

КОМПЕТЕНТНОСТЬ К *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СЕГМЕНТОВ ПОБЕГА ЭЛИТНЫХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

С. И. Михальская¹

Н. И. Адаменко¹

Б. В. Моргун²

А. В. Кочетов³

Е. Н. Тищенко¹

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
Новосибирск

E-mail: oltyko@gmail.com

Получено 01.07.2011

Agrobacterium-опосредованная трансформация является важнейшим экспериментальным инструментом для разработки молекулярных биотехнологий. Тем не менее, генетическое улучшение большинства коммерческих линий кукурузы ограничено отсутствием эффективных методов регенерации и трансформации. Анализировали перспективность применения поперечно разрезанных сегментов (1–2 мм) узелковой области побегов 7–10-дневных проростков как эксплантов для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации элитных инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) Л250, Л390, Л1544, Л1552, Л1563, Л1652, используя штамм LBA4404, несущий бинарный вектор pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы и селективным геном неомизинфосфотрансферазы. Регенерация трансформированных побегов путем прямого органогенеза происходила независимо от генотипа на 10–14-й день культивирования, затем в течение непродолжительного времени наблюдалась индукция ризогенеза. Показано, что интродукция в клетки и интеграция Т-ДНК в геном кукурузы может осуществляться с использованием тиосульфата натрия без ацетосиригона. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения сегментов узелковой области побега для разработки методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации элитных линий кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, тиосульфат натрия, прямой органогенез, сегмент побега, супрессор гена пролиндегидрогеназы.

Несмотря на значительные успехи селекционно-генетических программ по получению трансгенных растений кукурузы (*Zea mays* L.) и их культивированию во многих регионах мира, генетическая трансформация коммерческих генотипов не является рутинной и надежно воспроизводимой. Один из ключевых этапов обсуждаемой методологии связан с тотипотентностью трансформированных клеток. Он имеет непосредственное отношение, с одной стороны, к выбору типа экспланта, оптимизации питательных сред и условий культивирования, взаимодействию генотип — окружающая среда, а с другой — к используемому методу доставки рекомбинантных молекул ДНК в геном кукурузы, векторной конструкции.

Традиционно для реализации морфогенетического потенциала кукурузы *in vitro* в качестве экспланта используют незрелые

зародыши [1–7]. При этом индукция регенерации фертильных растений осуществляется от эпидермальных и субэпидермальных клеток базальной области щитка непрямым органогенезом [8]. Однако способность к образованию эмбриогенного каллуса — признак, присущий далеко не всем генотипам, что ограничивает возможности получения трансгенных растений-регенерантов, особенно для сельскохозяйственно важных инбредных линий кукурузы. Наряду с использованием незрелых зародышей в последние годы начали разрабатывать системы методов генетической трансформации, где первичными эксплантами являются узелковые зоны побега, апикальные меристемы [9–13]. Исследования, сочетающие поиск наиболее подходящих для генетической трансформации эксплантов и оптимизацию условий культивирования, направлены на

преодоление генотипической зависимости регенерационной способности элитных линий и гибридов кукурузы. К числу основных проблем, связанных с реализацией морфогенетического потенциала кукурузы, относят: низкую частоту индукции каллусообразования и регенерации побегов, снижение уровня тотипотентности клеток при длительном культивировании, соматическую изменчивость, химерность [10].

Интерес к эксплантам кукурузы, включающим верхушку побега, обусловлен компетентностью к агробактериальной инфекции клеток апикальной меристемы, из L2-слоя которых способны развиваться генеративные структуры, формирующие гаметы [9, 11]. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация имеет ряд преимуществ по сравнению с биолистическим методом в связи с возможностью интеграции единичных копий Т-ДНК в транскрипционно-активные области ядерного генома, что обеспечивает стабильную экспрессию трансгенов в последующих поколениях [14]. Перенос Т-ДНК и ее интеграция в геном однодольных зависит от многих факторов, включающих, в частности, генотип, тип экспланта, условия инокуляции, культивирования, селекции, агробактериальный штамм и векторную конструкцию.

Цель настоящей работы состояла в анализе компетентности к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации поперечно разрезанных сегментов узелковой зоны побегов ряда элитных инбредных линий кукурузы отечественной селекции с использованием штамма LBA4404, содержащего векторную конструкцию pBi2E с двухцепочечным РНК-супрессором (дц РНК-супрессором) супрессором гена пролиндегидрогеназы, функционирование которого связано с повышением устойчивости растений к абиотическим стрессам.

Материалы и методы

В работе использовали зрелые зерновки инбредных линий кукурузы: Л250, Л390, Л1544, Л1552, Л1563, Л1652 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев). Стерилизацию зерновок проводили, обрабатывая 70%-м этанолом в течение 20 мин, с последующим промыванием стерильной дистиллированной водой и помещением на 30 мин в 25%-й раствор коммерческого отбеливателя. После поверхностной стерилизации зерновки трижды промывали стерильной дистиллированной водой и проращивали в течение

6–8 сут на среде MS [15] при 27 °С с 16-часовым фотопериодом и освещенностью 3–4 клк. Часть побега — узелковую зону и ткани, расположенные ниже и выше (~0,5 см), делили поперечно на сегменты размером 1–2 мм. Эти сегменты служили эксплантами при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации штаммом LBA4404, содержащим векторную конструкцию pBi2E с дцРНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы (PDH) на основе гена ERD5 арабидопсиса и с геном *nptII* *E. coli* (рис. 1).



Рис. 1. Блок-схема Т-ДНК области с двухцепочечным супрессором (pBi2E):

pNOS — промотор гена нопаинсинтазы; p35S — промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (CaMV); PDH-ex1 — первый экзон гена PDH (в конструкции присутствуют два фрагмента, расположенные в виде инвертированного повтора бц); int — фрагмент первого интрона гена PDH; *nptII* — ген неомизинфосфотрансферазы II *E. coli*; NOS — терминатор гена нопаинсинтазы, сигнал полиаденилирования; RB, LB — повторы, ограничивающие область Т-ДНК

Индукцию побегообразования *in vitro* осуществляли двумя способами.

Экспланты (по 15–20 штук на чашку Петри) высаживали:

I — на модифицированную нами питательную среду В5 Гамборга [16], содержащую 8,0 мг/л кинетина, 0,4 мг/л НУК (В5п);

II — на среду для каллусогенеза В5, содержащую 5 мг/л 2,4-Д (В5к), в течение трех недель (в темноте), а затем — на В5п (на свету).

рН сред до автоклавирования составляло 5,7–5,8. Культивирование проводили при условиях, описанных выше.

Агробактерию наращивали в течение суток в жидкой LB-среде на шейкере при 200 об/мин, 26–28 °С. Суспензию клеток агробактерии разводили в 5 раз средой В5п В5, содержащей 2 мМ Na₂S₂O₃ (оптическая плотность при 600 нм = 0,5). Экспланты инокулировали в течение 1 ч, высаживали на эту же агаризованную среду, не содержащую углеводов, и кокультивировали 2 сут в темноте при 27 °С, затем пассировали на среде В5п (или В5к) с антибиотиком цефотаксимом в конечной концентрации 500 мг/л, которая полностью ингибировала рост агробактерии. Что касается варианта II, то после трех недель пассирования на В5к продолжали культивирование на среде В5п. Селекцию на устойчивость к канамицину (Km, 100 мг/л)

осуществляли после индукции ризогенеза в течение 2–3 пассажей продолжительностью 12–14 дней каждый.

ДНК выделяли из листьев Км-устойчивых и контрольных растений-регенерантов, используя комплекс реактивов «ДНК-сорб-С» (Amplisens, Россия). Наличие целевого и селективного гена в ДНК кукурузы определяли ПЦР-методом. Применяли следующие праймеры для фрагментов: первого экзона гена PDH 5'-AACAA-CTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC-3' (F) и 5'-GAGAT-GTTGG-TCTAG-ATTTG-GCAGC-3' (R), размер ампликона составлял 545 п. о.; для фрагмента, включающего первый экзон и участок интрона гена PDH — 5'-AACAA-CTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC-3' (F) и 5'-ATTAA-GCTTT-CGAAC-CAAAC-AAGT-3' (R), размер ампликона — 700 п. о.; для гена *nptII* — 5'-CCTGA-ATGAA-CTCCA-GGACG-AGGCA-3' (F) и 5'-GCTCT-AGATC-CAGAG-TCCCG-CTCAG-AAG-3' (R), размер ампликона — 649 п. о. Реакционная смесь состояла из буфера для ПЦР DreamTaq™ Green Buffer (Fermentas, Литва), 0,2 мМ каждого дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Fermentas), 1 ед. полимеразы DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas), 30 нг суммарной ДНК, деионизированной воды Milli-Q до конечного объема 20 мкл. Наличие агробактериальной примеси контролировали по гену *virC*, используя праймеры 5'-ATCAT-TTGTA-GCGAC-T-3' (F) и AGCTC-AAACC-TGCTT-C-3' (R), размер ампликона — 730 п. о. [17].

ПЦР осуществляли в амплификаторе Mastercycler Personal 5332 Eppendorf, используя для PDH-ex1, PDH-int, *nptII* программу: первичная денатурация 94 °С 4 мин и 35 циклов — денатурация 94 °С 30 с, реассоциация 54 °С 30 с, элонгация 72 °С 30–45 с (в зависимости от размера ампликонов), конечная элонгация 72 °С 10 мин; для *virC* отличия были в условиях реассоциации — 59 °С 30 с. Безматричный негативный контроль — те же условия амплификации без добавления суммарной, общей для всех проанализированных образцов — показал отсутствие ампликонов. Электрофорез проводили в 1,2%-м агарозном геле в буфере 0,5-TBE, содержащем 0,5–2,5 мкг/мл бромистого этидия при напряженности 5 В/см в течение 1 ч. Маркером молекулярных масс служил GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

При статистической обработке полученных результатов использовали критерии Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Для повышения доступности *Agrobacterium tumefaciens* к тотипотентным клеткам, компетентным к агробактериальной инфекции, сегмент побега с узелковой зоной, определяемой по утолщению в области соединения мезокотилия с эпикотилем, делили поперечно на сегменты размером 1–2 мм. Реализацию морфогенетического потенциала осуществляли двумя способами, один из которых был связан с промежуточным этапом индукции каллусогенеза, а другой — с побегообразованием путем прямого органогенеза. Независимо от вариантов опыта и тестируемых генотипов частота регенерации побегов от инокулированных агробактерией эксплантов варьировала в пределах 15–17% и достоверно не отличалась. Относительно низкий уровень побегообразования, возможно, является отражением гетерогенности тканей анализируемой области сегмента побега, который помимо апикальной меристемы включает примордии листьев, частично мезокотиль, колеоптиль и развивающиеся листья. В частности, ранее нами было показано [18], что клетки мезокотилия кукурузы обладают крайне низкой способностью к органогенезу, несмотря на их компетентность к агробактериальной инфекции.

При культивировании на среде В5п регенерация осуществлялась прямым органогенезом. Индукция первых регенерантов происходила на 10–14-й день, в отдельных случаях наблюдали появление 2–3 побегов на эксплант, которые могли показывать разную устойчивость к селективной концентрации канамицинсульфата. Ризогенез происходил спонтанно на той же самой среде спустя непродолжительное время после регенерации побегов. Укорененные растения-регенеранты развивались в течение 4 недель. Следует отметить, что ответной реакцией проинокулированных агробактерией эксплантов на выбранные условия культивирования была не только преимущественная регенерация побегов, но иногда и прямое прорастание (рис. 2). Что касается каллусогенеза, то частота индукции каллуса и его нарастание на среде В5к была низкой. Тем не менее, если через 3 нед продолжали пассирование на среде В5п, регенерация побегов с указанной выше частотой осуществлялась не только непрямой, но и прямым органогенезом.

Одним из факторов, влияющих на индукцию регенерации *in vitro*, является стадия роста и дифференцировки клеток проростков кукурузы, из которых вычлняется эксплант. Это было отмечено нами ранее для

побегов этиолированных проростков тестируемых инбредных линий [18]. Однако, учитывая данные о возможности повышения частоты побегообразования при фотоморфогенезе [12, 18], прорастание зерновок кукурузы осуществляли на свету. Кроме того, поскольку канамицинсульфат может негативно влиять на ризогенез, селекцию на устойчивость к антибиотику проводили после формирования корней. На рис. 3 представлены растения-регенеранты инбредных линий кукурузы, устойчивые и неустойчивые к селективному агенту.



Рис. 2. Регенерация побегов прямым органогенезом

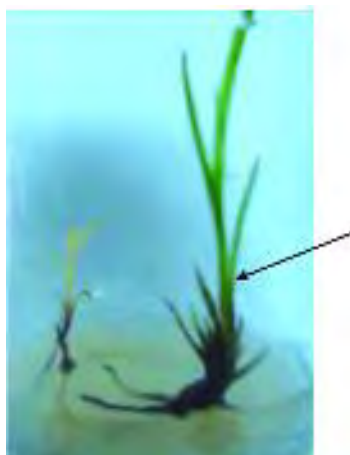


Рис. 3. Км-устойчивое (указано стрелкой) и неустойчивое R0-растение кукурузы

ПЦР-анализ с использованием праймеров к первому экзону и интрону целевого гена показал наличие дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы в суммарной ДНК листьев R0-растений инбредных линий J1250, J1544, J1552. Вместе с тем присутствие фрагментов целевого и селективного генов зафиксировано только в одном случае — у J1250 (рис. 4).

Была проанализирована случайная выборка из Км-устойчивых растений-регенерантов, которые в течение двух пассажей выдерживали селективную концентрацию

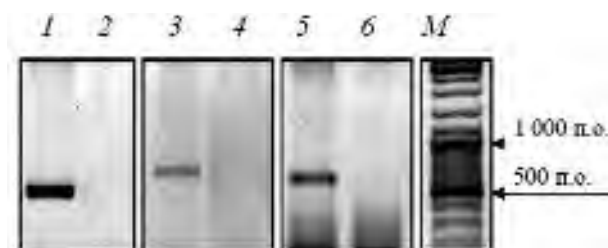


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредных линий кукурузы J1250, регенерант № 15 с использованием праймеров к ДНК векторной конструкции, несущей дцРНК-супрессор гена PDH и ген *nptII*:

1 — к фрагменту первого экзона гена PDH (545 п. о.);
3 — к фрагменту первого интрона гена PDH (700 п. о.);
5 — к фрагменту гена *nptII* (649 п. о.);
2, 4, 6 — ДНК контрольных (нетрансформированных) растений.
M — маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

антибиотика, превышающую в 2 раза его необходимую и достаточную концентрацию. В частности, количество R0-растений составляло: 4 (J1250), 3 (J1390), 3 (J1652), 2 (J1563), 2 (J1552), 1 (J1544). Кроме того, молекулярно-генетический анализ по гену *virC* штамма LBA4404 показал отсутствие агробактериальной примеси во всех проанализированных растениях-регенерантах (рис. 5). Перенос Т-ДНК в клетки и, вероятно, ее интеграция в геном кукурузы осуществлялись нами в отсутствие ацетосирингона, однако с использованием высокой концентрации тиосульфата натрия — одного из тиоловых компонентов, которые, как установлено Olhoft и др. [19], способны повышать частоту трансформации клеток. К тому же этот фактор, согласно нашим данным [20], может стимулировать и регенерацию побегов.

Компетентными к агробактериальной инфекции являются клетки апикальной меристемы кукурузы [9, 10, 13]. Впервые возможность трансформации этой культуры с использованием обезоруженного агробактериального штамма показана Gould J. и др. [9], где эксплантами были апексы побега зародыша или проростка размером около 1,0 x 0,3 мм, которые включали меристему и примордии с развивающимися листочками. С использованием апикальной меристемы размером 3–4 мм получены также трансформированные растения-регенеранты ряда гибридов кукурузы, реализация морфогенетического потенциала которых осуществлялась либо соматическим эмбриогенезом, либо прямым органогенезом в зависимости от питательных сред и условий культивирования

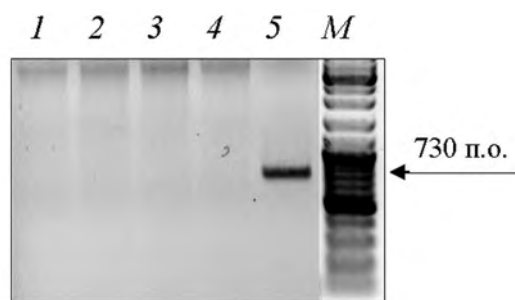


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК к гену *virC* инбредных линий кукурузы:

- 1 — Л250;
- 2 — Л1544;
- 3 — Л1552;
- 4 — негативный контроль (без ДНК);
- 5 — позитивный контроль — ДНК агробактериального штамма LBA4404;
- М — маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

[10]. Для индукции органогенеза эти авторы использовали МС-среду и 6-бензиламинопурин в комбинации с кинетином. Тем не менее для анализируемых нами генотипов регенерация побегов была редким событием, более эффективной оказалась частично модифицированная нами питательная среда В5 Гамборга. Позитивные результаты были получены при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации каллуса, индуцированного от сегментов продольно расщепленной на две части области побега 7–10-дневных проростков, содержащей узелковую зону и ткани, расположенные выше и ниже на 0,5 см [12]. Регенерация осуществлялась через непрямой органогенез, при этом авторы показали, что эмбриогенный каллус образовывался преимущественно от почек, расположенных в пазушной области колеоптиля, а не от апикальной меристемы. Вместе с тем инфицирование штаммом LBA4404 (pBI121 или pCB001) морфогенного каллуса, полученного нами от верхушки побегов (размером 2–3 мм) 7-суточных проростков, в частности инбредных линий Л250 и Л390, ингибировало индукцию побегообразования [21].

Основное внимание в настоящей работе было сконцентрировано на использовании в качестве экспланта для генетической трансформации не продольно, как предложено Sidorenko и др. [12], а поперечно расщепленной зоны побега 7–10-дневных проростков, выращенных на свету. В отличие от цитируемой работы, регенерация побегов происходила через прямой органогенез для всех тестируемых инбредных линий кукурузы в течение короткого периода времени, что снижает вероятность соматической

изменчивости инфицированных растений-регенерантов. Тот факт, что в ДНК Км-устойчивых растений показано наличие дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы, свидетельствует о компетентности клеток такого экспланта к инфекции используемым агробактериальным штаммом, несущим плазмиду pBi2E. Относительно низкая частота регистрируемых нами трансформационных событий может свидетельствовать о том, что не всегда индукция побегообразования через прямой органогенез происходит от единичных клеток, что приводит к химерности. В частности, это обсуждалось авторами работ [9, 12]. Кроме того, эффективность протоколов трансформации может зависеть от условий предобработки эксплантов, инокуляции, кокультивирования, селекции, использования промоторов генов однодольных в векторной конструкции. Варьируя компонентами сред и условий агробактериальной инфекции, мы предполагаем повысить частоту переноса и интеграции рекомбинантных молекул ДНК. Что касается селекции, целесообразным является ее проведение после индукции ризогенеза.

Таким образом, предложен способ индукции регенерации через прямой органогенез от поперечно расщепленных сегментов узелковой зоны побега для всех тестируемых генотипов и показана принципиальная возможность переноса двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы в клетки ряда генотипов элитных инбредных линий кукурузы.

ЛІТЕРАТУРА

1. Duncan D. R., Widholm J. M. Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine // *Plant Cell Rep.* — 1988. — V. 7, N 6. — P. 452–455.
2. 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. — V. 66, N 3–4. — P. 285–289.
3. Songstad D. D., Duncan D. R., Widholm J. M. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures // *Plant Cell Rep.* — 1988. — V. 7, N 4. — P. 262–265.
4. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. Protocol. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize // *Nature protocols.* — 2007. — V. 2, N 7. — P. 1614–1621.
5. Frame B., Main M., Schick R., Wang K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos / Thorpe T. A., Yeung E. C. (eds) *Plant Embryo Culture. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* — Springer Science-Business Media, 2011. — V. 710. — P. 327–341.
6. Frame B. R., Shou H., Chikwamba R. K. et al. *Agrobacterium-tumefaciens* — Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system // *Plant Physiol.* — 2002. — V. 129. — P. 13–22.
7. Данилова С. А., Долгих Ю. И. Условия, необходимые для эффективной агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens* эмбрионного каллуса кукурузы // *Физиол. раст.* — 2005. — Т. 25, № 4. — С. 600–608.
8. Fransz P. F., Schel J. H. N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus in maize (*Zea mays*) // *Can. J. Bot.* — 1991. — V. 69, N 1. — P. 26–33.
9. Gould J., Devey M., Hasegawa O. et al. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex // *Plant Physiol.* — 1991. — V. 95. — P. 426–434.
10. Sairam R. V., Parani M., Franklin G. et al. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // *Genome.* — 2003. — V. 46. — P. 323–329.
11. Sticklen M. B., Oraby H. F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops // *In Vitro Cell Dev. Biol. — Plant.* — 2005. — V. 41, N 3. — P. 187–200.
12. Sidorov V., Gillertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus // *Plant Cell Rep.* — 2006. — V. 25. — P. 320–328.
13. Zhong H., Sun B., Warkentin D. et al. The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes // *Plant Physiol.* — 1996. — V. 110. — P. 1097–1107.
14. Shou H., Frame B. R., Whitham S. A., Wang K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation // *Mol. Breed.* — 2004. — V. 13, N 2. — P. 201–208.
15. Murashighe T., Skoog F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
16. Gamborg J. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots // *Exp. Cell Res.* — 1968. — V. 50. — P. 151–158.
17. Sawada H., Ieki H., Matsuda I. PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — V. 61, N 2. — P. 828–831.
18. Струнин Д. Е., Сергеева Л. Е., Тищенко Е. Н. Регенерация растений путём прямого органогенеза из сегментов проростков элитных инбредных линий кукурузы // *Физиол. биохим. культ. раст.* — 2008. — Т. 40, № 2. — С. 164–170.
19. Olhoft P. M., Lin K., Galbraith J. et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells // *Plant Cell Rep.* — 2001. — V. 20. — P. 731–737.
20. Комисаренко А. Г., Михальская С. И., Малина А. Э. и др. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // *Физиол. биохим. культ. раст.* — 2009. — Т. 41, № 3. — С. 255–261.
21. Струнин Д. Е., Абраимова О. Е., Перри Л., Тищенко Е. Н. Компетентность к агробактериальной трансформации каллусных культур инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) // *Вісн. Укр. т-ва генет. селекц.* — 2008. — Т. 6, № 1. — С. 150–156.

**КОМПЕТЕНТНІСТЬ ДО
AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ
ТРАНСФОРМАЦІЇ СЕГМЕНТІВ ПАГОНІВ
ЕЛІТНИХ ГЕНОТИПІВ ІНБРЕДНИХ
ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ**

*С. І. Михальська¹
Н. І. Адаменко¹
Б. В. Моргун²
О. В. Кочетов³
О. М. Тищенко¹*

¹Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ

²Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України, Київ

³Інститут цитології і генетики Сибірського
відділення РАН, Новосибірськ
E-mail: oltyko@gmail.com

Agrobacterium-опосередкована трансформація є важливим експериментальним інструментом для розробки молекулярних біотехнологій. Однак генетичне поліпшення більшості комерційних ліній кукурудзи обмежено відсутністю ефективних систем методів регенерації й трансформації. Аналізували перспективність використання поперечно розрізаних сегментів (1–2 мм) вузлової області пагонів 7–10-денних проростків як експлантів для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації елітних генотипів кукурудзи (*Zea mays* L.) Л250, Л390, Л1544, Л1552, Л1563, Л1652, використовуючи штаб *LB*A4404, який містить бінарний вектор pBi2E з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази та селективним геном неоміцинфосфотрансферази. Регенерація трансформованих пагонів шляхом прямого органогенезу відбувалася незалежно від генотипу на 10–14-й день культивування, потім через деякий час спостерігалася індукція ризогенезу. Виявлено, що інтродукція у клітини та інтеграція Т-ДНК у геном кукурудзи може здійснюватися з використанням тіосульфату натрію без ацетосирингону. Отримані дані свідчать про перспективність використання вузлової області пагонів для розроблення методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації елітних ліній кукурудзи.

Ключові слова: кукурудза, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, тіосульфат натрію, прямий органогенез, сегмент пагона, супресор гена проліндегідрогенази.

**COMPETANCE TO
AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANS-
FORMATION OF SHOOT NODAL SECTION
SEGMENTS OF CORN ELITE INBREAD
LINES**

*S. I. Mykhalska¹
N. I. Adamenko¹
B. V. Morgun²
A. V. Kochetov³
O. M. Tishchenko¹*

¹Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

²Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy of Sciences of
Ukraine, Kyiv

³Institute of Cytology and Genetics of
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk
E-mail: oltyko@gmail.com

Agrobacterium-mediated transformation is an important experimental tool for the development of molecular biotechnologies. But the genetic improvement of majority commercial maize lines is limited by lack of the effective system methods of regeneration and transformation. Possibility of using of the segments (1–2 mm) of cross section nodal area of 7–10 days old shoots as explant for *Agrobacterium*-mediated transformation of elite corn inbred line L250, L390, L1544, L1552, L1563, L1652 using strain of *LB*A4404 harboring binary vector pBi2E with ds-RNA suppressor for proline dehydrogenase with selective gene neomycinphosphotransferase II was analyzed. Regeneration of shoots transformed by through direct organogenesis was established independent from genotype after 10–14 days and shortly afterwards rooting introduction were observed. It was shown that introduction into cells and corn genome integration of T-DNA could be used with sodium thiosulfate without acetosyringone. Data received showed viability of nodal cross section using to develop the method of *Agrobacterium*-mediated transformation of elite corn inbred line are shown.

Key words: *Zea mays* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, direct organogenesis, cross section nodal area, thiosulfate Na.