

УДК 604.6:633.15

## AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КУКУРУДЗИ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

І.О. НІТОВСЬКА<sup>1</sup>, Т.М. САТАРОВА<sup>2</sup>, О.Є. АБРАІМОВА<sup>2</sup>,  
Д.Ю. ПАЛЕХА<sup>1</sup>, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ<sup>1</sup>, Б.В. МОРГУН<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Академіка Заболотного, 148, 03143, Київ, Україна

<sup>2</sup> Державна установа Інститут зернових культур НААН України, вул. Володимира Вернадського, 14, 49600, Дніпро, Україна

<sup>3</sup> Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17, Київ, 03022, Україна

E-mail: iranit@ukr.net, molgen@icbge.org.ua, satarova2008@ukr.net,

Автор для кореспонденції – І.О. Нітовська, e-mail: iranit@ukr.net

З огляду на те, що Україна є потужним експортером кукурудзи в світі, скринінг піддатливих до генетичної трансформації генотипів, що культивуються на її теренах, та створення ефективною технології трансформації української кукурудзи є актуальним. Прекультивовані незрілі зародки кукурудзи дев'яти генотипів (інбредні лінії та гібриди) піддавали *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації. У роботі використовували три штами *A. tumefaciens* та три векторні конструкції, які містили селективний маркерний ген неоміцинофосфотрансферази II, а також репортерні гени зеленого флуоресціюючого протеїну або  $\beta$ -глюкуронідази. Трансгенні рослини відбирали на живильних середовищах із пароміцином. На селективних середовищах для шести генотипів спостерігали регенерацію пагонів після трансформації. Методом ПЛР виявлено присутність трансгенів у 43 клонах, отриманих від чотирьох генотипів із використанням усіх наявних векторів. Частота трансформації варіювала від 0 до 27 % в окремих експериментах. Знайдено сильну кореляцію між частотами регенерації та трансформації. Виявлено значущу різницю у частоті регенерації та трансформації між генотипами та рослинами одного генотипу, які були донорами експлантів. Використання вектору pCB271, який містив нуклеотидні послідовності регуляції експресії генів однодольних перед селективним маркерним геном, а саме інтрон гена *hsp70* кукурудзи, достовірно збільшувало частоту регенерації пагонів після трансформації. Аналіз рослин покоління  $T_1$  виявив однокусне вбудовування трансгенів у рослинний геном. Запропонований протокол генетичної трансформації з ви-

користанням пароміцину як селективного агенту є ефективним для отримання трансгенної кукурудзи ліній та гібридів української селекції. Відібрано три генотипи (лінія ДК232 та гібриди КП7×ПРЖ5 і КС277×RS15) як найбільш сприйнятливі до *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації і перспективні для подальших досліджень з отримання трансгенних рослин кукурудзи.

**Ключові слова:** *Zea mays* L., *nptII*, *S65Tpgfp*, *uidA*, пароміцин, трансгенна кукурудза, покоління  $T_1$ .

**Вступ.** Кукурудза (*Zea mays* L.) займає перше місце у світовому виробництві злакових культур серед будь-яких інших (USDA, 2024). За порівняння з пшеницею та рисом кукурудза, з точки зору її застосування, є найбільш різномановою злаковою культурою. З продовольчою метою використовується близько 12 % світової кукурудзи, ще 60 % йде на корми для тваринництва та птахівництва, і майже третину кукурудзи використовують на так звані технічні цілі, в тому числі для виробництва біопалива. Україна в останні роки, до повномасштабного вторгнення РФ у 2022 р., займала четверте місце в світі серед країн-експортерів кукурудзи, поступаючись США, Бразилії та Аргентині. Щорічно 75–85 % української кукурудзи реалізовувалось на зовнішніх ринках. Тому, кукурудза, як експортно орієнтована культура, є стратегічно важливою для розвитку агровиробництва в Україні та служить запорукою енергетичної незалежності країни, адже дає змогу виготовляти газ, паливо й якісні корми.

Світове виробництво кукурудзи зростає з кожним роком за рахунок збільшення посівних площ та/або врожайності. Застосування сучасних біотехнологій є потужним інструментом покращення існуючих генотипів для збільшення їхньої економічної привабливості під час вирощування (ISAAA, 2019). У США, які є світовим лідером із врожайності, 92 % посівних площ кукурудзи засіяно генно-модифікованим (ГМ) насінням. В Україні лише 3–5 % посівів кукурудзи є генно-модифіковані (Fedorenko et al, 2012; <https://latifundist.com/analitics/27-svtovij-rinok-kukurudzi-2021--ukransk-realvd-globalnogo-do-lokalnogo>). З одного боку Україна зайняла свою нішу збуту кукурудзи – це ті ринки, які надають перевагу кукурудзі без генетичних модифікацій, з іншого боку, вирощувати ГМ-кукурудзу краще з точки зору витрат, прогнозування врожайності та планування збільшення виробництва. Тому, розробка технологій створення трансгенної кукурудзи української селекції актуальна і на часі.

На сьогодні для створення трансгенної кукурудзи в основному застосовують біолістичний (Klein et al, 1988; O’Kennedy et al, 2011) та *Agrobacterium*-опосередкований методи генетичної трансформації (Grimsley et al, 1987; Ishida et al, 1996; Sidorov et al, 2009). Використання *Agrobacterium tumefaciens* для трансформації рослин має певні переваги, порівняно з біолістичною трансформацією. Головною перевагою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації є те, що маленька кількість копій відносно великого фрагмента Т-ДНК із визначеними кінцями інтегрує у рослинний геном із мінімальними перебудовами (Ishida et al, 2007; Kausch et al, 2021a). Не зважаючи на те, що однодольні рослини не являються природними господарями *A. tumefaciens*, ця бактерія, завдяки створенню ефективних протоколів, активно використовується для генетичної трансформації злакових, в тому числі кукурудзи. Проте, створення ГМ-кукурудзи сильно залежить від генотипу й ускладнюється через слабку сприйнятливості до трансформації (Masters et al, 2020; Yassitepe et al, 2021).

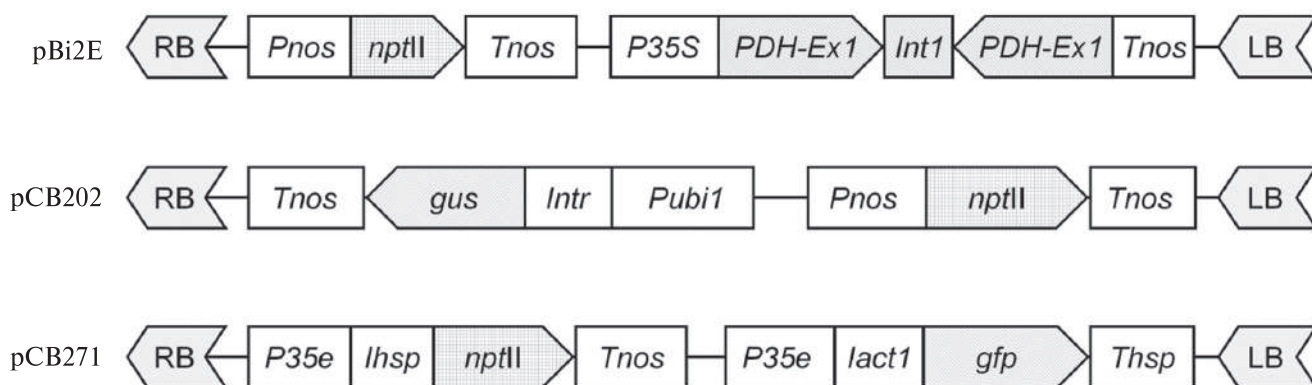
Одним із шляхів підвищення ефективності трансформації однодольних рослин є створення адаптованих векторних конструкцій із спеціальними промоторами та регуляторними еле-

ментами, спрямованими на посилення експресії трансгенів (Lu et al, 2015; Kausch et al, 2021b). Для того, щоб дослідити вплив регуляторних нуклеотидних послідовностей на експресію гена, використовують репортерні гени, які полегшують візуалізацію протеїну, що кодує репортерний ген, та/або його кількісне вимірювання. Найчастіше в дослідженнях використовують такі репортерні гени як ген зеленого флуоресціюючого протеїну медузи (*gfp*) та β-глюкуронідази (*uidA*) (Anami et al, 2013; Gerasymenko et al, 2017; Varchenko et al, 2020).

Метою роботи було провести скринінг генотипів кукурудзи української селекції на придатність до *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації й отримати трансгенні рослини. У дослідженні використовували культуру прекультивованих незрілих зародків; вектори, які містили селективний маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), репортерні гени (*gfp*, *uidA*) та різнились у наявності регуляторних нуклеотидних послідовностей однодольних; паромоміцинову селекцію трансгенних рослин.

**Матеріали і методи.** *Плазмиди та бактеріальні штами.* Для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи використовували бінарні вектори: pCB202, pCB271 (банк плазмід Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (ІКБГІ НАН України)) та pBi2E, які знаходились у різних штаммах *A. tumefaciens*. Вектори pCB202 та pCB271 були у бактеріальних нопалінових штаммах GV3101 та C58 (Koncz et al, 1986) відповідно, а плазміда pBi2E знаходилася в октопіновому штамі LBA4404. Всі вектори, які використовували в дослідженні, містили у своєму складі селективний маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), який інактивує аміноглікозидні антибіотики, такі як канаміцин, неоміцин, G-418, гентаміцин, паромоміцин тощо. Плазміда pCB202 мала ген *nptII* під контролем промотору нопалін синтази та ген β-глюкуронідази (*uidA*) під контролем промотору і першого інтрону гена убіквітину 1 кукурудзи 1 (рис. 1).

Вектор pCB271 у ділянці Т-ДНК містив маркерний селективний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) та репортерний мутантний синтетичний ген зеленого флуоресціюючого протеїну (*S65Tpgfp*), обидва під контролем



**Рис. 1.** Схема Т-ДНК ділянок плазмід pBi2E, pCB202 і pCB271: RB, LB – границі Т-ДНК; Pnos – промотор гена нопалін синтази; nptII – ген неоміцинфосфотрансферази II; Tnos – термінатор гена нопалін синтази; P35S – промотор гена 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти; PDH-Ex1 та Int1 – фрагменти першого екзону й інтрону гена проліндегідрогенази *Arabidopsis thaliana* відповідно; gus – ген β-глюкуронідази uidA; Intr – інтрон 1 гена убіквітину 1 кукурудзи, Pubi1 – промотор гена убіквітину 1 кукурудзи; P35e – посилений промотор гена 35S РНК вірусу мозаїки цвітної капусти; lhsp – інтрон кукурудзяного гена hsp70; lact1 – інтрон 1 гена актину 1 рису; gfp – ген S65Tpgfp зеленого флуоресціюючого протеїну; Thsp – термінатор гена hsp пшениці

посиленого промотору вірусу мозаїки цвітної капусти e35S. Між промоторною та кодуючою частинами генів вектор мав регуляторні нуклеотидні послідовності однодольних для покращення експресії трансгенів, а саме інтрон кукурудзяного гена hsp70 перед геном nptII та інтрон 1 рисового гена актину 1 (*OsAct1*) перед *S65Tpgfp* (рис. 1) (Nitovska et al, 2018). Конструкція pBi2E містила ген nptII під контролем промотору нопалін синтази й антисенсовий супресор гена проліндегідрогенази (*PDH*) *Arabidopsis thaliana* під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (рис. 1) (Tyshchenko et al, 2014). Антисенсова РНК супресія транскрипту гена *PDH* призводить до зниження синтезу і, відповідно, активності ферменту проліндегідрогенази і, як наслідок, збільшення вмісту вільного L-проліну, що може приводити до підвищення стресостійкості рослин.

При виборі векторів для трансформації звертали увагу на наявність нуклеотидних послідовностей регуляції експресії генів однодольних, щоб оцінити їх вплив на генетичну трансформацію. Вектор pBi2E взагалі не містив нуклеотидних послідовностей однодольних та був обраний як контрольний, що показав свою ефективність для отримання трансгенної кукурудзи (Mykhalska et al, 2012); век-

тор pCB202 містив промотор та перший інтрон гена убіквітину кукурудзи лише перед репортерним геном; вектор pCB271 містив нуклеотидні послідовності однодольних між промоторною та кодуючою частиною обох генів (маркерного селективного та репортерного) та термінатор гена hsp пшениці після кодуючої частини репортерного гена.

Нарощування *A. tumefaciens* для трансформації здійснювали за протоколом (Sidorov et al, 2009) з покроковим використанням живильного (LB) та індукційного середовищ із додаванням антибіотиків під час вирощування відповідно до штаму бактерії з плазмідною: штам GV3101 з вектором pCB202 – 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину, 100 мг/л карбеніциліну; для бактерій з вектором pCB271 – 100 мг/л канаміцину і 100 мг/л стрептоміцину; та 50 мг/л рифампіцину і 100 мг/л канаміцину вирощуючи бактерії штаму LBA4404. Перед трансформацією бактеріальну суспензію осаджували центрифугуванням та ресуспендували в інокуляційному середовищі до оптичної густини ( $OD_{600}$ ) 0,3–0,4 одиниці.

**Рослинний матеріал.** У дослідженні були задіяні 9 генотипів кукурудзи української селекції, серед них 5 інбредних ліній (ДК232, КП7, ПРЖ5, КС277, RS15) та 4 гібриди F<sub>1</sub> (ДК959×ДК232, КП7×ПРЖ5, КС277×RS15,



RS15×KC277). Вирощування донорних рослин кукурудзи, ізоляцію волотей і качанів та контрольоване штучне запилення донорних рослин проводили на ділянках ДУ Інститут зернових культур НААН України (ІЗК НААН) (Дніпро). В експериментах *in vitro* використовували зародки, отримані від 25 донорних рослин. Для експлантації ізолювали незрілі зародки довжиною 1,0–1,5 мм у віці 11–14 діб після запилення (DAP, days after pollination). Поверхневу стерилізацію качанів, виокремлення та культивування *in vitro* незрілих зародків на живильному середовищі для індукції калюсогенезу здійснювали як було описано (Nitovska et al, 2019). Через 7–12 діб прекультивовані незрілі зародки з утвореними на експлантах калюсами піддавали *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації. Отримані після процедури трансформації рослини-регенеранти позначали як  $T_0$ , зазначаючи в назві також найменування використаних векторів. Рослини  $T_1$  отримували від схрещування рослин  $T_0$  однакового або різних донорних генотипів. Для аналізу успадкування трансгенів рослини покоління  $T_1$  були поділені на три групи залежно від генотипу донорних рослин і використаних векторів. До групи 1 були віднесені рослини покоління  $T_1$  з генотипом  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5))$ , отримані в результаті схрещування двох рослин-регенерантів  $T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5)$ . До групи 2 були віднесені рослини покоління  $T_1$  з генотипом  $T_1(T_{0pCB202}(DK232) \times T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5))$ , тобто, отримані в результаті схрещування регенерантів  $T_0$  генотипів  $T_{0pCB202}(DK232)$  і  $T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5)$ . До групи 3 увійшли рослини покоління  $T_1$  з генотипом  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pBi2E}(KP7 \times PRJ5))$ , тобто, отримані в результаті схрещування регенерантів  $T_0$  того самого донорного генотипу, але після генетичної трансформації різними векторами.

Насіння з рослин, отриманих після процедури трансформації, висаджували в горщики з ґрунтом та вирощували в теплиці за 12-годинного фотоперіоду і температури повітря 25 °С.

**Генетична трансформація та селекція трансгенних рослин.** *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію морфогенного калюсу кукурудзи виконували за методикою (Sidorov et al, 2009), проводили від 1 до 9 окремих експериментів для

кожного генотипу і від 6 до 13 окремих експериментів з кожним вектором (таблиця S1, <https://cytgen.com/articles/5920003s.pdf>). Після двох діб співкультивування з бактерією калюси переносили на бактеріостатичне середовище (середовище для калюсогенезу з додаванням 500 мг/л цефотаксиму) для інгібування росту бактерій і культивували у темряві за 27 °С впродовж 4 діб. Потім калюси пересаджували на бактеріостатичне селективне середовище з додаванням 50 мг/л паромоміцину, культивували два тижні за тих самих умов і переносили для культивування впродовж ще двох тижнів на бактеріостатичне селективне середовище, яке містило 100 мг/л паромоміцину. Калюси, які активно наростали, переносили на селективне регенераційне середовище (модифіковане MSGR (Sidorov et al, 2009), яке містило вітаміни Мореля (Morel et al, 1951), 0,25 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), 500 мг/л цефотаксиму і 50 мг/л паромоміцину) та культивували у режимі освітлення з фотоперіодом 16 год за температури 24 °С. Через три тижні калюси переносили на селективне регенераційне середовище, яке містило 100 мг/л паромоміцину, та вирощували за означених умов освітлення, субкультивуючи на свіже середовище кожні три тижні. Культивування калюсів здійснювали, поки відбувалась регенерація пагонів, або впродовж 9 тижнів, якщо регенерацію пагонів не спостерігали. Розраховували частоту регенерації з калюсів на селективних середовищах після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (ЧРПТ) у відсотках як співвідношення експлантів, що утворили регенеранти, до загальної кількості експлантів, підданих трансформації, а також ефективність регенерації після трансформації (ЕРПТ) як максимальне число пагонів з регенеруючого калюсу, отриманого від одного окремого експланту. Рослини-регенеранти відокремлювали від калюсу та висаджували в банки із селективним середовищем MS (Murashige et al, 1962) без регуляторів росту, яке містило 500 мг/л цефотаксиму та 50 мг/л паромоміцину. Укорінені регенеранти переносили в горщики з ґрунтом та вирощували в теплиці за 12-годинного фотоперіоду та температури повітря 25 °С.

**Виділення рослинної ДНК та її аналіз методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).** Виділен-

ня сумарної рослинної ДНК з листків кукурудзи, її аналіз методом ПЛР на присутність трансгенів *nptII*, *S65Tpgfp* і бактеріального гена *vir-D1* та візуалізацію продуктів ампліфікації проводили як описано раніше (Nitovska et al, 2018). Аналіз на наявність гена *nptII* в ДНК регенерантів кукурудзи покоління  $T_0$  проводили з використанням наступної пари праймерів: 5'-CCTGA ATGAA CTCCA GGACG AGGCA-3' (F) і 5'-GCTCT AGATC CAGAG TCCCG CTCAG AAG-3' (R) (Mykhalska et al, 2012). Розмір продукту ампліфікації послідовності для *nptII* складав 649 п.н. Програма для ПЛР була задана наступним чином: перший цикл за 94 °C впродовж 4 хв з наступними 34 циклами (денатурація за 94 °C 30 с, ренатурація за 64 °C 30 с, елонгація за 72 °C 40 с). Кінцева елонгація тривала 5 хв за 72 °C з наступним охолодженням до 22 °C. Для виявлення першого екзону гена *PDH* використовували наступну пару праймерів: 5'-AACAA ACTGG ATCCG CTTAC-3' (F) і 5'-ATTAA GCTTT CGAAC CAAAC AAGT-3' (R) (Mykhalska et al, 2012). Розмір амплікону – 700 п.н. Програма для ПЛР фрагменту екзону *PDH-ex1* була така, як для послідовності *nptII*, окрім температури ренатурації, яка складала 54 °C. У ролі позитивного контролю використовували загальну ДНК рослини тютюну, трансформовану вектором pCB271, ДНК бактерії штаму GV3101, або ДНК *Arabidopsis thaliana* чи плазмиди pBi2E в залежності від реакції.

Виходячи з результатів аналізу методом ПЛР вираховували частоту виявлення трансгена (ЧВТ) як відсоткове співвідношення кількості зразків, які містили трансгени, до загальної кількості проаналізованих зразків. Частоту трансформації (ЧТ) визначали у відсотках як співвідношення експлантів, що утворили трансгенні рослини, до загальної кількості експлантів, підданих процедурі трансформації. Клоном позначали регенеранти, які утворились від одного експланту.

**Активність  $\beta$ -глюкуронідази.** Гістохімічний аналіз активності  $\beta$ -глюкуронідази у рослинному матеріалі проводили за методикою (Jefferson, 1987).

**Статистичний аналіз.** Статистичний аналіз результатів проводили за стандартними методиками (McDonald, 2014; Ewens et al, 2023).

Для оцінки нормального розподілу даних застосовували критерій Шапіро-Вілکا. Тест Левеня використовували для перевірки гомоскедастичності вибірок. Основні показники, такі як ЧПРТ, ЧТ, чутливість регенерантів до антибіотику та адаптація в ґрунті порівнювали за генотипами та векторами, використовуючи формули для якісної мінливості:

$$m = \sqrt{p \times (100-p)/n},$$

де  $p$  – значення показника в %;  $n$  – розмір вибірки.

Результати представляли з довірчим інтервалом за рівня значущості 0,05 –  $mt_{0,05}$ , де  $m$  – стандартна похибка середнього;  $t_{0,05}$  – критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05. Достовірність різниць між варіантами дослідів оцінювали за порівняння довірчих інтервалів середніх значень.

Коефіцієнт парної кореляції між даними визначали за Пірсоном. Для перевірки гіпотези про розподіл трансгенів використовували критерій узгодженості Пірсона (критерій  $\chi^2$ ). Результати вважали статистично істотними за рівня значущості 0,05.

**Результати.** В проведених дослідях *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації загалом було піддано 1765 незрілих прекультивованих зародків кукурудзи. Кількість опрацьованих зародків з калусами різнилась між генотипами в залежності від наявного матеріалу: від 73 для гібрида ДК959×ДК232 до 607 зародків лінії ДК232 (табл. 1). Серед опрацьованих генотипів 29,0 % експлантів належали до лінії ДК232, 16,1 % – відносились до гібрида КП7×ПРЖ5, по 12,9 % експлантів були від гібридів КС277×РС15 та РС15×КС277, по 6,5 % експлантів у досліді займали лінії КП7, КС277, РС15 та гібрид ДК959×ДК232, 3,2 % незрілих зародків належали до лінії ПРЖ5. Загалом 41,9 % експлантів піддавали трансформації вектором pBi2E, 38,7 % – вектором pCB271, 19,4 % експлантів трансформували вектором pCB202.

Частота регенерації після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (ЧРПТ) у досліджених генотипів коливалася від 0 до 18,1 %. Регенерацію рослин спостерігали у шести з дев'яти генотипів: ДК232, КП7, КП7×ПРЖ5, КС277×РС15, РС15×КС277 і ДК959×ДК232 (табл. 1), причому, за ЧРПТ всі гібриди дос-

товірно перевершували лінії, окрім ДК232. Лінія ДК232 мала високе значення даного показника (17,9 %), чим помітно відрізнялась від інших досліджених ліній. За векторами, які використовували, ЧРПТ коливалася в межах 7,1–17,5 %. При використанні вектору рСВ271, частота регенерації рослин після трансформації була значущо більшою порівняно з двома іншими векторами. Ефективність регенерації після трансформації (ЕРПТ) знаходилася в межах від 1 (КП7, ДК959×ДК232) до 6 (КП7×ПРЖ5) пагонів з одного калюсу (експланту) (таблиця S1, <https://cytgen.com/articles/5920003s.pdf>).

Спостерігали суттєву різницю у ЧРПТ між донорними рослинами одного генотипу (табл. 2). Так, наприклад, зародки, отримані від донорної рослини № 2 лінії ДК232, мали значущо

більшу частоту регенерації після трансформації різними векторами порівняно із зародками від інших донорних рослин цієї лінії. Цю особливість ми фіксували не тільки для лінії ДК232, а й для гібридів КП7×ПРЖ5 та RS15×КС277.

Перші регенеранти висаджували в банки із селективним середовищем MS вже через 5 тижнів після трансформації (рис. 2, а–в). Пік регенерації, з урахуванням кількості висаджених рослин в банки, спостерігали на 7-й тиждень (рис. 2, д). Найбільше регенерантів було отримано для генотипів ДК232 та КП7×ПРЖ5 після трансформації вектором рСВ271 (таблиця S1 <https://cytgen.com/articles/5920003s.pdf>). У банки із селективним середовищем загалом було висаджено 201 рослину-регенерант. Значна частина їх виявлялась чутливою до селек-

Таблиця 1. Результати *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації кукурудзи залежно від генотипу донорної рослини і вектора, які використовували для трансформації

| Генотип донорної рослини/тип вектора          | Загальна кількість експлантів, підданих трансформації, шт | Показники трансформації |                           |                         | Властивості регенерантів, отриманих після процедури трансформації |                           |                    |                          |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------|
|                                               |                                                           |                         |                           |                         | Чутливість до паромоміцину                                        |                           | Адаптація у ґрунті |                          |
|                                               |                                                           | n <sub>1</sub>          | ЧРПТ, %                   | ЧТ, %                   | n <sub>2</sub>                                                    | %                         | n <sub>3</sub>     | %                        |
| За генотипами донорних рослин                 |                                                           |                         |                           |                         |                                                                   |                           |                    |                          |
| КП7                                           | 180                                                       | 90                      | 1,1 ± 2,2 <sup>ac</sup>   | 0 <sup>a</sup>          | —                                                                 | —                         | —                  | —                        |
| ПРЖ5                                          | 80                                                        | 40                      | 0 <sup>a</sup>            | 0 <sup>a</sup>          | —                                                                 | —                         | —                  | —                        |
| КП7×ПРЖ5                                      | 277                                                       | 138                     | 18,1 ± 6,5 <sup>b</sup>   | 6,5 ± 4,1 <sup>b</sup>  | 64                                                                | 75,0 ± 10,6 <sup>ab</sup> | 7                  | 42,9 ± 44,9 <sup>a</sup> |
| КС277                                         | 100                                                       | 50                      | 0 <sup>a</sup>            | 0 <sup>a</sup>          | —                                                                 | —                         | —                  | —                        |
| RS15                                          | 100                                                       | 50                      | 0 <sup>a</sup>            | 0 <sup>a</sup>          | —                                                                 | —                         | —                  | —                        |
| КС277×RS15                                    | 149                                                       | 74                      | 16,2 ± 8,4 <sup>b</sup>   | 8,1 ± 6,3 <sup>b</sup>  | 18                                                                | 44,4 ± 24,5 <sup>a</sup>  | 8                  | 37,5 ± 41,1 <sup>a</sup> |
| RS15×КС277                                    | 199                                                       | 76                      | 7,9 ± 6,1 <sup>bc</sup>   | 3,9 ± 4,3 <sup>ab</sup> | 11                                                                | 54,5 ± 33,0 <sup>ab</sup> | 4                  | 25,0 ± 69,4 <sup>a</sup> |
| ДК232                                         | 607                                                       | 302                     | 17,9 ± 4,3 <sup>b</sup>   | 8,3 ± 3,1 <sup>b</sup>  | 104                                                               | 76,9 ± 8,0 <sup>b</sup>   | 22                 | 31,8 ± 19,4 <sup>b</sup> |
| ДК959×ДК232                                   | 73                                                        | 27                      | 14,8 ± 13,6 <sup>bc</sup> | —                       | 4                                                                 | 25,0 ± 69,4 <sup>a</sup>  | 2                  | 0 <sup>a</sup>           |
| За типом вектора для генетичної трансформації |                                                           |                         |                           |                         |                                                                   |                           |                    |                          |
| pCB271                                        | 732                                                       | 343                     | 17,5 ± 4,1 <sup>a</sup>   | 7,3 ± 2,7 <sup>a</sup>  | 125                                                               | 69,8 ± 8,0 <sup>a</sup>   | 29                 | 31,0 ± 16,8 <sup>a</sup> |
| pCB202                                        | 333                                                       | 156                     | 7,1 ± 4,1 <sup>b</sup>    | 3,8 ± 2,9 <sup>a</sup>  | 19                                                                | 52,6 ± 24,1 <sup>a</sup>  | 7                  | 57,1 ± 44,8 <sup>a</sup> |
| pBi2E                                         | 700                                                       | 348                     | 8,9 ± 2,9 <sup>b</sup>    | 3,4 ± 2,0 <sup>a</sup>  | 57                                                                | 80,7 ± 10,2 <sup>a</sup>  | 7                  | 14,3 ± 31,7 <sup>a</sup> |

*Примітка.* ЧРПТ — частота регенерації з калюсів на селективних середовищах після трансформації; ЧТ — частота трансформації; n<sub>1</sub> — досліджено експлантів після процедури трансформації, шт; n<sub>2</sub> — кількість регенерантів, отриманих після процедури трансформації та висаджених у банки із селективним середовищем, шт; n<sub>3</sub> — кількість регенерантів, отриманих після процедури трансформації, які були висаджені в ґрунт, шт. Середні значення показників наведені із довірчими інтервалами за рівня значущості 0,05. Значення того самого показника з однаковою літерою під час порівняння окремо за генотипами й окремо за векторами недостовірно розрізняються на рівні значущості 0,05.

Таблиця 2. Різниця у частоті регенерації після трансформації (ЧРПТ) та частоті трансформації (ЧТ) між рослинами одного генотипу, які були донорами експлантів

| Генотип    | Донорна рослина, № | DAP | DIC | N   | n   | ЧРПТ, %                  | ЧТ, %                    |
|------------|--------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|--------------------------|
| ДК232      | 1                  | 11  | 12  | 110 | 54  | 7,4 ± 7,1 <sup>a</sup>   | 1,9 ± 3,7 <sup>a</sup>   |
|            | 2                  | 11  | 12  | 160 | 80  | 51,3 ± 11,2 <sup>b</sup> | 23,8 ± 9,5 <sup>b</sup>  |
|            | 22                 | 10  | 8   | 37  | 18  | 16,7 ± 18,4 <sup>a</sup> | 11,1 ± 15,5 <sup>a</sup> |
|            | 25                 | 11  | 7   | 300 | 150 | 4,0 ± 3,1 <sup>a</sup>   | 2,0 ± 2,2 <sup>a</sup>   |
| КП7×ПРЖ5   | 8                  | 10  | 11  | 177 | 88  | 2,3 ± 3,2 <sup>a</sup>   | 1,1 ± 2,2 <sup>a</sup>   |
|            | 13                 | 11  | 10  | 100 | 50  | 46,0 ± 14,2 <sup>b</sup> | 16,0 ± 10,4 <sup>b</sup> |
| КС277×RS15 | 9                  | 11  | 10  | 39  | 19  | 5,3 ± 10,7 <sup>a</sup>  | 0 <sup>a</sup>           |
|            | 18                 | 11  | 9   | 110 | 55  | 20,0 ± 10,8 <sup>a</sup> | 10,9 ± 8,4 <sup>b</sup>  |
| RS15×КС277 | 16                 | 12  | 9   | 33  | 16  | 0 <sup>a</sup>           | 0 <sup>a</sup>           |
|            | 17                 | 12  | 9   | 166 | 60  | 10,0 ± 7,7 <sup>b</sup>  | 5,0 ± 5,6 <sup>a</sup>   |

Примітка. DAP (days after pollination) – кількість днів після запилення на момент ізоляції зародків; DIC (days in culture) – кількість днів прекультивування експлантів; N – загальна кількість експлантів, підданих трансформації, шт; n – кількість досліджених експлантів після процедури трансформації, шт. Середні значення показників наведені із довірчими інтервалами за рівня значущості 0,05. Значення того самого показника з однаковою літерою під час порівняння за генотипами недостовірно розрізняються на рівні значущості 0,05.

тивного агенту під час подальшого культивування (рис. 2, з). Частка рослин-регенерантів, які виявляли чутливість (знебарвлення листків, їх засихання та відмирання) до антибіотику паромоміцину та не укорінювались під час культивування на селективному середовищі, складала в окремих експериментах від 25 (ДК959×ДК232) до 100 % (КП7, ДК232, КП7×ПРЖ5, КС277×RS15) (таблиця S1, <https://cytgen.com/articles/5920003s.pdf>). Загалом, найменша частка регенерантів, які виявили чутливість до антибіотику під час подальшого культивування *in vitro*, була серед гібридів ДК959×ДК232 та КС277×RS15 (табл. 1). За обрахування частки регенерантів, чутливих до селективного агенту, в залежності від векторів, які використовували в дослідженні, достовірних різниць не встановлено, але відмічено тенденцію до підвищення чутливості до паромоміцину рослин-регенерантів, отриманих після трансформації вектором pBi2E (табл. 1).

За результатами аналізу рослинної ДНК методом ПЛР усі рослини-регенеранти, які укорі-

нювались і росли на селективному середовищі, містили трансгени (таблиця S1, <https://cytgen.com/articles/5920003s.pdf>). Показана наявність гена *nptII* для регенерантів різних генотипів кукурудзи, отриманих за допомогою всіх трьох векторних конструкцій (рис. 3, а), гена *S65Tpgfp* у регенерантів, отриманих після трансформації вектором pCB271 (рис. 3, б), екзону *PDH-ex1* у рослин, одержаних після трансформації вектором pBi2E (рис. 3, в) та відсутність забруднення рослинного матеріалу ДНК *A. tumefaciens* (рис. 3, д). Трансгени були виявлені у 48 регенерантів кукурудзи чотирьох генотипів: ДК232 (30 шт), КП7×ПРЖ5 (9 шт), КС277×RS15 (6 шт) і RS15×КС277 (3 шт). Для трьох генотипів кукурудзи (ДК232, КС277×RS15 та RS15×КС277) були отримані трансгенні рослини з використанням усіх трьох векторів.

Частота трансформації (ЧТ) коливалася серед досліджених генотипів від 0 до 8,3 %, а серед досліджених векторів – від 3,4 до 7,3 % (табл. 1). Гібриди КП7×ПРЖ5, КС277×RS15 та лінія ДК232 достовірно перевищували за да-



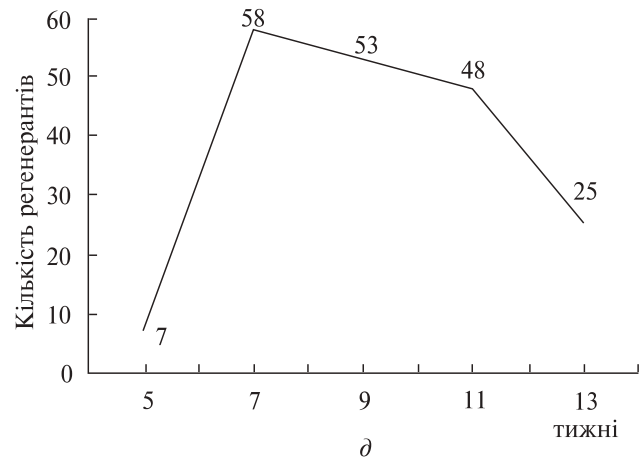
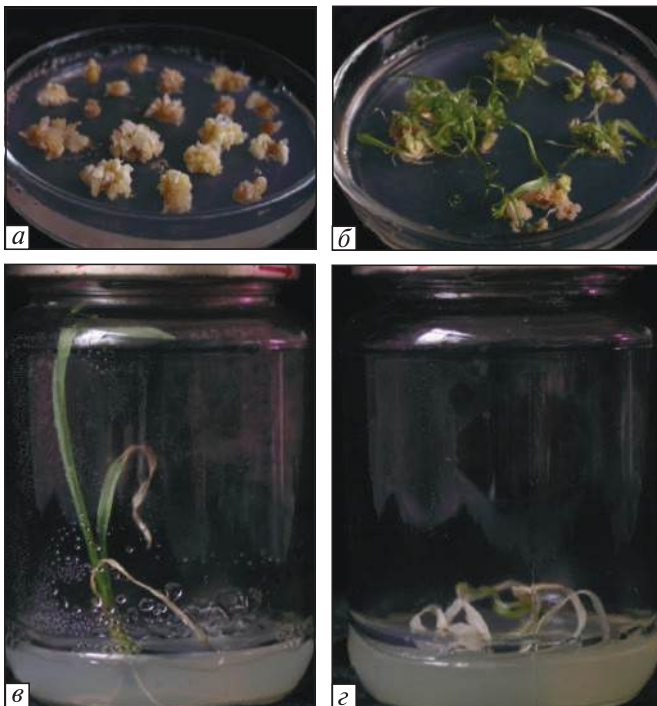


Рис. 2. Етапи відбору *in vitro* трансгенних рослин кукурудзи після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB271 на прикладі інбредної лінії ДК232. а – зовнішній вигляд калюсів на селективному середовищі; б – регенерація пагонів на середовищі із 50 мг/л паромоміцину; в, г – зовнішній вигляд рослин-регенерантів в банках на середовищі з антибіотиком – стійка укорінена (в) та чутлива знебарвлена (г); д – загальна кількість регенерантів, висаджених у банки впродовж культивування

ним показником решту ліній і гібрид RS15×KC277. Достовірної різниці за показником ЧТ за порівняння векторів, що були задіяні до трансформації, знайдено не було, однак, відмічено тенденцію до збільшення частоти трансформації за використання вектора pCB271 (табл. 1). Найбільший показник ЧТ був зафіксований в окремому експерименті з інбредною лінією ДК232 за використання вектору pCB271 (таблиця S1, <https://cytgen.com/articles/5920003s.pdf>). Частота трансформації, як і ЧРПТ, значущо різнилась серед експлантів, отриманих від різних донорних рослин одного генотипу (табл. 2). Виявлено різницю серед рослин лінії ДК232 та гібридів КР7×ПРЖ5, КС277×РС15. Знайдено сильну кореляцію між частотами регенерації та трансформації. Коефіцієнт кореляції Пірсона між ЧРПТ та ЧТ дорівнював 0,93.

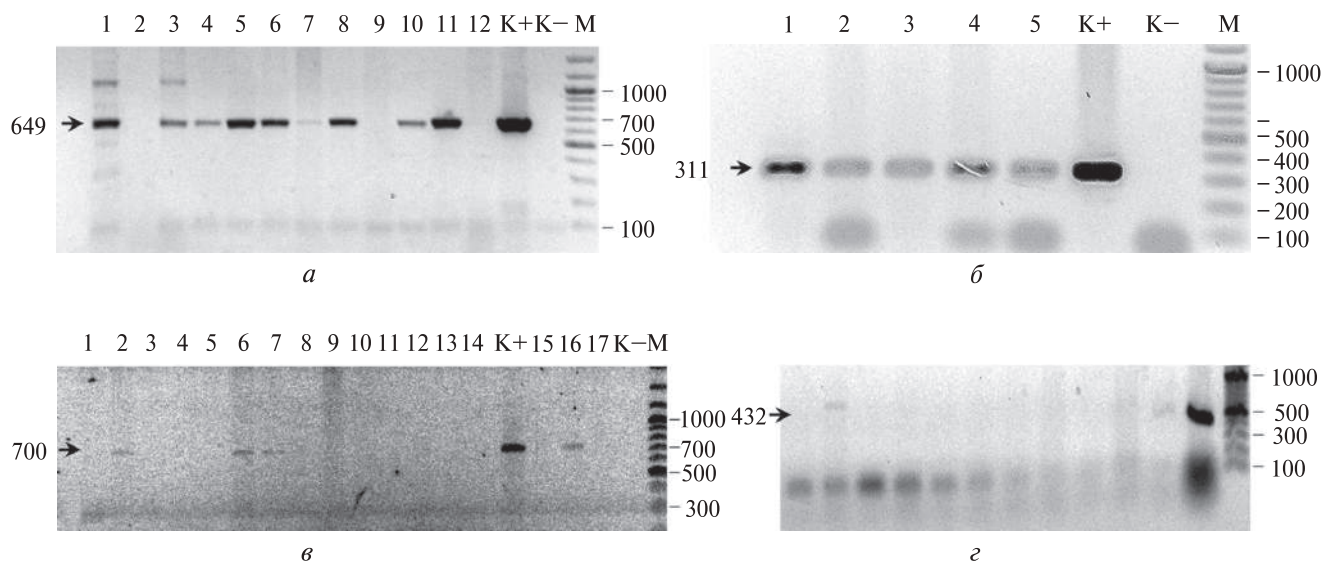
Укорінені рослини-регенеранти, отримані після процедури трансформації, висаджували в ґрунт і вирощували в умовах теплиці. Всього було висаджено 43 регенеранти. Виживаність у ґрунті серед рослин-регенерантів, отриманих після трансформації, коливалася в межах від 0 (ДК959×ДК232) до 42,9 % (КР7×ПРЖ5)

залежно від генотипу (табл. 1). Значущої різниці в адаптації рослин різних генотипів до умов *ex vitro*, отриманих із використанням різних векторів, не було виявлено. Коефіцієнт кореляції Пірсона між частотою адаптації регенерантів і ЧТ був 0,34, а між частотою адаптації та ЧРПТ – 0,27.

В умовах універсальної теплиці ІКБГІ НАН України, яка не була пристосована до вирощування світлолюбивої вибагливої культури, регенеранти кукурудзи росли слабко, не формували повноцінні генеративні органи, взагалі не розвивали чоловічих суцвіть (рис. 4). Жіночі суцвіття часто були недорозвинуті. Культивування та генетична трансформація *in vitro* можуть також призводити до порушень у морфології та фертильності отриманих рослин (Ishida et al, 2007). У трансгенних рослин, отриманих за допомогою вектора pCB202, виявляли активність ферменту β-глюкуронідази в листках, обгортці качанів і жіночих суцвіттах (рис. 4, е).

Рослини покоління T<sub>1</sub> трьох дослідних груп, отриманих від схрещування регенерантів покоління T<sub>0</sub>, (табл. 3), оцінювали на наявність транс-





**Рис. 3.** Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу рослинної ДНК регенерантів кукурудзи покоління  $T_0$  на присутність генів *nptII* (а), *S65Tpgfp* (б), інвертованого повтора з двох копій екзона 1 гена проліндегідрогенази *PDH-ex1* арабідопсису (в) та гена *vir-D1 A. tumefaciens* (г). а – доріжки 1 та 5–10 – ДНК регенерантів, отриманих після трансформації вектором рСВ271, доріжки 3 та 11 – ДНК регенерантів, отриманих після трансформації вектором рСВ202, доріжка 4 – ДНК регенеранту, отриманого після трансформації вектором рВі2Е, доріжки 2, 12 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини кукурудзи, К+ – позитивний контроль, ДНК трансгенної рослини тютюну; довжина очікуваного фрагменту – 649 пар нуклеотидів (п.н.). б – доріжки 1, 3 – ДНК регенерантів гібрида КР7×ПРЖ5, доріжки 2, 4, 5 – ДНК регенерантів лінії ДК232, К+ – позитивний контроль, ДНК трансгенної рослини тютюну; довжина очікуваного фрагменту – 311 п.н. в – доріжки 1 та 7 – ДНК регенерантів гібрида RS15×КС277, доріжки 2, 3, 5, 8, 10, 16 – ДНК регенерантів лінії ДК232, доріжки 4 та 17 – ДНК регенерантів гібрида КС277×RS15, доріжки 6, 12, 14 – ДНК регенерантів гібрида КР7×ПРЖ5, котрі були отримані після трансформації вектором рВі2Е; доріжки 9 та 11 – негативний контроль, ДНК нетрансформованих рослин лінії ДК232 та гібрида КР7×ПРЖ5; К+ – позитивний контроль, ДНК *A. thaliana*; довжина очікуваного фрагменту 700 п.н. г – доріжки 1–11 – ДНК ліній кукурудзи після трансформації, К+ – позитивний контроль, сумарна ДНК *A. tumefaciens* штаму GV3101; довжина очікуваного фрагменту 432 п.н. К– – контроль без ДНК, М – маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix

генів методом ПЛР. У кожній дослідній групі одна або обидві батьківські рослини були відібрані після трансформації вектором рСВ271, який містив синтетичний мутантний репортерний ген *S65Tpgfp* зеленого флуоресціюючого протеїну (GFP). Тому, в першу чергу намагались дослідити успадкування цього гена у поколінні  $T_1$ . Серед 180 рослин ген *S65Tpgfp* був виявлений у 96 рослин (53,3 %) (табл. 3, рис. 5, а). Співвідношення рослин покоління  $T_1$  за наявністю-відсутністю трансгена було близьким до 1 : 1 і суттєвим за критерієм узгодженості Пірсона на рівні значущості 0,05 (табл. 3), оскільки отримані значення знаходяться за межами критичної області (критерій Пірсона<sub>0,05</sub> = 3,84).

Оскільки вектори, які використовували для трансформації, містили ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*) в своєму складі (рис. 5, б), було проведено дослідження на присутність його в ДНК рослин покоління  $T_1$ . Цей ген був виявлений методом ПЛР у 24 зразках першої, другої та третьої груп, які містили ген *S65Tpgfp* (табл. 2), що охоплювало загалом четверту частину рослин. У групі рослин № 3 частота виявлення гена *nptII* була найменшою. Аналіз групи рослин № 3 на присутність інвертованого повтора з двох копій екзона 1 гена проліндегідрогенази арабідопсису, який входив до вектора рВі2Е, не виявив наявності цього фрагмента гена в рослинній ДНК (рис. 5, в).

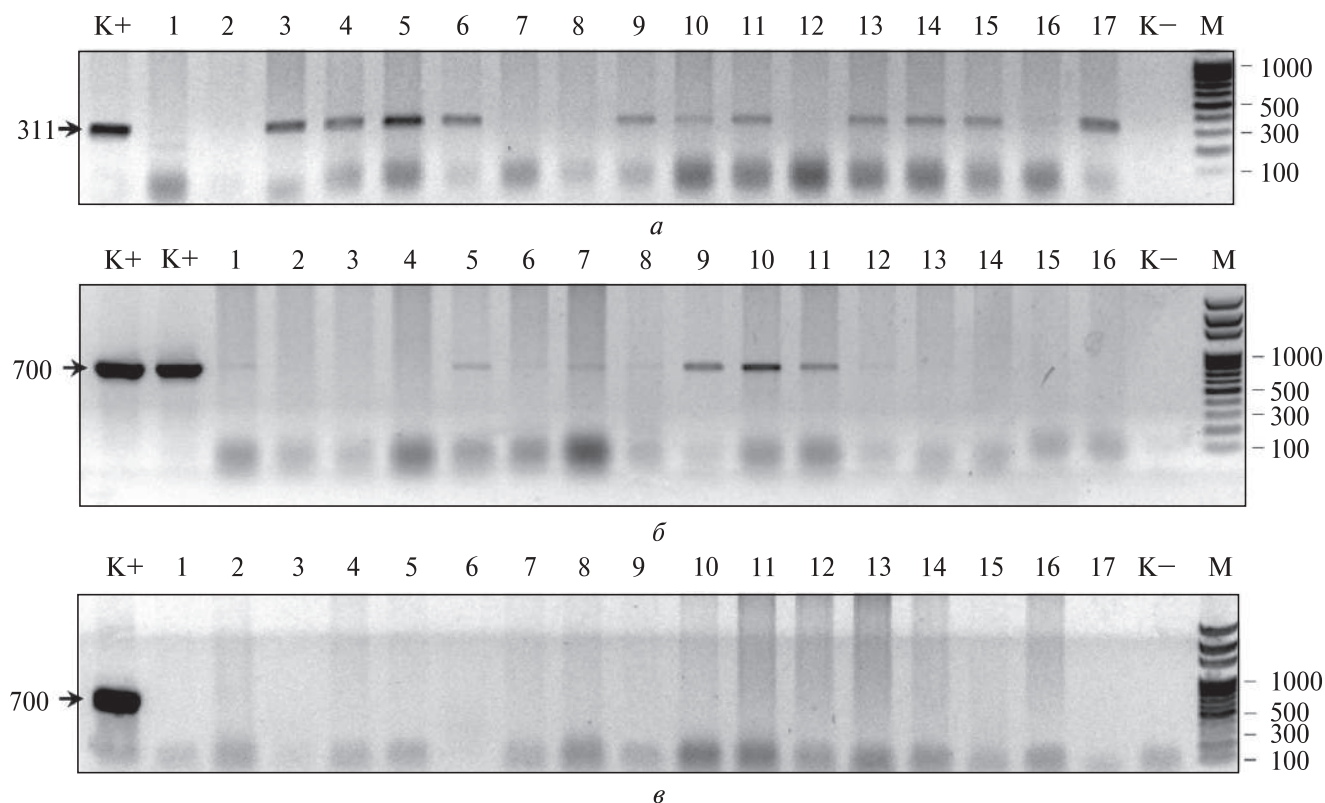


**Рис. 4.** Зовнішній вигляд регенерантів кукурудзи, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації незрілих зародків, у теплиці. *а* – RS15×KC277, вектор pCB202; *б*, *в* – ДК232, вектор pCB271; *г* – верхівкове суцвіття; *д* – бічне суцвіття; *е* – блакитне забарвлення жіночого суцвіття регенеранта КП7×ПРЖ5, отриманого після трансформації вектором pCB202, свідчить про активність ферменту β-глюкуронідази

**Таблиця 3.** Частота рослин-носіїв генів *S65Tpgfp* та *nr1II* серед рослин кукурудзи покоління  $T_1$  за результатами аналізу методом ПЛР

| № групи | Генотип рослин покоління $T_1$                  | Вектори*       | Ген <i>S65Tpgfp</i> |                                                                   |                               | Ген <i>nr1II</i> |                                                                                                  |
|---------|-------------------------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         |                                                 |                | n                   | Частота рослин-носіїв гена <i>S65Tpgfp</i> серед рослин $T_1$ , % | Критерій узгодженості Пірсона | n                | Частота рослин-носіїв гена <i>nr1II</i> серед рослин $T_1$ , які містять ген <i>S65Tpgfp</i> , % |
| 1       | $T_1(T_0^{pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_0)$ | pCB271; pCB271 | 46                  | 43,5                                                              | 0,78                          | 20               | 30,0                                                                                             |
| 2       | $T_1(T_0^{pCB202}(DK232) \times T_0)$           | pCB202; pCB271 | 80                  | 57,5                                                              | 1,80                          | 46               | 28,3                                                                                             |
| 3       | $T_1(T_0^{pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_0)$ | pCB271; pBi2E  | 54                  | 55,6                                                              | 0,67                          | 30               | 16,7                                                                                             |
| Загалом |                                                 |                | 180                 | $53,3 \pm 7,3$                                                    | —                             | 96               | $25,0 \pm 8,7$                                                                                   |

**Примітка.** n – кількість проаналізованих рослин, шт.; \*вектори, які були використані під час отримання материнської та батьківської рослин покоління  $T_0$  відповідно. Критерій узгодженості Пірсона на рівні значущості 0,05 дорівнює 3,84. Середні значення показників наведені із довірчими інтервалами за рівня значущості 0,05.



**Рис. 5.** Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу ДНК рослин покоління  $T_1$  на присутність генів *S65Tpgfp* (а), *nptII* (б), екзону *PDH-ex1* арабідопсису (в) в 1%-вому агарозному гелі. а – доріжки 1–17 – ДНК рослин групи № 3 –  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pBi2E}(KP7 \times PRJ5))$ ; К+ – позитивний контроль, ДНК трансгенної рослини тютюну, отриманої в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB271; довжина очікуваного амплікону складала 311 п.н. б – доріжка 1–16 – ДНК рослин кукурудзи групи № 2 –  $T_1(T_{0pCB202}(DK232) \times T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5))$ , К+ – позитивний контроль, ДНК трансгенної рослини тютюну, довжина очікуваного амплікону становила 700 п.н. в – доріжки 1–17 – ДНК дослідних рослин групи № 3 –  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pBi2E}(KP7 \times PRJ5))$ , К+ – позитивний контроль, ДНК *A. tumefaciens*, яка містила плазмиду pBi2E, довжина очікуваного амплікону становила 700 п.н.; К– – контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси ДНК Ladder Mix

Оскільки насіння другої групи рослин  $T_1(T_0(DK232) \times T_0(KP7 \times PRJ5))$  було отримано в результаті запилення материнської рослини DK232, одержаної після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB202 (табл. 1), який містив ген  $\beta$ -глюкуронідази (*uidA*), ми досліджували цю групу рослин на наявність експресії ферменту за допомогою гістохімічного аналізу. У листках 42 рослин спостерігали появу блакитного забарвлення, що свідчить про активність ферменту  $\beta$ -глюкуронідази, а отже, експресію гена *uidA* та, відповідно, наявність трансгена в рослинній ДНК. У листках контрольних інтактних рослин блакитного забарвлення виявлено не

було. Спостерігали градацію за площею листка, на якій проявлялося блакитне забарвлення, від точкового до часткового та суцільного (рис. 6). Синє забарвлення часто фіксували в місцях пошкодження поверхні листка, а саме зрізів і згинів, де був кращий доступ субстрату до клітинного соку та, зокрема, ферменту.

Експресію гена  $\beta$ -глюкуронідази виявили у 52,5 % рослин, що відповідає розщепленню 1 : 1, характерному для гетерозиготного стану гена за аналізуючого схрещування та, відповідно, однокласного вбудовування гена *uidA* в геном материнської рослини DK232. Статистичний аналіз отриманих даних за критерієм узгодженості Пірсона виявив значущим розподіл





**Рис. 6.** Гістохімічний аналіз активності ферменту β-глюкуронідази в листках рослин кукурудзи покоління  $T_1$  генотипу ( $T_0$ (ДК232) ×  $T_0$ (КП7×ПРЖ5))

рослин за геном *uidA* у потомстві у співвідношенні 1 : 1.

**Обговорення.** Генетичною трансформацією кукурудзи розпочали займатися ще з 80-х років минулого століття. На цей час створено трансгенну кукурудзу, стійку до гербіцидів, шкідників, захворювань, посухи тощо. Проте, кількість генотипів кукурудзи, які були успішно

залучені до генетичної трансформації, вкрай обмежена (Kausch et al, 2021b; Yassitepe et al, 2021). Це обмеження настільки значне, що в світі застосовують спеціальні біотехнологічні підходи для того, щоб його уникнути та збільшити кількість генотипів, які мають високу регенераційну здатність та можуть бути залучені до генетичної трансформації (Lowe et



al, 2016; Masters et al, 2020). Зважаючи на те, що Україна є потужним експортером кукурудзи в світі, скринінг піддатливих до трансформації генотипів, що культивуються на її теренах, і створення ефективної технології трансформації кукурудзи української селекції є надзвичайно актуальним як для внутрішньої, так і для світової агропромисловості та біотехнології кукурудзи в цілому. Для того, щоб визначити сприйнятливі до генетичної трансформації генотипи кукурудзи, в роботі було протестовано дев'ять генотипів української селекції, а саме п'ять інбредних ліній та чотири гібриди  $F_1$ . Прекультивовані незрілі зародки кукурудзи піддавали *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації, спрямовано використовуючи тестові вектори, які містили селективний маркерний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) та репортерні гени GFP (*S65Tgfp*) або  $\beta$ -глюкуронідази (*uidA*), для визначення ефективності трансформації. Серед протестованих п'яти інбредних ліній тільки у однієї (ДК232) спостерігали високу частоту регенерації на селективних середовищах після трансформації. Решта ліній виявляли чутливість до бактеріальної контамінації, регенерація серед них була практично відсутня. У той же час, всі протестовані гібриди мали достатньо високу частоту регенерації на селективних середовищах після трансформації, що свідчить про більшу витривалість гібридів порівняно з інбредними лініями щодо співкультивування з *A. tumefaciens*. І хоча інбредні лінії порівняно з гібридами вважаються більш привабливим матеріалом для біотехнологічних досліджень через їхню генетичну визначеність і стабільність, використання гібридів  $F_1$  в експериментах з генетичної трансформації з подальшим застосуванням зворотних насичувальних схрещувань із маркер-допоміжною селекцією є також перспективним через їхню високу регенераційну здатність та витривалість до біотехнологічних маніпуляцій *in vitro* (Morgun et al, 2021).

Після трансформації та селекції трансгенного матеріалу з використанням пароміцину були отримані регенеранти шести генотипів у загальній кількості 201 та висаджені в скляні ємності із селективним середовищем. Значна кількість регенерантів виявилась чут-

ливою під час подальшого культивування. Це могло бути пов'язано із м'якшою дією пароміцину на регенераційний потенціал рослинних клітин порівняно з іншими селективними агентами, такими, як канаміцин (Nitovska et al, 2015) або фосфінотрицин (Nitovska et al, 2019, 2020), що призвело до відбору хибно трансгенних рослин. Так, наприклад, ми спостерігали регенерацію пагонів при культивуванні вихідного нетрансформованого матеріалу деяких генотипів на середовищі, що містило 100 мг/л пароміцину, хоча і з меншою частотою, ніж у контролі на середовищі без антибіотику. На рівні рослин-регенерантів дія пароміцину була більш жорсткою порівняно з калюсами через безпосередній контакт рослинних тканин із селективним середовищем. Аналіз ДНК укорінених регенерантів, стійких до антибіотику, методом ПЛР виявив наявність трансгенів у всіх зразках. Отже, застосована схема селекції з використанням пароміцину є ефективною для отримання трансгенних рослин кукурудзи. Пароміцин не пригнічує значно регенераційний потенціал рослинних клітин та дає можливість надійно відбирати трансгенні рослини після укорінення регенерантів на селективному середовищі. Найбільший відсоток чутливих до пароміцину регенерантів кукурудзи був отриманий після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pBi2E. Вважаємо, що це пов'язано з тим, що вектор pBi2E єдиний із застосованих векторів не містив нуклеотидних послідовностей злакових для посилення експресії генів. Так, наприклад, після трансформації вектором pCB271, який на відміну від інших векторів містив регуляторні послідовності однодольних перед селективним маркерним геном, значуще збільшувалась регенерація рослин на селективних середовищах, порівняно з використанням інших векторів.

За допомогою ПЛР виявили трансгени у 43 клонах кукурудзи, що відносилися до чотирьох генотипів (ДК232, КП7×ПРЖ5, КС277×RS15, RS15×КС277), які були отримані з використанням усіх наявних векторних конструкцій у трьох штаммах *A. tumefaciens*. Загальні показники ЧТ були значуще кращими для трьох генотипів (інбредна лінія ДК232 та гібриди КП7×ПРЖ5 і КС277×RS15). Тому, за-

значені генотипи є більш перспективними для проведення подальших досліджень з отримання трансгенної кукурудзи. Цікаво, що за поєднання генотипів KC277 та RS15 кращі результати з трансформації отримано, якщо як материнську форму використовувати KC277.

Ми спостерігали сильну кореляцію між частотою трансформації (ЧТ) та частотою регенерації після трансформації (ЧРПТ). Частота трансформації (ЧТ), так само як і ЧРПТ, сильно залежала від індивідуальної рослини, яка слугувала донором експлантів. На це можуть впливати фізіологічний стан донорних рослин на момент виокремлення зародків через нерівномірну дію абіотичних (опаді, інсоляція, температура) та біотичних факторів (інфікування патогенами), кількість днів після запилення (DAP) на момент ізоляції зародків та час їх прекультивації (DIC) (Ishida et al, 2007). Порівняно із попередніми дослідженнями отримані нами показники з частоти трансформації є високими (Omer et al, 2013; Yassitepe et al, 2021). Найбільший загальний показник з ЧТ був після трансформації з використанням вектору pCB271, ймовірно, через те, що цей вектор на відміну від інших векторів містив перед селективним маркерним геном регуляторні нуклеотидні послідовності злакових для посилення експресії, а саме інтрон кукурудзяного гена *hsp70*. Отже, для успішної генетичної трансформації кукурудзи важлива наявність регуляторних нуклеотидних послідовностей однодольних перед трансгенами.

Аналіз покоління  $T_1$  на наявність репортерних генів виявив розщеплення, відповідне гетерозиготному стану, що вказує на однокласне вбудовування. Зрозуміло, що у групах рослин —  $T_1(T_{0pCB202}(DK232) \times T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5))$  та  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pBi2E}(KP7 \times PRJ5))$  результати аналізу за геном GFP відповідали результатам аналізуючого схрещування, оскільки інша батьківська рослина  $T_0$ , отримана з використанням інших векторів, не містила цей ген. У групі рослин  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5))$  обидві батьківські форми були отримані після трансформації вектором pCB271 та мали б мати трансген *S65Tpgfp*. Тоді, у випадку однокласного вбудовування трансгена в геном обох рос-

лин, розщеплення у нащадків мало б бути 3 : 1 (моногібридне схрещування, закон розщеплення). За умови вбудовування двох і більше копій гена, розщеплення за даною ознакою у нащадків мало б бути відсутнє. Проте, в цій групі рослин нами спостерігалось істотне розщеплення 1 : 1 за геном *S65Tpgfp* у нащадків так само, як і в інших групах. Звідси, в групі рослин  $T_1(T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5) \times T_{0pCB271}(KP7 \times PRJ5))$  лише одна батьківська рослина була трансгенною, а ген *S65Tpgfp* у геномі рослин  $T_1$  був представлений тільки однією копією. Відсутність трансгена *S65Tpgfp* у ДНК рослин покоління  $T_1$  свідчить про те, що обрана для гібридизації рослина не була трансгенною, хоч і була отримана в результаті процедури генетичної трансформації.

Відсутність амплікону потрібного розміру гена *nr1I* у деяких зразках ДНК трансгенної кукурудзи, в яких був виявлений ген *S65Tpgfp*, або слабка його візуалізація може свідчити про метилювання трансгена (Rajeevkumar et al, 2015), що могло призвести до ускладнення доступу праймерів до ділянки ДНК з геном, або про його втрату (випадіння) в результаті мейотичних рекомбінацій. Аналізуючи покоління  $T_0$  ми спостерігали втрату амплікону потрібного розміру у тепличної рослини, хоча виявляли його у регенеранта на стадії селекції *in vitro*. Можливо це пов'язано з тим, що ген має бактеріальне походження і його нуклеотидна послідовність не була оптимізована для експресії у рослинах. Подібне явище ми також фіксували в іншому дослідженні (Nitovska et al, 2020), де спостерігали втрату бактеріального гена *CP4epsps*. З іншого боку, отримання трансгенних рослин з бажаними ознаками без селективного маркерного гена краще для їх подальшого впровадження.

**Висновки.** Доведено ефективність протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням пароміцину як селективного агента для отримання трансгенних рослин кукурудзи української селекції. Наявність інтрону гена *hsp70* кукурудзи перед селективним маркерним геном *nr1I* у векторі pCB271 мала значущий вплив на результати з трансформації та виживаності регенерантів. За допомогою ПЛР-аналізу показано успадкування трансгенів у наступному поколінні.

Виявлена експресія репортерного гена  $\beta$ -глюкоронідази у поколінні  $T_1$  трансгенної кукурудзи. За результатами успадкування репортерних генів зеленого флуоресціюючого протеїну та  $\beta$ -глюкоронідази статистично доведено вбудовування однієї копії трансгена в рослинний геном. Відібрано три генотипи кукурудзи української селекції, в тому числі інbredна лінія ДК232, для використання в подальших дослідженнях як найбільш сприйнятливий до *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації. Отримані в результаті дослідження знання є корисними для створення трансгенної кукурудзи української селекції із бажаними ознаками.

*Автори висловлюють вдячність О.М. Тищенко за дозвіл використання вектора pBi2E та керівництву Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України і Державної установи Інститут зернових культур НААН України за організацію досліджень в полі, теплиці та лабораторіях.*

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і хребетних тварин в якості об'єктів дослідження.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Роботу виконано згідно Програми наукових досліджень 23 «Біотехнологія і генетика в рослинництві» за завданням Ф23.00.01.06Ф «Розробити фундаментальні основи молекулярно-генетичних і клітинних біотехнологій для селекційного поліпшення кукурудзи, № державної реєстрації 0116U001246 (ДУ Інститут зернових культур НААН України) та відомчої тематики НАН України 2023–2027 рр. «Вивчення особливостей життєдіяльності біотехнологічних рослин після геномних модифікацій» (номер Держреєстрації 0123U100462) Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

#### AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF MAIZE OF UKRAINIAN BREEDING

I.O. Nitovska, T.M. Satarova, O.E. Abraimova, M.Yu. Palekha, I.K. Komarnytsky, B.V. Morgun

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the NAS of Ukraine

Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho Str., 148

Institute of Grain Crops of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine

Ukraine, 49600, Dnipro, Volodymyra Vernadskoho Str., 14

Institute of Plant Physiology and Genetics of the NAS of Ukraine

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska Str., 31/17

E-mail: iranit@ukr.net

Since Ukraine is a powerful maize exporter in the world, screening genotypes susceptible to genetic transformation among cultivated on its territory and the development of an effective technology for the transformation of maize of Ukrainian breeding are relevant. Precultivated immature maize embryos of nine genotypes (inbred lines and hybrids) were subjected to *Agrobacterium*-mediated transformation. Three strains of *A. tumefaciens* and three vector constructs, which contained the selective marker gene of neomycin phosphotransferase II, as well as the reporter genes of green fluorescent protein or  $\beta$ -glucuronidase, were used in the work. Transgenic plants were selected on nutrient media with paromomycin. For six genotypes, shoot regeneration was observed after transformation on selective media. The presence of transgenes in 43 clones obtained from four genotypes using all available vectors was revealed by the PCR method. The transformation frequency varied from 0 to 27 % in individual experiments. A strong correlation was found between frequencies of the regeneration and the transformation, as well as a significant difference in the frequencies between genotypes and donor plants of the same genotype. The use of pCB271 vector, which contained monocot nucleotide sequences of gene expression regulation upstream the selective marker gene, namely the intron of the maize *hsp70* gene, significantly increased the frequency of shoot regeneration after transformation. Analysis of  $T_1$  generation plants revealed single-locus integration of transgenes into the plant genome. The proposed protocol of genetic transformation using paromomycin as a selective agent is effective to obtain transgenic maize of Ukrainian breeding. Three genotypes (inbred line DK232 and hybrids KP7×PRZh5 and KS277×RS15) were selected as the most susceptible among tested genotypes to *Agrobacterium*-mediated transformation and promising for further research on the production of transgenic maize plants.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anami S, Njuguna E, Coussens G et al (2013) Higher plant transformation: principles and molecular tools. *Int J Dev Biol* 57:483–494. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130232mv>
- Ewens WJ, Brumberg K (2023) Introductory statistics for data analysis. Springer Cham. 273. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-28189-1>
- Fedorenko T, Markovskiy O, Vlasova O et al (2012)



- Detection of resistant to glyphosate maize transformation events GA21, MON88017 and NK603 among Ukrainian market samples. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, Washington, USA, 2012, P-2057
- Gerasymenko IM, Sheludko YV, Klebanovych AA et al (2017) Comparison of effectiveness of 5'-regulatory sequences in transplastomic tobacco chloroplasts. *Transgenic Res* 26(1):65–75. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9980-2>
- Grimsley N, Hohn T, Davies JW et al (1987) *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325:177–179. <https://doi.org/10.1038/325177a0>
- ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019. Ithaca, NY: The International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications. 2020. [online], Available at: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/default.asp>
- Ishida Y, Saito H, Ohta S et al (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14(6): 745–750. <https://doi.org/10.1038/nbt0696-745>
- Ishida Y, Hiei Y, Komari T (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature Protocols* 2 (7):1614–1621. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.241>
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387–405. <https://doi.org/10.1007/BF02667740>
- Kausch AP, Nelson-Vasilechik K, Tilelli M et al (2021a). Maize tissue culture, transformation, and genome editing. *Vitr Cell Dev Biol – Plant* 2:1–9. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10196-y>
- Kausch AP, Wang K, Kaeppler HF et al (2021b). Maize transformation: history, progress, and perspectives. *Mol Breed* 41:38. <https://doi.org/10.1007/s11032-021-01225-0>
- Klein TM, Fromm M, Weissinger A et al (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(12):4305–4309. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4305>
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of  $T_L$ -DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molec Gen Genet* 204:383–396. <https://doi.org/10.1007/BF00331014>
- Lowe K, Wu E, Wang N et al (2016). Morphogenic regulators Baby boom and Wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell* 28:1998–2015. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00124>
- Lu A, Diehn S, Cigan M (2015) Maize protein expression. In: Azhakanandam K, Silverstone A, Daniell H et al (eds) *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*. Springer, New York, NY. P. 3–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2202-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2202-4_1)
- Masters A, Kang M, McCaw M et al (2020) *Agrobacterium*-mediated immature embryo transformation of recalcitrant maize inbred lines using morphogenic genes. *J Vis Exp* 156:e60782. <https://doi.org/10.3791/60782>
- McDonald JH (2014) *Handbook of Biological Statistics*, (3rd ed.) Maryland, Baltimore: Sparky House Publishing. <http://www.biostathandbook.com/>
- Morel G, Wetmore RH (1951) Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38(2):141–143. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1951.tb14804.x>
- Morgun BV, Satarova TM, Nitovska IO et al (2021) The method of obtaining of maize regenerants *in vitro*. Application No. u202007323 dated November 16, 2020, for a patent of Ukraine for a utility model No. 148028; IPC (2006) A01H 4/00, A01H 1/02 (2006.01). Published on 30.06.2021, Bull. No. 26/2021 (In Ukrainian). <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1602283/>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Mykhalska SI, Adamenko NI, Morgun BV et al (2012) Competence to *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot nodal section segments of corn elite inbred lines. *Biotechnologia* 5(3):98–105. [https://www.biotechnology.kiev.ua/images/BTA/2012/3\\_2012/mykhal3\\_2012.pdf](https://www.biotechnology.kiev.ua/images/BTA/2012/3_2012/mykhal3_2012.pdf) (In Ukrainian)
- Mykhalska SI, Sergeeva LE, Matveyeva AYU et al (2014). The elevation of free proline content in osmotolerant transgenic corn plants with dsRNA suppressor of proline dehydrogenase gene. *Plant Physiol Genet* 46(6):482–489. [http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR\\_2014\\_45\\_6\\_5](http://nbuv.gov.ua/UJRN/FBKR_2014_45_6_5) (In Russian).
- Nitovska IO, Avilov ID, Morgun BV (2015) The positive effect of antibiotic paromomycin compared with kanamycin for selection of transgenic plants with *nptII* gene on the example of *Nicotiana tabacum*. *Factors in Experimental Evolution of Organisms* 17:270–273
- Nitovska I, Vasilenko M, Morgun B (2018). Effect of monocot introns on transgene expression in genus *Nicotiana* plants. *Biotechnologia Acta* 11(4):73–83. <https://doi.org/10.15407/biotech11.04.073>
- Nitovska IO, Aбраїмова ОYe, Duplij VP et al (2019) Application of beta-glucuronidase transient expression for selection of maize genotypes competent for genetic transformation. *Cytol Genet* 53(6):451–458. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060082>
- Nitovska IO, Morgun BV, Aбраїмова ОYe et al

- (2020) Glyphosate selection of maize transformants containing *cp4epsps* gene. *Factors in Experimental Evolution of Organisms* 26:239–244. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1273>
- O’Kennedy MM, Stark HC, Dube N (2011) Biolistic-mediated transformation protocols for maize and pearl millet using pre-cultured immature zygotic embryos and embryogenic tissue. *Methods Mol Biol* 710:343–354. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_23)
- Omer RA, Matheka JM, Abdelbagi AM et al (2013). Transformation of tropical maize with the NPK1 gene for drought tolerance. *Int J Genet Eng* 3:7–14. <https://doi.org/10.5923/j.ijge.20130302.01>
- Rajeevkumar S, Anunanthini P, Sathishkumar R (2015) Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front Plant Sci* 6:693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
- Sidorov V, Duncan D (2009) *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. In: Scott MP (eds) *Transgenic Maize. Methods in Molecular Biology™* 526:47–58. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-494-0_4)
- Tishchenko OM, Komisarenko AG, Mykhalska SI 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.* 48, 218–226 (2014). <https://doi.org/10.3103/S0095452714040094>
- USDA. Grain: world markets and trade. March 8, 2024 (Internet). Available at: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/zs25x844t/hh63vf62k/pc28c528c/grain.pdf>
- Varchenko OI, Kuchuk MV, Parii MF et al (2020) Comparison of *gfp* gene expression levels after *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Nicotiana rustica* L. by constructs with different promoter sequences. *Cytol Genet* 54(6):531–538. <https://doi.org/10.3103/S0095452720060110>
- Yassitepe JECT, da Silva VCH, Hernandez-Lopes J et al (2021) Maize transformation: from plant material to the release of genetically modified and edited varieties. *Front Plant Sci* 12:766702. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.766702>

Надійшла в редакцію 01.11. 2024

Після доопрацювання 13.11.2024

Прийнята до друку 18.03.2025