

ӘОЖ 602.6:58

А.Б. Исакова, Қ.Р. Утеулин, Г. Бари, А.Ж. Исмагул
 РМҚ шаруашылық жүргізу құқығындағы «Өсімдіктер биологиясы және
 биотехнологиясы институты» ҚР БҒМ ҒК, Қазақстан, Алматы қ.
 *E-mail: gen_uteulink@mail.ru

Тұзға төзімді *TaNHX1* генімен күрішті агротрансформациялау

Трансформация – көне латын тілінен аударғанда «transformatio» – «айналу» деген мағынаны білдіреді. Яғни генетикада – оқшауланған дезоксирибонуклеин қышқылының көмегімен генетикалық ақпаратты қандай да бір клеткаға ендіру процесі). Трансформация нәтижесінде генетикалық ақпарат трансформацияланған клеткада және сол клеткадан тараған ұрпақ клеткаларда жаңа белгілер пайда болады. Трансформация құбылысын 1928 жылы ағылшын ғалымы Ф. Гриффит ашқан болатын. *Agrobacterium tumefaciens* – өсімдіктер әлемінде паразитті түрде өмір сүретін бактерия. Ол қос жарнақты өсімдіктердің 60% және кейбір дара жарнақты өсімдіктерде тәж тәрізді галл ісігін тудыру арқылы өсімдіктерді зақымдайды.

Түйін сөздер: күріш, агротрансформация, регенерант, тұзға төзімділік, ген.

А.В. Iskakova, K.R. Uteulin, G. Bary, A.Zh. Ismagul **Agrobacterium-mediated transformation of rice the salt tolerance gene *TaNHX1***

The rice variety Bakanas was co-transformed with the salt tolerance gene *TaNHX1* and the HPT selective marker gene using *Agrobacterium*-mediated transformation. Salt-tolerant transgenic plants were obtained. The resulting salt-tolerant transgenic plants were tested by PCR analysis using Actin 1 promoter forward primer and NosTr reverse primer.

Keywords: rice, agrotransformation, salt tolerance, gen, regenerant.

А.Б. Исакова, К.Р. Утеулин, Г. Бари, А.Ж. Исмагул **Агротрансформация риса геном солеустойчивости *TaNHX1***

С помощью метода агротрансформации были ко-трансформированы каллусы риса сорта Баканасский с солевым *taNHX1* геном и селективным Hpt геном. Были получены солеустойчивые трансгенные растения. Полученные солеустойчивые трансформанты были проверены ПЦР-анализом с использованием прямого праймера Actin-1 promotor (forward primer) и обратного праймера f NosTr (reverse primer).

Ключевые слова: рис, агротрансформация, регенерант, солеустойчивость, ген.

Agrobacterium tumefaciens цитоплазмасында Tі – плазмида орналасқан [1]. Бұл плазмиданың құрамында өсімдіктердің жасушасына кіріп және оның геномына ене алатын Т-ДНҚ және бұл процесі жүзеге асыратын *vir*-гені болады. Ал Т-ДНҚ-ның құрамында агробактерияның өзі қоректенетін арнайы аминқышқыл – опиндер мен көмірсудың синтезіне жауап беретін гендер, сонымен қатар ісіктің өсуін индуцирлейтін фитогормондардың гендері де орналасқан. Өсімдіктің сыртқы қабаты бұзыла бастағанда бактерияның бетінде орналасқан сезімтал рецепторлар оны сезіп, нәтижесінде *vir*-гені активтеніп

Т-ДНҚ-ны реципиент-клеткаға тасымалдап және репликация процесін жүзеге асырады.

Агробактерияның өсімдік клеткасына байланысуы әлсіз және қайтымды екі сатысынан тұратын процесс. Соның нәтижесінде бактерия целлюлозды фибриллаларды синтездеп шығарады. Бұл процесте мынадай гендер жұмыс атқарады: *chvA*, *chvB*, *pseA* және *att*. Бастапқы үш ген бактерияның зақымданған клеткаға колония түзі арқылы байланысуына көмектесетін целлюлозды фибриллалардың синтезіне қатысады. Фибрилла пайда болғаннан кейін бактерияны өсімдіктің клетка қабатына «жабыстыратын»

белок синтезделінеді. Жоғары гомологты және 25 нуклеотидтен тұратын шеткі қайталаманың арасынан Т-ДНҚ кесіліп, оның 5'-соңымен *VirD2* белогі ковалентті түрде байланысып, осы түрде ДНҚ тасымалданады [2, 3]. Нәтижесінде өсімдік клеткасының ядро ішіне өткен Т-ДНҚ өсімдік-қожайынның геномына енеді. Галл пайда болу үшін Т-ДНҚ метаболитикалық жолмен гормондардың өсу синтезінің гендерін кодтайды. Пайда болған гормондар клеткалардың пролиферациясына және галлдардың өсуіне жағдай жасайды [4, 5].

Агробактериалды трансформация өсімдіктердің гендік инженериясында құрамында Т-ДНҚ және *vir*-гендері бар плазмидадан тұратын бинарлы векторлы жүйесі арқылы кеңінен қолданылады.

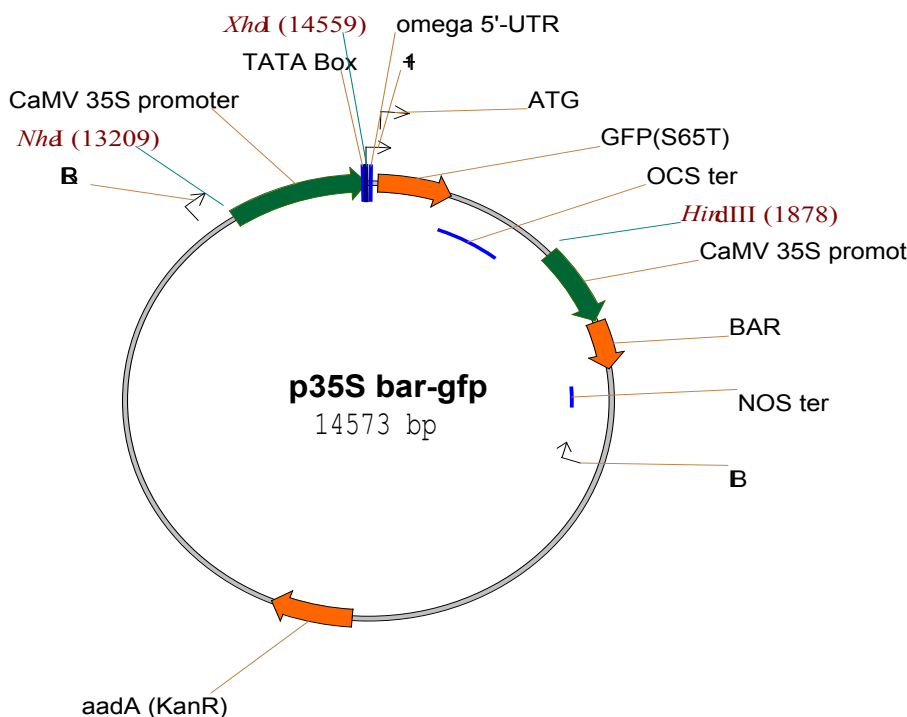
Зерттеу материалдары және әдістері

Зерттеу нысанасы ретінде қазақстандық селекциясында күріштің 10 сорты талданып,

солардың ішінен *in vitro* жағдайында жақсы нәтижелер көрсеткен Бақанас, Мадина және Маржан сорттары болды. Арнайы агротрансформациялау үшін Бақанас сорты таңдап алынды.

Бақанас сортының каллусына селективті *Hpt* гені (*pUbiHpt35Ster*) және *Actin-1* күріштің промоторымен (*pAct1toltaNHX1NOSter*) тұзға төзімді *taNHX1* гені ко-трансформация жасалыны.

Каллусогенездің индукциясы, каллусты өсіру және морфогенездің индукциясы үшін Мурасиге-Скуг қоректік ортасы қолданылды. Агробактерия *AGL1* штамының көмегімен трансформация жүргізілді. Қазақстандық күрішті агротрансформациялауды тұрақтандыру үшін төмендегі конструкция таңдап алынды (1-сурет). Ол біздің тәжірибемізде фосфинотрицин *ppt* (коммерциялық атауы – БАСТА) гербицидіне төзімділік көрсететін селективті маркер - *bar* генін тексеруіне мүмкіндік береді.



1-сурет – Агротрансформацияға қолданылған плазмида: 35S промоторымен *GFP* репортерлі гені және *bar* селективті гені

SIGMA фирмасының ПТР китінің (REDE-extract N.Amp plant PCR kit, Sigma Aldrich) көмегімен ДНҚ бөліп алынды. Трансформант өсімдіктерге молекулярлы-биологиялық тал-

дау полимеразды тізбекті реакцияның (ПТР) көмегімен жүргізілді. Амплифицирленетін өнімнің ұзындығы 430 жұп нуклеотид негізден тұрады. Полимеразды тізбекті реакцияның

шарттары келесі: ДНҚ алғашқы денатурациясы 94°C-та 3 минут, одан кейін 35 циклден тұратын амплификация процесі жүреді (94°C/20 сек, 55°C/40 сек және 72°C/60 сек) және соңғы кадам – элонгация процесі (72°C/3 мин). ПТР амплификацияның өнімдерін көру үшін оны бромды этидий қосылған 1.5% агароза гелін электрофорезде жүргізу керек.

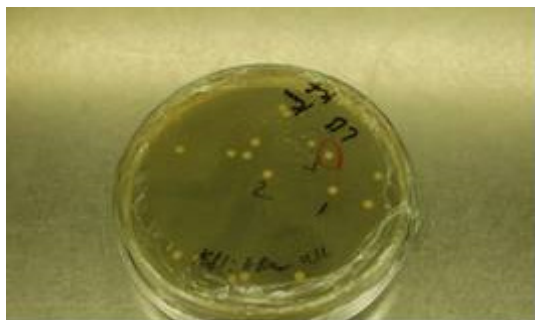
Агробактериалды трансформацияның протоколы және күрішті трансформациялаудың барлық жұмыстары Австралияның Аделаида қаласында Өсімдіктердің Функционалдық Геномикасының Австралия Орталығында (ӨФГАО) доктор Серік Елібайдың кеңесімен жүргізілді.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

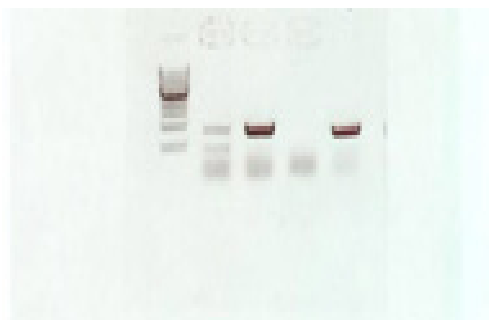
Агробактерияның компетентті клеткаларын *p35SGFPBAR* плазмидасының *AGL* штамына трансформациялау 2-суретте көрсетілген. Өсіп шыққан агробактерияның 3 колониясын ПТР анализде 35S Fwd и GFP Rev праймерлерімен

тексерудің нәтижесінде №3 колония бізге керекті ұзындыққа 700 bp сәйкес келетіні анықталды (3-сурет). Бұл №3 колонияны көбейту үшін 4 мл TYNG қоректік ортасында (10 г/л бакто-триптон, 5 г/л ашытқы сығындысы, 5 г/л NaCl және 200 мг/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7,5) +28°C температурасында 24 сағаттық шайқағышта өсірілген.

Инфекциядан кейін агробактериалды ерітінді толығымен шайып тасталып, каллус залалсыздандырылған сүзгі қағазға салып аздап кептірілді. Содан кейін каллус құрамындағы гиромоциин (50 мг/л) мен агробактерия толығымен жойылуы үшін тиминтин (400 мг/л) қосылған қоректік ортаға отырғызылды. Екі ай бойы селекция өтті (4-сурет). Гиромоциинге төзімділік көрсеткен каллустар регенерациялық қоректік ортаға отырғызылды. Бастапқыда оларға қараңғы жерде 28°C температурада 2 күн инкубация жасалды. Сонан соң оларды жарық жерге климокамераның ішінде (фотопериод 12 сағат) 4-6 аптадай өсімдіктері регенеранттары шыққанға дейін ұстайды.

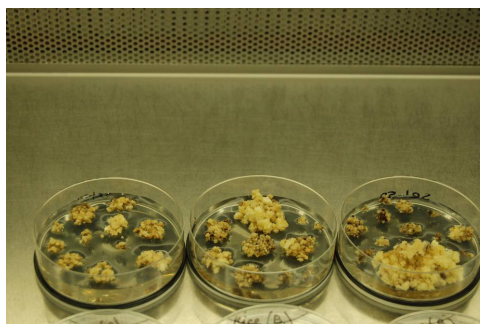


2-сурет – Агробактерияның колониялары



№2 №3 4
35S Fwd
GFP Rev №3-700bp

3-сурет – ПТР анализдің нәтижесі

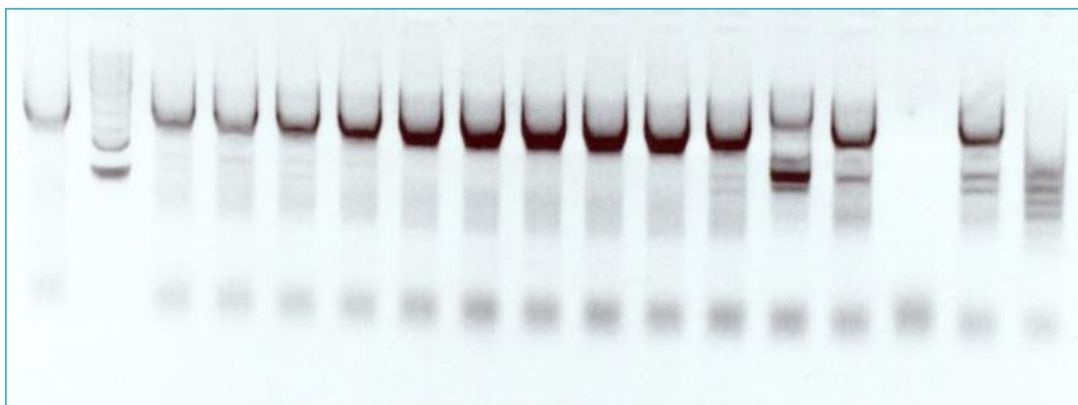


4-сурет – Бақанас күріш сорты каллустарының (*Actin-1* күріш промоторымен *taNHX1* гені енгізілген) гиромоциин (25 мг/л) қоректік ортасында селекция өту кезеңі

Actin-1 күршіш промоторымен *TaNHX1* гені күршіш клеткасының геномына енгенін анықтау үшін ПТР талдауы жүргізілді. Агротрансформация барысында 18 тәуелсіз тізбектің ішінен 23 трансгенді өсімдіктер алынды. ПТР анализ тексеруінен өткен 18 тізбектің ішінен 6 клон *TaNHX1* генінен тұратынын көрсетті (5-сурет).

100 трансформацияланған каллустың ішінен тек 6 ғана трансгенді өсімдік регенеранттары алынды. Яғни трансформацияның күштілігі 6% құрайды.

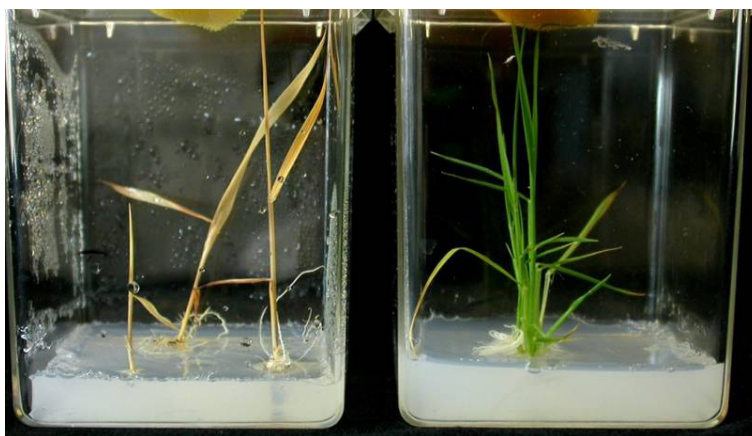
Алынған регенеранттардың тұзға төзімділігін анықтау үшін оларды концентрациясы 1,0 % натрийдың хлориды бар қоректік ортасында тексерілді. Тұзды ортада трансформацияланбаған өсімдік регенеранттары өлген, ал трансформанттар болса өз тіршілігін үзбеген (6-сурет). Алынған 28 тізбектің ішінен тұзды ортада 16 трансформантты өсімдіктер ғана өз төзімділігін көрсетті. Абиотикалық стреске төзімділік көрсеткен трансгенді өсімдіктер ағардан тазартылып топыраққа отырғызылды (7-сурет).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
C+ + + + + + + + + + - + - + C-

1 – Позитивті бақылау (1.5 kb) 2 – Маркерлі ДНҚ, 3-16. Үлгілер, 17 – негативті бақылау

5-сурет – Бақанас күршіш сортының ДНҚ-на NHX праймерларының (*Actin-1 promoter forward primer*, *NosTr. reverse primer*) көмегімен жүргізілген ПТР талдауы



Бақылау

Трансформант

6-сурет – Құрамында натрийдың хлориды (1,0 %) бар қоректік ортасында Бақанас сортының трансгендерін тұзға төзімділігін тексеру кезеңі



7-сурет – *Actin-1* күрішті промоторымен тұзға төзімді *TaNHX1* генімен өзгертілген Баканас сортының регенеранттарын топыраққа отырғызу кезі

Қорытындылай келе, *Hpt* селективті маркер және тұзға төзімді *NHX1* геннің *pUbi1taNHX1-NOSTerminator* конструкциясын және *35S* промоторымен селективті *bar* геннің конструкциясын қолдану арқылы ко-трансформация жүргізілді. *Ubi1* жүгері және *Actin-1* күрішті промотормен

тұзға төзімді *taNHX1* гені күріштің каллусына трансформация жасалынды. Трансформация үшін агробактерияның *AGL1* штамы қолданылды. Баканас сортының агротрансформация күштілігі 6% құрайды. Алынған тұзға төзімді трансформанттар топыраққа отырғызылды.

Әдебиеттер

- 1 Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство. – 2003. – С. 157-148.
- 2 Christie P.J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S., Cascales E. Biogenesis, architecture and function of bacterial type IV secretion systems // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol.59. – P.451–485.
- 3 Juhas M., Crook D.W. Hood D.W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence // *Cellular Microbiology.* – 2008. – Vol.10. – P.2377–2386.
- 4 White C.E., Winans S.C. Cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2007. – Vol.362. – P.1135–1148.
- 5 Рябушкина Н.А., Галиакпаров Н.Н., Рахимбаев И.Р. Трансформация растений с помощью агробактерий. Вероятные последствия // *Биотехнология.* – 2009. – N 4. – С.29-37.
- 6 <http://www.ru.wikipedia.org>