± 9,3
ДК633325×ДК6080	93,2 ± 7,7	90,9 ± 8,8	0	90,9 ± 8,8
ДК236×ДК633325	84,0 ± 8,5	82,7 ± 8,8	0	82,7 ± 8,8
ДК633325×ДК236	91,4 ± 6,7	91,4 ± 6,7	0	91,4 ± 6,7
Середнє	91,2±4,3	79,9±2,2	45,5±1,7	34,4±1,6

Таблиця В.12

Рівень ознак, які характеризують індукцію калусогенезу у гібридів кукурудзи між лініями плазми Ланкастер та лінією A188

Гібрид	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
		морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
ДК420-1×A188	85,9 ± 7,3	83,7 ± 7,7	81,5 ± 8,1	2,2 ± 3,1
A188×ДК420-1	98,6 ± 2,9	97,1 ± 4,1	94,2 ± 5,7	2,9 ± 4,1
ДК298×A188	98,7 ± 2,7	98,7 ± 2,7	22,7 ± 9,7	76,0 ± 9,9
A188×ДК298	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	2,8 ± 3,9	97,2 ± 3,9
ДК633×A188	100,0 ± 0,0	97,7 ± 4,6	93,2 ± 7,7	4,5 ± 6,4
A188×ДК633	100,0 ± 0,0	97,7 ± 4,6	27,3 ± 13,6	70,4 ± 13,9
Середнє	96,2 ± 1,9	95,0 ± 2,2	53,6 ± 5,0	41,4 ± 5,0

Таблиця В.13

Рівень ознак, які характеризують індукцію калусогенезу у гібридів кукурудзи між лініями плазми Ланкастер та лінією Chi31

Гібрид	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
		морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
ДК633×Chi31	65,9 ± 10,4	60,0 ± 10,7	57,7 ± 10,8	2,3 ± 3,3
Chi31×ДК633	60,0 ± 11,8	60,0 ± 11,8	60,0 ± 11,8	0
ДК3070×Chi31	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0
Chi31×ДК3070	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	98,3 ± 3,3	1,7 ± 3,3
ДК236×Chi31	100,0 ± 0,0	98,7 ± 2,7	98,7 ± 2,7	0
Chi31×ДК236	37,5 ± 10,9	37,5 ± 10,9	37,5 ± 10,9	0
Середнє	73,8 ± 4,4	72,4 ± 4,4	71,7 ± 4,5	0,7 ± 0,8

Таблиця В.14

Рівень ознак, які характеризують індукцію калусогенезу у гібридів кукурудзи між лініями плазми Ланкастер та лінією PLS61

Гібрид	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
		морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
ДК267× PLS61	94,3 ± 3,7	94,3 ± 3,7	94,3 ± 3,7	0
PLS61×ДК267	98,1 ± 1,5	97,8 ± 1,5	97,8 ± 1,5	0
ДК212×PLS61	100,0 ± 0,0	95,2 ± 3,8	4,7 ± 3,1	90,5 ± 5,3
PLS61×ДК212	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	9,3 ± 4,8	90,7 ± 4,8
ДК6080×PLS61	64,1 ± 6,8	64,1 ± 6,8	64,1 ± 6,8	0
PLS61×ДК6080	68,4 ± 7,0	67,8 ± 7,0	67,8 ± 7,0	0
ДК420-1×PLS61	97,8 ± 4,4	93,5 ± 7,4	78,3 ± 12,3	15,2 ± 12,3
PLS61×ДК420-1	96,2 ± 5,3	77,4 ± 11,6	77,4 ± 11,6	0
ДК633266×PLS61	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0
PLS61×ДК633266	100,0 ± 0,0	96,3 ± 3,3	96,3 ± 3,3	0
ДК298×PLS61	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	8,5 ± 6,7	91,6 ± 6,7
PLS61×ДК298	96,3 ± 7,4	92,6 ± 6,3	29,6 ± 10,9	63,0 ± 11,5
ДК633×PLS61	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0
PLS61×ДК633	96,7 ± 4,6	96,7 ± 4,6	96,7 ± 4,6	0
ДК3070×PLS61	100,0 ± 0,0	91,4 ± 6,7	87,1 ± 8,1	4,3 ± 4,9
PLS61×ДК3070	100,0 ± 0,0	98,0 ± 4,0	98,0 ± 4,0	0
ДК236×PLS61	100,0 ± 0,0	98,0 ± 4,0	98,0 ± 4,0	0
PLS61×ДК236	100,0 ± 0,0	98,7 ± 2,7	98,7 ± 2,7	0
ДК633325×PLS61	100,0 ± 0,0	95,0 ± 5,7	93,3 ± 6,5	1,7 ± 3,3
PLS61×ДК633325	97,7 ± 3,2	95,5 ± 4,5	94,3 ± 5,0	1,1 ± 2,3
Середнє	92,9 ± 1,1	91,0 ± 1,3	74,7 ± 1,9	16,3 ± 1,6

Таблиця В.15

Вплив мінеральної складу середовища на індукцію калусогенезу у ліній кукурудзи плазми
Ланкастер

Лінія	Мінеральна основа середовища індукції калусогенезу	Загальна частота ка- лусогенезу, %	Частота утворення,%		
			морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
Лінії плазми Ланкастер					
ДК633	N ₆	92,0 ± 5,5	88,0 ± 6,5	0	88,0 ± 6,5
	MS	95,7 ± 4,9	87,1 ± 8,1	2,8 ± 4,0	84,3 ± 8,8
ДК267	N ₆	95,5 ± 1,8	51,3 ± 4,4	4,5 ± 1,8	46,8 ± 4,4
	MS	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0	100,0 ± 0,0
ДК6080	N ₆	94,2 ± 4,6	86,4 ± 6,8	40,8 ± 9,7	45,6 ± 9,9
	MS	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0	100,0 ± 0,0
ДК420-1	N ₆	82,0 ± 7,7	77,0 ± 8,5	59,0 ± 9,9	18,0 ± 7,7
	MS	82,0 ± 11,0	54,0 ± 14,2	0	54,0 ± 14,2
ДК298	N ₆	93,6 ± 4,1	91,5 ± 4,7	86,5 ± 5,8	5,0 ± 3, 7
	MS	92,0 ± 11,1	80,0 ± 16,3	0	80,0 ± 16,3
ДК3070	N ₆	87,8 ± 5,0	13,4 ± 5,2	0	13,4 ± 5,2
	MS	76,0 ± 12,2	26,0 ± 12,5	16,0 ± 10,5	10,0 ± 8,6
ДК236	N ₆	98,5 ± 2,1	98,5 ± 2,1	22,0 ± 7,2	76,5 ± 7,4
	MS	100,0 ± 0,0	90,0 ± 20,0	0	90,0 ± 20,0
ДК633325	N ₆	87,2 ± 5,8	67,7 ± 8,1	0	67,7 ± 8,1
	MS	82,0 ± 11,0	26,0 ± 12,5	0	26,0 ± 12,5
Середнє для ліній Ланкастер	N ₆	91,4±1,7	71,7±2,2	26,6±2,1	45,1±2,5
	MS	91,0±2,9	70,4±4,4	2,4±1,4	68,0±4,4
Лінія-стандарт					
PLS61	N ₆	96,3 ± 2,5	95,0 ± 2,8	5,0 ± 2,8	90,0 ± 3,9
	MS	96,0 ± 3,9	90,0 ± 6,0	0	90,0 ± 6,0

Таблиця В.16

Вплив сахарози на калусогенну здатність ліній кукурудзи плазми Ланкастер

Лінія	Сахароза у середовищі індукції калусогенезу, г/л	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення, %		
			морфогенних калусів	калусів I типу	калусів II типу
Лінії плазми Ланкастер					
ДК633	30	53,4 ± 6,2	14,4 ± 4,3	9,9 ± 3,7	4,5 ± 2,6
	60	68,9 ± 4,7	29,6 ± 4,6	15,9 ± 3,7	13,6 ± 3,5
ДК267	30	95,2 ± 3,0	88,9 ± 4,4	14,5 ± 4,9	74,4 ± 6,1
	60	99,1 ± 1,3	75,6 ± 5,7	8,9 ± 3,8	66,7 ± 6,3
ДК212	30	100,0 ± 0,0	94,4 ± 7,7	0	94,4 ± 7,7
	60	100,0 ± 0,0	92,5 ± 4,8	0,8± 0,67	91,7 ± 5,1
ДК6080	30	88,5 ± 5,1	67,5 ± 7,5	5,1 ± 3,5	62,4 ± 7,8
	60	58,1 ± 8,5	37,5 ± 8,3	26,5 ± 7,6	11,0 ± 5,4
ДК420-1	30	98,8 ± 1,7	47,3 ± 7,8	3,0 ± 2,7	44,3 ± 7,7
	60	72,6 ± 6,2	39,4 ± 6,8	12,0 ± 4,5	27,4 ± 6,2
ДК633266	30	97,9 ± 2,4	88,8 ± 5,3	0	88,8 ± 5,3
	60	99,6 ± 0,8	96,8 ± 2,2	0	96,8 ± 2,2
ДК298	30	97,1 ± 2,5	82,3 ± 5,8	10,3 ± 4,6	72,0 ± 6,8
	60	99,2 ± 1,1	87,7 ± 4,2	50,8 ± 6,3	36,9 ± 6,1
ДК3070	30	99,6 ± 0,9	82,1 ± 5,0	13,3 ± 4,4	68,8 ± 6,1
	60	96,1 ± 1,9	93,3 ± 2,4	68,2 ± 4,5	25,1 ± 4,2
ДК236	30	97,9 ± 2,9	72,2 ± 9,2	19,6 ± 8,1	52,6 ± 10,2
	60	98,3 ± 2,0	61,1 ± 7,4	11,4 ± 4,8	49,7 ± 7,6
ДК633325	30	96,0 ± 5,6	64,0 ± 13,7	0	64,0 ± 13,7
	60	90,2 ± 4,2	48,3 ± 7,0	33,5 ± 6,6	14,8 ± 5,0
Середнє для L-ліній	30	92,4±1,1	70,2±2,4	7,6±1,3	62,6±2,5
	60	88,2±1,3	66,2±1,8	22,8±1,5	43,4±2,8
Лінії-стандарти					
A188	30	98,7 ± 2,7	92,0 ± 6,3	0	92,0 ± 6,3
	60	98,3 ± 2,0	91,9 ± 4,2	43,9 ± 7,6	48,0 ± 7,6
PLS61	30	97,3 ± 2,4	96,1 ± 2,8	48,6 ± 7,4	47,5 ± 7,4
	60	97,1 ± 1,9	95,2 ± 2,5	94,2 ± 2,7	1,0 ± 1,1
Chi31	30	94,8 ± 4,1	84,6 ± 6,7	0	84,62± 6,7
	60	97,9 ± 2,4	90,9 ± 4,8	6,3 ± 4,1	84,6 ± 6,1
Середнє для ліній-стандартів	30	96,9±1,5	90,9±2,7	16,2±2,1	74,7±3,3
	60	97,8±1,0	92,7±1,9	48,1±2,5	44,5±2,7

Таблиця В.17

Характеристика процесу регенерації рослин з калусної тканини І типу у ліній кукурудзи
плазми Ланкастер

Лінія	Тривалість регенерації, діб	n*	R/100Ca**	Частота органогенезу, %	Частота ембріодогенезу, %
ДК267	0-30	78	7,7±6,1	50,0	50,0
	31-60	78	43,6±11,3	67,7	32,4
	61-90	78	0	0	0
	91-180	78	0	0	0
Всього	0-60	78	51,3±11,4	65,0	35,0
ДК6080	0-30	18	5,6±11,1	0	100,0
	31-60	18	16,7±18,1	0	100,0
	61-90	18	0	0	0
	91-180	18	0	0	0
Всього	0-60	18	22,2±20,2	0	100,0
ДК420-1	0-30	33	0	0	0
	31-60	33	6,1±8,4	50,0	50,0
	61-90	33	3,0±6,1	0	100,0
	91-180	33	0	0	0
Всього	31-90	33	9,1±10,2	33,3	66,7
ДК298	0-30	54	0	0	0
	31-60	54	18,5±10,7	8	2
	61-90	54	1,9±3,7	0	100,0
	91-180	54	0	0	0
Всього	31-90	54	20,4±11,1	72,7	27,3
ДК3070	0-30	59	1,7±3,4	0	100,0
	31-60	59	1,7±3,4	100,0	0
	61-90	59	0	0	0
	91-180	59	0	0	0
Всього	0-60	59	3,4±4,8	50,0	50,0
Всього	0-30	242	3,3±2,3	37,5±36,6	62,5±36,6
	31-60	242	20,7±5,2	66,0±13,5	34,0±13,5
	61-90	242	0,8±1,2	0	100,0
	91-180	242	0	0	0
Всього	0-90	242	24,8±5,6	60,0±12,8	40,0±12,8

Примітка. Тут і далі *n – кількість культивованих калусів, шт., **R/100Ca – кількість рослин-регенерантів на 100 калусів, шт./100 калусів.

Таблиця В.18

Характеристика процесу регенерації *in vitro* з калусної тканини І типу у ліній-стандартів
кукурудзи

Лінія	Тривалість регенерації, діб	n	R/100Ca	Частота органогенезу, %	Частота ембріодогенезу, %
А188	0-30	78	0	0	0
	31-60	78	35,9±10,9	71,4	28,6
	61-90	78	30,8±10,5	87,5	12,5
	91-120	78	9,0±6,5	100,0	0,0
	121-180	78	1,3±2,6	0,0	100,0
Всього	31-180	78	76,9±9,6	80,0	20,0
Chi31	0-30	39	0	0	0
	31-60	39	94,9±7,2	86,5	13,5
	61-90	39	0	0	0
	91-120	39	43,6±16,1	88,2	11,8
	121-180	39	5,1±7,2	50,0	50,0
Всього	31-180	39	143,6±25,7	85,7	14,3
PLS61	0-31	82	0	0	0
	31-60	82	80,5±8,8	80,3	19,7
	61-90	82	113,4±8,7	94,6	5,4
	91-120	82	25,6±9,7	100,0	0,0
	121-180	82	14,6±7,9	58,3	41,7
Всього	31-180	82	234,1±39,4	88,0	12,0
Всього	0-30	199	0	0	0
	31-60	199	65,8±6,7	80,2±7,0	19,8±7,0
	61-90	199	58,8±7,0	93,2±4,7	6,8±4,7
	91-120	199	22,6±5,9	95,6±6,2	4,4±6,2
	121-1810	199	7,5±3,8	53,3±26,7	46,7±26,7
Всього	31-180	199	154,8±13,1	86,0±4,0	14,0±4,0

Таблиця В.19

Характеристика процесу регенерації рослин з калусної тканини I і II типу у гібридів кукурудзи за участю ліній плазми Ланкастер та лінії-стандарту A188

Гібрид	Регенерація з калусної тканини I типу			Регенерація з калусної тканини II типу		
	R/100Ca	Частота		R/100Ca	Частота	
		органо-генезу, %	ембріодогенезу, %		органо-генезу, %	ембріодогенезу, %
ДК633266хA188	82,6±16,2	89,5±14,5	10,5±14,5	-	-	-
A188хДК420-1	-	-	-	22,2± 16,3	50,0±44,7	50,0±44,7
ДК298хA188	48,1±13,7	100,0±0,0	0	-	-	-
A188хДК298	138,5±42,1	94,4±11,1	5, 6±11,1	33,3±33,3	33,3±66,7	66,7±66,7
ДК633хA188	59,3±19,3	87,5±17,1	12,5±17,1	44,4±24,1	12,5±25,0	87,5±25,0
Середнє	67,5±8,7	93,4±5,5	6,6±5,5	31,5±12,8	29,4±22,8	70,6±22,8

Таблиця В.20

Характеристика процесу регенерації рослин з калусної тканини I і II типу у гібридів кукурудзи за участю ліній плазми Ланкастер та лінії-стандарту Chi31

Гібрид	Регенерація з калусної тканини I типу			Регенерація з калусної тканини II типу		
	R/100Ca	Частота		R/100Ca	Частота	
		органо-генезу, %	ембріодогенезу, %		органо-генезу, %	ембріодогенезу, %
ДК633хChi31	20,8±16,9	80,0±40,0	20,0±40,0	17,4±16,2	50,0±57,5	50,0±57,5
ДК3070хChi31	16,0±15,0	75,0±50,0	25,0±50,0	66,7±28,4	50,0±37,8	50,0±37,8
Chi31хДК3070	-	-	-	11,1±15,2	50,0±100,0	50,0±100,0
ДК236хChi31	8,3±16,7	100,0±0,0	0	62,5±36,6	80,0±40,0	20,0±40,0
Середнє	16,4±9,6	80,0±26,7	20,0±26,7	31,1±12,0	57,9±23,3	42,1±23,3

Таблиця В.21

Характеристика процесу регенерації рослин з калусної тканини I і II типу у гібридів кукурудзи за участю ліній плазми Ланкастер та лінії-стандарту PLS61

Гібрид	Регенерація з калусної тканини I типу			Регенерація з калусної тканини II типу		
	R/100Ca	Частота		R/100Ca	Частота	
		органо-генезу, %	ембріодогенезу, %		органо-генезу, %	ембріодогенезу, %
ДК267хPLS61	36,0±13,7	94,4±11,1	5,6±11,1	33,3±10,3	96,4±7,1	3,6±7,1
PLS61хДК267	59,8±7,4	85,1±6,9	14,9±6,9	428,6±208,2	91,7±7,2	8,3±7,2
ДК212хPLS61	24,3±14,3	88,9±22,2	11,1±22,2	8,9±7,7	80,0±40,0	20,0±40,0
PLS61хДК212	45,5±21,7	100,0±0,0	0,0	33,3±22,9	83,3±33,3	16,7±33,3
ДК6080хPLS61	47,4±16,4	94,4±11,1	5,6±11,1	11,8±11,2	75,0±50,0	25,00±50,0
PLS61хДК6080	-	-	-	26,1±18,7	66,7±42,2	33,3±42,2
ДК420-1хPLS61	100,0±0,0	79,2±16,9	20,8±16,9	38,9±23,6	100,0±0,0	0
PLS61хДК420-1	100,0±0,0	88,2±16,1	11,8±16,1	53,3±26,7	87,5±25,0	12,5±25,0
Середнє	55,3±5,2	87,2±4,7	12,8±4,7	47,3±6,2	90,3±5,3	9,7±5,3



Рис. В.3. Вирощування рослин-регенерантів кукурудзи в ґрунті у вегетаційних посудинах

Параметри	Лінія									
	ДК633	ДК267	ДК212	ДК6080	ДК420-1	ДК298	ДК633266	ДК3070	ДК236	ДК633325
Експлант	Незрілий зародок									
Довжина експланта, мм	1,0-1,5									
Стерилізація	Ізольовані качани, 96% етанол – 1', 0,1 % розчин сулеми +Tween-80 – 20'									
Спосіб експлантації	Незрілі зародки щитком догори, по 25-50 зародків на чашку Петрі діаметром 90 мм									
Середовище для індукції калусогенезу:										
макро-, мікросолі, вітаміни	MS	N ₆	N ₆	N ₆	N ₆	N ₆	N ₆	MS	N ₆	-
сахароза, г/л	60	30	60	60	60	60	30	60	30	60
цефотаксим, мг/л	-	-	0	-	-	0	-	-	-	0
AgNO ₃ , мг/л	10									
2,4-Д, мг/л	1,0									
АБК, мг/л	0,1									
гідролізат казеїну, мг/л	100									
L-пролін,мг/л	690									
інозитол, мг/л	100									
агар, мг/л	8000									
Умови культивування:										
Температура, °С	26-27									
Умови освітлення	темрява									
Термін культивування, діб	30									

Таблица В.23

Параметри	Лінія									
	ДК633	ДК267	ДК212	ДК6080	ДК420-1	ДК298	ДК633266	ДК3070	ДК236	ДК633325
Експлант	Незрілий зародок									
Довжина експланта, мм	1,0-1,5									
Стерилізація	Ізольовані качани, 96% етанол – 1', 0,1 % розчин сулеми +Tween-80 – 20'									
Спосіб експлантації	Незрілі зародки щитком догори, по 25-50 зародків на чашку Петрі діаметром 90 мм									
Середовище для індукції калусогенезу:										
макро-, мікросолі, вітаміни	N ₆	MS	N ₆	MS	MS	MS	N ₆	N ₆	MS	N ₆
сахароза, г/л	60	30	30	30	30	30	60	30	30	30
цефотаксим, мг/л	-	-	0	-	-	150	-	-	-	150
AgNO ₃ , мг/л	10									
2,4-Д, мг/л	1,0									
АБК, мг/л	0,1									
гідролізат казеїну, мг/л	100									
L-пролін,мг/л	690									
інозитол, мг/л	100									
агар, мг/л	8000									
Умови культивування:										
Температура, °С	26-27									
Умови освітлення	темрява									
Термін культивування на середовищі для індукції калусогенезу, діб	більше 30									

Параметри	Лінія									
	ДК633	ДК267	ДК212	ДК6080	ДК420-1	ДК298	ДК633266	ДК3070	ДК236	ДК633325
Експлант	Шматочки морфогенної калусної тканини									
Розмір експланта	Калусна тканина з одного незрілого зародка									
Спосіб експлантації	На відстані 1-2 см один від одного, по 10 шматочків на чашку Петрі діаметром 90 мм									
Середовище для індукції регенерації:										
макро-, мікросолі, вітаміни	-	MS	-	MS	MS	MS	-	-	-	-
сахароза середовища калусогенезу, г/л	-	60	-	30	30	30	-	-	-	-
сахароза середовища регенерації, г/л	-	20	-	20	20	20	-	-	-	-
БАП, мг/л	-	0,1	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-
ІМК, мг/л	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
гідролізат казеїну, мг/л	100									
L-пролін,мг/л	690									
інозитол, мг/л	100									
агар, мг/л	7000									
У м о в и к у л ь т и в у в а н н я :										
Температура, °С	26-27									
Умови освітлення	Освітленість – 2–5 тис. люкс, 16-годинний фотоперіод									
Термін культивування на середовищі для індукції калусогенезу, діб	До появи рослинки або пагонів довжиною 3–5 см з 2–3 листочками									

Таблица В.25

Параметри	Лінія									
	ДК633	ДК267	ДК212	ДК6080	ДК420-1	ДК298	ДК633266	ДК3070	ДК236	ДК633325
Експлант	Шматочки морфогенної калусної тканини									
Розмір експланта	Калусна тканина з одного незрілого зародка									
Спосіб експлантації	На відстані 1-2 см один від одного, по 10 шматочків на чашку Петрі діаметром 90 мм									
Середовище для індукції регенерації:										
макро-, мікросолі, вітаміни	-	MS	-	-	-	MS	-	-	-	-
сахароза середовища калусогенезу, г/л	-	60	-	-	-	30	-	-	-	-
сахароза середовища регенерації, г/л	-	20	-	-	-	20	-	-	-	-
БАП, мг/л	-	0,1	-	-	-	0,1	-	-	-	-
ІМК, мг/л	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
гідролізат казеїну, мг/л	100									
L-пролін, мг/л	690									
інозитол, мг/л	100									
агар, мг/л	7000									
Умови культивування:										
Температура, °С	26-27									
Умови освітлення	Освітленість – 2–5 тис. люкс, 16-годинний фотоперіод									
Термін культивування на середовищі для індукції калусогенезу, діб	До появи рослинки або пагонів довжиною 3–5 см з 2–3 листочками									

Параметри	Лінія									
	ДК633	ДК267	ДК212	ДК6080	ДК420-1	ДК298	ДК633266	ДК3070	ДК236	ДК633325
Експлант	Рослинки або пагони з 2–3 листочками, регенеровані з калусної тканини I або II типу									
Довжина експланта, мм	3–5 см									
Спосіб експлантації	Рослинки переносять у культуральні склянки висотою 200 мм і діаметром 30 мм по 1 рослині на склянку									
Середовище для дорошування рослин:										
макро-, мікросолі, вітаміни	-	1/2MS	-	1/2MS	1/2MS	1/2MS	-	-	-	-
сахароза, г/л	-	15	-	15	15	15	-	-	-	-
гідролізат казеїну, мг/л	50									
L-пролін, мг/л	345									
інозитол, мг/л	50									
агар, мг/л	5000									
Умови культивування:										
Температура, °С	26-27									
Умови освітлення	Освітленість – 2–5 тис. люкс, 16-годинний фотоперіод									
Термін культивування на середовищі для індукції калусогенезу, діб	До досягнення пагоном рослини-регенеранта R ₀ висоти 15–20 см, а кореневою системою довжини до 20 см, 15-30 діб									

Додаток Г

Додаткові матеріали до розділу 5

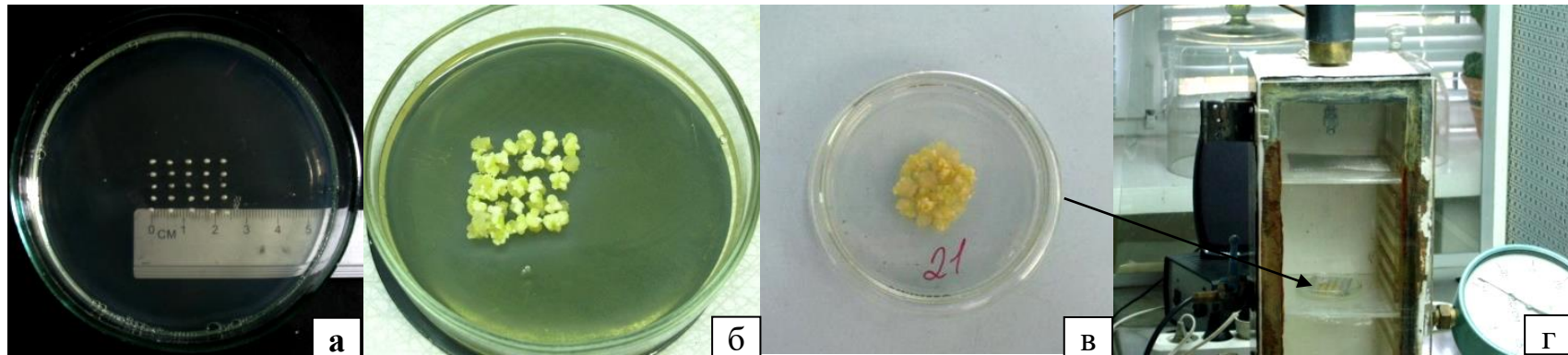


Рис. Г. 1. Підготовчий етап біолістичної трансформації генотипу кукурудзи PLS61×ДК633266: а – експлантація незрілих зародків на живильне середовище Б1; б – молода калусна тканина у віці 15 діб перед біолістичною трансформацією; в, г – калусна тканина на середовищі Б1+0,3 М манітолу безпосередньо перед обстрілом з гармати типу particle inflow gun

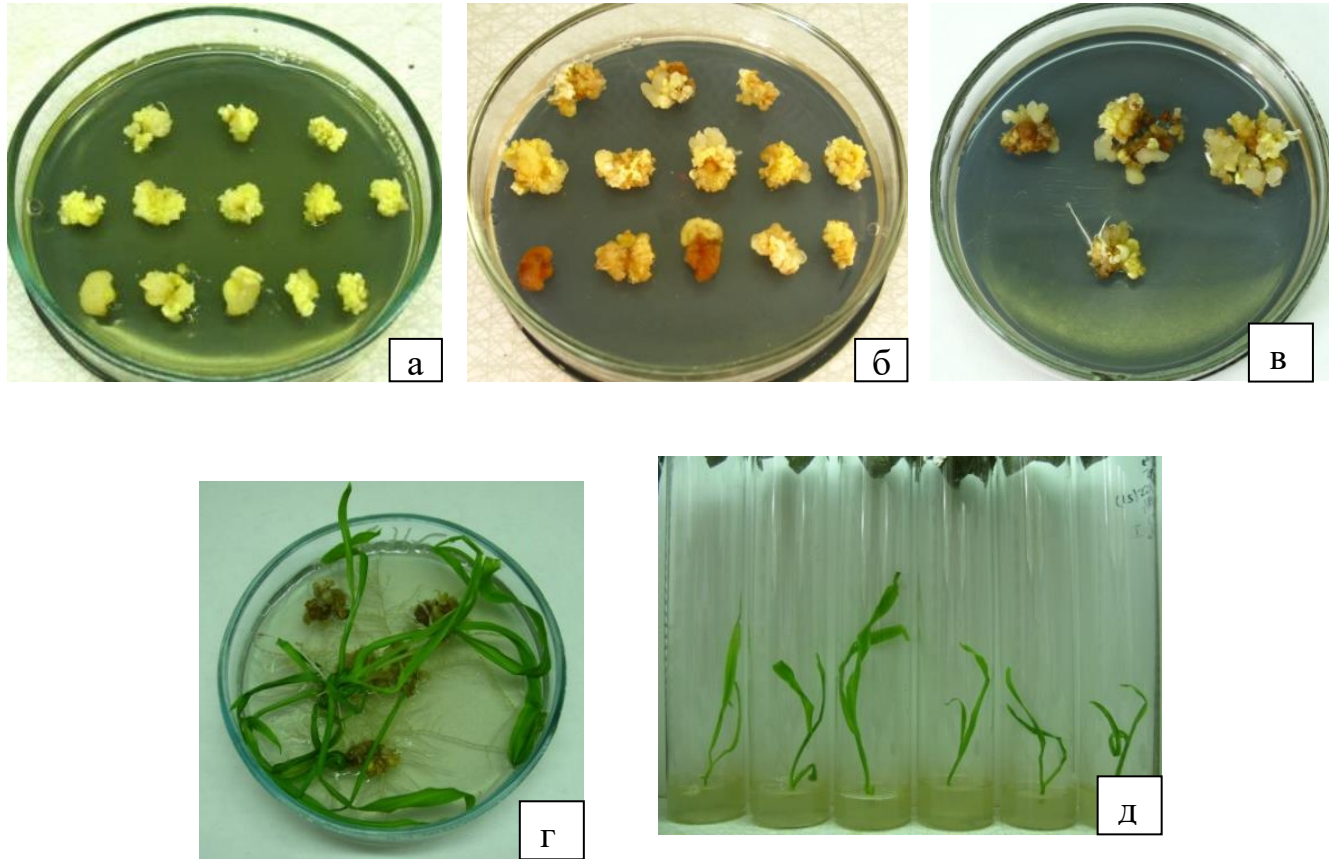


Рис. Г. 2. Субкультивування калусної тканини кукурудзи генотипу PLS61×ДК633266 після біолістичної обробки: а – через 14 діб після трансформації на середовищі Б2 без селективного агенту; б – через 30 діб після перенесення на середовище Б2+10 мг/л фосфінотрицину; в – трансплантація тривалосубкультивованої калусної тканини на селективне регенераційне середовище Б3+5 мг/л фосфінотрицину; г – формування проростків Т₀ з калусної тканини на середовищі Б3+5 мг/л фосфінотрицину за 30 діб після індукції регенерації; д – перенесення проростків та окремих пагонів Т₀ в біологічні пробірки з середовищем для дорощування та укорінення Б5



а



б



в

Рис. Г. 3. Вирощування рослин, отриманих після генетичної трансформації та тривалої селекції *in vitro*: а – вирощування та запилення рослин-регенерантів покоління T_0 у вегетаційних посудинах; б – вирощування та запилення рослин-регенерантів покоління T_1 у вегетаційних посудинах; в – вирощування рослин-трансформантів покоління T_2 в ґрунтових теплицях в умовах закритого ґрунту

Таблиця Г.1

Загальна схема отримання і комплексного дослідження рослин-трансформантів гібрида кукурудзи

PLS61×ДК633266

Показник	Значення показника							
Покоління	Калус	Рослини-трансформанти						
		T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Генотип калусної тканини	PLS61× ДК633266	-	-	-	-	-	-	-
Біолістична обробка калусів вектором рАНС25 з генами <i>uidA</i> та <i>bar</i>	10.08.2011, постріл №21	-	-	-	-	-	-	-
Селекція калусів на фоні 10 мг/л фосфіотрицину	так	-	-	-	-	-	-	-
Генотип рослини, що вирощується у ґрунті	-	T ₀ (PLS61× ДК633266)	T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]1сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]2сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]3сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]4сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]5сз
Рік вирощування у ґрунті	-	2012	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Кількість рослин, що вирощувалася в ґрунті	-	1	20	більше 25	більше 25	більше 25	більше 25	більше 25
Селекція на гербіцидному фоні (обприскування сходів гербіцидом «Баста»™ (1 г/л у перерахунку на фосфіотрицин))	-	ні	ні	так	так	так	так	так
Запилення	-	пилком лінії ДК633266	самозапилення	самозапилення рослин, стійких до гербіциду	самозапилення рослин, стійких до гербіциду	самозапилення рослин, стійких до гербіциду	самозапилення рослин, стійких до гербіциду	самозапилення рослин, стійких до гербіциду
Отримано насіння із зародками покоління	-	T ₁ – 40 шт.	T ₂ – 2079 шт.	T ₃ – більше 500 шт.	T ₄ – більше 500 шт.	T ₅ – більше 500 шт.	T ₆ – більше 500 шт.	T ₇ – більше 500 шт.
Отримано насіння із зародками генотипу	-	T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]1сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]2сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]3сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]4сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]5сз	[T ₀ (PLS61× ДК633266) ×ДК633266]6сз

Таблиця Г.2

Загальна схема отримання і комплексного дослідження рослин-трансформантів лінії кукурудзи PLS61

Показник	Значення показника		
Покоління	Калус	Рослини-трансформанти	
		T ₀	T ₁
Генотип калусної тканини	PLS61	-	-
Біолістична обробка калусів вектором pAHC25 з генами <i>uidA</i> та <i>bar</i>	9.08.2011, постріл №5	-	-
Селекція калусів <i>in vitro</i> на фоні 10 мг/л фосфінотрицину	так	-	-
Генотип рослини, що вирощується у ґрунті	-	T ₀ PLS61	T ₀ (PLS61) × (ДК377×Chi31)
Рік вирощування у ґрунті	-	2012	2012
Кількість рослин, що вирощуються в ґрунті	-	2	20
			12
Селекція на гербіцидному фоні (обприскування сходів гербіцидом «Баста» ^{ТМ} (1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин))	-	ні	ні
Запилення	-	пилком гібрида ДК377×Chi31	самозапилення
Отримано насіння із зародками покоління T ₁ , генотип зародків: T ₀ (PLS61) × (ДК377×Chi31)	-	Рослина 1 - 31 шт.	-
		Рослина 2 – 12 шт.	
Отримано насіння із зародками покоління T ₂ , генотип зародків: [T ₀ (PLS61) × (ДК377×Chi31)]1сз	-	-	Рослина 1 – 2792 шт.
			Рослина 2 – 1691 шт.



Рис. Г.4. Рослини кукурудзи вихідного генотипу PLS61×ДК633266 на 20-у добу після обробки дослідних ділянок гербіцидом «Баста»TM (1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин): а – нетрансформовані рослини-сомаклони покоління R₂, без обробки гербіцидом; б – нетрансформовані рослини-сомаклони покоління R₂, після обробки гербіцидом; в – рослини-трансформанти з чужорідним геном *bar* покоління T₂, після обробки гербіцидом. Вік рослин – 34 доби після появи сходів



Рис. Г.5. Нетрансформовані рослини-сوماклони покоління R_2 вихідного генотипу PLS61×ДК633266 (ліві рядки) та рослини-трансформанти за чужорідним геном *bar* покоління T_3 вихідного генотипу PLS61×ДК633266 (праві рядки) у кукурудзи: а – молоді рослини у віці 14 діб після появи сходів, перед обробкою гербіцидом «Баста»TM; б – рослини у віці 34 доби, на 20-ту добу після обробки гербіцидом «Баста»TM (1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин)

ДОДАТОК Д

Довідки про впровадження



**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
ІНСТИТУТ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

вул. Володимира Вернадського, 14,
м. Дніпро, 49027

Тел./факс (0562) 36-26-18

E-mail: inst_zerna@ukr.net

Web: http:// www.institut-zerna.com

КОД ЄДРПОУ 00496662

19.02.2018 № 183

На № _____ від _____

Довідка

Видана Деркач Катерині Вікторівні, науковому співробітнику лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур НААН України (ДУ ІЗК НААН), про те, що розроблені в процесі виконання дисертаційної роботи на тему «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер» методичні розробки:

1. SNP-паспорти ліній та гібридів кукурудзи (в електронному вигляді) / **К.В. Деркач**, В.В. Борисова, Т.М. Сатарова. – Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. – 4 с.

2. Алельний стан SNP-маркерів ліній кукурудзи плазми Ланкастер (методичні рекомендації) / **К.В. Деркач**, В.В. Борисова, Т.М. Сатарова. – Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. – 7 с.

застосовуються у селекційному процесі при створенні вихідного матеріалу, ліній і гібридів кукурудзи у відділі селекції і насінництва зернових культур ДУ ІЗК НААН.

Директор Державної установи
Інститут зернових культур НААН України



А.В. Черенков

Завідувач відділу селекції і насінництва
зернових культур Державної установи
Інститут зернових культур НААН України

Борис

Б.В. Дзюбецький



**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
ІНСТИТУТ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

вул. Володимира Вернадського, 14,

м. Дніпро, 49027

Тел./факс (0562) 36-26-18

E-mail: inst_zerna@ukr.net

Web: [http:// www.institut-zerna.com](http://www.institut-zerna.com)

КОД ЄДРПОУ 00496662

19.02.2018 № 184

На № _____ від _____

Довідка

Видана Деркач Катерині Вікторівні, науковому співробітнику лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур НААН України (ДУ ІЗК НААН) про те, що соматоклональні варіанти R₁ на основі ліній кукурудзи ДК267, ДК298, Chi31 та PLS61, а також гібридів кукурудзи ДК267хPLS61, PLS61хДК267, ДК633/266 та PLS6хДК633/266, які були отримані нею в культурі калусних тканин *in vitro* в процесі виконання дисертаційної роботи на тему «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер», використовуються в селекційних дослідженнях відділу селекції та насінництва зернових культур ДУ ІЗК НААН.

Директор Державної установи
Інститут зернових культур НААН України



А.В. Черенков

Завідувач відділу селекції і насінництва
зернових культур Державної установи
Інститут зернових культур НААН України

Б.В. Дзюбецький



**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
ІНСТИТУТ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ**

вул. Володимира Вернадського, 14,

м. Дніпро, 49027

Тел./факс (0562) 36-26-18

E-mail: inst_zerna@ukr.net

Web: [http:// www.institut-zerna.com](http://www.institut-zerna.com)

КОД ЄДРПОУ 00496662

19.02.2018 № 182

На № _____ від _____

Довідка

Видана Деркач Катерині Вікторівні, науковому співробітнику лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур НААН України (ДУ ІЗК НААН) про те, що на основі вихідного матеріалу плазми Ланкастер, зокрема з гібрида PLS61хДК633266, отримано 8 трансгенних гербіцидостійких інбредних ліній, у яких *bar*-позитивність в T_6 підтверджена за ПЛР. Отримані лінії передано до селекційних підрозділів ДУ ІЗК НААН і можуть використовуватися в селекційному процесі як батьківські форми для гетерозисних гербіцидостійких гібридів, а також як донори гена *bar*, здатні передавати його в схрещуваннях іншим лініям кукурудзи.

Директор Державної установи
Інститут зернових культур НААН України



А.В.Черенков

Завідувач відділу селекції і насінництва
зернових культур Державної установи
Інститут зернових культур НААН України

Б.В. Дзюбецький


«Компанія «Маїс»

 Науково-виробниче
фермерське господарство

 вул. Музейна, 11, м. Синельникове
Дніпропетровська область, 52502, Україна
тел./факс: +38 (05663) 2-22-14, 2-22-15
3-71-27, 4-37-33, тел. +38 (056) 785-25-47
e-mail: mais@maize.com.ua

www.mais-seeds.com
Вих. №30 від 20.02.2018р.
Довідка

про впровадження результатів дисертаційної роботи Деркач Катерини Вікторівни на
тему «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми
Ланкастер»

Методичні розробки із застосуванням SNP-аналізу, отримані К. В. Деркач в процесі виконання дисертаційної роботи на тему «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер», а саме «SNP-паспорти ліній та гібридів кукурудзи (в електронному вигляді)» (**К.В. Деркач**, В.В. Борисова, Т.М. Сатарова. – Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. – 4 с.) та «Алельний стан SNP-маркерів ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер (методичні рекомендації)» (**К.В. Деркач**, В.В. Борисова, Т.М. Сатарова. – Дніпро: ДУ ІЗК НААН, 2017. – 7 с.), застосовуються у селекційному процесі при створенні нових високопродуктивних гібридів кукурудзи в НВФГ «Компанія «Маїс».

Генеральний директор
Науково-виробничого фермерського
господарства «Компанія «Маїс»



Федько М. М.

Завідувач відділу селекції
Науково-виробничого фермерського
господарства «Компанія «Маїс»

Кравченко В.М.



Міністерство освіти і науки України

**ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ХІМІКО-ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»**

просп. Гагаріна, 8, Дніпро, 49005, Україна
Телефон: (0562) 47-46-70, факс: (0562) 47-33-16, E-mail: ughtu@dict.dp.ua, Код ЄДРПОУ 02070758

19.02.2018 № 10-34-10/39-5

на № _____

Довідка

Видана Деркач Катерині Вікторівні, науковому співробітнику лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур НААН України (ДУ ІЗК НААН), про те, що матеріали дисертаційної роботи на тему «Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер» використовуються при викладанні курсу «Біотехнологія рослин» для студентів напрямку «Біотехнологія» ДВНЗ «УДХТУ», зокрема в лекціях і на лабораторних заняттях, та увійшли до видання «Методичні вказівки до лабораторних робіт з курсу «Біотехнологія рослин та тварин» для студентів напрямку «Біотехнологія» усіх форм навчання» (Укл.: Сметанін В.Т.; Сатарова Т.М., Абраїмова О.Є., **Деркач К.В.**, Сировнєв Г.І., Гейсун А.А. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2012. – 28 с.).

Ректор
Державного вищого навчального закладу
«Український державний
хіміко-технологічний університет»

Півоваров О.А.

Завідувач кафедри біотехнології
Державного вищого навчального закладу
«Український державний
хіміко-технологічний університет»

Сметанін В.Т.




**ДЕРЖАВНА ВЕТЕРИНАРНА ТА
ФІТОСАНІТАРНА СЛУЖБА УКРАЇНИ**

СВІДОЦТВО

№ 150421

**ПРО АВТОРСТВО
НА СОРТ РОСЛИН**

ДН Корунд
 назва сорту
Кукурудза звичайна
Zea mays L.
 ботанічний таксон

Заявка № 12004133
 Автор(и):

Дзюбецький Борис Володимирович	Черчель Владислав Юрійович
Ільченко Лариса Анатоліївна	Боденко Наталя Анатоліївна
Рябченко Едуард Миколайович	Фелько Микола Миколайович
Гайдаш Олександр Леонідович	Деркач Катерина Вікторівна
Федоренко Едуард Миколайович	Галечко Іван Дмитрович

Директор Департаменту
 фітосанітарної безпеки


 Романченко В.О.