

Використання таких маркерів дозволяє відрізнити колонії, трансформовані пустим вектором від тих, які містять потрібну вставку. Наприклад, поширеним репортерним геном є *LacZ* для біло-блакитного відбору, що базується на здатності бактерій розщеплювати речовину специфічну речовину X-gal (галактоза пов'язана з заміщеним індолом). Цей ген у векторі займає положення, яке повинно заміщуватися на вставку у разі вдалого клонування. X-gal дає синє забарвлення колоніям трансформованим пустим вектором, а ті, що містять цільовий вектор, залишаються білими.

На наступному етапі складання сумісні вектори рівня 0 спрямовано збираються у вектор рівня 1, створюючи суцільну одиницю транскрипції (наприклад: промотор, 5'UTR, область кодування та термінатор). Такий вектор уже придатний для трансформації цільових об'єктів. Іншим варіантом є збирання кількох модулів рівня 1 у вектор рівня 2 з отриманням повнофункціональної генетичної конструкції. Слід зауважити, що між рівнями використовуються різні види рестриктаз типу IIS. Обмеження такої системи клонування полягає в тому, що внутрішні сайти розпізнавання для ферментів рестрикції, що використовуються, повинні бути вилучені з усіх стартових модулів. Такий підхід дозволяє уникнути зайвого або неспецифічного розрізання цільових конструкцій.

Таким чином, технологія ієрархічної системи клонування Golden Gate дає змогу збирати окремі функціональні генетичні елементи та мультигенні конструкції з попередньо виготовлених стандартизованих генетичних модулів. Це дозволяє високоефективно та спрямовано компонувати кілька фрагментів ДНК в одній реакції. Механізмом цього методу можна вважати принцип конструктора, який передбачає компонування окремих ключових одиниць в єдиний експресійний елемент за допомогою таких інструментів, як рестриктази та лігази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Engler C., et al. // PLoS One. 2008. 3(11): e3647. doi: 10.1371/journal.pone.0003647
2. Weber E., et al. // PLoS One. 2011. 8; 6(2): e16765. doi: 10.1371/journal.pone.0016765
3. Nakic Z. R., et al. // Chimia. 2023. 28; 77(6): 437-441. doi: 10.2533/chimia.2023.437
4. Sorida M., et al. // Cell Rep Methods. 2023. 22; 3(8): 100564.

MODERN AND CLASSICAL MAIZE INBREDS FROM BSSS GERMPLASM ON SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

T. Satarova¹, K. Denysiuk², V. Cherchel³, B. Dziubetskyi⁴, V. Semenova⁵, P. Soudek⁶

Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic,

¹scientist of the laboratory of plant biotechnologies, satarova2008@ukr.net

⁶ head of the laboratory of plant biotechnologies, soudek@ueb.cas.cz

State Enterprise Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
Dnipro, Ukraine,

² senior researcher of the laboratory of selection methods and primary seed production,
kvderkach@gmail.com

³ director of the State Enterprise Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Sciences
of Ukraine, vlad_cherch@ukr.net

⁴ head of the grain selection department, inst_zerna@ukr.net
SPFE “Company “Mais”, Zaitseve village, Dnipro region, Ukraine,

⁵ R&D Manager, v.semenova@maize.com.ua

Introduction. The affiliation of modern, perspective maize inbreds to definite type of germplasm is important for modern maize hybrid selection as the heterosis effect for lines of

different germplasms is higher than of the identical one. From this point of view the partial sequencing on markers of single nucleotide polymorphism (SNP) is a convenient and wide-spread model for characteristics of maize inbreds and typing them to the actual germplasm types. In general, there are two ways for determination of the proper germplasm SNP characteristics. The first is to select the most common SNP alleles among the great amount of inbreds with well-known affiliation to the certain germplasm. The second way is to compare new, modern inbreds with classical inbreds, basic for a germplasm. At any case a standard for a germplasm type should be chosen as typical or original lines.

BSSS is a large-scale type of germplasm which becomes of great importance in connection with climate warming and the advanced opportunity to cultivate maize hybrids of latter ripeness groups. Inbreds B14, B37 and B73 are widely known as classical for BSSS germplasm (Troyer 2000).

The aim of the work was to compare modern maize inbreds of BSSS germplasm with classical BSSS representatives on the allele states of SNP markers.

Methods. Partial genotyping on SNP markers was done for 28 modern inbreds belonging to BSSS germplasm on origin and having been selected in the northern part of steppe zone of Ukraine as well as for classical BSSS inbreds B14, B37, B73. SNP analysis was provided through *GoldenGate* testing and *Illumina VeraCode* (Fan et al., 2006) on the *BDI-III* panel with 384 markers of single nucleotide polymorphism especially selected for temperate maize lines (Venkatramana et al., 2010). SNP genotyping was fulfilled automatically on an *Illumina BeadStation 500G* equipped with a *BeadReader* device (*Illumina*, San Diego, CA, USA).

Results. Modern 28 BSSS inbreds of Ukrainian selection had average genetic diversity 0.1744 ± 0.0064 , frequency of monomorphic markers – 4.11 ± 2.07 %. The mean SNP distance for a set of modern BSSS inbreds was 0.3900 ± 0.0107 while the mean SNP distances for these lines inside the BSSS germplasm (GDs) varied from 0.3444 to 0.4374. The minimum GDs varied from 0.0130 (between inbreds DK3931MV and DK3129) to 0.3802 (between DK3301 and MSST37, IM_131 and MSST45A). Maximum GDs differed from 0.4479 (between MSST45A and MS44SV, DK1212 and MSSTV-50) up to 0.5130 (between MSST33 and MSST261). These data demonstrate the great heterosis potential of modern BSSS inbreds even under the intraplasmic hybridization.

The classical inbred of BSSS germplasm B14 coincided with the studied modern BSSS lines by 46.2 %, in particular had alternative alleles G by marker 297, 374C2, 096, 155C2, 156C2 instead of A, A by marker 329 instead of G and T by marker 097 instead of A. Another typical BSSS inbred B37 matched 92.3 % with the studied modern BSSS lines and had an alternative allele A by marker 144 instead of T. Classical inbred B73 was 69.2 % similar to the studied modern BSSS lines and had alternative alleles G by markers 297 and 096 instead of A, A by marker 329 instead of G (Satarova et al., 2023). A certain divergence of modern BSSS lines from their ancestors can be explained by long-term selection in specific soil and climatic conditions of the steppe zone and the intensive improvement of this germplasm in breeding programmes. It was noteworthy that the highest concordance of the studied BSSS lines occurred compared to line B37, which was the most common standard of BSSS in the steppe zone.

Thus, classical and modern BSSS inbreds are close enough except for the specific SNP alleles as result of long breeding process. The SNP characteristics of modern BSSS lines can be used to control germplasm type when establishing initial populations for subsequent selection cycles and assessing genetic relatedness.

REFERENCES

1. Fan J.-B. et al. // *Method. Enzymol.* 2006. 410: 57-73.
2. Satarova T. M. et al // *Biologia Plantarum.* 2023. 67: 150-158.
3. Troyer F. *Temperate corn – background, behaviour and breeding.* 2000.
4. Venkatramana P. et al. // *Seed Technol.* 2010.32: 153.