Agrobacterial transformation of maize by *in planta* and *in vitro* methods: problems and decisions

Fadeev V.V., Mazilov S.I., Ulyanov A.V., Gusev Yu.S., Chumakov M.I.

Institute of biochemistry and physiology of plants and microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

E-mail: vvf2593@gmail.com

Annotation. Problems of agrobacterial transformation of maize by methods *in planta* and *in vitro* are described. Experimental data on optimization of regeneration from transformed embryogenic maize callus of the KM line are presented.

Keywords: maize, Agrobacterium-mediated transformation, regeneration, embryogenic callus

Relevance: currently, the Agrobacterium-mediated plant transformation method is widely used in modern biotechnology, including the CRISPR/Cas system.

Purpose: Regeneration the maize KM line plants from the immature embryo.

Results: The main problem with the agrobacterial transformation of maize by *in planta* method are the seasonality of maize flowering and temperature requirements. The effectiveness of maize transformation by the *in planta* method is also affected by the use of various agrobacterial strains and maize lines, the procedure for applying of agrobacterial cell-pollen suspension to the maize pistil filaments [1].

In the case of agrobacterial transformation of maize by *in vitro* method, one of the problems is to obtain an embryogenic callus from 10-12-day-old embryos. Not all maize genotypes regenerate well from callus cultures [2]. For each type of regenerated plant, it is necessary to select the environment for cultivation. For monocotyledonous plants, regeneration is complicated by a low morphogenic potential.

Experimental data showed that for optimal regeneration from the embryogenic maize callus, it is necessary to add 1 mg/l of 2,4-D and 15 g/l of sucrose to the Murashige-Skoog (MS) medium. With such changes, regeneration was 2 times more intense, compared to the literature described MS media with a content of 1.5 mg/l of 2,4-D and 25 g/l or 30 g/l of sucrose. For rooting regenerants of maize for 3 weeks before planting into the soil, a gradual decrease in the content of sucrose was carried out, which contributed to the formation of adventitious roots. Experiments have shown that the optimal conditions for regeneration and growth were: illumination of 3000-4000 Lux with a 16-hour photoperiod, the temperature is 23-25 °C.

The work was carried out under the program of fundamental scientific research of the state academies of Sciences for 2020 (№ AAAA-A17-117102740101-5) and with the financial support of grants from RFBR-a №20-016-00020 and RFBR-mol-e-a № 20-316-80020.

Проблемы агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta*, *in vitro*

Фадеев В.В., Мазиллов С.И., Ульянов А.В., Гусев Ю.С., Чумаков М.И.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов, Россия

Аннотация. Описаны проблемы агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta*, *in vitro*. Приведены экспериментальные данные оптимизации регенерации трансформированного эмбриогенного каллуса кукурузы линии КМ.

Ключевые слова: кукуруза, агробактериальная трансформация, регенерация, эмбриогенный каллус

Метод агробактериальной трансформации растений широко используется в современной биотехнологии. В том числе в одном из перспективных современных методов геномного редактирования (CRISPR/Cas9).

Целью исследования является описание проблем агробактериальной трансформации кукурузы методами *in planta*, *in vitro*, а также оптимизация регенерации из трансформированного эмбриогенного каллуса кукурузы линии КМ.

Главными проблемами агробактериальной трансформации кукурузы методом *in planta* являются: сезонность цветения кукурузы, трудность соблюдения оптимальной температуры. Эффективность трансформации зависит от использования различных штаммов агробактерий, линий кукурузы, способа и порядка нанесения суспензии агробактериальных клеток и пыльцы на пестичные нити [1].

При агробактериальной трансформации кукурузы методом *in vitro*, одной из проблем является трудность получение эмбриогенного каллуса из 10-12 дневных зародышей. Не все генотипы кукурузы хорошо регенерируют из каллуса [2]. Экспериментальные данные показали, что для оптимальной регенерации из эмбриогенного каллуса кукурузы линии КМ необходимо добавить в среду Мурасиге-Скуга (МС) 1 мг/л 2,4-D и 15 г/л сахарозы. При таких изменениях регенерация происходила в 2 раза интенсивнее, в сравнении с литературно описанными средами МС с содержанием 1,5 мг/л 2,4-D и 25 г/л либо 30 г/л сахарозы. Для укоренения регенерантов на протяжении 3 недель до высаживания в почву, проводили постепенное снижение содержания сахарозы, что способствовало образованию придаточных корней. Подобраны оптимальные условия для регенерации и выращивания: освещённость 3000-4000 люкс, 16 часовой фотопериод, температура 23-25 °C

Работа выполнена по программе фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2020 г. (№ гос. регистрации AAAA-A17-117102740101-5) и при финансовой поддержке грантов РФФИа №20-016-00020 и РФФИ-мол-э-а № 20-316-80020.

1. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Генетика. 2006. Т. 42, №8. С 1083-1088.
2. O'Kennedy M., Lotter-Stark H., Dube N. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 2011. 710. 343-54.