

УДК 577.218

Р.М. Наргилова\*, О.В. Карпова, А.М. Писаренко, Б.К. Искаков  
 Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, г. Алматы, Казахстан  
 \*e-mail: rufina.nargilova@mail.ru

### Разработка технологии получения генетически модифицированных растений рапса

Целью работы являлась разработка биотехнологии и получение трансгенных растений рапса *Brassica napus L.* после трансформации с помощью *Agrobacterium tumerfaciens* на примере гена транскрипционного фактора *AtDREB1A*.

В данной работе налажен метод регенерации растений рапса из гипокотилей и котиледонов, полученных из проросших семян. На основе этого метода были подобраны условия для генетической трансформации котиледонов и гипокотилей с помощью штаммов агробактерий. В результате получены трансгенные растения рапса, несущие в своем геноме рекомбинантные ДНК-последовательности.

**Ключевые слова:** *Brassica napus*, рапс, регенерация, трансформация, *AtDREB1A*.

M. Rufina Nargilova, Oxana V. Karpova, Alyona M. Pissarenko, Bulat K. Iskakov  
**Elaboration of technology for obtaining of genetically modified canola plants**

The task of this work is optimization of the conditions for regeneration of different tissue and obtaining of transgenic rape plants (*Brassica napus L.*) after transformation by *Agrobacterium tumerfaciens* using of transcription factor *AtDREB1A* gene.

The method of rape regeneration has developed using hypocotyls and cotyledons obtained from germinated seeds. By virtue of this development the conditions were selected for stable genetic transformation of cotyledons and hypocotyls by *Agrobacterium* strains. As results transgenic rape plants with the recombinant DNA sequences have obtained.

**Keywords:** *Brassica napus*, canola, regeneration, transformation, *AtDREB1A*.

Р.М. Наргилова, О.В. Карпова, А.М. Писаренко, Б.К. Искаков

### Генетикалық модификацияланған рапс өсімдігінің технологиясын зерттеме

Жұмыстың мақсаты - *Brassica napus L.* рапсының регенерацияның шартының онтайландыруы және трансформациядан кейін *Agrobacterium tumerfaciens* көмекпен *AtDREB1A* транскрипция факторының әузатының мысалында трансгендік өсімдігінің жаралған.

Айтылмыш жұмыста рапс өсімдігінің регенерациясы әдісі гипокотилден онтайланды. Осы әдістің негізінде котиледондар және гипокотильдер тұрақты трансформация үшін агробактериялар көмегімен шарттар сайлау болды. Жұмыстың ара нәтижесінде рапстың трансгендік өсімдіктері алынды.

**Түйін сөздер:** *Brassica napus*, рапс, регенерация, трансформация, *AtDREB1A*.

В настоящее время трансформация растений является актуальным направлением исследований в биотехнологии и имеет практическое применение с целью улучшения свойств растений. Она позволяет решать задачи селекции биологических объектов, повышая устойчивость, продуктивность и качество продукции. Генетическая инженерия растений открывает широкие возможности для изучения функционирования растительных организмов и регуляции протекающих в них биохимических и физиологических процессов. В перспективе это позволит влиять на свойства растений, изменять их характеристики или придавать новые свойства, включая самые разные направления: увеличение продуктивности, усиление резистентности к болезням, пестицидам, стрессам со стороны окружающей среды, качественные изменения состава плодов и семян и т.д. Сегодня накоплен большой опыт конструирования генетически модифицированных растений и имеются примеры успешного решения ряда задач [1, 2, 3, 4].

Рапс является второй по величине масличной культурой в мире. Благодаря своей экономической значимости, он является одной из первых генетически трансформированных культур, и генетически модифицированные сорта рапса применяются в промышленном производстве в очень значительных количествах [5]. Создание новых высоко-продуктивных сортов этой культуры не может обойтись без достижений в области генетической инженерии.

Цель работы - разработка биотехнологии получения трансгенных растений рапса *Brassica napus L.* в результате трансформации с помощью *Agrobacterium tumerfaciens* на примере гена транскрипционного фактора *AtDREB1A*.

## Материалы и методы

**Трансформация клеток агробактерий путем электропорации.** Для проведения электропорации использовали компетентные клетки *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260S. Электропорацию проводили на приборе GenePulser фирмы Bio-Rad (США) в режиме –25 мФ, 1,8 кВ, 200 Ом. Отбор трансформированных клеток проводили на селективной среде с канамицином 25 мкг/л.

**Подготовка суспензии агробактерий.** Агробактерии, выращенные на среде Лурия-Бертани содержащей 100 мкг/л канамицина, открутили при 6 тыс. об/мин. 7 минут. Затем гомогенизировали в среде MMA (1x соли Мурасиге-Скуга, 10 mM 2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислоты, 20 г/л сахарозы, pH 5,6 и 200 μM ацетосирингона), выращивали в течение 1 ч при 24°C. Затем культуру разбавляли средой MMA до оптической плотности 0,7 о.е. при OD<sub>600</sub>. В этой суспензии проводили вакуумную инфльтрацию и ко-культивацию.

**Трансформация пыльников рапса.** Использовали бутоны растений сортов «Крис», «Nyola» и «Гадемин», которые были простерилизованы. После этого пыльники подвергали процессу вакуумной инфльтрации с суспензией агробактерий в режиме 25 единиц вакуума в течении 10 минут. Пыльники поместили на среду MS2S с 2,4-Д – 2 мг/л, и NAA 0,25 мг/л.

**Трансформация листовых дисков рапса.** При трансформации листовых дисков использовали диплоидные растения сортов «Крис», «Nyola» и «Гадемин». Листья пробирочных растений были обрезаны по периметру листовой пластинки для проникновения агробактерий. Листья ко-культивировали в суспензии агробактерий в течение 10 минут. После этого листья помещали на среду MS2S с добавлением 2 мг/л БАП.

**Трансформация проростков рапса.** Для трансформации гипокотилей и котиленонов использовали проростки рапса сортов «Крис», «Nyola» и «Гадемин». Семена стерилизовали, после чего помещали на среду MS и проращивали на свету 10 дней. Проростки разбирали на гипокотили и котиленоны. Для предотвращения осмотического шока операцию проводили в стерильной среде Мурасиге-Скуга (MS3S-среда). Трансформацию проводили ко-культивированием в течение 10 минут в суспензии агробактерий. Гипокотили помещали на среду для каллусообразования: MS с добавлением 1 мг/л 2,4 – Д, для органогенеза: MS с добавлением 4 мг/л БАП, 2 мг/л зеатина, для побегообразования: MS с добавлением 3 мг/л БАП, 2 мг/л зеатина; затем, MS с добавлением 0,05 мг/л БАП котиленоны - для каллусогенеза и органогенеза: MS с добавлением 4,5 мг/л БАП и для побегообразования: MS с добавлением 0,5 мг/л БАП. Для укоренения побегов использовали MS с добавлением 5 мг/л ИБК.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** При проверке на содержание трансгена в геноме растений-регенерантов для синтеза фрагмента готовили реакционную смесь №1 объемом 20 мкл следующего состава: 2 мкл полимеразного буфера, 2 мкл 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мкл смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) фирмы «Promega», 0,5 мкл бычьего сывороточного альбумина (BSA) концентрация раствора – 0,1 мг/мл, 0,2 мкл ДНК, по 0,2 мкл каждого из праймеров, 0,2 мкл Taq-полимеразы фирмы «Promega», 14,6 мкл бидистиллированной стерильной воды [6]. Амплификацию ДНК проводили на Omn-E Thermal Cycler (Великобритания).

## Результаты и их обсуждение

Согласно литературным данным, для рапса *Brassica napus* L. система регенерации налажена на разных тканях растений: микроспорах, гипокотилиях, котиленолах [7,8], пластидах и протопластах, полученных из листовых дисков и котиленонов. Перед нами стояли две задачи: 1 - наладить метод регенерации тканей растений рапса сортов «Крис», «Nyola» и «Гадемин», 2 – на основе отлаженного метода регенерации оптимизировать метод стабильной генетической трансформации растительной ткани с помощью созданных нами штаммов агробактерий.

Для налаживания процесса трансформации различных тканей проводились контрольные эксперименты без инокуляции агробактериями.

Для решения первой поставленной перед нами задачи эксперименты проводились на разных тканях растений: пыльниках, листовых дисках пробирочных растений, гипокотилиях и котиленолах, полученных из проростков семян рапса. Наряду с контрольными экспериментами (без инокуляции агробактериями) мы ставили пробные эксперименты с агробактериальным штаммом.

Прежде всего, нами был апробирован метод трансформации пыльников растений рапса. В результате 3 месяцев культивации не было получено ни одного ответа эксплантов на использованную композицию гормонов в культуральной среде.

Кроме вакуумной инфльтрации также был испробован метод ко-культивации с агробактериями. Замена процедуры вакуумной инфльтрации на обычный метод ко-культивации пыльников с агробактериями также не дал существенных результатов.

Во-вторых, нами поставлен эксперимент с листовыми дисками гаплоидных растений вышеуказанных сортов без агробактерий на средах с различным содержанием гормонов. Через 2 месяца культивации эксплантов нами были получены только рыхлые ярко-зеленые каллусы, неспособные к дальнейшему органогенезу.

Далее проводились эксперименты по регерации различных тканей проростков растений рапса. Для проведения контрольного эксперимента (без инокуляции агробактериями) в работу были взяты три сорта: «Крис», «Нуола» и «Гадемин». Для работы брали десятидневные проростки семян указанных сортов, которые предварительно были простерилизованы и пророщены на среде MS, состав которой указан в разделе «Материалы и методы».

В результате контрольных экспериментов были получены жизнеспособные каллусы. После инкубации эксплантов в течение 4 недель нами были получены явные признаки побегообразования в случае с котиленодами и гипокотилими, а также полноценные побеги в эксперименте с гипокотилими (рисунок 1).

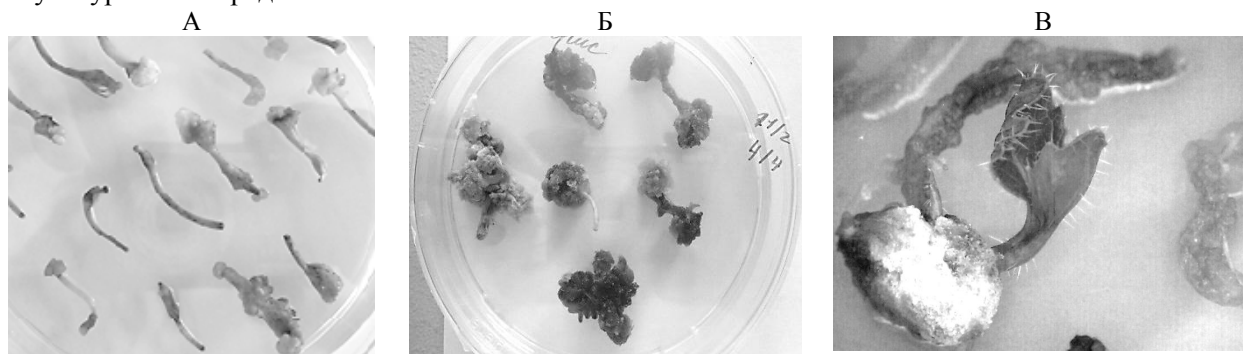
Исходя из результатов контрольного эксперимента и данных, полученных из литературных источников, были начаты эксперименты по трансформации гипокотилей и котиленонов штаммами агробактерий, несущих в составе своего генома кассеты, содержащие гены *AtDREB1A* и  $\beta$ -глюкуронидазы (*GUS*), которые находятся под контролем 35S-промотора и терминатора гена нопалинсинтетазы.



А – гипокотили, Б – котиленоны

**Рисунок 1** – Внешний вид эксплантов в контрольном эксперименте после 4 недель культивирования

На рисунке 2 представлен внешний вид эксплантов после 4-х и 8-ми недель инкубации на культуральных средах.



**Рисунок 2** - Внешний вид эксплантов после 4 недель (А) и 8 недель (Б) с момента инокуляции, В – каллус, с образовавшимся побегом

Из листьев полученных растений выделяли ДНК, которую проверяли на наличие вставки ПЦР-методом. Не все растения показали наличие трансгена.

В результате трансформации гипокотилей рапса были получены растения-регенеранты: 26 растений сорта «Нуола» (*GUS*-содержащие), 12 растений сорта «Крис» и 18 растений сорта «Гадемин» (оба варианта несут в своем геноме кодирующую последовательность гена *AtDREB1A*).

В результате проделанной работы был налажен метод регенерации растений рапса из гипокотилей и котиледонов, полученных из проросших семян. На основе этого метода были подобраны условия для генетической трансформации котиледонов и гипокотилей с помощью штаммов агробактерий. В результате получены трансгенные растения рапса, несущие в своем геноме рекомбинантные ДНК-последовательности.

Кроме того, начаты эксперименты по отбору трансгенных линий рапса, способных расти и развиваться в условиях моделируемой засухи и стрессовых температур.

#### Литература

- 1 Кучук Н.В. Генетическая трансформация высших растений, опосредованная бактериями из рода *Agrobacterium* // Успехи современной биологии. 1997. - Т. 117. - Вып. 6. - С. 645 – 659.
- 2 Курочкина С.Д., Картель Н.А. Генетическая трансформация растений, процессы рекомбинации и регуляции экспрессии генов у трансгенных растений // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1998. - Т. 4. - С. 3 -12.
- 3 Hansen G., Wright M.S. Recent advances in the transformation of plants // Trends in plant science. 1999. - V. 4 (6). - P 226 – 231.
- 4 Hammond J., McGarvey P., Yusibov V. Biotechnology: new products and applications //Berlin: Springer Verlag. - 2000. - P. 196.
- 5 Maheshwari P, Selvaraj G, Kovalchuk I. Optimization of Brassica napus (canola) explant regeneration for genetic transformation//N Biotechnol. - 2011 Dec . - № 29. - P. 144-55.
- 6 СправочникPromega. Protocols and Application Guide. Promegacorp. 1996.
- 7 Cardoza V., Steward C. Increased Agrobacterium-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus L.*) from hypocotyls segment explants // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21. – P. 599-604. 43.
- 8 Kong F., Li J., Tan X.et all A new time-saving transformation system for *Brassica napus* // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8 (11). – P. 2497-2502.

ӘОК 637.12

М.Х. Нармуратова, Ж. Әдбүбек\*, М. Касимбекова  
 әл-Фараби ағындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан  
 \*e-mail: [adbubek\\_juldiz@mail.ru](mailto:adbubek_juldiz@mail.ru)

#### Түйе сүті негізінде ірімшік алу технологиясы

Мақалада түйе сүтінің физико-химиялық көрсеткіштерін ескере отырып, түйе сүтінен арнайы *Camifloc<sup>mm</sup>* ұйытқысын қолданып ірімшік алудың технологиялық нұсқасы жасалынды. Алынған өнімнің органолептикалық және тұтынушылық қасиеттері мен өнімділігі зерттелді.

**Түйін сөздер:** Түйе сүті, сиыр сүті, ірімшік, ұйытқы, *Camifloc<sup>mm</sup>*.

M.Narmuratova, Zh. Adbubek, M.Kasimbekova

#### The technology of making cheese from camel milk

This paper shows a process diagram of obtaining cheese made from camel milk using starter *Camifloc<sup>mm</sup>*. Also studied the physicochemical parameters of camel milk and organoleptic properties, the performance of the product.

**Keywords:** camel milk, cow milk, cheese, starter, *Camifloc<sup>TM</sup>*.

М.Х. Нармуратова, Ж. Адбубек, М. Касимбекова

#### Технология получения сыра из верблюжьего молока

В данной статье представлена технологическая схема получения сыра из верблюжьего молока используя закваски *Camifloc<sup>mm</sup>*. Также изучены физико-химические показатели верблюжьего молока и органолептические свойства, производительность полученного продукта.

**Ключевые слова:** верблюжье молоко, коровье молоко, сыр, фермент, *Camifloc<sup>TM</sup>*.

Түйе сүті басқа ауыл шаруашылық жануарларының сүтінен өзінің қоректік және емдік қасиеті бойынша ерекшеленеді [1, 2]. Оның құрамында С витамині, ниацин жоғары мөлшерде және лактоза, холестерол аз мөлшерде кездеседі. Тағамдық аллергиясы бар адамдардың диетикалық қоректенуінде