

УДК 58.085:58.084.1:57.085.23:633.11

## Восприимчивость к агробактериальной трансформации мезокотилей кукурузы и регенерация из них растений в культуре *in vitro*

© 2017 В.Н. ОВЧИННИКОВА<sup>1,\*</sup>, В.С. СОТЧЕНКО<sup>2</sup>, Ю.В. СОТЧЕНКО<sup>2</sup>, Н.В. ВАРЛАМОВА<sup>1</sup>, М.А. РОДИОНОВА<sup>1</sup>, П.Н. ХАРЧЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ВНИИ СБ), 127550, Москва

<sup>2</sup>ФБГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт кукурузы» (ВНИИ кукурузы), 357528, Пятигорск

\*e-mail: vera.ovchinnikova.1957@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.2016

Принята в печать 11.07.2016

Исследовали компетентность к агробактериальной трансформации мезокотилей кукурузы линий 4766, РБ-179, L-1 и L-2 и условия регенерации из них растений. Регенерацию мезокотилей кукурузы наблюдали на средах с различным сочетанием ауксинов и цитокининов. Эффективность этого процесса зависела от качественного и количественного состава регуляторов роста. Частота регенерировавших эксплантов и среднее количество побегов, образовавшихся на одном экспланте, увеличивались с повышением концентрации цитокинина 6-БАП и дефолианта Дропп (тидазурон) в среде. Наиболее эффективными для регенерации мезокотилей являются 6-БАП (3–5 мг/л) и Дропп (3 мг/л) в сочетании с ауксинами (ИУК – 0, 5 мг/л и 2,4-Д – 2 мг/л). Количество регенерировавших эксплантов достигало 59,0 %, а среднее число побегов на эксплант – 7,5 за шесть недель культивирования. Укоренение и дорастивание регенерировавших побегов успешно проводили на среде МС с добавлением 0,2 мг/л ИМК. С целью определения компетентности мезокотилей была проведена их генетическая трансформация штаммом *AGLO Agrobacterium tumefaciens*, содержащим генетическую конструкцию pVecActI-GUS, которая кодирует репортерный ген *uidA* под контролем промотора гена актина (*ActI*) риса и содержит селективный ген *hptII*, определяющий устойчивость к гиромидину. У некоторых регенерантов, устойчивых к селективному агенту, методом ПЦР показано наличие вставки гена *hptII* в геном растения. Таким образом, установлена возможность использования мезокотилей кукурузы в качестве эксплантов для агробактериальной трансформации.

**Ключевые слова:** ауксины, 2,4-Д, Дропп, ИУК, ИМК, кинетин, НУК, регенерация *in vitro*, 6-БАП, *Agrobacterium*-опосредованная генетическая трансформация (АТМТ), цитокинины, *Zea mays* L.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-1-62-71

Кукуруза является одной из ведущих злаковых культур в мировом сельскохозяйственном производстве. Она используется в качестве пищевого, технического и кормового продукта. Увеличение производства этой культуры является актуальной проблемой, решение которой требует реализации современных биотехнологических методов и подходов, таких как генетическая инженерия и клеточная селекция, с целью создания высокопродуктивных линий и гибридов, устойчивых к заболеваниям, вредителям и неблагоприятным факторам среды.

Эти методы базируются на возможности культивирования и регенерации клеток растений в условиях *in vitro*, и их эффективность в значительной степени зависит от морфогенетического потенциала культуры. Выявление генотипов и видов эксплантов, быстро и эффективно реагирующих на индукцию соматического эмбриогенеза, оптимизация питательных сред и условий культивирования – необходимы в начальной стадии для успешного проведения последующих биотехнологических процессов в растениеводстве.

**Список сокращений:** 6-БАП – 6-бензиламинопурин; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; Дропп – тидазурон; ИМК – β-индолилмасляная кислота; ИУК – индолилуксусная кислота; МС – минеральные соли; НУК – α-нафтилуксусная кислота; ОП – оптическая плотность; АТМТ (*Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation) – *Agrobacterium*-опосредованная генетическая трансформация.

Основные проблемы, связанные с реализацией морфогенетического потенциала кукурузы – это низкая частота каллусообразования и регенерации побегов, а также снижение уровня тотипотентности клеток при их длительном культивировании.

Гормональный состав культуральной среды – один из наиболее важных факторов, влияющих на положительный результат при культивировании тканей кукурузы [1, 2]. Так, при определенных соотношениях экзогенных регуляторов роста происходит дедифференциация тканей экспланта (образование каллуса) или редифференциация каллуса (индукция морфогенеза).

Особенностью злаков является то, что индукция каллусообразования у них происходит при высоком содержании ауксинов [2–6]. В работе с кукурузой наиболее часто применяют синтетический ауксин 2,4-Д; при этом для формирования эмбрионного каллуса оптимальными считаются концентрации 2, 4-Д до 3 мг/л. Более высокое содержание ауксина (6 мг/л) приводит к формированию неэмбрионного каллуса [7].

Совместное использование цитокининов и ауксинов является необходимым условием индукции соматического эмбриогенеза у кукурузы [8–10], и из всех видов цитокининов при работе с этой культурой предпочтение отдается 6-БАП [8]. Показано, что добавление 6-БАП даже в незначительных концентрациях (0,1 мг/л) является определяющим для индукции эмбриогенеза каллуса кукурузы при всех уровнях концентраций 2,4-Д (до 10 мг/л). В отсутствие цитокининов в среде уровень регенерации снижается [7].

В случае, когда для получения регенерантов кукурузы используют не щитки зародышей, а другие виды эксплантов – апикальные меристемы или сегменты стеблей цитокинины (предпочтительно 6-БАП) также применяют совместно с ауксинами [11–15].

Однако традиционным видом эксплантов при регенерации *in vitro* однодольных культур и, в частности, кукурузы остаются щитки зародышей, чаще – незрелых [1–4, 16, 17], иногда – зрелых [9, 18, 19]. Незрелые зародыши способны формировать эмбрионный каллус, обеспечивающий достаточно высокую частоту регенерации. Однако доступность незрелых зародышей ограничена сезонностью или большими инвестициями, связанными с тепличным культивированием донорных растений кукурузы. В то же время, зрелые зародыши хотя и доступны в течение всего года, обладают в сравнении с незрелыми более низкими каллусогенным и регенерационным потенциалами. Все это сдерживает применение ге-

нетической трансформации для ряда селективно ценных линий и сортов.

В связи с этим важно вести поиск новых видов эксплантов, обладающих высоким регенерационным потенциалом и оптимизировать состав культуральных сред. Это позволит обеспечить высокий и стабильный выход регенерантов.

В последнее время ряд исследователей использует для успешной регенерации и агробактериальной трансформации такие альтернативные виды эксплантов кукурузы, как апикальные меристемы побегов [11–13], а также сегменты побегов [14, 15, 20, 21], которые обладают выраженным и длительным морфогенетическим потенциалом и высоким уровнем компетентности к *Agrobacterium tumefaciens*.

Способностью к тотипотентности обладают не все ткани растений, в особенности злаковых. Это зависит от возраста экспланта, активности клеточных делений и баланса эндогенных/экзогенных регуляторов роста.

Мезокотили кукурузы – это ткань, располагающаяся в переходной зоне между побегом и корнем и выполняющая транспортную, синтетическую и распределительную функции. Здесь происходит тканеспецифический синтез и накопление значительного количества аминокислот. Вдоль всей длины мезокотилия наблюдается активное деление клеток [22]. Несмотря на эти предпосылки, мезокотили кукурузы редко используются в качестве эксплантов для регенерации [15] и их реакция на экзогенные гормоны не изучена, так как они попали в поле зрения исследователей относительно недавно.

При изучении условий индукции каллусогенеза и регенерации различных видов эксплантов кукурузы всегда отмечается зависимость этого процесса от генотипа исходных растений. При этом значительная часть коммерчески ценных генотипов обладает слабой способностью к регенерации в культуре *in vitro*.

В связи с этим, а также учитывая фактор зависимости регенерации от генотипа, характерный для кукурузы, целью настоящего исследования было определить оптимальную комбинацию регуляторов роста для каждого из четырех генотипов перспективных линий кукурузы отечественной селекции (4766, РБ-179, L-1 и L-2) с целью получения эффективной и воспроизводимой системы их регенерации и проанализировать компетентность данных генотипов к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации мезокотилей. Исходя из поставленной цели, основная задача заключалась в изучении влияния экзогенных регуляторов роста на индукцию морфогенеза изолированных мезокотилей кукурузы.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали селекционно перспективные линии кукурузы, полученные во ВНИИ кукурузы – 4766, РВ-179, L-1 и L-2. L-1 – раннеспелая линия, являющаяся родительской формой для двух гибридов. Недостаток этой линии заключается в восприимчивости к вредителям, пыльной и пузырчатой головне. L-2 – ультраранняя линия, является отцовской формой для двух раннеспелых гибридов; ее недостаток – восприимчивость к пыльной головне. РВ-179 – раннеспелая холодоустойчивая линия, отцовская форма для трех гибридов. 4766 – трехлинейный ультраранний гибрид, недостатком которого является восприимчивость к пыльной и пузырчатой головне.

**Стерилизация семян.** Зрелые семена кукурузы стерилизовали 20 мин в 70%-ном спирте, а затем 20 мин в 20%-ном растворе «Белизна» и после этого трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена помещали в пробирки (рис. 1) на безгормональную среду, содержащую  $\frac{1}{2}$  концентрации МС [23]. Семена культивировали на рассеянном свете при температуре от 21°C до 23°C.

**Культивирование мезокотилей кукурузы.** У 7–10-дневных проростков изолировали мезокотили и помещали их в чашки Петри приблизительно по 20 эксплантов (рис. 2). Использовали три повторности. Мезокотили культивировали в климокамере Sanyo WLR-351H (Япония) при температуре от 22°C до 25°C, освещенности 4 клк и 16-часовой продолжительности светового дня.

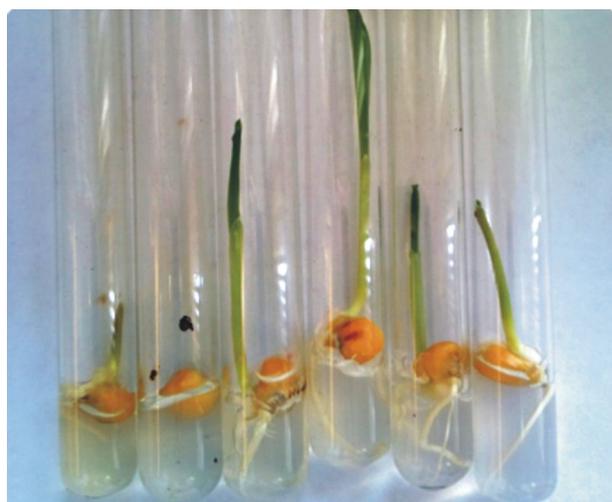


Рис. 1. Выращивание донорных растений для изоляции мезокотилей

Fig. 1. Growing of donor plants for mesocotyle extraction

**Изучение регенерационного потенциала мезокотилей** используемых генотипов кукурузы проводили на средах, содержащих гормоны цитокининовой (6-БАП, Дропп, кинетин) и ауксиновой (2,4-Д, ИУК, НУК) природы (Sigma-Aldrich (США)) в различных сочетаниях и соотношениях (табл. 1).

Учет количества регенерировавших эксплантов и побегов на них проводили через 4 и 6 нед культивирования на индукционных средах. Статистическую обработку выполняли с использованием пакета статистического анализа Microsoft Office Excel.

**Генетическая конструкция.** Для трансформации кукурузы использовали генетическую конструкцию pVecActI-GUS на основе экспрессионного вектора pVec035 [24], кодирующую репортерный ген *uidA* под контролем промотора *Act1* риса и содержащую селективный ген *hptII*.

**Проверка трансформантов методом ПЦР.** ДНК из растительных тканей выделяли в соответствии с методом, предложенным Kang и Yang [25]. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре Nanodrop (США). Качество выделения и чистоту нуклеиновых кислот определяли по отношению ОП<sub>260</sub>/ОП<sub>280</sub>. ПЦР проводили в объеме 50 мкл в амплификаторе Mj Mini (BioRad, США). ПЦР осуществляли по схеме: денатурация – 94°C, 2 мин; элонгация – 35 циклов: 94°C, 30 с; 62°C, 30 с; 72°C, 30 с; отжиг – 72°C, 5 мин. Для разделения продуктов амплификации использовали электрофорез в 1%-ном агарозном геле (Helicon, Россия) в присутствии бромистого



Рис. 2. Посадка мезокотилей на культуральную среду

Fig. 2. Planting of mesocotyles onto culture medium

этидия (Invitrogen, США). Визуализацию продуктов амплификации осуществляли при помощи трансиллюминатора УВТ1 (Россия). Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли с помощью маркеров Gene Ruler 1kb DNA Ladder или Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, США). Присутствие целевой вставки в геноме растения оценивали с использованием праймеров к гену устойчивости к антибиотику гигромицину (20 мг/л) (Invitrogen, США). Отсутствие контаминации агробактерией в образцах проверяли с использованием праймеров, специфичных для бактериальных генов семейства *VirE* (*virE-f*: CGA-ATACATTCTCGTGCGTCAAACG и *virE-r*: TTT-CGAGTCATGCATAATGCCTGAC). Праймеры предоставлены фирмой «Синтол» (Россия).

В качестве контроля при исследовании ДНК полученных регенерантов использовали препараты нетрансгенного растения кукурузы (линии 4766) и трансгенной кукурузы линии *MON 810* («Синтол», Россия), а также *A. tumefaciens*, штамма AGLO (любезно предоставлен лабораторией стрессоустойчивости ВНИИ СБ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали регенерационную активность четырех отечественных генотипов кукурузы, которые являются перспективными для дальнейшей селекционной работы. С этой целью использовали различные комбинации цитокининов и ауксинов в питательной среде (см. табл. 1).

Показатели регенерации мезокотилей на различных по составу средах через 4 и 6 нед культивирования приведены в табл. 2 и 3.

Как видно из данных таблиц 2 и 3, появление первых регенерантов наблюдали уже на 4-й неделе культивирования эксплантов всех четырех генотипов; в отдельных случаях доля эксплантов с побегами достигала 18 % и увеличивалась к 6-й неделе культивирования до 59, 0 % (см. табл. 2, линия L-2, вариант 6).

Регенерация мезокотилей кукурузы осуществлялась по двум направлениям: 1) путем прямого органогенеза, когда регенеранты образовывались непосредственно из тканей первичного экспланта (минуя форму каллуса); 2) путем непрямого морфогенеза, когда образование каллуса имело место. По пути прямого органогенеза регенерация проходила на средах с преобладающим содержанием цитокининов (варианты 1–4, 9–13). Здесь образованию микропобегов предшествовало увеличение эксплантов в размере.

В других же вариантах (5–8), более высокая концентрация ауксинов (НУК – 3 мг/л; 2, 4-Д – 3 мг/л

#### Комбинации регуляторов роста, использованные в работе

#### Growth factors combinations used in this work

Вариант	Содержание среды			
	Цитокинины	мг/мл	Ауксины, мг/мл	мг/мл
1	6-БАП	3	ИУК	0,1
2	6-БАП	5	ИУК	0,1
3	6-БАП	2	2,4-Д	2
4	6-БАП	3	2,4-Д	2
5	6-БАП	2	2,4-Д	3
6	6-БАП	3	2,4-Д	3
7	6-БАП	2	НУК	3
8	6-БАП	0,5	2,4-Д	4
9	Кинетин	3	2,4-Д	2
10	Дропп	2	2,4-Д	2
11	Дропп	3	2,4-Д	2
12	6-БАП	4	НУК	0,5
13	6-БАП	3	2,4-Д	0,5

и более) индуцировала каллусообразование и не прямой эмбриогенез. В то же время, при любом гормональном балансе образование меристематических очагов с последующей регенерацией наблюдали по всей поверхности эксплантов (рис. 3).

На основании полученных данных трудно сделать однозначный вывод о большей эффективности того или иного пути органогенеза. При одинаковом составе и количестве ауксинов в культуральной среде ведущая роль в индукции регенерации мезокотилей исследованных нами генотипов принадлежит цитокининам, и в первую очередь 6-БАП.

Так, например, наиболее активную регенерацию наблюдали у всех генотипов при содержании 6-БАП 5 мг/л и ИУК 0,1 мг/л (вариант 2) (см. табл. 2). Снижение 6-БАП до 3 мг/л (вариант 1) приводило к небольшому снижению интенсивности регенерации. Замена ИУК на другие ауксины (2,4-Д и НУК) в небольших концентрациях существенно не влияло на регенерационный эффект от высоких концентраций 6-БАП (варианты 12, 13).

**Частота регенерировавших эксплантов мезокотилей четырех линий кукурузы на средах с различным сочетанием фитогормонов, наблюдаемая через 4 и 6 недель, %**

Frequency, %, of regenerating mesocotyle explants of four corn lines on media with various phytohormone combinations after 4 weeks and 6 weeks of cultivation

Гормональный фон	Вариант*	4 нед				6 нед			
		4766	L-1	L-2	PB-179	4766	L-1	L-2	PB-179
Высокое содержание цитокининов	1	14,2±2,0	15,0±2,7	14,3±2,0	13,0±2,7	43,5±4,2	45,9±5,0	54,7±3,9	38,8±4,3
	2	17,5±1,9	15,4±2,3	16,1±2,5	13,1±2,9	51,8±3,8	48,6±3,9	57,4±4,8	42,5±5,0
	3	9,7±2,7	10,0±1,9	15,0±2,0	11,3±2,0	37,1±3,1	30,1±4,0	49,0±3,3	37,5±2,9
	4	10,1±1,8	11,4±3,0	16,7±2,9	12,0±2,6	38,7±2,9	35,4±4,6	50,0±4,8	39,0±3,2
Высокое содержание ауксинов	5	9,3±3,0	8,2±2,0	12,0±3,4	9,0±2,4	35,2±4,0	29,3±3,4	41,0±5,3	35,9±5,3
	6	14,1±2,8	11,3±3,9	18,0±3,1	14,3±2,7	39,0±4,3	20,0±4,0	<b>59,0±5,1</b>	44,0±5,4
	7	5,4±1,7	6,0±1,7	8,9±2,2	4,5±2,0	18,3±3,0	33,7±3,9	42,9±4,1	14,3±3,5
	8	3,1±1,3	2,0±1,4	8,0±2,5	2,5±1,1	19,4±2,9	25,0±3,7	29,0±3,8	23,3±3,7
Высокое содержание цитокининов	9	0	5,7±1,7	7,7±2,3	15,1±2,6	5,8±2,3	15,9±3,1	30,0±4,7	33,3±4,3
	10	7,7±2,0	11,8±2,5	13,7±2,4	9,7±2,3	31,4±3,9	27,8±3,1	43,8±5,6	33,1±4,6
	11	10,1±1,7	9,4±2,6	7,7±2,7	12,5±1,9	28,8±2,5	25,9±3,1	50±5,7	34,9±3,9
	12	15,4±3,0	16,5±3,0	14,7±2,0	14,3±2,0	40,3±5,5	43,0±4,9	55,7±3,9	39,5±3,1
	13	15,1±2,7	16,4±2,9	14,0±3,0	15,1±2,4	48,7±4,9	37,4±5,0	50,7±5,1	41,9±5,3

Примечание: полужирным шрифтом показаны данные по экспланту с наиболее высокой частотой генерации.

Data on explant with the highest regeneration frequency are typed bold.

\*Здесь и в табл.3 комбинации регуляторов роста, обозначенные номерами вариантов, см. табл. 1

Here and in Table 3 for numbers of growth factors combinations see Table 1.

С увеличением концентрации ауксинов в культуральной среде наблюдали тенденцию к снижению интенсивности регенерации всеми изучаемыми генотипами (см. табл. 2). Однако и при таком гормональном балансе цитокинины сохраняли определяющую роль в процессе регенерации. Так, с повышением концентрации 6-БАП от 2 мг/л до 3 мг/л при одинаковом уровне 2, 4-Д в среде (2 мг/л) у всех генотипов количество регенерировавших эксплантов увеличивалось (варианты 3 и 4). Аналогично реагировали мезокотили и на более высокое (3 мг/л) содержание 2,4-Д (варианты 5 и 6).

Использованные цитокинины проявили неодинаковую активность в отношении регенерации мезокотилей кукурузы. При сравнении 6-БАП

и Дропп было отмечено несколько более сильное влияние первого (сравни варианты 3 и 10; варианты 4 и 11). Кинетин (3 мг/л, вариант 9) проявил себя как менее эффективный для индукции регенерации однодольных культур гормон [25, 26].

Менее активно регенерация проходила в 7–9 вариантах у генотипов 4766 и PB-179. Эти варианты содержали либо малое количество 6-БАП (0,5 мг/л), либо кинетин (3,0 мг/л) и НУК (2,0 мг/л). В то же время, генотипы L-1 и L-2 положительно реагировали на НУК; регенерация эксплантов у них составила 33,7% и 42,9% соответственно (см. табл. 2, вариант 7).

Генотип материнского растения также оказывает влияние на регенерацию изолированных мезокотилей. Наиболее активную регенерацию на-

Среднее количество побегов-регенерантов, образовавшихся на одном экспланте через 4 и 6 недель на средах с различным сочетанием фитогормонов

Mean number of regenerating shoots per explant on media with various phytohormone combinations after 4 weeks and 6 weeks of culturing

Гормональный фон	Вариант	4 нед				6 нед			
		4766	L-1	L-2	PB-179	4766	L-1	L-2	PB-179
Высокое содержание цитокининов	1	4,8±1,7	2,2±1,1	3,1±1,1	2,7±1,2	4,9±1,7	6,5±2,1	5,4±2,0	4,8±1,7
	2	4,8±2,0	3,1±1,4	3,9±2,0	3,1±1,3	5,3±1,9	6,9±2,4	5,6±2,1	5,1±2,4
	3	3,6±1,6	2,8±1,3	3,3±1,8	2,9±1,7	4,4±1,9	4,8±2,1	5,1±1,9	5,0±2,2
	4	3,9±1,8	2,9±1,6	3,9±1,6	3,4±2,1	5,1±2,1	6,3±2,5	<b>7,4±2,1</b>	5,6±2,7
Высокое содержание ауксинов	5	3,1±1,1	3,0±1,3	3,3±1,2	3,0±1,6	4,2±1,5	5,6±1,9	4,9±1,4	5,0±2,3
	6	3,6±1,4	3,5±1,4	3,3±1,3	3,1±2,0	4,7±2,3	5,9±2,0	<b>6,7±2,3</b>	5,6±2,2
	7	2,4±2,0	1,9±1,2	2,6±1,2	3,4±1,7	3,3±2,2	3,0±1,5	5,0±1,6	4,5±1,9
	8	2,6±1,7	2,2±1,1	2,0±1,7	2,4±1,3	2,9±1,9	3,3±1,3	3,7±2,1	3,1±1,9
Высокое содержание цитокининов	9	0	1,7±1,1	1,3±1,1	2,1±1,2	2,3±1,8	3,1±1,3	3,2±1,1	4,0±1,2
	10	3,3±1,1	3,1±1,1	2,9±2,0	2,7±1,4	4,5±2,3	5,4±2,0	5,7±2,4	4,8±2,0
	11	3,2±1,9	2,9±2,0	3,9±1,3	3,3±1,7	5,1±1,9	6,3±2,0	<b>7,4±1,5</b>	4,4±1,7
	12	4,1±2,0	3,3±1,3	3,8±1,2	3,3±1,4	5,3±2,1	6,0±1,4	<b>7,5±1,8</b>	5,0±2,0
	13	4,3±1,7	3,3±1,8	3,1±1,4	3,0±1,7	5,4±2,0	5,3±1,8	5,4±1,6	5,1±2,0

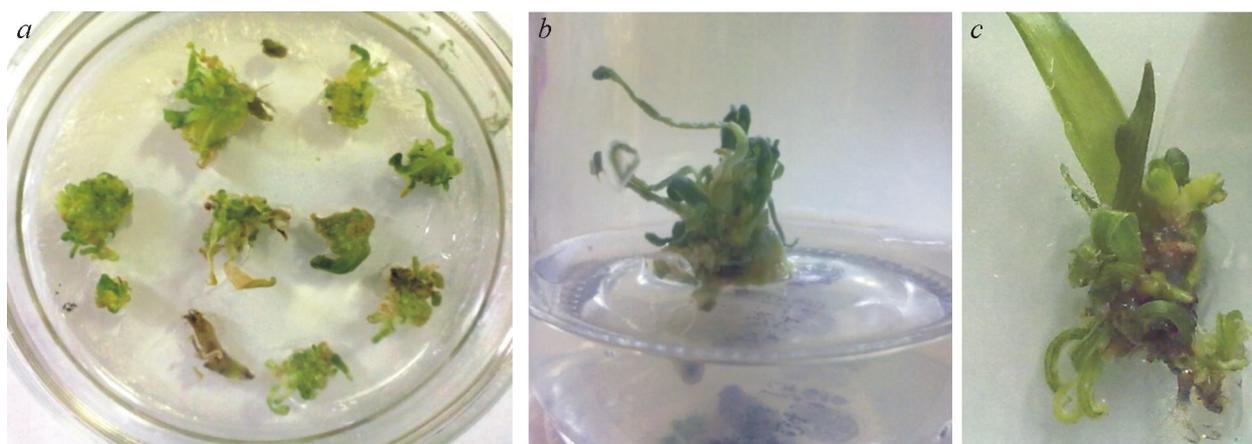
Примечание: полужирным шрифтом показаны данные по эксплантам с наиболее эффективным побегообразованием.  
Data on explants with the most efficient shooting are typed bold.

блюдали у мезокотилей линии L-2, менее эффективную – у 4766 и L-1; максимальный процент регенерировавших эксплантов составил у этих линий 59,0%, 51,8 и 48,6 %, соответственно. Наименьшим этот показатель был у PB-179 – 44,0 %. Необходимо также отметить, что ткани линии L-2 наиболее активно реагировали на гормональный состав среды. Даже при самом неудачном сочетании ауксинов и цитокининов (варианты 8 и 9) доля регенерировавших побегов мезокотилей у данной линии составляла 29,0 и 30,0 % при максимальном значении 33,3% для варианта 9 (см. табл. 2).

Таким образом, предложенные нами комбинации цитокининов и ауксинов интенсивно индуцируют регенерацию мезокотилей у всех тестируемых генотипов.

Среднее количество побегов-регенерантов, образовавшихся на одном экспланте, также находилось в зависимости от гормонального состава среды (см. табл. 3).

Для генотипов 4766, PB-179 и L-2 самое низкое число побегов было характерно при использовании сред с кинетином (см. табл. 3, вариант 9) и/или с малым содержанием 6-БАП на фоне высокой концентрации 2,4-Д (вариант 8). У генотипа L-1 наряду с этими вариантами гормонального состава среды наименьшее побегообразование наблюдали в варианте 7 (6-БАП – 2 мг/л и НУК – 3 мг/л). НУК также не стимулировала побегообразование у генотипов 4766 и L-1 (вариант 7). Во всех остальных случаях, когда концентрация 6-БАП в культуральной среде была высокой (бо-



**Рис. 3.** Образование меристематических очагов с последующей регенерацией (a); отдельные экспланты с регенерантами (b, c)

**Fig. 3.** Formation of meristematic loci with following regeneration (a); individual explants with regenerants (b) and (c)

лее 2 мг/л), даже при высокой концентрации ауксинов (2 мг/л 2,4-Д) отмечали повышенную интенсивность регенерации побегов на эксплантах. При этом у генотипов 4766, PB-179 и L-1 разница в показателях не выглядела достоверной. Только у эксплантов линии L-2 цитокинины в концентрации 3 мг/л и более вызвали достоверно лучшее побегообразование (см. табл. 3, вар. 4, 6, 11 и 12).

В то же время, следует отметить тенденцию к снижению числа побегов с увеличением содержания в среде 2, 4-Д.

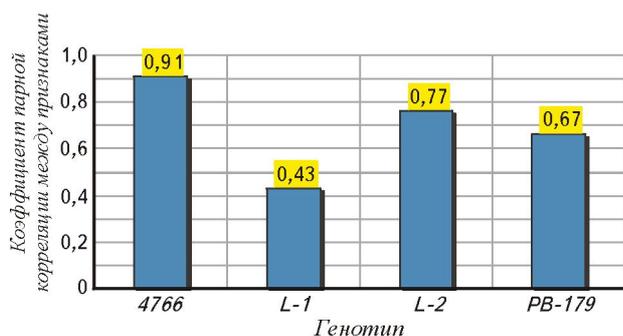
Важным обстоятельством является то, что для всех исследуемых генотипов отмечено незначительное изменение количества образовавшихся побегов при регенерации мезокотилей (средний показатель 4, 9–7,3).

Корреляционный анализ позволил установить наиболее высокую взаимозависимость между регенерационной активностью мезокотилей и количеством побегов на эксплант у генотипа 4766 (рис. 4). Несколько меньший коэффициент парной корреляции характерен для линий L-2 и

PB-179. У L-1 корреляция между регенерацией мезокотилей и количеством образовавшихся на них регенерантов скорее слабая (коэффициент корреляции 0,43). На основании этих показателей, можно сделать вывод, что оба рассматриваемых признака – частота побегообразования мезокотилей кукурузы и регенерационная способность самих эксплантов – а также степень их корреляции зависят от генотипа материнского растения.

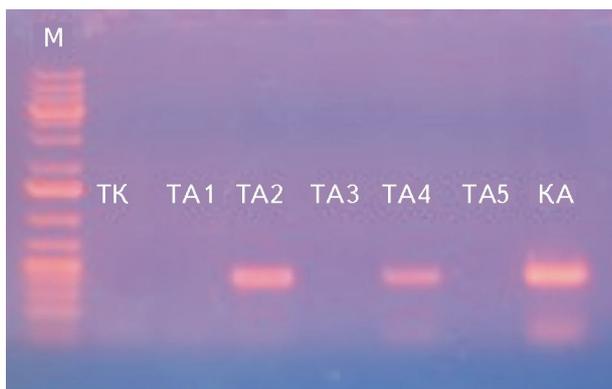
После определенного периода роста регенеранты пересаживали для укоренения на питательную среду, содержащую ИМК в концентрации 0,2 мг/л, и культивировали в климокамере Sanyo WLR-351H (Япония) при температуре от 22°C до 25°C, освещенности 4 клк и 16-часовой продолжительности светового дня. Через 30 дней культивирования доля укоренившихся побегов достигала 90 %.

Затем укоренившиеся побеги кукурузы линии 4766 подвергали агробактериальной трансформации методом, предложенным С.А. Даниловой с соавт. [26]. Отбор трансгенных регенерантов



**Рис. 4.** Корреляция между регенерационной активностью мезокотилей и количеством побегов на эксплант для различных генотипов кукурузы

**Fig. 4.** Correlation between mesocotyle regeneration capacity and shoot number per explant in various corn genotypes



**Рис. 5.** Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента гена *hptII*. Дорожки слева направо: М – маркер молекулярной массы (Gene Ruler 1kb DNA Ladder); ТК – отрицательный контроль (нетрансгенное растение кукурузы); ТА1, ТА2, ТА3, ТА4, ТА5 – продукты амплификации фрагмента гена *hptII* у устойчивых к антибиотику регенерантов; КА – положительный контроль (трансгенная кукуруза *MON 810*)

**Fig. 5.** Electrophoresis of amplification products of gene *hptII* fragment. Lanes from left to right: M, molecular mass marker (Gene Ruler 1kb DNA Ladder); ТК, negative control (nontransgenic corn plant); ТА1, ТА2, ТА3, ТА4 and ТА5, amplification products of gene *hptII* fragment in antibiotic-resistant regenerants; КА, positive control (transgenic corn *MON 810*)

проводили на среде, содержащей селективный антибиотик гигромицин в концентрации 20 мг/л.

У регенерантов, устойчивых к селективному агенту, методом ПЦР проверяли наличие вставки в геном растения по селективному гену устойчивости к антибиотику гигромицину (*hptII*). Было установлено, что в исследуемых образцах этот ген присутствует (рис. 5), что свидетельствует о наличии целевой вставки у части исследованных регенерантов.

Также была проведена ПЦР-диагностика агробактериальной контаминации полученных регенерантов, результаты которой свидетельствовали о ее отсутствии (рис. 6).

Таким образом, мы показали компетентность мезокотилей проростков зрелых зародышей кукурузы отечественной селекции к агробактериальной трансформации.

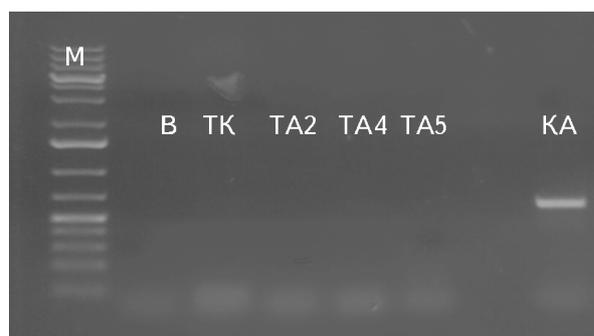
Одним из итогов нашей работы явилось то, что показана возможность использования мезокотилей кукурузы для регенерации четырех генотипов отечественной селекции. Активную регенерацию во всех случаях наблюдали уже через месяц после начала культивирования. Через 6 нед в наиболее эффективных случаях регенерация превы-

шала 50%, что свидетельствует о высоком регенерационном потенциале исследованных генотипов. Оптимальными для регенерации мезокотилей кукурузы являются среды, содержащие 6-БАП в концентрации более 2–3 мг/л в сочетании с небольшим содержанием ауксинов.

В экспериментах с мезокотилиями, так же, как и с другими видами эксплантов, проявилась зависимость регенерации от генотипа. В связи с этим для интенсификации побегообразования целесообразно подбирать оптимальные по составу и концентрации регуляторы роста для конкретного генотипа.

Достаточно высокий коэффициент регенерации создает предпосылки к использованию данного вида эксплантов для проведения генетической трансформации этой культуры. В данной работе показана компетентность мезокотилей кукурузы к агробактериальной трансформации.

Использование мезокотилей по сравнению с растениями упрощает и ускоряет процесс получения эксплантов кукурузы. Этот прием является эффективным и экономически обоснованным, так как позволяет избежать трудоемкого и энергозатратного этапа получения донорных растений



**Рис. 6.** Электрофореграмма продуктов ПЦР с целью контроля агробактериального загрязнения регенерантов (*VirB*). Дорожки слева направо: М – маркер молекулярной массы (Gene Ruler 1kb DNA Ladder); В – вода; ТК – отрицательный контроль (нетрансгенное растение кукурузы); ТА2, ТА4, ТА5 – проверяемые образцы регенерантов; КА – положительный контроль (штамм агробактерии *AGLO*)

**Fig. 6.** Electrophoresis of PCR products in order to assess agrobacterial contamination (*VirB*). Lanes from left to right: M, molecular mass marker (Gene Ruler 1kb DNA Ladder); В, water; ТК, negative control (nontransgenic corn plant); ТА2, ТА4 and ТА5, investigated regenerant samples; КА, positive control (*Agrobacterium AGLO* strain)

в тепличных условиях и, кроме того, устраняет неудобства, связанные с сезонностью. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения мезокотилей для разработки методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации испытанных элитных линий кукурузы.

Работа была выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Биотехнология» ФБГНУ ВНИИ СБ.

## ЛИТЕРАТУРА

- Binott J. Songa J.M., Ininda J., et al. Plant regeneration from immature zygotic embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. *Afr. J. Biotechnol.*, 2008, 7(8). 981–987.
- Frame B.R., Mc Murray J.M., Fonger T.M., et al. Improved *Agrobacterium* mediated transformation of three maize inbred lines using MS salt. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(10). 1024–1034.
- Danson J.W., Lagat M. and Mbogotri M. Screening tropical maize lines for the production and regeneration of friable and embryogenic Type II callus. *Afr. J. Biotechnol.*, 2006, 5(23), 2367–2370.
- El-Itriby H.A., Assem S.K., Hussein E.H.A., et al. Regeneration and transformation of Egyptian maize inbred lines via immature embryo culture and a Biolistic particle delivery system. *In vitro Cell Developmental Plant*, 2003, 39(5), 524–531.
- Odour R.O., Njaji E.N.M., Ndung's S. and Machuka J.S. *In vitro* regeneration of dryland Kenyan maize Genotypes through somatic embryogenesis. *Int. J. Bot.*, 2006, 2(2), 146–151.
- Bi B.M., Kou M., Mao S.P. and Wang H.G. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum*. *Plant Breed*, 2007, 126, 9–12.
- Jia X.X., Zhang J.W., Wang H.N. and Kong W.P. Efficient maize (*Zea Mays* L.) regeneration derived from mature embryos *in vitro*. *Maydica*, 2008, 53, 239–248.
- Hisajima S., and Arai Y. Micripropagation of maize plant through seed culture *in vitro*. *Plant Tissue Culture Letters*, 1987, 4(1), 38–40.
- Huang X.Q., and Wei Z.M. High-frequency plant regeneration through callus from mature embryos of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.*, 2004, 22(11), 793–800.
- Shevelukha V.S., Kalashnikova E.A., Voronin E.S., Kovalev V.M., and Kovalev A.A. Agricultural biotechnology. Moscow: Visshaya Shkola. 2003, 469.
- Li W., Pat M., Kasha R., and Pauls P. Developmental, tissue culture, and genotypic factors affecting plant regeneration from shoot apical meristems of germinated *Zea mays* L. Seedlings. *In vitro Cell Developmental Plant*, 2002, 38(3), 285–292.
- Sairam R. V., Parani M., Franklin G., et al. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation. *Genome*, 2003, 46(2), 323–329.
- Sticker M.B., and Orady H.F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic engineering of cereal crops. *In vitro Cell Developmental Plant*, 2005, 41(3), 187–200.
- Sidorov V., Gilbertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep.*, 2006, 25(4), 320–328.
- Strunin D.E., Sergeeva L.E., and Tischenko E.N. Plant regeneration of maize elite inbred lines by direct organogenesis from seedling segments. *Fiziologiya i Biokhimiya Kulturnykh Rastenii (Physiol. Biochem. Cultivated Plants)*, 2008, 40(2), 164–170.
- Frame B.R. Main M.L., Schick R., and Wang K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos. [Eds. T.A. Thorpe, and E.A. Yeung]. *Plant embryo culture. Methods and protocols. Methods in molecular biology*. Springer Science – Business Media. 2011, 710, 327–341.
- Gorji A.H., Tolnoori M., Jamasbi A., and Fohnodi F. *In vitro* plant regeneration of tropical maize genotypes. International Conference on environmental, biomedical and biotechnology, Singapore: IPCBEE. IACSIT Press, 2011, 16, 52–59.
- Al-Abed D., Redrabhatla S., Talla R., and S. Godma Split-seed: a new tool for maize researches. *Planta*, 2006, 223(6) 1355–1360.
- Pathi K.M. Tula S., Huda K.Md.K., et al. An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). *Plant Signaling Behavior.*, 2013, 8(10). e25891.
- Mikhalska S.I., Adamenko N.I., Morgun B.V. Competance to *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot nodal section segments of corn elite inbred lines. *Biotechnologia Acta*, 2012, 5(3), 98–104.
- Cao Sh., Masilamany P., Li W., and Pauls P. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of corn (*Zea mays*) multiple shoots. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2014, 28(2), 208–216.
- Frolov K.B., and Demchenko N.P. Anatomical structure, growth and development of coleoptyle and mesocotyle of corn seedlings. Fundamental and applied problems in botany at the beginning of XXI century. In: Mat. All-Russ. Conf., Petrozavodsk, September 22–27, 2008: Petrozavodsk: KarNTs RAN, 2008, 237–239.
- Murashige T., and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.*, 1962, 15(3). 473–479.
- Santarini E.R., Trick H.N., Essig J.S., and Finer J.J. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.*, 1998, 17, 752–759.
- Kang, T.J., and Yang M.S. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnol.*, 2004, Sep 2, 4–20.
- Danilova S.A., Kuznetsov V.V., and Dolgikh V.A. A Novel efficient method for maize genetic transformation with usage of *Agrobacterium* monolayer. *Fiziologiya Rastenii (Russian J. Plant Physiol.)*, 2009, 56(2) 285–290.

## Susceptibility of Corn Mesocotyle Culture to *Agrobacterium* Transformation and its *in vitro* Regeneration

V.N. OVCHINNIKOVA<sup>1,\*</sup>, V.S. SOTCHENKO<sup>2</sup>, Yu.V. SOTCHENKO<sup>2</sup>, N.V. VARLAMOVA<sup>1</sup>, M.A. RODIONOVA<sup>1</sup>, and P.N. KHARCHENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow 127550, Russia

<sup>2</sup>The Russian Corn Research Institute, Piatigorsk 357528, Russia

\*e-mail: vera.ovchinnikova.1957@mail.ru

Received May 25, 2016

Accepted July 11, 2016

**Abstract** – The competence to agrobacterial transformation of four corn mesocotyle lines, 4766, RB-179, L-1, L-2 and conditions for their *in vitro* regeneration have been studied. The regeneration of the corn mesocotyles was observed in media containing various auxins and cytokinins combinations. The efficiency of the process depended on qualitative and quantitative compositions of growth regulators. The frequency of regenerated explants and the average number of shoots formed at one explant increased with growing cytokinin 6-BAP and defoliant Dropp (thidiazuron) concentrations in the medium. 6-BAP (3–5 mg/L) and Dropp (3 mg/L) in combination with auxins (IUK, 0.5 mg/L and 2,4-D, 2 mg/L) were shown to be most effective for the mesocotyle regeneration. The number of regenerated explants reached 59.0%, whereas the average number of shoots per explant was 7.5 for 6 weeks of cultivation. The rooting and growing of regenerated shoots was successfully carried out on the MS medium supplemented with 0.2 mg/L IMK. To assess the competence of the mesocotyle, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) was performed using an AGL0 strain containing a genetic construction of pVecActI-GUS that encodes a reporter gene *uidA* under the control of the promoter for the actin-encoding *Act1* rice gene and contains a selection gene *hptII* of hygromycin resistance. A few regenerants with the resistance to the selective agent were shown by PCR to contain the insertion of the antibiotic-resistance gene (*hptII*) in their genomes. Thus, the possibility of using corn mesocotyles as explants for agrobacterial transformation was shown.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), auxins, 6-BAP, cytokinins, 2,4-D, Dropp, IMA, IAA, kinetin, NAA, regeneration *in vitro*, *Zea mays* L.

**Acknowledgements** – The work was performed using the scientific equipment of the Center of Collective Usage *Biotekhnologiya*, RRIAB.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-1-62-71