

ВИКОРИСТАННЯ ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА БЕТА-ГЛЮКУРОНІДАЗИ ДЛЯ ВІДБОРУ ГЕНОТИПІВ КУКУРУДЗИ, КОМПЕТЕНТНИХ ДО ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

І.О. НІТОВСЬКА¹, О.Є. АБРАІМОВА², В.П. ДУПЛІЙ¹, К.В. ДЕРКАЧ², Т.М. САТАРОВА²,
В.А. РУДАС¹, В.Ю. ЧЕРЧЕЛЬ², Б.В. ДЗЮБЕЦЬКИЙ², Б.В. МОРГУН¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148,

² Державна установа Інститут зернових культур НААН України
49600, м. Дніпро, вул. Володимира Вернадського, 14

E-mail: molgen@icbge.org.ua

Проведено генетичну трансформацію інбредних ліній та гібридів F_1 кукурудзи, зареєстрованих в Україні. В дослідженні було використано біолістичний метод генетичної трансформації незрілих зародків кукурудзи, що утворювали калюсну тканину, та вектор рАНС25, який містив гени фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) і β -глюкуронідази (*uidA*). В результаті трансформації калюсної тканини генотипів кукурудзи отримано стійкі до фосфінотрицину калюсні лінії та рослини-регенеранти. Виявлено активність β -глюкуронідази в калюсах, стійких до гербіциду, та методом ПЛР показано присутність гена *bar* в ДНК калюсів. Частота стабільної трансформації складала від 2,2 до 30% залежно від генотипу. Спостерігали взаємозв'язок результатів транзійентної експресії гена β -глюкуронідази та стабільної генетичної трансформації. Запропонований протокол генетичної трансформації кукурудзи з використанням дослідження транзійентної експресії гена β -глюкуронідази дозволяє значно спростити процес відбору генотипів, компетентних до генетичної трансформації, та створювати трансгенні організми з новими ознаками.

Ключові слова: *Zea mays* L., незрілі зародки, біолістична генетична трансформація, *bar*, *uidA*.

Вступ. Кукурудза (*Zea mays* L.) є однією з найпоширеніших злакових культур у світовому та вітчизняному агропромисловому виробництві. За обмеженості посівних площ генетична трансформація є потужним інструментом покращення існуючих генотипів для збільшення їхньої економічної привабливості при вирощуванні [1].

На експресію трансгенів та біосинтез чужинного білка впливають різноманітні фактори, зокрема, місце вбудовування ДНК, кількість інтегрованих копій, регуляторні елементи транскрипції генів, внутрішньоклітинний таргетинг та інші [2]. Взагалі, інтеграцію чужинної ДНК важко контролювати, а вплив, який здійснює геном рослини на рівні експресії трансгена, може виявитись значним. Тому, важливим етапом дослідження є підбір генотипів, компетентних до трансформації. З цією метою використовують вектори, які містять репортерні гени, для візуалізації події трансформації, найчастіше з яких застосовують гени *uidA* та *gfp* [3, 4]. Ген β -глюкуронідази (*uidA*), виділений із геному *Escherichia coli*, присутній не тільки у бактерій, а й у хребетних та безхребетних тварин, але відсутній у більшості видів вищих рослин [5]. Субстратом β -глюкуронідази є β -глюкуроніди, які у присутності ферменту перетворюються на нерозчинний продукт блакитного кольору. Ця реакція використовується для гістохімічної локалізації β -глюкуронідазної активності в клітинах та тканинах.

У своїй роботі ми досліджували компетентність до генетичної трансформації генотипів кукурудзи (інбредні лінії та гібриди F_1) української й іноземної селекції, більшість з яких створена і використовується у селекційному процесі в Україні. Генетичну трансформацію незрілих зародків кукурудзи здійснювали біолістичним методом, використовуючи вектор рАНС25 [6], який містив селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) та репортерний ген β -глюкуронідази (*uidA*) під контролем промотору гена убіквітину кукурудзи.

© І.О. НІТОВСЬКА, О.Є. АБРАІМОВА, В.П. ДУПЛІЙ,
К.В. ДЕРКАЧ, Т.М. САТАРОВА, В.А. РУДАС,
В.Ю. ЧЕРЧЕЛЬ, Б.В. ДЗЮБЕЦЬКИЙ, Б.В. МОРГУН,
2019

Матеріали і методи. Для генетичної трансформації використовували інбредні лінії кукурудзи (*Zea mays* L.) української (ДК959, RS15, ДК633266, ДК267) і зарубіжної селекції (PLS61) та гібриди F_1 (PLS61 $\times$ ДК959, ДК959 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ ДК633266, ДК633266 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ КП7).

Вирощування донорних рослин кукурудзи, ізоляцію волотей і качанів та контрольоване штучне запилення рослин проводили на ділянках ДУ Інститут зернових культур НААН України (м. Дніпро). Незрілі зародки довжиною 1,0–1,5 мм ізолювали з 2–7 донорних рослин та експлантували *in vitro* на живильне середовище для індукції калюсогенезу (середовище № 1), яке містило макро-, мікросолі, вітаміни N_6 , 100 мг/л гідролізату казеїну, 690 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 10 мг/л $AgNO_3$, 1,0 мг/л дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д), 0,5 мг/л дикамби, 0,1 мг/л абсцизової кислоти (АБК), 7 г/л агару, щитком догори, як було описано раніше [7]. Через 10–20 діб незрілі зародки з утвореними на щитках калюсами піддавали біолістичній трансформації.

Для генетичної трансформації використовували вектор рАНС25 [6], який містив гени *uidA* та *bar* під контролем промотору гена убіквітину кукурудзи.

Біолістичну трансформацію проводили за допомогою саморобної гармати типу particle inflow gun (PIG) [8], використовуючи при пострілі тиск стиснутого гелію 118 psi, зменшення тиску у камері гармати до 1 psi та відстань у 19 см від макроносія з металевими частинками до рослинного матеріалу. Носіями плазмідної ДНК були частинки золота діаметром 0,6 мкм (Bio-Rad). ДНК вектору адсорбували на металевих частинках шляхом поступового додавання до 50 мкл суспензії частинок у 50 % гліцеролі (0,03 мг/мл) 10 мкл плазмідної ДНК (1 мкг/мкл) та 20 мкл розчину PEG/ $MgCl_2$ (50 % PEG 2000, 5 M $MgCl_2$, взятих у співвідношенні 4 до 1). Після інкубації впродовж 30 хв за кімнатної температури частинки збирали центрифугуванням (2000 об/хв впродовж 1 хв) та ресуспендували у 60 мкл абсолютного етилового спирту. На металеву решітку наносили 6 мкл отриманої суспензії металевих частинок з ДНК та використовували для одного по-

стрілу. Підготовку рослинного матеріалу до трансформації та подальше культивування робили згідно [9]. Кількість експлантів, яку обробляли одним пострілом, становила від 15 до 35 залежно від розмірів калюсів. Через 5–6 діб після біолістичної обробки рослинний матеріал переносили на селективне середовище для індукції калюсогенезу (середовище № 2), яке за складом відповідало середовищу № 1, проте не містило гідролізату казеїну, мало зменшений вміст проліну (300 мг/л), 30 г/л манітолу та 10 мг/л фосфінотрицину, і вирощували у темряві за температури 27 °С. За 15 діб від початку селекції калюси переносили на середовище для індукції регенерації (середовище № 3), яке містило сольовий компонент та вітаміни MS [10], 300 мг/л L-проліну, 20 г/л сахарози, 10 мг/л $AgNO_3$, 0,1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП), 7 г/л агару та 5 мг/л фосфінотрицину. З наступного пасажу з середовища № 3 вилучали $AgNO_3$ та 2,4-Д (середовище № 4).

Для визначення питомого приросту калюсів після біолістичної обробки використовували калюси після 3 місяців субкультивування у темряві на контрольному середовищі № 5, яке за складом було аналогічне середовищу № 2, але за відсутністю манітолу і фосфінотрицину. До селективного варіанту середовища № 5 додавали 5 мг/л фосфінотрицину. Для кожного варіанту досліду визначали вихідну сирю масу кожного окремого калюсу з добірки у 25–126 штук залежно від варіанту досліду та сирю масу того ж самого калюсу через 3 місяці культивування. Культивування калюсів проводили за температури 26 °С, на середовищах № 1, 2, 5 у темряві. Питомий приріст калюсів (мг/калюс) розраховували як відношення середньої різниці між сирою масою через 3 місяці культивування та вихідною сирою масою кожного калюсу до загальної кількості проаналізованих калюсів.

Частоту регенерації (%) розраховували як відсоткове відношення кількості незрілих зародків, калюси яких після культивування на середовищі для індукції регенерації утворили рослини-регенеранти, до загальної кількості незрілих зародків, перенесених на селективне середовище для індукції регенерації. Аналіз даного показника проводили на 60-у добу від

біолістичної обробки (30 діб на середовищі для індукції калюсогенезу + 30 діб на середовищі для індукції регенерації).

Гістохімічний аналіз активності β -глюкуронідази у рослинному матеріалі проводили за методикою [5] через 4 доби після обстрілу для виявлення транз'єнтної експресії гена *uidA* та через 2–3 місяці з метою підтвердження події стабільної трансформації. Частоту стабільної трансформації (%) розраховували як відсоткове відношення кількості калюсних ліній, які виявляли активність β -глюкуронідази, до загальної кількості калюсів, перенесених на селективне середовище для індукції регенерації.

З калюсів кукурудзи, стійких до фосфінотрицину, виділяли загальну ДНК методом з використанням ЦТАБ [11]. Наявність гена *bar* у рослинній ДНК встановлювали методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів *bar1f1* (прямий) 5'-AC-ATC GAGAC AAGCA CGGTC-3' та *bar1r2* (зворотній) 5'-GCCAG AAACC CACGT CAT-GC-3', температури відпалу 59 °C впродовж 30 с з наступним етапом синтезу впродовж 30 с за 72 °C. Довжина очікуваного фрагменту складала 411 пар нуклеотидів (п.н.) [12]. Як позитивний контроль використовували загальну ДНК вже трансформованої рослини ріпаку. Продукти реакції фракціонували в 1%-ному агарозному гелі з бромистим етидієм (0,5 мкг/мл) у трис-боратному буфері при 8 В/см впродовж 90 хв.

Статистичну обробку результатів проводили за стандартною методикою [13]. Скрізь, де це було можливо, вираховували середнє значення та довірчий інтервал на рівні значущості ($p < 0,05$). Питомі прирости сиріої маси калюсів, вирощених на середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину, після біолістичної обробки та без такої обробки, порівнювали за критерієм Стюдента. Відсоток позеленіння калюсів рахували для кожного пострілу та визначали середнє і довірчий інтервал ($p < 0,05$).

Результати досліджень. Транз'єнтна експресія гена *uidA* у калюсах кукурудзи після біолістичної трансформації. В ході виконання роботи з біолістичної трансформації калюсів кукурудзи було проведено 2 серії експериментів із 20 і 16 пострілів та опрацьовано близько 1000 незрілих зародків (табл. 1). Після обстрі-

лювання зародки з калюсами переносили на середовище № 2.

Через чотири доби після обстрілу вивчали транз'єнтну експресію гена *uidA* в калюсах різних генотипів кукурудзи. Для проведення гістохімічного аналізу брали від одного пострілу по 5 зародків з калюсами. Дослідження проводили не для всіх, а лише для частини пострілів, обраних випадково. Експресія гена β -глюкуронідази призводила до появи синього забарвлення, яке різнилося за інтенсивністю та площею калюсу, яку воно займало (рис. 1, а). У контрольних калюсах, які не піддавали трансформації, появу синього забарвлення не спостерігали. Наявність блакитного забарвлення у дослідному калюсі через 4 доби після трансформації та його відсутність у контрольному необробленому матеріалі свідчить про транз'єнтну експресію гена *uidA*.

У досліджених інбредних ліній кукурудзи 20–90 % калюсів виявили транз'єнтну експресію гена *uidA* (рис. 1, б). Наочне оцінювання за інтенсивністю та площею забарвлення калюсу показало залежність рівня транз'єнтної експресії трансгена *uidA* від генотипу калюсу. Серед ліній найвищий рівень експресії гена *uidA* виявила PLS61, а калюси ДК633266 та ДК267 показали найслабшу експресію гена. Калюси всіх досліджених гібридів демонстрували транз'єнтну експресію гена *uidA* на рівні 100 % (рис. 1, б), що свідчить на користь

Таблиця 1. Біолістична трансформація кукурудзи різних генотипів

Генотип	Кількість, шт.	
	експланти	постріли
PLS61	178	6
ДК959	58	2
RS15	127	5
ДК633266	88	4
ДК267	35	2
PLS61 × ДК959	75	3
ДК959 × PLS61	45	2
PLS61 × ДК633266	124	4
ДК633266 × PLS61	152	6
PLS61 × КП7	46	2
Разом	928	36

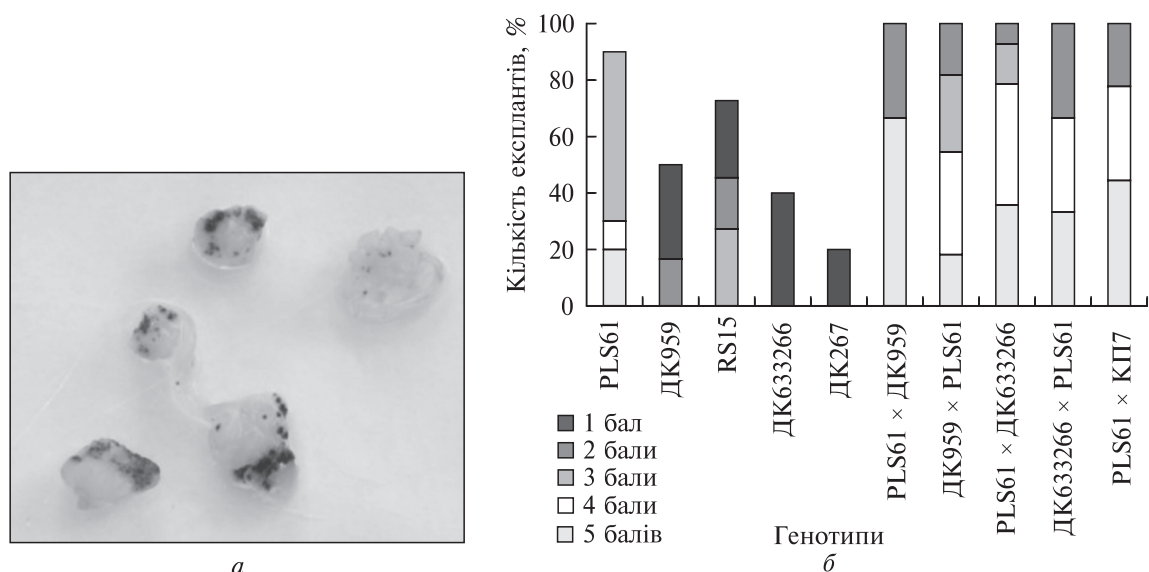


Рис. 1. Транзйентна експресія гена *uidA* в калюсах кукурудзи на 4-ту добу після біолістичної трансформації. *а* – зовнішній вигляд калюсу інбредної лінії PLS61 після гістохімічного аналізу активності ферменту β -глюкуронідази; *б* – оцінка транзйентної експресії гена *uidA* для різних генотипів кукурудзи. Бали від 1 до 5 вказують на інтенсивність та площу забарвлення в напрямку їхнього збільшення

більшій компетентності гібридів до біолістичної трансформації порівняно з лініями. Найінтенсивніше забарвлення спостерігали у гібрида PLS61 × DK959, а найслабше у DK959 × PLS61.

Селекція трансгенних ліній кукурудзи та регенерація рослин. Досліджували вплив селектив-

ного агента та трансформації на проліферацію калюсів шляхом вивчення динаміки приросту сирової маси калюсної тканини на прикладі лінії DK633266 (табл. 2).

Як видно з представлених даних, у варіанті № 2 (без біолістичної обробки, але за дії фосфінотрицину) спостерігалася значне зниження приросту сирової маси калюсів по відношенню до варіанту № 1 (без біолістичної обробки і без впливу фосфінотрицину), що свідчить про інгібуючу дію гербіциду на проліферацію клітин в умовах темряви на противагу існуючій думці, що інгібуючий ефект фосфінотрицину в умовах темряви не виявляється [3]. Як відомо, фосфінотрицин інгібує глютамінсинтазу, яка відіграє ключову роль у асиміляції аміаку, що активно утворюється в процесі фотосинтезу. Тому, найбільш негативний вплив на рослинні тканини гербіцид має в умовах освітлення. У варіанті № 3 (після біолістичної обробки, без впливу фосфінотрицину) відмічено тенденцію до навіть інтенсивнішого росту калюсів, ніж у контрольному варіанті № 1. Пояснити таку стимуляцію росту калюсної тканини можна самою процедурою біолістичної трансформації, оскільки обстріл металевими кульками ство-

Таблиця 2. Питомий приріст сирової маси калюсної тканини за дії селективного тиску фосфінотрицину через 3 місяці культивування від біолістичної обробки

Варіант	Лінія DK633266	
	кількість калюсів, шт.	питомий приріст сирової маси, мг/калюс
1	29	282,0 ± 194,4
2	29	52,7 ± 29,4
3	38	555,8 ± 221,1
4	107	112,4 ± 18,6

Примітка. 1 – калюси без біолістичної обробки, середовище № 5; 2 – калюси без біолістичної обробки, середовище № 5 + 5 мг/л фосфінотрицину; 3 – калюси після біолістичної обробки, середовище № 5; 4 – калюси після біолістичної обробки, середовище № 5 + 5 мг/л фосфінотрицину. Довірчий інтервал вказано на рівні значущості ($p < 0,05$).

рює раневу поверхню тканини і потенційно може активізувати ростові процеси у відповідь на поранення. Приріст сирої маси калюсів у варіанті № 4 (після біолістичної обробки, культивування на фоні 5 мг/л фосфінотрицину) був очікувано нижчий, ніж у варіантах № 1 і 3. Однак порівняно з варіантом № 2, у варіанті № 4 виявлено статистично значиме ($p < 0,05$) збільшення приросту сирої маси. Такі відмінності можна пояснити тим, що частина клітин калюсів варіанту № 4 містить ген *bar* і мала генетично обумовлену стійкість до фосфінотрицину.

Після перенесення калюсів, які піддавали біолістичній трансформації, на селективне середовище для індукції регенерації спостерігали їхнє позеленіння (рис. 2). Відсоток калюсів, які зеленіли під час селекції, різнився за генотипами. У контролі, після культивування необробленого калюсу, на середовищі, яке містило 5 мг/л фосфінотрицину, впродовж 6 тижнів зелених калюсів не спостерігали.

Після 2–3 місяців культивування на селективному середовищі стійкі до гербіциду калюсні лінії досліджували на наявність активності ферменту β -глюкуронідази. Через ризик втрати трансгенної події гістохімічному дослідженню піддавали не всі калюсні лінії, стійкі до фосфінотрицину, а лише ті, які мали рослинний матеріал у достатній кількості для подальшого отримання трансгенних рослин. Після проведення гістохімічного аналізу спостерігали появу синього забарвлення для частини калюсів (рис. 3, а, табл. 3), що свідчить про експресію гена *uidA* та, відповідно, трансгенну природу калюсів, оскільки у контролі не спостерігали синього забарвлення. Інші дослідники також не виявляли активності, подібної до дії ферменту β -глюкуронідази у тканинах нетрансформованої кукурудзи [14–17].

Серед генотипів кукурудзи, які піддавали біолістичній трансформації, наявність експресії гена *uidA* було показано для 5-ти: PLS61, ДК959 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ ДК959, ДК633266 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ ДК633266 (табл. 3). Найбільш інтенсивне синє забарвлення спостерігали для генотипів PLS61 та PLS61 $\times$ ДК959. Результати гістохімічного аналізу калюсів після тривалої селекції співвідносяться з результатами, отриманими після дослідження транзійтної експре-

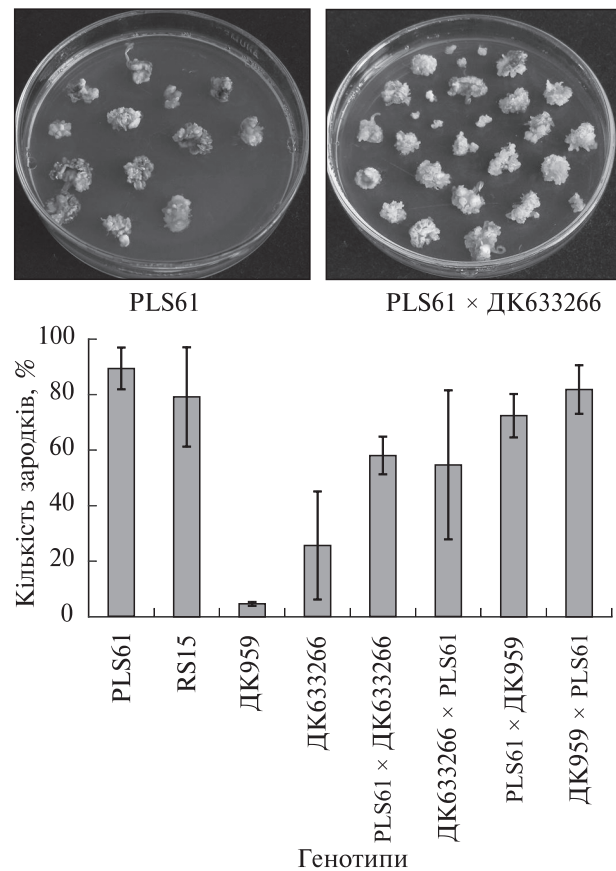


Рис. 2. Позеленіння калюсів кукурудзи після біолістичної трансформації на селективному середовищі з фосфінотрицином. Довірчий інтервал вказано на рівні значущості ($p < 0,05$)



Рис. 3. Гістохімічний аналіз на присутність активності ферменту β -глюкуронідази калюсної лінії гібрида PLS61 $\times$ ДК959 (а) та регенеранта лінії PLS61 (б) через 2,5 місяці культивування на селективному середовищі після біолістичної трансформації

сії гена *uidA*. Генотипи, які мали активність β -глюкуронідази через 2–3 місяці після трансформації, було відібрано як більш компетентні

до біолістичної трансформації, порівняно з іншими, виходячи з результатів транзйентної експресії гена *uidA*. Приймаючи до уваги дані гістохімічного аналізу, ми розраховували частоту стабільної трансформації (табл. 3).

Частота трансформації складала від 2,2 до 30 % залежно від генотипу і була найбільшою для генотипу ДК959 × PLS61. В цілому частота трансформації була достатньо високою і відповідала найкращим показникам, отриманим іншими авторами [17–19]. Це свідчить на користь того, що запропонований протокол трансформації є достатньо ефективним для досліджуваних генотипів.

З калюсів, які виявили експресію гена *uidA* або стійкість до фосфінотрицину, було виділено загальну ДНК та проаналізовано методом ПЛР на наявність нуклеотидної послідовності гена *bar*. Для всіх калюсних ліній окрім двох було показано наявність фрагменту очікуваного розміру (рис. 4). Відсутність очікуваного амплікону для двох калюсних ліній кукурудзи може бути пов'язана з низькою якістю ДНК, виділеної з калюсу або його химерністю.

Стійкі до фосфінотрицину калюси перенесли на селективне середовище для індукції регенерації. Через 30–45 діб культивування спостерігали регенерацію пагонів для чотирьох генотипів (табл. 3, рис. 5). Частота регенерації варіювала від 2,2 до 6,8 % і найбільшою бу-

ла у лінії PLS61 та гібриду ДК633266 × PLS61. При культивуванні контрольних нетрансформованих калюсів на селективному середовищі з фосфінотрицином регенерація була повністю відсутня, а на середовищі без гербіциду, частота регенерації варіювала в межах 74,2–99,5%.

Гістохімічний аналіз листків регенерантів виявив активність ферменту β-глюкуронідази (рис. 3, б).

Обговорення. Аналіз транзйентної експресії гена *uidA* через 4 дні після біолістичної трансформації показав її залежність від генотипу калюсу. У гібридів виявляли більший рівень експресії трансгена порівняно з інбредними лініями. Серед ліній найбільшу, на рівні 90 %, експресію гена *uidA* зафіксовано лише у PLS61, яка відома високою регенераційною здатністю в культурі *in vitro* [20]. Серед інших, залучених до дослідження ліній кукурудзи, які представляють поширені в Україні зародкові плазми, експресію даного гена виявили лише 20–70 % калюсів. Разом з тим, усі досліджені гібриди продемонстрували транзйентну експресію гена *uidA* на рівні 100 %. Ці результати співвідносяться отриманим даним з позеленіння калюсів, регенерації рослин на селективному середовищі та гістохімічного аналізу активності β-глюкуронідази в калюсах після тривалої селекції. Отже, генотипи, які виявляли найбільші рівні транзйентної експресії гена β-глюкуронідази виявилися найбільш компетентними до біолістичної трансформації.

Питання залучення до генетичної трансформації ліній чи гібридів F₁ є актуальним у контексті розширення генетичної бази для трансформації кукурудзи та інших перехресно-запильних сільськогосподарських культур. Зазвичай вважається, що генетичну модифікацію треба проводити, використовуючи інбредні лінії, оскільки в результаті можна отримати лінію, сестринську вихідній, яка буде містити трансген, що надає вихідній лінії додаткових властивостей. Використання комерційних ліній для генетичної трансформації технологічно стикається з проблемою низької ефективності індукції калюсогенезу, підтримання калюсної тканини та регенерації рослин. Разом з тим, використання для генетичної трансформації незрілих зародків гібридів F₁, які у своєму генотипі поєднують лінію, яка становить селек-

Таблиця 3. Регенераційна та β-глюкуронідазна активність калюсів кукурудзи після біолістичної трансформації

Генотип	Регенерація, кількість ліній	Частота регенерації, %	GUS-аналіз*, кількість ліній	Частота трансформації, %
PLS61	5	6,8	9	12,2
ДК959 × PLS61	1	5,0	6	30,0
PLS61 × ДК959	0	0	6	12,2
PLS61 × ДК633266	2	2,2	2	2,2
ДК633266 × PLS61	4	6,8	9	15,3

Примітка. * GUS-аналіз — гістохімічний аналіз калюсів на наявність β-глюкуронідазної активності.

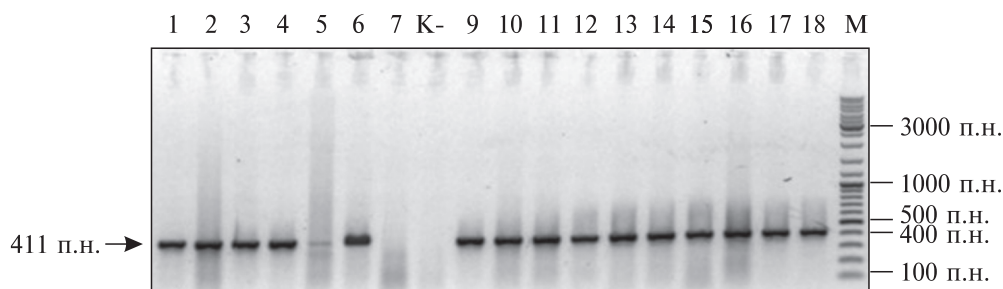


Рис. 4. Електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР ДНК калюсу ліній і гібридів кукурудзи на присутність гена *bar*. Доріжки 1–7, 9–18 – біолістично оброблені калюси: 1 – PLS61; 2 – ДК959 × PLS61; 3 – PLS61; 4–6 – PLS61 × ДК959; 7 – ДК959 × PLS61; 9 – ДК959 × PLS61; 10 – PLS61; 11, 12 – PLS61 × ДК959; 13 – PLS61 × ДК633266; 14–18 – ДК633266 × PLS61; К- – негативний контроль, PLS61; М – маркер молекулярної маси Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Довжина очікуваного фрагмента – 411 п.н.

ційну цінність, та лінію-донора високої калюсогенної та регенераційної здатності, може бути більш ефективним [21]. Відомо, що для генетичної трансформації кукурудзи у світі широко використовується генотип Ні-ІІ, який був відібраний за беккросною схемою з гібрида А188 × В73 [22–25]. Частота утворення ембріогенних калюсів у лінії кукурудзи В73 різко підвищувалася за інтрогресії хромосомних сегментів лінії А188 при класичній беккросній селекції [26]. В цій роботі ембріогенний калюс формували лише 0,2 % незрілих зародків В73. Після схрещування А188 × В73 і 6-ти беккросів на В73 з відборами у кожному поколінні на підвищену частоту утворення калюсів та 4-х самозапилень середня частота утворення ембріогенних калюсів сягнула 46 %. RFLP-аналіз дозволив ідентифікувати сегменти геному А188, інтрогресовані у геном В73. Один з них, розташований у довгому плечі хромосоми 9, був тісно пов'язаний із показниками ефективності індукції морфогенних калюсів і регенерації рослин *in vitro*. Автори припускають, що у цій ділянці розташовується головний ген (гени), відповідальний за калюсогенез і регенерацію, інтрогресія якого в інші генотипи кукурудзи дозволить розширити коло чутливих генотипів. Ці результати та описаний, у тому числі і в наших дослідженнях, факт різкого підвищення чутливості у культурі *in vitro* у гібридів першого покоління порівняно з інбредними лініями, свідчать про переваги використання для безпосередньої біолістичної обробки саме гібридних генотипів, які несуть частку генетичного матеріалу як селекційно

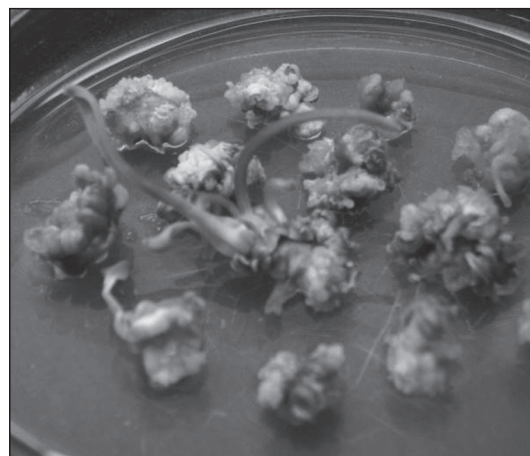


Рис. 5. Регенерація пагонів з калюсу кукурудзи лінії PLS61 на селективному середовищі

перспективних зародкових плазм, так і донорів високої чутливості *in vitro*. При використанні калюсів гібридів для генетичної трансформації для переведення в гомозиготний стан як трансгена, так й інших генів потрібні будуть 5–7 поколінь самозапилення рослин-регенерантів або використання методу матроклинної гаплоїдії з отриманням подвоєнних гаплоїдних ліній впродовж 2–3 років [27–29].

У нашому дослідженні методом ПЛР підтверджено *bar*-позитивний статус калюсів гібридів лінії PLS61 з комерційними лініями української селекції ДК959 зародкової плазми Лакон і ДК633266 плазми Ланкастер. Отже, застосування гібридних незрілих зародків спеціально відібраних генотипів і калюсів, що на них утворюються, як об'єктів для введення ці-

льових генів дозволить значно розширити коло генотипів кукурудзи, які можуть бути безпосередньо модифіковані, зокрема, комерційних зародкових плазм, поширених в Україні. Можна також застосувати стратегію беккресування отриманих трансгенних рослин у поколіннях T_0 – T_6 з лінією комерційної зародкової плазми, яка входить до формули використаного для трансформації гібрида, та відборів за морфологічними і селекційними ознаками комерційної лінії. Серед великого різноманіття гібридних генотипів порівняно з інбредними лініями метод дослідження транзйентної експресії гена β -глюкуронідази дозволить суттєво звужити їхнє коло та відібрати найбільш компетентні до генетичної трансформації, і, таким чином, заощадити зусилля, час та витрати для отримання трансгенних рослин кукурудзи.

Запропонований протокол генетичної трансформації кукурудзи генотипів зарубіжної та вітчизняної селекції, поширених в Україні, який базується на використанні балістичного методу, незрілих зародків з сформованою калюсною тканиною як експлантів та фосфінотрицину як селективного агента, виявився ефективним для отримання трансгенних калюсних ліній кукурудзи та рослин-регенерантів. У нашому дослідженні показано, що фосфінотрицин як селективний агент у середовищах для індукції калюсогенезу та регенерації має інгібуючу дію на проліферацію калюсної тканини кукурудзи як в умовах темряви, так і освітлення. Проте, його негативний вплив виявляється суттєвіше саме на регенераційному, а не на калюсогенному етапі розвитку *in vitro*, що цілком зрозуміло, виходячи з механізму дії гербіциду, результатом якої є порушення азотного обміну рослинної клітини та накопичення аміаку, котрий продукується у процесі фотосинтезу в токсичній кількості. Тому, саме на середовищі для індукції регенерації яскраво проявився вплив проведеної селекції з використання фосфінотрицину після генетичної трансформації, коли вдалося отримати частоту регенерації рослин на рівні 2,2–6,8 %, тоді як без генетичної трансформації на селективних середовищах з фосфінотрицином вона дорівнювала нулю.

Висновки. В результаті біолістичної генетичної трансформації калюсної тканини geno-

типів кукурудзи, зареєстрованих в Україні, 5-ти інбредних ліній (PLS61, ДК959, RS15, ДК633266, ДК267) та 5-ти гібридів F_1 (PLS61 $\times$ ДК959, ДК959 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ ДК633266, ДК633266 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ КП7), вектором рАНС25 було отримано трансгенні калюси та рослини-регенеранти. За результатами дослідження транзйентної експресії гена β -глюкуронідази були виділені 6 генотипів кукурудзи як найбільш компетентні до генетичної трансформації. Найбільшу транзйентну експресію гена *uidA* серед інбредних ліній продемонструвала PLS61, а серед гібридів – PLS61 $\times$ ДК959. Відібрано стійкі до фосфінотрицину калюсні лінії кукурудзи 5-ти генотипів. Виявлено активність β -глюкуронідази в калюсних клітинах, стійких до гербіциду, та методом ПЛР доведено присутність гена *bar* в ДНК калюсів. На селективних середовищах відбулася регенерація рослин 4-х генотипів: PLS61, ДК959 $\times$ PLS61, PLS61 $\times$ ДК633266, ДК633266 $\times$ PLS61. Найвищою частотою регенерації після біолістичної обробки та культивування на фоні фосфінотрицину вирізнялися лінія PLS61 та гібрид ДК633266 $\times$ PLS61. Показано, що фосфінотрицин як селективний агент у середовищах для індукції калюсогенезу та регенерації має інгібуючу дію, а його вплив суттєво блокує життєдіяльність калюсної тканини генотипів кукурудзи саме на регенераційному етапі розвитку *in vitro*. Частота стабільної трансформації складала від 2,2 до 30 % залежно від генотипу. Найбільшу частоту стабільної трансформації спостерігали у гібрида ДК959 $\times$ PLS61 та лінії PLS61. Показано відповідність результатів з транзйентної експресії гена β -глюкуронідази в калюсах різних генотипів до результатів з отримання стабільних трансформаційних подій. Дослідження транзйентної експресії гена *uidA* являється корисним для відбору компетентних до біолістичної трансформації генотипів кукурудзи.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Роботу виконано згідно Програми наукових досліджень 23 «Біотехнологія і генетика в рос-

лінництві» за завданням 23.00.01.06Ф «Розробити фундаментальні основи молекулярно-генетичних і клітинних біотехнологій для селекційного поліпшення кукурудзи, № державної реєстрації 0116U001246 (ДУ Інститут зернових культур НААН України) та програмно-цільової і конкурсної тематики НАН України за 2015–2019 рр. номер П-5-15 «Використання молекулярних та клітинних технологій для отримання біотехнологічних рослин пшениці та кукурудзи, стійких до гербіциду гліфосату» (№ держреєстрації 0115U004187) Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

APPLICATION OF BETA-GLUCURONIDASE TRANSIENT EXPRESSION FOR SELECTION OF MAIZE GENOTYPES COMPETENT TO GENETIC TRANSFORMATION

I.O. Nitovska, O.Ye. Abrahimova, V.P. Duplij, K.V. Derkach, T.M. Satarova, V.A. Rudas, V.Yu. Cherchel, B.V. Dziubetskyi, B.V. Morgun

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
03143, Kyiv, Akademika Zabolotnoho Street, 148,
Institute of Grain Crops, National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine
49600, Dnipro, Volodymyr Vernadsky Street, 14
E-mail: molgen@icbge.org.ua

Genetic transformation of inbred lines and maize hybrids F_1 , registered in Ukraine, has been carried out. The study used a biolistic method for the genetic transformation of maize immature embryos that formed callus tissue, pAHC25 vector containing the genes of phosphinothricin-N-acetyltransferase (*bar*) and β -glucuronidase (*uidA*). As a result of the transformation of callus tissue of maize genotypes, resistant to phosphinothricin lines and regenerated plants were obtained. The activity of β -glucuronidase in herbicide-resistant calli was detected. The presence of *bar* gene in the calli DNA was demonstrated by PCR method. The rate of stable transformation ranged from 2,2 to 30 % depending on genotype. The relationship of transient expression results of β -glucuronidase gene and stable genetic transformation was observed. The proposed protocol for the genetic transformation of maize using a transient expression study of β -glucuronidase gene allows for a significant simplification of selection of competent to genetic transformation genotypes and creation of transgenic organisms with new traits.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА БЕТА-ГЛЮКУРОНИДАЗЫ

ДЛЯ ОТБОРА ГЕНОТИПОВ КУКУРУДЗЫ, КОМПЕТЕНТНЫХ К ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

И.А. Нитовская, О.Е. Абраимова, В.П. Дуплий, К.В. Деркач, Т.М. Сатарова, В.А. Рудас, В.Ю. Черчель, Б.В. Дзюбецкий, Б.В. Моргун

Проведена генетическая трансформация инбредных линий и гибридов F_1 кукурудзы, зарегистрированных в Украине. В исследовании был использован библистический метод генетической трансформации незрелых зародышей кукурудзы, которые образовывали каллусную ткань, и вектор pAHC25, который содержал гены фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы (*bar*) и β -глюкуронидазы (*uidA*). В результате трансформации каллусной ткани генотипов кукурудзы получены устойчивые к фосфинотрицину каллусные линии и растения-регенеранты. Выявлена активность β -глюкуронидазы в каллусах, устойчивых к гербициду, и методом ПЦР показано присутствие гена *bar* в ДНК каллусов. Частота стабильной трансформации составляла от 2,2 до 30 % в зависимости от генотипа. Наблюдали взаимосвязь результатов транз'єнтной экспрессии гена β -глюкуронидазы и стабильной генетической трансформации. Предложенный протокол генетической трансформации кукурудзы с использованием исследования транз'єнтной экспрессии гена β -глюкуронидазы позволяет значительно упростить процесс отбора генотипов, компетентных к генетической трансформации, и создавать трансгенные организмы с новыми признаками.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ji, Q., Xu, X., and Wang, K., Genetic transformation of major cereal crops. *Int. J. Dev. Biol.*, 2013, vol. 57, pp. 495–508. doi: 10.1387/ijdb.130244kw.
2. Lu, A., Diehn, S., and Cigan, M., Maize protein expression. In: *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*, K. Azhakanandam et al. (eds.), Springer Science+Business Media, LLC, 2015, pp. 3–40. doi: 10.1007/978-1-4939-2202-4_1.
3. Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., and Van Lijsebettens, M., Higher plant transformation: principles and molecular tools. *Int. J. Dev. Biol.*, 2013, vol. 57, pp. 483–94. doi: 10.1387/ijdb.130232mv.
4. Sidorov, V.A., Plant tissue culture in biotechnology: recent advances in transformation through somatic embryogenesis. *Biotechnologia Acta.*, 2013, vol. 6, no. 4, p. 118–31. doi: 10.15407/biotech6.04.118.
5. Jefferson, R.A., Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1987, vol. 5, pp. 387–405. doi: 10.1007/BF02667740.

6. Christensen, A.H., Quail, P.H., Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgen. Res.*, 1996, vol. 5, pp. 213–18. doi: 10.1007/BF01969712.
7. Derkach, K.V., Abraimova, O.E., and Satarova, T.M., Morphogenesis *in vitro* in maize inbred lines from the Lancaster heterotic group. *Cytol. Genet.*, 2017, vol. 51, no. 1, pp. 48–53. doi: 10.3103/S00-95452717010030.
8. Finer, J.J., Vain, P., Jones, M.W., and McMullen, M.D., Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.*, 1992, vol. 11, pp. 323–28. doi: 10.1007/BF00233358.
9. Nitovska, I.O., Duplij, V.P., Rudas, V.A., Abraimova, O.E., Satarova, T.M., and Morgun, B.V. Optimization of the conditions of transformation of maize callus tissues by the detection of transient expression of gene of β -glucuronidase. *Achievements and Problems of Genetics, Breeding and Biotechnology*, 2012, vol. 4, pp. 587–92. [In Ukrainian] ISBN 978-966-171-543-0.
10. Murashige, T., Skoog, F., A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Planta*, 1962, vol. 15, pp. 473–97. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
11. Somma, M., Extraction and purification of DNA. Session 4. In: *Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms – User Manual*. Edited by M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede. European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg, 2006, 229 pp. ISBN 92-79-02242-3.
12. Nitovska, I.O., Abraimova, O.Ye., Satarova, T.M., Shakhovsky, A.M., and Morgun, B.V., Biolistic transformation of immature maize embryos. *Faktori Eksperimental'noi Evolucii Organizmiv*, 2014, Kyiv, vol. 15, pp. 112–17. [In Ukrainian] ISSN 2219-3782 <http://utgis.org.ua/journals/index.php/Faktory/article/view/313>.
13. McDonald, J.H. *Handbook of Biological Statistics*, (3rd ed.) Maryland, Baltimore: Sparky House Publishing, 2014. <http://www.biostathandbook.com/>
14. Gordon-Kamm, W.J., Spencer, M., Mangano, M.L., Adams, T.R., Daines, R.J., Start, W.G., O'Brien, J.V., Chambers, S.A., Adams, W.R. Jr, Willetts, N.G., Rice, T.B., Mackey, C.J., Krueger, R.W., Kausch, A.P., and Lemaux, P.G., Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, 1990, vol. 2, pp. 603–18. doi: 10.1105/tpc.2.7.603.
15. McElroy, D., Blowers, A., Jenes, B., and Wu, R., Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act 1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 231, pp. 150–60. doi: 10.1007/BF00293832.
16. Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T., and Kumashiro, T., High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.*, 1996, vol. 14, pp. 745–50. doi: 10.1038/nbt0696-745.
17. Shou, H., Frame, B.R., Whitham, S.A., and Wang, K., Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed.*, 2004, vol. 13, pp. 201–8. doi: 10.1023/B:MOLB.0000018767.64586.53.
18. Brettschneider, R., Becker, D. and Lörz, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, vol. 94, no. 6–7, pp. 737–48. doi: 10.1007/s001220050473.
19. Ower, R.A., Matheka, J.M., Ali, A.I.M. and Machuka, J. Transformation of tropical maize with the *NPK1* gene for drought tolerance. *Int. J. Genet. Eng.*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 7–14. doi: 10.5923/j.ijge.20130302.01.
20. Abraimova, O.E., Piralov, G.R., and Satarova, T.M., Biotechnological characteristics of callusogenesis in maize immature embryo culture under the influence of abscisic acid and 6-benzylaminopurine. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Medicine*, 2010, vol. 1, no. 1, pp. 3–8. doi: 10.15421/021001.
21. Abraimova, O.Ye., Nitovska, I.O., Morgun, B.V., Dzhibetsky, B.V., Cherchel, V.Yu., Derkach, K.V., and Satarova, T.M., Method of transformation and selection of maize/Patent of Ukraine for Invention No. 117974. Owners: Institute of Grain Crops of the National Academy of Sciences of Ukraine, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine. Registered in the State Register of Patents of Ukraine for Inventions on 10/25/2018, Bul. no. 20. [In Ukrainian].
22. O'Kennedy, M.M., Stark, H.C., and Dube, N. Biolistic-mediated transformation protocols for maize and pearl millet using pre-cultured immature zygotic embryos and embryogenic tissue. *Methods Mol. Biol.*, 2011, vol. 710, pp. 343–54. doi: 10.1007/978-1-61737-988-8_23.
23. Armstrong, C.L., Parker, G.B., Pershing, J.C., Brown, S.M., Sanders, P.R., Duncan, D.R., Stone, T., Dean, D.A., De Boer, D.L., Hart, J., Howe, A.R., Morrish, F.M., Pleau, M.E., Petersen, W.L., Reich, B.J., Rodriguez, R., Santino, C.G., Sato, S.J., Schuler, W., Sims, S.R., Stehling, S., Tarochione,

- L.J., and Fromm, M.E., Field evaluation of European corn border control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Sci.*, 1995, vol. 35, no. 2, pp. 550–57. doi: 10.2135/cropsci1995.0011183X003500020045x.
24. Frame, B.R., Main, M., Schick, R., and Wang, K., Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. *Methods Mol. Biol.*, 2011, vol. 710, pp. 327–41. doi: 10.1007/978-1-61737-988-8_22.
25. Wang, K., Frame, B., Biolistic gun-mediated maize genetic transformation. *Methods Mol. Biol.*, 2009, vol. 526, pp. 29–45. doi: 10.1007/978-1-59745-494-0_3.
26. Armstrong, C.L., Romero-Severson, J., and Hodges, T.K., Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 1992, vol. 84, no. 5–6, pp. 755–62. doi: 10.1007/BF00224181.
27. Prigge, V., Melchinger, A.F., Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods Mol. Biol.*, 2012, vol. 877, pp. 161–72. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_13.
28. Satarova, T.N., Cherchel, V.Yu., and Cherenkov, A.V., *Kukuruza: biotekhnologicheskie i selekcionnye aspekty gaploidii [Maize: biotechnological and breeding aspects of haploidy]*. Dnepropetrovsk: Novaya ideologiya, 2013. [in Russian].
29. Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., Hamblin, J., and Liu, C., Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Front. Plant Sci.* 2017, vol. 8, no. 1786. doi:10.3389/fpls.2017.01786.

Надійшла в редакцію 24.01.19
Після доопрацювання 28.02.19
Прийнята до друку 18.11.19