

8 Huey B., Hall J. Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13 // *J. Bacteriol.*, 1989. 5: 2528-2532.

#### Тұжырым

Қазақтың ұлттық кымыз және шұбат сусындарын алуда қатысатын сүтқышкылды ашытқы продуценттерінің ДНҚ-ларының RAPD анализі бұрынғы сипатталмаған кейбір ашытқы дақылдарының систематикалық орындарың анықтауға мүмкіндік берді.

#### Summary

RAPD-analysis of DNA of microorganisms-producers of Kazakh national milk beverages, kumiss and shoubat, had allowed to specify the systematic position of some previously undefined laboratory cultures of yeasts.

**Бишимбаева Н.К., Ертаева Б.Е., Амирова А.К.,  
Шаяхметова И.Ш., Гусейнов И.Р., Умбетаев И.И., Рахимбаев И.Р.  
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЫЛЬЦЫ  
ХЛОПЧАТНИКА КАЗАХСТАНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ**

(Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы,  
Институт хлопководства МСХ РК, г. Атакент, Казахстан)

*Оптимизирован способ получения трансгенных растений отечественного хлопчатника при помощи метода агробактериальной трансформации пыльцы. Получены трансгенные растения хлопчатника с. Мактаарал 4005 с встроенными репортерным GUS- геном и селективным маркерным nptII- геном.*

Хлопчатник (*Gossypium hirsutum* L.) является важнейшей технической культурой, широко распространен и выращивается в промышленных масштабах как в средней полосе, так и в тропиках в более, чем 50 странах по всему миру. Площади, занятые этой культурой, встречаются в Америке, Австралии, Китае, Индии и на Ближнем Востоке, где климатические условия соответствуют естественным для произрастания этих видов, включая периоды жаркой сухой погоды, и где существуют адекватные условия влажности, часто поддерживаемые с помощью ирригации [1]. Более того, хлопковое волокно не только покрывает потребности текстильной промышленности нашей страны, но и является основой экспорта, наряду с экспортом нефти, зерна и цветных металлов [2]. Культивируемый на полях хлопчатник подвержен абиотическим стрессам, нападением насекомых, вирусному и грибному заражению. Для получения трансгенного хлопчатника с коммерчески ценными признаками был использован, в основном, метод агробактериальной трансформации [3, 4]. В качестве реципиентных систем для генетической трансформации хлопчатника обычно используют различные экспланты – семядоли и гипокотили [5, 6, 7], апексы побегов [8], пыльца [9], эмбрионные каллусные ткани [10]. Отмечено, что агробактериальная трансформация с использованием пыльцы позволяет избежать зависимости от генотипа, занимает мало времени и решает проблему соматической изменчивости. В целом, трансформация хлопчатника развивалась медленно по сравнению с другими сельскохозяйственными культурами. Проблемы, связанные с зависимостью процессов регенерации растений от генотипа ограничивали использование хозяйственно ценных сортов хлопчатника.

Целью данного исследования является оптимизация способа агробактериальной трансформации пыльцы для сорта хлопчатника Мактаарал-4005 казахстанской селекции.

#### Объекты и методы

Объектом исследования служил районированный сорт хлопчатника казахстанской селекции - Мактаарал-4005.

Агробактериальную трансформацию пыльцы проводили по протоколу Li et al. [9], модифицированному нами для сорта Мактаарал-4005. Цветки хлопчатника опыляли пыльцой, трансформированной суспензией *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей плазмиду с репортерным геном глюкоксидазы (*GUS*-ген) и селективным маркерным геном (*nptII*).

Определение экспрессии репортерного *GUS*- гена проводили при помощи метода гистохимического окрашивания растительных эксплантов по Jefferson с соавторами [11] с использованием реактива *X-gluc*. Геномную ДНК выделяли по СТАБ методу [12]. ДНК разделяли в 1% агарозном геле, проявляли этидиум бромидом и анализировали при помощи гель-документирующей системы “BioRad”. Идентификацию встраивания *nptII*- и *GUS*-генов в геном тестируемых растений проводили методом ПЦР на амплификаторе “Eppendorf Personal”.

#### Результаты и их обсуждение

*Агробактериальная трансформация хлопчатника при помощи пыльцы.* Проведена агробактериальная трансформация хлопчатника при помощи трансформированной пыльцы. Пыльцу трансформировали при помощи агробактерии, содержащей плазмиду с *GUS*- и *npt II*- генами, и опыляли ей предварительно кастрированные цветки. В результате из 140 опыленных таким образом цветков было получено 19 коробочек, из которых получено 600 семян. Растения из этих семян выращивали в торфяных горшках и пересаживали в грунт (рисунок 1).

Проведен скрининг потомства этих растений (Т1) на устойчивость к канамицину методом опрыскивания листьев. Отобраны устойчивые растения – предположительные трансформанты.



**Рисунок 1** – Выращивание растений-трансформантов в лабораторных условиях и в грунте.

Проведены эксперименты по оптимизации условий выделения геномной ДНК хлопчатника и проверке качества ДНК при помощи электрофореза. Геномную ДНК выделяли из нетрансформированных растений по СТАБ-методу [12]. Оптимизацию проводили в зависимости от условий выделения (растирание материала в жидком азоте и без жидкого азота в пробирке Эппендорф), навески (100, 200 и 300 мг) и экспланта (листья 3-х месячных растений, семядоли 3-х недельных проростков) (таблица 1). ДНК разделяли в 1% агарозном геле, проявляя красителем этидиум бромид и изучали при помощи гель-документирующей системы “BioRad”.

В результате, оптимизированы условия выделения ДНК хлопчатника, обеспечивающие наибольший выход и качество ДНК: использование навески растительного материала 100 мг и растирание без жидкого азота в пробирке Эппендорф (таблица 1).

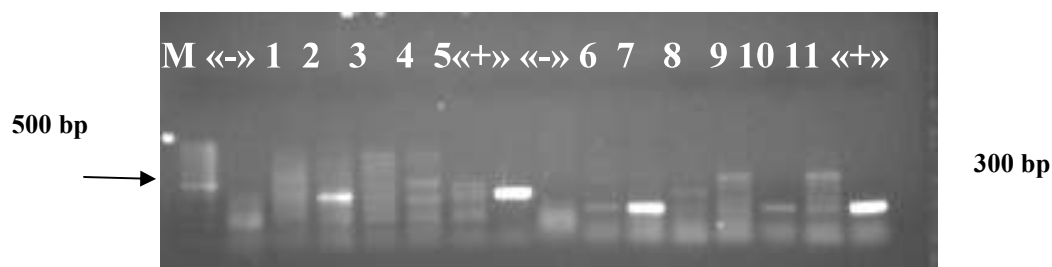
Особенностью метода является использование поливинилпирролидона для связывания эндогенных фенольных соединений, высокий уровень которых значительно снижает чистоту ДНК хлопчатника. Кроме того были использованы антиоксиданты (меркаптоэтанол и аскорбиновая кислота) и для лизиса - детергенты и протеиназа-к. Используя данную процедуру получили выход ДНК 400-450 мкг/г сырой массы листьев 3-х месячных растений, 720 мкг/г сырой массы семядолей 3-х недельных проростков.

Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически. Отношение оптических плотностей D260/D280 было равно 1,99-2,24 (таблица 1), что соответствует отношению экстинкций для чистых препаратов ДНК [13].

Выделена ДНК *GUS*- положительных растений-трансформантов T0 поколения, и при помощи ПЦР для некоторых из них получено молекулярно-биологическое подтверждение встраивания *nrIII*- и *GUS*- генов. Двадцать пять из предположительных растений-трансформантов T0 поколения дали положительную реакцию на *GUS*-тест. Качество ДНК также проверено при помощи электрофореза (рисунок 2). Получены препараты ДНК хлопчатника для использования в качестве негативного контроля при ПЦР.

**Таблица 1**– Количественное определение ДНК хлопчатника

Экспланты	№ Вар-та	Масса навески	Р-р ДНК разб. в 20 раз				Конц. ДНК мкг /мл	Выход ДНК мкг /г сыр. в.
			D260 nm	D280 nm	D260 / D280	Конц. мкг/мл		
Листья	1	100 мг	0,448	0,214	2,09	22,4	448,4	448,4-
	2	200 мг	0,242	0,133	1,82	12,1	242,0	121,0
	3	300 мг	0,485	0,366	1,33	24,3	486,0	162,0
Семядоли	4	100 мг	0,046	0,206	0,22	2,34	46,8	46,8
	5	200 мг	0,077	0,139	0,55	3,89	77,8	38,9
	6	300 мг	0,485	0,260	1,87	24,3	486,0	162,1
Листья	7	100 мг	0,406	0,204	1,99	20,3	406,0	406,0
	8	200 мг	0,444	0,228	1,95	22,2	444,0	222,0
	9	300 мг	0,207	0,179	1,16	10,4	208,0	69,3
Семядоли	10	100 мг	0,720	0,322	2,24	36,0	720,0	720,0
	11	200 мг	0,715	0,346	2,07	35,8	716,0	358,0
	12	300 мг	1,3496	0,672	2,01	69,8	1396,0	465,3



М- маркерная ДНК (100bp), «-» - отрицательный контроль, «+» - положительный контроль, 1 -11 – предположительно трансгенные растения.

**Рисунок 2**– Электрофоретические спектры ПЦР-продуктов, подтверждающие присутствие *GUS*-гена в трансформированных растениях.

Таким образом из 600 растений предположительных трансформантов Т1 поколения двадцать пять дали *GUS*-положительную реакцию, что составляет 4,16%. Всего при помощи ПЦР для 12 из них получено молекулярно-биологическое подтверждение встраивания *nptII*- и *GUS*- генов в геном хлопчатника. Эффективность трансформации составила 2,0%. В данной работе впервые получены трансгенные растения хлопчатника казахстанской селекции, экспрессирующие перенесенный репортерный *GUS*-ген. Оптимизирован способ генетической трансформации пыльцы для получения трансгенных растений отечественного хлопчатника.

#### Литература

- 1 Ozyigit I.I., Kahraman M.V., Ercan O. Relation between Explant Age, Total Phenols and Regeneration Response in Tissue Cultured Cotton (*Gossypium hirsutum* L.)// *African Journal. Biotechnology.*, 2007. – V.6. – P.3-8.
- 2 Умбетаев И.И. Технология возделывания отечественных сортов хлопчатника – Алматы. – 2005. – 235 с
- 3 Umbeck P., Johnson G., Barton K., Swain W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants // *Biotechnology*, 1987. – V. 5. – P. 263-265.
- 4 Umbeck P., Swain W., Yang N.S. Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants // *Crop Science*, 1989. – V. 29. – P. 196-201.
- 5 Firoozabady E., De Boer D.L., Merlo D.J., Halk E.L., Amerson L.N., Rashka K.E., Murray E.F. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants // *Plant Molecular Biology*, 1987. – V. 10. – P. 105-116.
- 6 Cousins Y.L., Lyon B.R., Llewellyn D.J. Transformation of an Australian cotton cultivar: Prospects for cotton improvement through genetic engineering // *Australian Journal Plant Physiology*, 1991. – V. 18. – P. 481-494.
- 7 Mishra R., Wang H., Yadav N.R., Wilkins T. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) - a step towards genotype independent regeneration // *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 2003. – V. 73. – P. 21-35.
- 8 Zapata C., Park S.H., El-Zik K.M., Smith R.H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex // *Theoretical and Applied Genetics*, 1999. – V. 98. – P. 252-256.
- 9 Li X., Wang X.D., Zhao X., Dutt Y. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration // *Plant Cell Report*, 2004. – V. 22. – P. 691-697.
- 10 Chaudhary B., Kumar S., Prasad K.V.S., Oinam G.S., Burma P.K., Pental.D. Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L cv.Coker 310 FR). // *Plant Cell Rep.*, 2003. – V. 21. – P. 955-960.
- 11 Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1987. – V.5. – P. 387-405
- 12 Chaudhary B., Kumar S., Prasad K.V.S., Oinam G.S., Burma P.K., Pental.D. Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L cv.Coker 310 FR). // *Plant Cell Rep.*, 2003. – V. 21. – P. 955-960.
- 13 Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. – Москва «Мир», 1984.

#### Тұжырым

Қазақстан селекциясындағы мактаның тозан арқылы агробактериальды трансформация жағдайлары оптимизацияланды. Репортерлы *GUS*- генді және селективті маркерлі *nptII*-генді тасымалдайтын трансгенді Мактаарал -4005 сорты алынды.

#### Summary

Optimization of agrobacterial pollen transformation method for cotton variety Kazakhstan selection has been carried out by the use of reporter *GUS*- and selective marker *nptII*- genes. Transgenic plants of Maktaaral 4005 with *nptII*- и *GUS*- genes have been obtained.