

УДК 57.084:633.15

## МОРФОБІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РОСЛИН-ТРАНСФОРМАНТІВ КУКУРУДЗИ

**К. В. Деркач<sup>1\*</sup>**;

**О. Є. Абраїмова<sup>1</sup>**, кандидат біологічних наук;

**В. Ю. Черчель<sup>1</sup>**, кандидат сільськогосподарських наук;

**Б. В. Дзюбецький<sup>1</sup>**, доктор сільськогосподарських наук;

**Б. В. Моргун<sup>2\*\*</sup>**, **І. О. Нітовська<sup>2</sup>**, кандидати біологічних наук;

**Т. М. Сатарова<sup>1</sup>**, доктор біологічних наук

<sup>1</sup>Державна установа Інститут зернових культур НААН, вул. Володимира Вернадського, 14, м. Дніпро, Україна, 049027, \*e-mail: kvderkach@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН, вул. академіка Заболотного, 148, м. Київ, Україна, 03680, \*\* e-mail: molgen@icbg.org.ua

Охарактеризовано морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи T<sub>0</sub>–T<sub>6</sub> після біолістичної обробки калусної тканини плазмідною конструкцією з чужорідним геном *bar*, який забезпечує стійкість до діючої речовини гербіциду баста – фосфінотрицину. Проаналізовано схожість насіння, виживаність сходів після обробки гербіцидом баста, тривалість міжфазних періодів «сходи - цвітіння волотей», «сходи - цвітіння качанів» і особливості формування висоти рослин. Частота виживаності рослин T<sub>6</sub> за гербіцидної обробки становила 100 %. Представлений аналіз морфобіологічних особливостей рослин-трансформантів загалом свідчить про вірогідне накопичення гена *bar* в геномі рослин в п'ятьох циклах гомозиготації шляхом самозапилення та успішний добір на селективному фоні у попередніх поколіннях.

**Ключові слова:** кукурудза, стійкість до гербіцидів, фосфінотрицин, рослини-трансформанти, ген *bar*.

Стійкість до гербіцидів є однією з важливих ознак сільськогосподарських рослин, зокрема кукурудзи (*Zea mays* L.). Вона не є природною, проте її можливо досягти шляхом генетичної трансформації. За рахунок методів генетичної інженерії вдається успішно і цілеспрямовано вводити в геном рослин й інші цінні гени. Так, відомо про генетично модифіковані рослини, які стійкі до гербіцидів, комах-шкідників, фітовірусів, посухи, а також зі сповільненим дозріванням плодів, зміненою харчовою цінністю, оптимізованим жирокислотним складом ліпідів олійних культур тощо [1–5].

Одним з широко використовуваних у сільському господарстві препаратів є баста – контактний гербіцид широкого спектра дії, діюча речовина якого – глюфосинат амонію являє собою еквімолярну, рацемічну суміш D- та L-ізомерів фосфінотрицину. Фосфінотрицин інгібує фермент глютамінсинтазу, який відіграє ключову роль у асиміляції аміаку і регуляції метаболізму азоту в рослині. При застосуванні фосфінотрицину азотний метаболізм у тканинах порушується, і аміак накопичується в токсичних кількостях. Аміак продукується під час реакцій, які пов'язані з фотосинтетичним електронним транспортом, його накопичення зростає при наявності світла. У цих умовах чутливість рослинних тканин до фосфінотрицину збільшується [6]. Стійкість трансгенних рослин до фосфінотрицину забезпечується за рахунок експресії ферменту фосфінотрицинацетилтрансферази, який кодується геном *bar* із геному грам-позитивної бактерії *Streptomyces hygrosopicus*. Відомо про успішне отримання *bar*-позитивних рослин кукурудзи [7, 8], ріпаку [6], пшениці [9] та ін.

Створено лінії кукурудзи, стійкі до інших гербіцидів (хлорсульфурону, гліфосату та дикамби), за рахунок введення в геном кукурудзи відповідно мутантного гена ацетоллак-

татсинтетази, знайденого у тютюну і арабідопсису, мутантних генів *aroA* бактерії *Salmonella typhimurium* та мутантного гена бактерії *Pseudomonas maltophilia* [10–14].

Проте більшість проведених досліджень присвячені методичним засадам генетичної трансформації та аналізу ефективності трансформації. Разом з тим морфобіологічний аналіз рослин-трансформантів протягом декількох поколінь не проводився, незважаючи на актуальність питання оцінки трансформантів за комплексом фенологічних і селекційних параметрів.

**Мета досліджень** – охарактеризувати морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи в поколіннях  $T_0$ – $T_6$ . Програмою досліджень передбачалось вивчення схожості насіння, виживаності сходів після обробки гербіцидом баста, визначення тривалості міжфазних періодів «сходи - цвітіння волотей» і «сходи - цвітіння качанів», з'ясування висоти рослин-трансформантів.

**Матеріали і методи досліджень.** Матеріалом досліджень були рослини-трансформанти, одержані з вихідного гібрида кукурудзи PLS61 x ДК633266, батьківські лінії якого належать до зародкових плазм PLS61 (лінія PLS61) та Ланкастер (лінія ДК633266). Генетичну трансформацію проводили шляхом біолістичної обробки калусів, які утворилися на щитках незрілих зародків. Для цього ізольовані незрілі зародки довжиною 1,0–1,5 мм експлантували *in vitro* щитком догори на живильне середовище для індукції калусогенезу Б1 [15], яке містило макро-, мікросолі та вітаміни середовища  $N_6$ , 100 мг/л інозитулу, 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 10 мг/л  $AgNO_3$ , 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), 0,5 мг/л дикамби, 0,1 мг/л абсцизової кислоти (АБК), 7 г/л агару. Через 10–20 діб молоді калуси, що утворилися на щитках незрілих зародків, піддавали біолістичній трансформації згідно з методикою [7]. Калуси, які слугували контролем, біолістичної обробки не зазнавали.

Для трансформації використовували плазмідний вектор рАНС25 [16], який містив маркерний ген  $\beta$ -глюкуронідази *Escherichia coli* та цільовий ген фосфінотрицинацетилтрансферази *Streptomyces hygroscopicus* (*bar*), обидва під контролем промотору гена убіквітину кукурудзи. Біолістичну обробку проводили за допомогою модифікованої гармати типу particle inflow gun (PIG) [7, 17, 18].

Через 5–6 діб після біолістичної обробки рослинний матеріал переносили на селективне середовище для калусогенезу Б2, яке містило макро-, мікросолі, вітаміни  $N_6$ , 100 мг/л інозитулу, 300 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 10 мг/л  $AgNO_3$ , 30 г/л манітолу, 1 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л дикамби, 0,1 мг/л АБК, 7 г/л агару та як селективний агент – 10 мг/л фосфінотрицину і вирощували у темряві при 27 °С. Субкультивування калусів на свіже середовище Б2 проводили кожні два тижні. Для індукції регенерації калуси переносили на середовище Б3, яке в контрольному варіанті містило макро-, мікросолі та вітаміни MS, 300 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 10 мг/л  $AgNO_3$ , 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), 7 г/л агару. До селективного варіанту середовища для індукції регенерації Б3, крім перелічених компонентів, було додано 5 мг/л фосфінотрицину. З наступного пасажу із середовища для індукції регенерації вилучали  $AgNO_3$  та 2,4-Д, концентрацію БАП збільшували до 0,25 мг/л.

Сформовані калусною тканиною рослини-регенеранти (покоління  $T_0$ ) висаджували в біологічні пробірки на безгормональне середовище Б4, яке містило половинну концентрацію макро-, мікросолей і вітамінів MS, 15 г/л сахарози, 50 мг/л інозитулу, 345 мг/л L-проліну. Культивування на регенераційних середовищах проводили при 26–27 °С та інтенсивності освітлення 2000–5000 люкс. Рослини-регенеранти  $T_0$  з біологічних пробірок пересаджували в пакети з ґрунтом, а після приживлення – у вегетаційні посудини з об'ємом ґрунту 20 дм<sup>3</sup>. Вирощували рослини  $T_0$  у ґрунті також при 26–27 °С, освітленості 5000–10000 люкс та 16-годинному фотоперіоді. В період цвітіння ізолювали як волоті, так і качани рослин  $T_0$  паперовими ізоляторами. Рослини  $T_0$  підлягали самозапиленню або при неможливості провести самозапилення їх 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 закритого типу і вирощували за загальноприй-

нятою методикою вирощування кукурудзи у закритому ґрунті [19]. Розмноження рослин  $T_1$ – $T_6$  проводили шляхом контрольованого самозапилення після ізоляції волотей та качанів. Рослини поколінь  $T_2$ – $T_6$  у фазі сходів випробовували на стійкість до фосфінотрицину на селективному фоні, який створювали шляхом обприскування сходів розчином гербіциду баста в концентрації 1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин. Спостереження за реакцією контрольних та дослідних рослин здійснювали через 20 діб після обробки гербіцидом, по закінченні цвітіння та у фазі повної стиглості зерна.

Генетичну трансформацію калусної тканини проводили на базі відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Вирощування донорних рослин, отримання калусної тканини, субкультивування трансформованої калусної тканини, одержання рослин-регенерантів, вирощування покоління рослин-трансформантів від самозапилення в закритому ґрунті проводили на базі Державної установи Інститут зернових культур НААН України.

Дані в таблицях представлені у вигляді  $\bar{x} \pm \Delta$ , де  $\bar{x}$  – середнє арифметичне значення показника,  $\Delta$  – довірчий інтервал, який розраховували як  $\Delta = m \cdot t_{0,05}$ , де  $m$  – похибка середнього арифметичного,  $t_{0,05}$  – критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05 [20].

Рослина  $T_0$ , регенерована з калусної тканини гібрида PLS61 x ДК633266, біолістично обробленої конструкцією з чужорідними генами, була запилена пилком лінії Ланкастер ДК633266 (самозапилення трансформанта виявилось неможливим через відсутність у нього фертильного пилку). Присутність гена *bar* в рослині  $T_0$ , використаної для подальших досліджень, підтверджено методом полімеразної ланцюгової реакції. В результаті одержано 40 насінин із зародками покоління  $T_1$ , генотип яких  $T_1$ : [ $T_0$ (PLS61 x ДК633266) x ДК633266]. Частину насіння  $T_1$  висівали у вегетаційні посудини з ґрунтом. На рослинах  $T_1$  одержано насіння від самозапилення із зародками  $T_2$  генотипу  $T_2$ : [ $T_0$ (PLS61 x ДК633266) x ДК633266] 1сз, де 1сз – номер самозапилення (2079 шт.). В наступних поколіннях на рослинах  $T_2$ – $T_6$  насіння одержували тільки шляхом самозапилення. Генотипи зародків цього насіння і рослин, які формувалися при його проростанні, відповідно становили  $T_{3-6}$ : [ $T_0$ (PLS61 x ДК633266) x ДК633266] 2-5сз. Для вирощування рослин поколінь  $T_2$ – $T_6$  висівали по 25 і більше рослин на покоління. В кожному поколінні по 5 і більше рослин самозапилювалися.

Для рослин-трансформантів поколінь  $T_2$  і  $T_3$  відзначених вище генотипів вивчали ріст та розвиток за чотирма варіантами дослідів:

1 – рослини, які не є потомками генетично трансформованих рослин; без обробки гербіцидом баста;

2 – рослини, які не є потомками генетично модифікованих рослин; з обробкою гербіцидом баста;

3 – рослини-трансформанти (потомки рослин-регенерантів з калусної тканини, яка пройшла біолістичну обробку, потенціальні носії гена *bar*); без обробки гербіцидом баста;

4 – рослини-трансформанти (потомки рослин-регенерантів з калусної тканини, яка пройшла біолістичну обробку, потенціальні носії гена *bar*); з обробкою гербіцидом баста.

У варіантах 1 і 2 використовували рослини-сомаклони покоління  $R_2$  генотипу (PLS61 x ДК633266) x ДК633266, одержані в лабораторії біотехнології Державної установи Інститут зернових культур при культивуванні калусної тканини гібрида PLS61 x ДК633266 без біолістичної обробки.

Досліджували ріст і розвиток 8 окремих сімей  $T_2$  (нащадки від самозапилення 8 окремих рослин  $T_1$ ) і 8 окремих сімей  $T_3$  (нащадки від самозапилення 8 окремих рослин  $T_2$ ), насіння кожної з яких було висіяне на окремій ділянці. Ці дослідження для рослин  $R_2$ ,  $T_2$  та  $T_3$  проводилися одночасно і в однакових умовах 2014 р. Дослідження з рослинами-трансформантами покоління  $T_6$  були проведені в 2017 р.

**Результати досліджень.** В таблиці 1 наведено схожість насіння піддослідних рослин за чотирма варіантами експерименту.

Дані таблиці 1 стосуються стану рослин на момент появи сходів, тобто до обробки

гербицидом у варіантах 2 та 4. Виходячи з цих даних, можна оцінити вплив біолістичної обробки й умов вирощування рослин поколінь  $T_0$ – $T_2$  на схожість насіння із зародками відповідно другого і третього поколінь трансформантів. Так, порівняно з рослинами, які не були трансформовані, а одержані з насіння соматоклонів, трансформанти мали значно меншу схожість, причому в  $T_3$  вона знижувалася навіть порівняно з  $T_2$ . Якщо аналізувати за окремими сім'ями, то схожість насіння в поколінні  $T_2$  більш вирівняна і варіювала між сім'ями у діапазоні 17,2–67,6 %. У поколінні  $T_3$  схожість насіння варіювала між сім'ями з більшим розмахом – в межах 0–73,5 %, причому насіння двох сімей не зійшло. Можна припустити, що причинами зниження схожості в поколіннях трансформантів може бути присутність чужорідних генів, а також специфічна реакція окремих сімей на умови закритого ґрунту при формуванні зернівок.

**1. Схожість насіння рослин-трансформантів поколінь  $T_2$  і  $T_3$   
(вихідний генотип PLS61 x ДК633266)**

Рослини	Варіант/ покоління *		Кількість висіяного насіння, 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

\* Тут і далі варіант 1 – рослини-соматоклони, без обробки гербицидом баста; 2 – рослини-соматоклони, з обробкою і гербицидом баста; 3 – рослини-трансформанти за геном *bar*, без обробки гербицидом баста; 4 – рослини-трансформанти за геном *bar*, з обробкою гербицидом баста.

Аналіз реакції рослин на обробку гербицидом баста, проведена на 34-ту добу після появи сходів і на 20-ту добу після обробки дослідних ділянок гербицидом, показав, що нетрансформовані рослини-соматоклони покоління  $R_2$  без обробки гербицидом були неушкоджені та мали здоровий вигляд, а такі ж рослини після обробки гербицидом повністю загинули. Рослини-трансформанти за геном *bar* покоління  $T_2$  у варіанті після обробки гербицидом були стійкими і умовно стійкими з різним ступенем пошкодження. Разом з тим до обробки гербицидом 14-добові сходи і в контрольному варіанті (рослини-соматоклони покоління  $R_2$  вихідного генотипу PLS61 x ДК633266), і в дослідному варіанті (рослини-трансформанти за геном *bar* покоління  $T_3$  того ж вихідного генотипу PLS61 x ДК633266) були однаково розвинуті, хоча схожість як соматоклонів  $R_2$ , так і рослин-трансформантів  $T_3$  виявилася дещо зниженою. У варіанті після обробки гербицидом рослини-соматоклони  $R_2$  повністю загинули, а рослини-трансформанти  $T_3$  загалом вижили, хоча і відзначались різним ступенем стійкості до дії гербициду.

В таблиці 2 наведено підсумкові дані щодо виживаності рослин кукурудзи на 20-ту добу після обробки їх гербицидом баста (34-та доба від появи сходів) і впливу на них біолістичної обробки конструкцією з геном *bar*.

Як видно з таблиці 2 найвищий бал виживаності при оцінці за 5-бальною шкалою мали 100 % контрольних рослин – без трансформації і обробки гербицидом (варіант 1) та трансформованих, але без обробки гербицидом в поколінні  $T_2$  (варіант 3). Варіант 3 в поколінні  $T_3$  мав 4 бали виживаності для 72 % рослин на ділянці, що перш за все пов'язано з якістю насіння покоління  $T_3$ . У варіанті дослід 2 нетрансформовані рослини загинули протягом тижня після обробки їх гербицидом. У варіанті 4 серед рослин трансформованих і з обробкою гербицидом виживаністю на рівні 4–5 балів відзначалось 19,8 % рослин покоління  $T_2$  і 30,2 % рослин –  $T_3$ . Загалом середній бал виживаності для рослин  $T_2$  коливався в діапазоні 1,3–2,0, а частка рослин на кожній ділянці, стійких до впливу гербициду, з балом виживаності 4–5 варіювала у межах 6,7–52,4 %. Для рослин  $T_3$  після обробки гербицидом серед-

ній бал виживаності дещо збільшувався і був в діапазоні 1,5–3 бали. Збільшилася і частка рослин в поколінні T<sub>3</sub>, які після обробки гербіцидом характеризувалися виживаністю на рівні 4–5 балів – 8,0–84,6 %. Найбільшу кількість рослин з виживаністю 4–5 балів (84,6 %) забезпечила сім'я № 27, що свідчить про успішний добір на селективному фоні у попередніх поколіннях та поступовий перехід трансгену в гомозиготний стан у двох циклах гомозиготації шляхом самозапилення. Насіння від самозапилення сім'ї № 27, яка пройшла відбір на селективному фоні у ґрунті і була морфологічно схожа на батьківську лінію ДК633266, використано в наступному році для вирощування покоління T<sub>4</sub>.

**2. Виживаність рослин-трансформантів кукурудзи в поколіннях T<sub>2</sub> та T<sub>3</sub> за дії гербіциду баста, 1 г/л (вихідний генотип PLS61 x ДК633266)**

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

\* У варіантах 1, 3 – кількість рослин на ділянці; 2, 4 – кількість рослин, які підлягали обробці гербіцидом баста (1 г/л у перерахунку на фосфінотрицин). \*\* У варіантах 1, 3 частота виживаності розраховувалася від кількості рослин на ділянці; 2, 4 – від кількості рослин, які підлягали обробці гербіцидом. \*\*\* 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, які зазнавали дії гербіциду.

Кількісна оцінка рослин за виживаністю протягом всього вегетаційного періоду показала, що в контрольних варіантах досліджу 1 та 3 (без обробки гербіцидом) протягом вегетаційного періоду всі рослини на ділянці збереглися. В контрольному варіанті 2, де вирощувалися нетрансформовані рослини, після обробки гербіцидом спостерігалася загибель всіх рослин. У варіанті 4 через 20 діб після обробки гербіцидом вижило 64,5 % рослин покоління T<sub>2</sub> і більше 80,0 % рослин T<sub>3</sub>. Післядія гербіциду проявлялася не тільки в загибелі рослин до 20-ї доби після обробки, а й в пригніченні їх розвитку протягом всього вегетаційного періоду. Так, сумарно за вегетаційний період від загальної кількості рослин, що зазнали дії гербіциду, в поколінні T<sub>2</sub> їх загинуло 53,6 %, а в поколінні T<sub>3</sub> – лише 32,4 %. Ці результати, з урахуванням умов запилення, уможливають припустити вбудовування в геном калусної тканини і передачу рослинам-трансформантам однієї копії гена *bar*.

В таблиці 3 висвітлено результати фенологічних спостережень за тривалістю міжфазних періодів «сходи - цвітіння волотей» та «сходи - цвітіння качанів» у досліджуваних варіантах. Ці ознаки є важливими для синхронізації цвітіння чоловічих та жіночих суцвіть з метою здійснення самозапилення.

Як видно з таблиці 3, у рослин-трансформантів поколінь T<sub>2</sub> і T<sub>3</sub>, які були оброблені гербіцидом (варіант 4), збільшився термін від сходів до цвітіння волотей та качанів порівняно з нетрансформованими і трансформованими рослинами без обробки їх гербіцидом – варіант 1 (контроль) та варіант 3 відповідно. У варіанті 4 між рослинами покоління T<sub>2</sub> і, особливо, T<sub>3</sub> спостерігалася підвищена варіабельність за досліджуваними ознаками, що призвело до збільшення відповідних коефіцієнтів варіації і опосередковано свідчить про розщеплення усередині популяції рослин T<sub>2</sub> і T<sub>3</sub> при інбридингу. Розрив між термінами

цвітіння волотей і качанів в поколіннях R<sub>2</sub>, T<sub>2</sub> та T<sub>3</sub> в цілому по досліді становив 1–5 діб. У варіанті 4 в обох поколіннях тривалість розриву між цими термінами (відповідно 3,3 ± 1,5 і 2,9 ± 1,0 діб) достовірно збільшувалася по відношенню до контролю без трансформації і обробки гербіцидом (варіант 1: 1,1 ± 0,5 діб), простежувалася тенденція до його збільшення порівняно з трансформованими рослинами і без обробки їх гербіцидом (відповідно в T<sub>2</sub> 1,6 ± 0,8 діб та T<sub>3</sub> 2,1 ± 1,0 діб).

**3. Вплив обробки гербіцидом баста на тривалість міжфазних періодів «сходи - цвітіння волотей» та «сходи - цвітіння качанів» у рослин-трансформантів кукурудзи поколінь T<sub>2</sub> і T<sub>3</sub> (вихідний генотип PLS61 x ДК633266)**

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

\* Кількість досліджених рослин, шт. \*\* Коефіцієнт варіації, у варіанті 2 рослини нетрансформовані, після обробки гербіцидом баста у фазі сходи загинули протягом тижня.

В таблиці 4 представлені результати впливу гербіциду баста на висоту рослин-трансформантів порівняно з нетрансформованими рослинами.

**4. Вплив обробки гербіцидом баста на висоту рослин (см) в поколіннях трансформантів кукурудзи (вихідний генотип PLS61 x ДК633266)**

Рік спостережень	Варіанти					
	нетрансформовані рослини (контроль)	1	2	трансформовані рослини (дослід)	3	4
2014	R <sub>2</sub>	160,8 ± 2,4	-	T <sub>2</sub>	155,2 ± 10,4	155,2 ± 10,4
2014	R <sub>3</sub>	160,8 ± 2,4	-	T <sub>3</sub>	125,3 ± 8,4	125,3 ± 8,4
2017	R <sub>6</sub>	143,9 ± 5,6	-	T <sub>6</sub>	166,9 ± 4,5	166,9 ± 4,5

Проведені у 2014 р. дослідження показали, що трансформовані рослини покоління T<sub>2</sub> (варіант 4) при обробці гербіцидом відзначалися пригніченим ростом і достовірно меншою висотою, ніж рослини нетрансформовані і трансформовані без обробки їх гербіцидом – варіант 1 (контроль) і варіант 3 відповідно. В поколінні T<sub>3</sub> відмічено зменшення висоти рослин (варіант 4) порівняно з нетрансформованими рослинами і без обробки їх гербіцидом (варіант 1), але вплив гербіциду на їх висоту порівняно з рослинами-трансформантами, які не зазнавали дії препарату баста (варіант 3), не встановлений. В даному експерименті виявлене достовірне зменшення висоти рослин в поколінні T<sub>3</sub> порівняно з поколінням T<sub>2</sub>, де на трансформанти гербіцид не впливав (варіант 3), при майже однаковому коефіцієнті варіації (відповідно 13,2 і 13,3 %). Таке зменшення є закономірним результатом інбридингу і добре відоме в поколіннях рослин від самозапилення [21–23]. Разом з тим аналогічне порівняння висоти рослин в поколіннях трансформантів T<sub>2</sub> і T<sub>3</sub> після дії гербіциду (варіант 4) показує відсутність суттєвої різниці у висоті рослин та підвищення коефіцієнта варіації (відповідно 24,4 і 18,7 %). Тобто сильніше варіювання ознаки на фоні стресу заважає виявити зміни висоти рослин при інбридингу і виокремити спадкове зменшення висоти від адаптивної реакції на стрес. Потрібно відзначити, що зміни тривалості міжфазних періодів і висоти

рослин можливо викликані введенням чужорідного гена в геном рослини, внаслідок чого можлива зміна експресії рослинних генів, що зосереджені біля місця вбудовування [24].

Морфобіологічні особливості рослин поколінь T<sub>4</sub>–T<sub>5</sub> не досліджувалися. В T<sub>6</sub> виживаність рослин-трансформантів після обробки їх у фазі сходів була на рівні 100 %. У 2017 р. середні значення висоти рослин-трансформантів покоління T<sub>6</sub> без обробки гербіцидом (варіант 3) та з його використанням (варіант 4) достовірно не різнилися, що опосередковано свідчить про стабілізацію рослинного геному після введення чужорідного гена в ряду поколінь (див. табл. 4). Рослини варіантів 3 і 4 за морфологією були подібні до батьківської лінії ДК633266, а контроль (варіант 1) – до батьківської лінії PLS61.

Представлений аналіз морфобіологічних особливостей рослин-трансформантів загалом свідчить і про явища, які зазвичай супроводжують інбридинг та підвищення гомозиготності – зниження висоти рослин, розщеплення на окремі сім'ї, диференціацію сімей за морфологічними ознаками тощо.

### **Висновки**

Таким чином, проведена морфобіологічна оцінка рослин у поколіннях T<sub>0</sub>–T<sub>6</sub> після генетичної трансформації стороннім геном стійкості до гербіциду баста (діюча речовина – фосфінотрицин) *bar* уможливила охарактеризувати стійкість трансформованих рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку та одержати насіння від самоzapилення. Встановлено, що рослини кукурудзи, які не зазнавали біолістичної трансформації, через тиждень після обробки гербіцидом баста гинуть з частотою 100 %. Рослини-потомки біолістично трансформованих геном *bar* рослин мають знижену схожість як в поколінні T<sub>2</sub>, так і в поколінні T<sub>3</sub>. За фенологічними показниками та висотою трансформовані рослини, які не зазнавали дії гербіциду, в поколінні T<sub>2</sub> суттєво не відрізняються від нетрансформованих (також без обробки їх гербіцидом), а в поколінні T<sub>3</sub> виявляють збільшення тривалості міжфазних періодів, розриву в цвітінні чоловічих та жіночих суцвіть, а також відзначаються пригніченими ростовими процесами, що призводить до зменшення висоти рослин. Дослідження морфобіологічних показників потомства трансгенних рослин свідчать про деяке відставання їх в розвитку, зокрема, за термінами цвітіння чоловічих і жіночих суцвіть та висотою, що можна розглядати як звичайну шоківу реакцію на дію стресового фактора або як наслідок вбудовування трансгена в рослинний геном. Але в цілому у потомстві трансформантів T<sub>2</sub> і T<sub>3</sub> шоківу реакцію швидко минає, рослини відзначаються добрим розвитком, жіночі та чоловічі суцвіття нормально вступають у фазу цвітіння, утворюють пилок і приймочки, формують насіння. Між рослинами усередині сімей T<sub>2</sub> та T<sub>3</sub> спостерігається більша варіабельність за дослідженими морфобіологічними ознаками, ніж в контрольних варіантах. Це дозволяє припустити, що в даному випадку наявні рослини з різним ступенем стійкості до гербіциду внаслідок присутності чи відсутності гена *bar* у поколіннях від самоzapилення вихідних рослин-регенерантів, одержаних безпосередньо після біолістичної обробки калусної тканини. Частота виживаності рослин T<sub>6</sub> після обробки гербіцидом становила 100 %, висота рослин-трансформантів як з обробкою гербіцидом, так і без неї достовірно не різнилася, що вказує на вірогідний перехід трансгена *bar* в гомозиготний стан в п'ятьох циклах гомозиготації шляхом самоzapилення та успішний добір на селективному фоні, а також на стабілізацію рослинного геному в ряду поколінь після введення трансгенів.

### **Використана література**

1. Дубініна А. А., Янчева М. О., Ольховська В. С., Непочатих Т. А. Товарознавство. Харчові продукти з генетично модифікованої сировини: [навч. посіб.]. Харків: ХДУХТ, 2015. 267 с.
2. Сатарова Т. М., Абраїмова О. Є., Вінніков А. І., Черенков А. В. Біотехнологія рослин: [навч. посіб.]. Дніпропетровськ: Адверта, 2016. 136 с.
3. Genetic engineering of maize with the Arabidopsis DREB1 A/CBF3 gene using split-seed explants / D. Al-Abed et al. *Crop Sci.* 2008. Vol. 47. P. 2390–2402.
4. Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *E. coli* / D. A. Lightfoot et al. *Euphytica.* 2007. Vol. 156, N 1–2. P. 103–116.
5. Advances in maize transformation technologies and development of transgenic maize / P. Yadava et al. *Frontiers in Plant Science.* 2016. Vol. 7. P.1949–1960.
6. Сахно Л. О., Комарницький І. К., Кучук М. В.

- Стойкість до гліфосату і глюфозінату в поколіннях T<sub>1</sub>–T<sub>2</sub> біотехнологічних рослин ріпаку (*Brassica napus* L.). *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2015. Т. 13, № 1. С.3–10.
7. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи / І. О. Нітовська та ін. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. Т.15. С. 112–117.
  8. Genetic transformation of the Brazilian BR 451 maize variety by the *Agrobacterium tumefaciens* method / M. R. Silva et al. *Ciencia Rural*. 2017. Vol. 47. P.11–16.
  9. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro* / І. Р. Горбатюк та ін. *Физиология растений и генетика*. 2016. Т. 48, № 1. С. 65–74.
  10. Chaleff R., Mauvais C. Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*. 1984. Vol. 224. P. 1443–1445.
  11. Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos / D. D. Songstad et al. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 1996. Vol. 32. P. 179–183.
  12. Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants / G. Barry et al. *American Society of Plant Physiologists*. 1992. Vol. 7. P. 139–145.
  13. Food safety – from the farm to the fork : EU register of genetically modified food and feed. – Режим доступу : [http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm). – Заголовок з екрану.
  14. Genetic engineering of maize (*Zea mays*) for high-level tolerance to treatment with the herbicide dicamba / M. Cao et al. *J. Agric. Food Chem*. 2011. Vol. 59, N 11. P. 5830–5834.
  15. Абраїмова О. Є., Піралов Г. Р., Сатарова Т. М. Біотехнологічна характеристика калусогенезу в культурі незрілих зародків кукурудзи під впливом абсцизової кислоти та 6-бензиламінопурину. *Вісн. Дніпропетровського нац. ун-ту*. 2010. В.18. Т. 1. С. 3–8. (Серія Біологія. Медицина).
  16. Christensen A. H., Quail P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*. 1996. N 5. P. 213–218.
  17. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies / O. Guerrero-Andrade et al. *Transgenic Res*. 2006. Vol. 15, N 4. P. 455–463.
  18. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron / G. Drakakaki et al. *Plant Molecular Biology*. 2005. Vol. 59. P. 869–880.
  19. Столяренко В. С., Самошкин А. А., Бондарь П. С. Продуктивность самоопыленных линий кукурузы в зависимости от источников освещения. *Селекция и семеноводство*. 1991, № 3. С. 6–9.
  20. Welham S. J., Gezan S. A., Clark S. J., Mead A. Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression. Boca Raton: CRC Press, 2014. 608 p.
  21. Спеціальна селекція і насінництво польових культур: [навч. посіб.] / за ред. В. В. Кириченка. Харків.: Ін-т рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України, 2010. 462 с.
  22. Спеціальна селекція польових культур: [навч. посіб.] / В. Д. Бугайов та ін.; за ред. М. Я. Молоцького. Біла Церква, 2010. 368 с.
  23. Troyer A. F. Temperate corn background, behavior, and breeding. CRC Press, 2000. 468 p.
  24. Kohli A., Miro B., Twyman R. M. Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. *Transgenic Crop Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, C. Kole et al. (Eds.). P. 201–237.

## Reference

1. Dubinina, A. A., Jancheva, M. O., Ol'hovs'ka, V. S., & Nepochatih, T. A. (2015). *Tovarovnavstvo. Harchovi produkti z genetichno modifikovanoi sirovini* [Commodity studies. Food products from genetically modified raw materials]. Harkiv: HDUHT [in Ukrainian]
2. Satarova, T. M., Abraimova, O. Є., Vinnikov, A. I., & Cherenkov, A. V. (2016). *Biotehnologija roslin* [Plant biotechnology]. Dnipropetrovs'k: Adverta. [in Ukrainian]
3. Al-Abed, D., Rudrabhatla, S., Talla, R., & Goldman S. (2008). Genetic engineering of maize with the Arabidopsis DREB1A/CBF3 gene using split-seed explants. *Crop Sci.*, 47, 2390–2402.
4. Lightfoot, D. A., Mungur, R., Ameziane, R. W., Nol-te, S., Long, L., Bernhard, K., ... Young B. (2007). Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *E.coli*. *Euphytica*, 2007, 156 (1–2), 103–116.
5. Yadava, P., Abhishek, A., Singh, R., Singh, I., Kaul, T., Pattanayak, A., & Agrawal, P. K. (2016). Advances in maize transformation technologies and development of transgenic maize. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1949–1960.
6. Sahno, L. O., Komarnic'kij, I. K., & Kuchuk, M. V. (2015). Resistance to glyphosate and glufosinate in generations of T1-T2 biotech plants of rape (*Brassica napus* L.). *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів* [Bulletin of Ukr. society of geneticists and breeders], 13 (1), 3–10. [in Ukrainian]
7. Nitov's'ka, I. O., Abraimova, O. Є., Satarova, T. M., Shahov's'kij, A. M., & Morgun, B. V. (2014). Biosystem transformation of immature embryos of maize. *Фактори експериментальної еволюції організмів* [Factors of experimental evolution of organisms], 15, 112–117. [in Ukrainian]
8. Silva, M. R., Didon, D. A., Ceccon, C. C., Almeida, V. O., & Grando M. F. (2017). Genetic transformation of the Brazilian BR 451 maize variety by the *Agrobacterium tumefaciens* method. *Ciencia Rural*, 47, 11–16.
9. Gorbatjuk, I. R., Shherbak, N. L., Bannikova, M. O., Velikozhon, L. G., Kuchuk, M. V., & Morgun, B. V. (2016). Receipt of phosphine-triacin-resistant



- tion in vitro. *Fiziologija rastenij i genetika* [Plant physiology and genetics], 48 (1), 65–74. [in Ukrainian]
10. Chaleff, R., & Mauvais, C. (1984). Acetolactate synthase is the site of action of two sulfonylurea herbicides in higher plants. *Science*, 224, 1443–1445.
  11. Songstad, D. D., Armstrong, C. L., Petersen, W. L., Hairston, B., & Hinchee, M. A. W. (1996). Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 32, 179–183.
  12. Barry, G., Kishore, G. M., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Welson, M. ... Hallas, L. (1992). Biosynthesis and molecular regulation of amino acids in plants. *American Society of Plant Physiologists*, 7, 139–145.
  13. 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](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm). Заголовок з екрану.
  14. Cao, M., Sato, S. J., Behrens, M., Jiang, W. Z., Clemente, T. E., & Weeks, D. P. (2011). Genetic engineering of maize (*Zea mays*) for high-level tolerance to treatment with the herbicide dicamba. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (11), 5830–5834.
  15. Abraimova, O. Ye., Piralov, G. R., & Satarova, T. M. (2010). Biotechnological characteristic of callusogenesis in the culture of maize immature embryos under the influence of abscisic acid and 6-benzylaminopurine. *Visnyk Dnipropetrovsko. Nationalnoho universytetu. Serija Biologija. Medicina* [Bulletin of Dnipropetrovsk National University. Series Biology, Medicine], 18 (1), 3–8. [in Ukrainian]
  16. Christensen, A. H., & Quail, P. H. (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5, 213–218.
  17. Guerrero-Andrade, O., Loza-Rubio, E., Olivera-Flores, T., Fehérvári-Bone, T., & Gómez-Lim, M. A. (2006). Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res.*, 15 (4), 455–463.
  18. Drakakaki, G., Marcel, S., Glahn, R. P., Lund, E. K., Parigh, S., Fischer, R., ... Stoger, E. (2005). 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*, 59, 869–880.
  19. Stolyarenko, B. C., Samoshkin, A. A., & Bondar, P. S. (1991). Produktivnost' samoopylennykh linij kukuruzy v zavisimosti ot istochnikov osveshheniya. *Selekcija i semenovodstvo* [Selection and seed production], 3, 6–9. [in Russian]
  20. Welham, S. J., Gezan, S. A., Clark, S. J., & Mead, A. (2014). *Statistical methods in biology: design and analysis of experiments and regression*. Boca Raton: CRC Press.
  21. Rjabchun, N. I., El'nikov, M. I., Zvjagin, A. F., Golik, V. S., Golik, O. V., Didenko, S. Ju. ... & Markova, T. Yu. (2010). *Special'na selekcija i nasinnictvo pol'ovih kul'tur* [Special selection and seed production of field crops]. Harkiv: In-t roslinnictva im. V. Ja. Jur'eva NAAN Ukrainu.
  22. Bugajov, V. D., Vasil'kivs'kij, S. P., Vlasenko, V. A., Girko, V. S., Dzjubec'kij, B. V., Kirichenko, V. V., ... Jacishen, O. L. (2010) *Special'na selekcija pol'ovih kul'tur* [Special selection of field crops]. Bila Cerkva.
  23. Troyer A. F. (2000). *Temperate corn background, behavior, and breeding*. CRC Press.
  24. Kohli, A., Miro, B., & Twyman, R. M. (2010). Transgene Integration, Expression and Stability in Plants: Strategies for Improvements. In: *Transgenic Crop Plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. C. Kole et al. (Eds.).

УДК 57.084:633.15

**Деркач Е. В.<sup>1\*</sup>, Абраимова О. Е.<sup>1</sup>, Черчель В. Ю.<sup>1</sup>, Дзюбецкий Б. В.<sup>1</sup>, Моргун Б. В.<sup>2\*\*</sup>, Нитовская И. О.<sup>2</sup>, Сатарова Т. Н.<sup>1</sup>, Морфобиологические особенности растений-трансформантов кукурузы. *Зерновые культуры*. 2017. Т 1. № 1. С. 232–241.**

<sup>1</sup>Государственное учреждение Институт зерновых культур НААН, ул. Владимира Вернадского, д. 14, г. Днепр, Украина, 49027, \*e-mail: kvderkach@gmail.com

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН, ул. Академика Заболотного, 148, г. Киев, Украина, 03680, \*\* e-mail: molgen@icbg.org.ua

**Ключевые слова:** кукуруза, устойчивость к гербицидам, фосфинотрицин, растения-трансформанты, ген *bar*.

Охарактеризованы морфобиологические особенности растений-трансформантов кукурузы T<sub>0</sub>–T<sub>6</sub> после биолиственной обработки каллусной ткани плазмидной конструкцией с чужеродным геном *bar*, который обеспечивает устойчивость к действующему веществу гербицида баста – фосфинотрицину. Проанализирована всхожесть семян, выживаемость всходов после обработки их гербицидом баста, длину межфазных периодов «всходы - цветение метелок», «всходы - цветение початков» и высоту растений. Частота выживаемости растений T<sub>6</sub> после обработки гербицидом составила 100 %. Представленный анализ морфобиологических особенностей растений-трансформантов в целом свидетельствует о вероятности накопления гена *bar* в геноме растений в пяти циклах гомозиготации путем самоопыления и успешном отборе на селективном фоне в предыдущих поколениях.

*Derkach K. V.<sup>1\*</sup>, Abraimova O. Ye.<sup>1</sup>, Cherhel V. Yu.<sup>1</sup>, Dzyubetskyi B. V.<sup>1</sup>, Morgun B. V.<sup>2</sup>, Nitovska I. O.<sup>2</sup>, Satarova T. M.<sup>1</sup> Morphobiological features of maize transformed plants. Grain Crops, 2017, 1 (2), 232–241.*

<sup>1</sup>SE Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Sciences, 14 Volodymyra Vernadskyi Str., Dnipro, Ukraine, 49027, \*e-mail: kvderkach@gmail.com

<sup>2</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU, 148, Akademika Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680, \*\* e-mail: molgen@icbge.org.ua

**Key words:** maize, resistance to herbicides, phosphinothricin, transformed plants, gene bar.

The aim of the work was to characterize the morphobiological features of maize genetically transformed plants in generations T<sub>0</sub>–T<sub>6</sub>. The tasks of the study were to investigate seed germination, the survival of young seedlings after the Basta herbicide treatment, the duration of the periods between seedlings emergence and tassel/ear flowering, plant height.

The maize hybrid PLS61xДК633266 which parent lines referred to PLS61 germplasm (PLS61) and Lancaster germplasm (ДК633266) was used as the initial research material. Genetic transformation was carried out via biolistic treatment of 10-20-days calli, which had been formed on scutellums of immature embryos. The control calli were not undergone biolistic treatment.

Plasmid vector pAHC25 containing the gene of β-glucuronidase (*uidA*) from *Escherichia coli* and the gene of phosphinothricinacetyltransferase (*bar*) from *Streptomyces hygroscopicus*, both under the control of the promoter of the maize ubiquitin gene, was used for transformation.

Initially the T<sub>0</sub> plant regenerated from callus tissue of PLS61xДК633266, which had been biolistically treated with the plasmid vector, was pollinated with pollen of ДК633266 (self-pollination of the transformed plant was impossible owing to pollen sterility). The presence of *bar* gene in the T<sub>0</sub> plant used for further studies has been confirmed by the polymerase chain reaction method. As a result, 40 seeds with T<sub>1</sub> embryos of genotype: [T<sub>0</sub>(PLS61xДК633266)xДК633266] were received. T<sub>1</sub> seeds partially were sown into the soil in vegetation vessels. The seeds obtained from T<sub>1</sub> plants via self-pollination had the genotype T<sub>2</sub>: [T<sub>0</sub>(PLS61xДК633266)xДК633266]1sp, where 1sp - the number of self-pollination (2079 pcs.). The seeds of the subsequent generations on plants T<sub>2</sub>–T<sub>6</sub> were received only by self-pollination. The genotypes of embryos of these seeds and plants which were formed after their germination were, respectively, T<sub>3-6</sub>: [T<sub>0</sub>(PLS61xДК633266)xДК633266]2-5sp. 25 and more plants per generation were sown for cultivation of T<sub>2</sub>–T<sub>6</sub>. Five or more plants were self-pollinated in each generation.

Morphological evaluation of plants in generations T<sub>0</sub>–T<sub>6</sub> after *bar*-transformation allowed to characterize transformed plants on post-herbicide survival and basic growth parameters and to obtain seeds after self-pollination. It was found that 100% untransformed maize plants died within a week after treatment with Basta. Plants-descendants of biolistic transformed ones have reduced seed germination both in T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> generations. By average phenological parameters and height transformed plants, not treated with herbicide, in T<sub>2</sub> do not differ significantly from untransformed untreated ones. In T<sub>3</sub> generation they revealed an increase in the duration of interphase periods, a break in flowering male and female inflorescences as well as growth inhibition, which leads to the decrease of plant height. But generally, the shock reaction quickly passes in T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> progenies. The plants look like well developed, female and male inflorescences normally enter the flowering phases, form pollen and silk, produce seeds. There was a greater variation in morphological characteristics between plants within families T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> than in control variants, which suggests the existence of plants with various degrees of resistance to the herbicide. It can be explained with the presence or absence of *bar* gene in generations from self-pollination of the original regenerants obtained directly from biolistically treated callus tissue. The survival of T<sub>6</sub> plants after herbicide treatment was 100%. The average values of the height of transformed plants without and after herbicidal treatment in T<sub>6</sub> did not differ significantly. This fact indicates a successful screening on the selective phone in previous generations and the probable accumulation of transgene in plant genome in five cycles of homozygosity via self-pollination.