

14. Ratushnyak Y.I., Latypov S.A., Samoylov A.M., Piven N.M., Gleba Y.Y. Introgressive hybridization of tomatoes by 'gamma-fusion' of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. Protoplasts // Plant Sci. – 1991. – 73, N 1. – P. 65–78.
15. Murashige T., Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – 15, N 3. – P. 473–497.
16. Shapiro S.S.; Wilk, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples) // Biometrika. – 1965 – 52, N 3–4. – P. 591–611.
17. Fisher R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance // Philosophical Transactions Royal Society Edinburgh. – 1918. – 52. – P. 399–433.
18. Ihaka R., Gentleman R.R: A language for data analysis and graphics // J. Computational Graphical Statistics. – 1996 – 5. – P. 299–314.

**RATUSHNYAK Y.I., DUPLIJ V.P.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 148, e-mail: yakivr@yahoo.com*

**CERTAIN CHARACTERISTICS OF RHYZOGENESIS IN *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL., *LYCOPERSICON PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM* DUN. AND THEIR CYBRIDS**

**Aims.** Capability for rooting of the peruvian and cultivated parental forms of the tomatoes (*Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. and *Lycopersicon esculentum* Mill.) and their cybrids with reciprocal plastom-genome organization as well as with back transferred chloroplasts was investigated. **Methods.** Shoots of the three different age and order groups of the nine tomato genotypes were grown on MS/2 medium with and without 1-naphtylacetic acid and their capability to multiple or single rhizogenesis estimated. Validity of the results obtained was calculated by variance analysis. **Results.** Among 3888 shoots only 2.1 % were incapable for rooting. One must point out that majority of such shoots was revealed when studying spontaneous rhizogenesis. Multiple regeneration of rootlets was encountered 1.8–4 times often in induced rhizogenesis than single one whereas in spontaneous rhizogenesis single rootlets formation encountered 1.7–4 times often compared to multiple one. In general regeneration of rootlets continues for six-nine days in induced rhizogenesis whereas in spontaneous rhizogenesis it exceeded 10 and even 20 days. **Conclusions.** Diversity of the two related genotypes (Quedlinburger Frühe Liebe i Frühe Liebe cultivars) was supported based on their ability for rooting as well as for four peruvian tomato cybrids clones with backward plastom transferred. Low ability for rooting of 1C clone of the cultivated tomato cybrid serves one more evidence for incompatibility of *L. peruvianum* var. *dentatum* plastom and *L. esculentum* nuclear genome. Both positive and negative correlation of rooting velocity was shown for clone B1A of peruvian tomato cybrid compared with parental species *L. peruvianum* var. *dentatum* what can evidence that rhizogenesis is controlled not only by nuclear genome but plastom as well.

**Key words:** *Lycopersicon esculentum* Mill., *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun., cytoplasmic hybrids, rhizogenesis, variance analysis.

**УДК 577.218:577.29**

**СЕКАН А.С., ІСАЄНКОВ С.В., БЛЮМ Я.Б.**

*ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Україна, 04123, м. Київ 123, вул. Осиповського, 2а, e-mail: ehirta3@gmail.com*

**ВИКОРИСТАННЯ САЙТ-СПЕЦИФІЧНОЇ РЕКОМБІНАЗНОЇ СИСТЕМИ CRE/loxP ДЛЯ ОТРИМАННЯ ТРАНСФОРМАНТІВ *ARABIDOPSIS THALIANA*, ВІЛЬНИХ ВІД МАРКЕРНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ**

Одним із головних напрямків біотехнології рослин є створення генетично модифікованих (ГМ) сортів рослин, використання яких дозволило б покращити якість продуктів харчування [1]. На сьогоднішній день технології створення ГМ

рослин дозволяють привносити в їх геном велику кількість генів інтересу. При цьому під час процесу трансформації разом з геном інтересу привносяться й самі різноманітні маркерні гени (селективні маркерні гени, СМГ), котрих налічується більше, ніж 50 [2]. До них

належать гени стійкості до антибіотиків та гербіцидів [3, 4]. Використання таких генів дозволяє проводити селекційний відбір трансформованих клітин чи тканин на етапі регенерації. Однак, під час подальшого практичного використання ГМ рослин виникає загроза потрапляння СМГ від трансформантів до дикоростучих родичів, що може спричинити виникнення нащадків з небажаними ознаками. Існують також застереження щодо можливості горизонтального перенесення генів. Тому розроблення генетично інженерних методів, за допомогою яких гарантовано можна уникнути такого розвитку подій, дозволило б вирішити ряд проблем, пов'язаних з комерціалізацією ГМ рослин [5].

На сьогоднішній день технологія сайт-специфічних рекомбіназних систем, яка є перспективною у цьому відношенні, набуває все більш широкого застосування [6]. Сайт-специфічна рекомбінація відбувається в районі специфічної послідовності чи сайту розпізнавання. Це призводить до розщеплення або з'єднання цільових послідовностей в результаті інтеграції, делеції чи інверсії фрагментів ДНК без набуття або втрати нуклеотидів. Найбільш відомими рекомбіназними системами, що використовуються для елімінації маркерних генів, є сайт-специфічна рекомбіназна система Cre-loxP, виділена з бактеріофагу P1 [7]. Рекомбіназа Cre належить до родини тирозинових інтеграз, а сама система складається з двох коротких послідовностей ДНК: lox (locus of crossing-over) та гену cre [4].

У ряді робіт описано використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre-loxP під контролем тканинспецифічних промоторів та промоторних послідовностей, виділених з генів теплового шоку. Так, для регуляції роботи системи Cre-loxP використовуються промотор, ідентифікований в зародкових тканинах [8], або індукційний промотор до гену теплового шоку HSP81-1 [9]. Недоліком використання таких послідовностей є необхідність створення специфічних умов для проведення трансформації, або ж залучення додаткових агентів для ініціації експресії рекомбінази. Тому для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від СМГ, нами було розроблено новий підхід до використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre-loxP [10]. Цей підхід характеризується тим, що маркерні гени та цільова послідовність в трансформуючій конструкції знаходяться під контролем -46 мінімального 35S промотору (перші 46 п.н. від

загальної послідовності промотору 35S) з вірусу мозаїки кольорової капусти (CaMV). Використання відповідної ДНК-конструкції в даному випадку передбачає швидку та ефективну трансформацію рослини, а під час трансформації рослинного матеріалу та періоду селекції відпадає необхідність застосування додаткових агентів чи створення специфічних умов зовнішнього середовища. Метою нашої роботи було дослідження ефективності трансформації рослин *Arabidopsis thaliana* за допомогою нового підходу у використанні сайт-специфічної рекомбінази Cre-loxP.

#### Матеріали і методи

Як рослинний матеріал використовували дикий тип *Arabidopsis thaliana* екотипу Columbia. Для одночасного проростання насіння інкубували в темряві при температурі 4 °C протягом двох діб, після чого висаджували в ґрунт та вирощували за тепличних умов. Для трансформації рослин використовували метод квіткового занурення в агробактеріальну суспензію [11]. За декілька днів до трансформації в рослин видаляли первинні суцвіття для стимуляції розвитку вторинних.

Для трансформації рослин було сконструйовано декілька типів ДНК-конструкцій з метою визначення більш ефективний варіант конструкції. За допомогою методу електропорації плазмідами [12] pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC трансформували бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101). Обидві конструкції мають однаковий набір генів. Різниця полягає в їх розташуванні на касеті. ДНК-конструкції містять такі послідовності, як ген рекомбінази cre, репортерний ген gus, ген стійкості до гігromіцину nptII. Послідовності обмежені сайтами ексцизи loxP і знаходяться під контролем 35S промотору та термінуючої послідовності нопалін-синтази (nos). Ген hptII в обох конструкціях винесений за межі сайтів loxP і у випадку здійснення події ексцизи залишається в геномі рослини (рис. 1).

Суспензію *A. tumefaciens* нарощували в рідкому середовищі Лурія-Бертані [13] у присутності гігromіцину (100 мг/л) впродовж 48 год при 28 °C на орбітальному шейкері (180 об/хв). Культуру бактерій осаджували при 4000 об/хв. протягом 5 хв та суспендували в розчині солей Мурасіге та Скуг («Sigma», США), 5 % сахарози, MES («Sigma», США) та манітолу («Sigma», США). Щільність суспензії при оптичній густині 600 нм становила 0,8. Інокуляцію здійснювали шляхом занурення

квіткових бруньок та квіток у бактеріальну суспензію на 1–2 хв. Рослини інкубували 12 год у темряві за умов підвищеної вологості.

Для проведення ПЛР аналізу геному ДНК виділяли за методом [14]. Рослинний матеріал гомогенізували в екстракційному буфері (200 мМ Tris-HCl pH 7,5, 250 мМ NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5 % ДДС натрію). Після осадження бруду супернатант преципітували ізопропанолом та відмивали в 70 % спирті. Сухий залишок ресуспендували у 50 мкл дистильованої води. Чистоту виділеної ДНК визначали за допомогою електрофорезу в 0,8 % агарозному гелі з флуоресцентним барвником бромистим етидієм (5 мкг/мл). До ПЛР-суміші об'ємом 25 мкл додавали 2 мкл розчиненої ДНК, 10 мкМ праймерів в об'ємі 0,5 мкл, 250 мкМ суміші dNTP, десятикратного розчину буферу ПЛР («Sigma», США), 250 мМ MgCl<sub>2</sub> та 0,3 мкл Taq-полімерази («Sigma», США). Для реакції використовували праймери: hptIIF2 (віджиг до 3'-кінця гену *hptII*) і 35StermRevAvrII (олігопослідовність, комплементарна 3'-кінцю 35S промотора). Розмір продуктів ампліфікації 300 п.н. Наявність продуктів ампліфікації за даною парою праймерів свідчить про присутність Т-ДНК в геномі. Видалення ділянок ДНК, обмежених сайтами екзцизиї за допомогою рекомбінази Cre визначали, використовуючи іншу пару праймерів в аналогічній суміші ПЛР. Були використані наступні праймери: rP1-vecprobe1 (послідовність комплементарна до векторної послідовності rORE) та rP1-vecprobe2. Розмір продуктів ампліфікації 1800 п.н. Реакції проводили за умов: початкова денатурація при 94 °С 2 хв; ампліфікація – 30 циклів (92 °С – 30 с, 60– 30 с, 72 °С – 90 с),

кінцева елонгація – 72 °С 5 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2 %-ному агарозному гелі з додаванням бромистого етидію.

### Результати та обговорення

Оскільки метою проведеної роботи була розробка ефективної системи трансформації рослин *A. thaliana* за допомогою використання сайт-специфічної рекомбінази Cre/loxP, на першому етапі роботи були розроблені відповідні ДНК-конструкції. В ряді робіт описано використання сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP під контролем тканиноспецифічних промоторів та промоторних послідовностей, ідентифікованих в складі генів теплового шоку. Так, для регуляції роботи системи Cre/loxP використовують промотор, ідентифікований в зародкових тканинах [8], або індукбельний промотор до гену теплового шоку HSP81-1 [9]. Недоліком використання таких послідовностей є необхідність створення специфічних умов для проведення трансформації, або ж залучення додаткових агентів для ініціації експресії рекомбінази. Тому застосування промотору 35S дозволяє спростити використання запропонованих конструкцій. В той же час, послідовності 35S промотору та pos-термінатора є гарною регулюючою системою для контролю експресії Т-ДНК в рослинному геномі.

Для визначення ефективності використання сконструйованих векторів була здійснена трансформація рослин арабідопсису методом квіткового занурення. Стабільність трансформації вбудованих Т-ДНК визначали за експресією генів *gus* та *cre*.

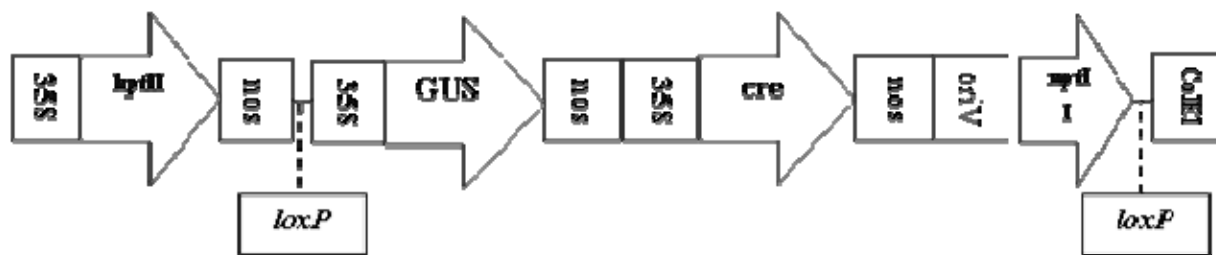


Рис. 1. Схема Т-ДНК конструкції рORE-lox2HGC. 35S-промотор з вірусу мозаїки кольорової капусти, *hptII* – ген стійкості до гігроміцину, *nos* – нопаліновий термінатор, *gus* – ген глюкуронідази, *cre* – ген рекомбінази, *oriV* – сайт початку ініціації реплікації, *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази, ColEI – послідовність, що відповідає за реплікацію плазмід в клітинах бактерії *E. coli*

Окрім цього, завдяки винесеному за межі сайтів ексцизиї селективному гену *hptII* можна було здійснюватися скринінг трансформованих тканин. Було виявлено високу частоту подій трансформації для кожної конструкції. Функціонування Т-ДНК в геномі визначали шляхом проведення гістохімічного аналізу на наявність GUS-активності. В результаті експерименту встановлено, що використання 35S промотору забезпечує стійку експресію гена *gus*. При трансформації за допомогою конструкції pORE-lox1HGC забарвлення за GUS-тестом відмічалось у 78 % трансгенних рослин. Після трансформації pORE-lox2HGC кількість забарвлених за GUS трансформованих рослин становила 85 % від загальної кількості досліджуваних зразків. Отже, використання конструкцій під контролем 35S промотору дає змогу отримати стабільну експресію Т-ДНК в рослинах арабідопсису.

У результаті аналізу ефективності проростання насіння на селективному середовищі (рис. 2) було встановлено, що стабільність трансформації за допомогою обох типів векторних конструкцій (pORE-lox1HGC та pORE-lox2HGC) є високою. Отримані результати свідчать про стабільну експресію кожної з векторних конструкцій в трансформантах. За результатами подальшого аналізу трансформантів за допомогою GUS-тесту трансгенних ліній арабідопсису результати були поділені на три групи: а) лінії, з позитивним результатом GUS-тесту (рослини забарвлювались повністю); б) лінії, в яких були присутні проростки з позитивним і негативним результатом GUS-тесту; в) лінії з негативним результатом GUS-тесту. Відмічено, що в лініях з позитивним результатом GUS-тесту досить велика кількість зразків була забарвлена лише частково (неоднорідне забарвлення тканин або окремих частин рослини), що вказує на виникнення химерності (рис. 3). Неоднорідне забарвлення рослинних тканин свідчить про видалення маркерних послідовностей з геном *gus* не з усього організму, а лише локально. За результатами GUS-тесту з'ясували, що приблизно 25 % досліджуваних ліній, трансформованих ДНК конструкцією pORE-lox1HGC є вільними від маркерних послідовностей, а у 12 % ліній були виявлені як GUS-позитивні, так і GUS-негативні зразки. У лініях, трансформованих ДНК-конструкцією pORE-lox2HGC, відбулась автоексцизія в 15 % від загальної кількості протестованих ліній. Кількість ліній з GUS-позитивними та GUS-негативними рослинами становила 13 %.



Рис. 2. Схожість трансформантів *A. thaliana* на селективному середовищі МС з антибіотиком гігроміцином на 10 день культивування



Рис. 3. Експресія гена *gus* у трансформованих рослинах *A. thaliana* (химерне забарвлення тканини)

### Висновки

У результаті проведеної роботи, продемонстровано ефективне застосування нового підходу з використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи *Cre/loxP* для отримання трансгенних ліній рослин, вільних від маркерних послідовностей та досягнення стабільності експресії Т-ДНК в наступному поколінні трансформантів. За допомогою проведеного гістохімічного аналізу трансформантів відзначена стабільна експресія Т-ДНК в рослинному геномі для обох типів конструкцій. Разом з тим, у деяких трансформантів з позитивним результатом GUS-тесту експресія гена *gus* спостерігалась нерівномірно у різних тканинах рослин, що свідчить про їх химерність (неоднорідне забарвлення тканин). Таким чином можна

вважати, що в наступних поколіннях ліній з химерними зразками сайт-специфічне видалення маркерних послідовностей відбудеться до кінця. Окрім цього вважається, що кількість трансформованих рослин, вільних від маркерних послідовностей, підвищуватиметься з кожним наступним поколінням. Оскільки методика отримання трансформантів з

використанням сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP є простою та не вимагає проходження додаткових етапів для активації роботи рекомбінази. Такий підхід можна ефективно застосовувати для отримання генетично модифікованих рослин, вільних від маркерних послідовностей.

### Література

1. Tuteja N., Verma S., Sahoo R.K., Raveendar S., Reddy L.B. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern // *J. Biosci.* 37. – 2012. – 1. – P. 167–197.
2. Rosellini D. Selectable markers and reporter genes: A well furnished toolbox for plant science and genetic engineering // *Crit. Rev. in Pla.* – 2012. – 31, N 5. – P. 401–453.
3. Yemets A.I., Baird W.V., Blume Ya.B. Modified tubulin genes as selectable markers for plant transformation // In: *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agro-Biotechnology* (Eds Blume Ya.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviario D.). – NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. – 2008. – P. 435–454.
4. Manimaran P., Ramkumar G., Sakthivel K., Sundaram R.M., Madhav M.S., Balachandran S.M. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: Present status and future prospects // *Biotech. Adv.* – 2011. – 29, N 6. – P. 703–714.
5. Рукавцова Е.Б., Лебедева А.А., Захарченко Н.С., Бурьянов Я.И. Пути создания биобезопасных трансгенных безмаркерных растений // *Физиол. раст.* – 2013. – 60, № 1. – С. 17–30.
6. Wang Y., Yau Y.-Y., Perkins-Balding D., Thompson J.G. Recombinase technology: applications and possibilities // *Plant Cell Rep.* – 2011. – 30. – P. 267–285.
7. Sauer B., Henderson N. Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic chromosome by the cre recombinase // *New Biol.* – 1990. – 2. – P. 441–449.
8. Kopertekh L., Schulze K., Frolov A., Strack D., Broer I., Schiemann J. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco // *Plant Mol. Biol.* – 2010. – 72. – P. 597–605.
9. Liu H.K., Yang C., Wei Z.W. Heat shock-regulated site-specific excision of extraneous DNA in transgenic plants // *Plant Sci.* – 2005. – 168. – P. 997–1003.
10. Sekan A., Isaenkov S. New approach in site-specific recombinase Cre/loxP technology for producing of marker-free transgenic plants // In: *7th EPSO Conference “Plants for a Greening Economy”* (Porto Heli, Greece, 1–4 September, 2013). – P. 163.
11. Clough J.S., Bent F.A. Floral dip: simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1998. – 16, N 6. – P. 735–743.
12. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* // Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. – 2001 – P. 2344.
13. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 1984. – 521 с.
14. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA minipreparation: version II // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1983. – 1. – P. 19–21.

**SEKAN A.S., ISAENKOV S.V., BLUME YA.B.**

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: ehirta3@gmail.com*

### DEVELOPMENT OF SITE-SPECIFIC RECOMBINASE SYSTEM CRE/loxP FOR THE PRODUCTION OF MARKER-FREE TRANSGENIC *ARABIDOPSIS THALIANA* PLANTS

**Aims.** One of the main issues in plant biotechnology is the development of marker-free genetically modified species that increase the consumer acceptance. One of the molecular tools that can help to resolve is site-specific recombination. We have developed a rapid and convenient DNA excision method mediated by the Cre/loxP recombination system. **Methods.** Analysis of stable transgenic *Arabidopsis* plants was determined by gistochemical analysis and PCR. **Results.** The aim of this study was to develop a novel Cre/loxP approach based on the *cre* gene expression. After expression recombinase could cause the excision of *nptII* marker gene and the Cre construct itself between the *loxP* sites. The excision event we examined by GUS staining. The results showed high level of unstained transgenes that could mean an excision event of target sequences. **Conclusions.** The development of efficient strategy to generate selectable marker-free transgenic plants could help increase the acceptance of genetically modified (GM) plants in community. Rapid and convenient

DNA excision method mediated by the Cre/loxP recombination system was developed to produce marker-free transgenic plants without conditional treatment or the genetic crossing of offspring. Present study demonstrates that the novel site-specific recombinase Cre/loxP system provides a simple and efficient way to generate marker-free transgenic plants.

*Key words:* genetically modified plants, site-specific recombinase system, transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, PCR analysis, GUS test.

УДК 579.254.2

**СЕРГЕЕВА Л.Е., МИХАЛЬСКАЯ С.И., КУРЧИЙ В.М., ТИЩЕНКО Е.Н.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,*

*Україна, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: svetlana\_mykhalska@mail.ru*

### **ИЗМЕНЕНИЯ В СОДЕРЖАНИИ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ПОБЕГАХ И КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ НА НАЧАЛЬНОЙ СТАДИИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕТАЛЬНЫХ ОСМОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ**

Осмотические стрессы окружающей среды (засоление и водный дефицит) оказывают негативное влияние на рост, развитие сельскохозяйственных культур и их продуктивность. Характерной чертой этих стрессов является продолжительность их воздействия, в случае же засоления речь идёт о постоянном действии стрессового фактора. Вместе с тем в природе существуют дикие виды, а также генотипы культурных растений, отличающиеся повышенным уровнем стресс-устойчивости. Очевидно, что выживание таких растений в критических условиях сопряжено со стабилизацией осмотического и ионного гомеостазов [1–3].

Для компенсации нарушений, вызываемых осмотическими стрессами, растения выработали ряд специальных механизмов, среди которых приоритетную роль играет свободный пролин (*Pro*). *Pro* нередко в больших количествах аккумулируется в растениях в ответ на водный дефицит и засоление. Широко обсуждается его роль как регулятора внутриклеточного осмотического потенциала, стабилизатора клеточных структур и бимополимеров, отмечается участие *Pro* в преодолении оксидативного стресса, а также в процессах восстановления, реабилитации и развития [4–7]. Свойства пролина таковы, что эта аминокислота может оказывать влияние на активность системы своего синтеза/катаболизма/транспорта. Очевидно, что уровень свободного *Pro* в тканях растения в значительной степени отражает эти события.

Ранее нами анализировался уровень аккумуляции свободного пролина в клетках растений, подвергавшихся продолжительным

осмотическим стрессам [8]. В этом случае содержание *Pro* было сопряжено со стабилизацией (поддержанием) процессов жизнедеятельности. Вместе с тем, эффективность выживания в неблагоприятных условиях обеспечивается и скоростью включения/активизации защитных механизмов. В связи с этим встаёт вопрос о характере изменений в содержании свободного пролина в начале стрессового воздействия, что даёт понимание «быстрых» ответных реакций организма. Немаловажное значение при этом имеет выяснение роли ключевых генов синтеза/катаболизма *Pro*. Удобной моделью для таких исследований являются трансгенные растения, в которых изменён уровень экспрессии ключевых генов, контролируемых метаболизм пролина – Д-пирролин-5-карбоксилатсинтазы и пролиндегидрогеназы. Исходя из этого, на начальных этапах воздействия моделированного летального засоления и обезвоживания проводили сравнительное изучение содержания свободного пролина в проростках исходной и трансформированной инбредной линии (Т0), полученной с использованием агробактериального штамма LBA4404, несущего pBi2E с двуцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы.

#### **Материалы и методы**

Объектами исследования были 7-ми суточные проростки инбредной линии кукурузы ЛЗ90, селекции ИФРГ НАН Украины, г.Киев, (контроль) и этой линии, трансформированной *in planta* с использованием LBA4404 (pBi2E с дц-РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы). Рекомбинатный штамм любезно