

BULLETIN OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ISSN 1991-3494

Volume 1, Number 359 (2016), 98 – 105

WHEAT CISGENIC TRANSFORMATION
WITH CLASS I CHITINASE

E. R. Maltseva¹, A. Zh. Ismagul², G. A. Iskakova²,
A. P. Chirkin¹, Y. A. Skiba¹, G. A. Ismagulova¹, S. Eliby², N. A. Aitkhozhina¹

¹M. A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,

²Australian Center for Plant Functional Genomics, Adelaide, Australia.

E-mail: elina_m@inbox.ru

Keywords: chitinase, biolistic transformation, cisgenics, bread wheat.

Abstract. Plant resistance to fungal pathogen caused diseases is regulated by gene expression of a large variety of PR (pathogenesis related) proteins. Hydrolytic enzymes acting on fungal cell wall form an important part of this diversity. The given research was focused on wheat class I chitinase. The goal was to create wheat plants constitutively expressing a chitinase gene. In order to achieve this goal embryogenic calli, obtained from immature embryos of wheat variety Saratovskaya 29, were stably transformed by biolistic approach. The calli were cotransformed with wheat gene of acetohydroxyacid synthase enzyme, coding resistance to imazethapyr herbicide, to ease the transformants' selection. Regenerant plants were checked for the presence of AHAS and wheat class I chitinase genes, revealing 59 transformed plants, 58 of which are carrying AHAS gene, and 51 carrying chitinase gene. Average transformation efficiency reached 1.84% (minimum of 0.3% and maximum of 3.4%).

УДК 602.6:582

ЦИСГЕННАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПШЕНИЦЫ СОРТА
САРАТОВСКАЯ 29 ГЕНОМ ХИТИНАЗЫ I КЛАССА

Э. Р. Мальцева¹, А. Ж. Исмагул², Г. А. Искакова², ¹Чиркин А. П.,
Ю. А. Скиба¹, Г. А. Исмагулова¹, С. Елибай², Н. А. Айтхожина¹

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина, КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²Австралийский центр функциональной геномики растений, Аделаида, Австралия

Ключевые слова: ген хитиназы, биобаллистическая трансформация, цисгенная трансформация, мягкая пшеница.

Аннотация. Устойчивость растений к грибковым заболеваниям регулируется экспрессией большого количества генов так называемых PR-белков (PR – pathogenesis related). Важной частью этого защитного ансамбля являются гены, кодирующие гидролитические ферменты, расщепляющие клеточную стенку грибов. В качестве объекта данного исследования была выбрана хитиназа пшеницы I класса. Цель работы состояла в получении цисгенных, т.е. экспрессирующих только пшеничные гены, растений с конститутивной экспрессией гена хитиназы. Для достижения этой цели была проведена биобаллистическая стабильная трансформация каллусов, полученных из незрелых зародышей пшеницы сорта Саратовская 29. Для отбора трансформантов использовали котрансформацию с пшеничным геном фермента ацетогидроксицидсингтазы, кодирующими устойчивость к гербициду имазетапиру. Проверка трансформированных растений выявила 59 трансформированных растений, из которых 58 несут вставку гена устойчивости к имазетапиру, а 51 растений имеют вставку гена хитиназы I класса пшеницы. Средняя эффективность трансформации составила 1.84%, с максимальным значением 3.4% и минимальным – 0.3%.

Пшеница является одним из основных казахстанских продуктов экспорта: в 2014 году ею было засеяно 12,8 миллионов гектаров земли со средней урожайностью 12,7 центнеров с гектара (по данным ИА Казах-Зерно, <http://kazakh-zerno.kz/vsjo-o-zerne/uropzhaj-2014/214771-kazahstancam-udalos-namolotit-18-mln-916-3-tys-tonn-zerna-zaklyuchitel-naya-svodka-msh-5835>). На урожайность этой культуры влияет множество факторов, одним из которых являются грибковые заболевания. Заражение сказывается не только на количестве – в годы эпифитотий урожай снижается на 30-40% и более [1], – но и на качестве зерна, ведь, пораженное микотоксинами, оно не подлежит дальнейшему использованию.

В качестве ответа на грибковое поражение растения пшеницы экспрессируют целый ряд генов защитного ответа (PR-гены – pathogenesis-related genes). Наиболее изученные гены этой группы кодируют гидролитические ферменты, такие как хитиназы и β -1,3-глюканазы. Эти ферменты ингибируют *in vitro* рост многих фитопатогенов, расщепляя хитин и β -глюкан, входящие в состав клеточной стенки грибов. При этом продукты расщепления хитина служат сигнальными молекулами и стимулируют дальнейшее развитие защитного ответа растения [2, 3].

Хитиназы (ЕС 3.2.1.14) – это гликозилгидролазы, катализирующие гидролитическое расщепление N-ацетилглюкозаминовых единиц хитина, связанных между собою β -1,4-гликозидной связью. Эти ферменты хорошо известны своими противогрибковыми свойствами и участием в защитном ответе растения на поражения патогенами. Хитиназы подразделяются на два семейства (семейство 18 и 19) гликозилгидролаз: это экзохитиназы, действующие на концевые части хитинового полимера, и эндохитиназы, расщепляющие внутренние β -1,4-гликозидные связи. В пределах этих двух семейств хитиназы делятся на семь классов (классы I-VII). Эта классификация обусловлена различиями в структуре, субстратной специфичности, механизмах катализа, чувствительности к ингибиторам и клеточной локализации. Классы I, II, IV, VI и VII относятся к семейству 19, в то время как классы III и V составляют семейство 18.

Хитиназы семейства 19, обладающие способностью связывать хитин и катализировать расщепление его полимера, обусловливают большую часть хитинолитической активности растительных клеток. Это относится к хитиназам I класса, характеризующимся четырьмя доменами: 1) гидрофобным вариабельным N-концевым сигнальным пептидом, 2) цистеин-богатым доменом, 3) чрезвычайно вариабельным пролин-богатым шарнирным элементом, и 4) каталитическим доменом [2].

Одним из подходов к усилению устойчивости пшеницы к грибным заболеваниям является сверхэкспрессия генов защитного ответа [4], в том числе и хитиназ [5–9].

Для генетической трансформации растений целевым геном чаще всего используют два метода [10]. Первый – агробактериальная трансформация – основан на способности почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* доставлять и встраивать в геном растительной клетки часть своей ДНК (Т-ДНК). Однако применение этой системы зависит от восприимчивости клеток растений к данному патогену, то есть от самого растения и его генотипа [11]. Второй способ – биобаллистический – охватывает более широкий спектр видов и его применение зависит в большей степени от регенерационных способностей выбранного объекта [10]. Суть этого метода состоит в физической доставке генетической конструкции, несущей целевой ген, в клетки растения. К настоящему времени этот метод был применен ко всем основным злаковым культурам, включая кукурузу, рис, пшеницу, ячмень и сорго [10]. К недостаткам этого способа переноса генов можно отнести встраивание большого числа копий гена.

Говоря о генетической трансформации зерновых культур, и имея в виду их потенциал в проведении селекционных исследований для получения новых линий и сортов, нужно учитывать их дальнейшее принятие населением [12]. В связи с неприятием трансгенных растений и связанных с этой технологией потенциальных правовых трудностей в последние годы складывается новое направление генетической инженерии растений – чистенная трансформация [13]. Смысл данной технологии заключается в использовании генов того же вида или близкородственных ему видов. Определенные успехи в применении этого подхода достигнуты и в получении растений, устойчивых к болезням. Например, с использованием генов диких родственных видов удалось повысить устойчивость растений картофеля к фитофторозу, а яблони – к парше. В другом случае резистентные к серой гнили клубника и виноград были получены сверхэкспрессией уже имеющихся в этих видах защитных генов [14, 15].

Цель данной работы заключалась в получении цисгенных, т.е. экспрессирующих только пшеничные гены, растений пшеницы со стабильной конститутивной экспрессией гена хитиназы I класса.

Материалы и методы. Исходным материалом для трансформации служила мягкая пшеница *Triticum aestivum* сорта Саратовская 29. Индукция каллуса проводилась на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 30 мг/л центрофеноксина, являющегося гормоном роста ауксинового ряда. Наличие эмбриогенного каллуса контролировалось с помощью микроскопии.

Ген хитиназы I класса был клонирован в лаборатории генома Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина. Полноразмерный ген протяженностью 957 п.н. был внесен в вектор для клонирования набором для лигирования Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) и размножен в хемокомпетентных *dam*⁻/*dcm*⁻ клетках *E.coli* (New England Biolabs). Наличие вставки проверяли рестрикцией плазмидной ДНК ферментом *XmnI* (New England Biolabs). Минимальную единицу экспрессии (MEU – minimal expression unit) (3272 п.н.), состоящую из промотора *Ubi1*, гена хитиназы и терминатора, вырезали из клонирующего вектора рестриктазами *SphI* и *XmaI* с ее последующим дефосфорилированием ферментом SAP согласно протоколу фирмы-производителя New England Biolabs. Дефосфорилированный фрагмент (MEU) элюировали из 1% агарозного геля набором GenElute Gel Extraction Kit (Sigma).

Для отбора растений, несущих целевую конструкцию, была проведена котрансформация с геном ацетогидроксиацидсинтазы (AHAS) пшеницы, предоставленным АЦФГР, Австралия, который обеспечивал устойчивость к гербицидам имидазолинонового ряда.

Биобаллистическая трансформация была проведена по протоколу согласно [16], с использованием установки Biolistic Particle Delivery System PDS-1000/He (Bio-Rad). Эмбриогенный каллус был инкубирован на осмотической среде, содержащей 100 г/л сахарозы, не менее 4 часов. Для эксперимента использовали 100 нг MEU хитиназы и 100 нг MEU селективного гена AHAS, ресуспендируемых в 50 мкл суспензии золота с добавлением 10 мкл раствора для связывания [16]. После трансформации каллусы выдерживали 24 часа в темноте, затем пересаживали на среду для восстановления с 60 г/л сахарозы. Через неделю каллусы рассаживали на селективную питательную среду MS с добавлением имазетапира в концентрации 5 мкМ с дальнейшим отбором трансформированных каллусов.

Прошедшие селекцию каллусы были пересажены на регенерационную среду, содержащую 5 мг/л зеатина и 1 мг/л кинетина. Полученные растения-регенеранты были проанализированы полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Растения, несущие вставку гена хитиназы, были высажены в почву.

Для подтверждения вставки целевого гена из этих растений с помощью набора Sigma EXTRACT-N-AMP-RED PLANT PCR KIT была выделена ДНК и проведена ПЦР со специфическими праймерами (Ufwd: 5'- ACCCTGTTGTTGGTGTACTTCTGC; Hrev: 5'- GCAGTAGCCCCAGGAGTAGG; размер ампликона 529 п.н.).

Эффективность трансформации подсчитывалась как отношение растений-регенерантов с подтвержденной вставкой гена хитиназы к общему количеству взятых для эксперимента образцов каллуса.

Результаты и обсуждение

Районированный в Казахстане сорт яровой пшеницы Саратовская 29 является классическим исходным сортом в селекционных исследованиях при создании новых сортов пшеницы, в том числе и районированной в Казахстане. К тому же на стадии предварительных экспериментов он проявил себя в культуре клеток лучше, чем другие испытанные сорта.

Растительный материал для получения эмбриогенного каллуса выращивали в теплице. В качестве эксплантов использовались незрелые зародыши, взятые на 10-14 день после опыления. Визуальный осмотр зерен на наличие подходящих по стадии развития зародышей проводили дважды: в теплице перед срезанием колоса, и непосредственно при выделении зародышей в стерильных условиях с использованием стереоскопического микроскопа. Подходящие по размеру (2-3 мм) и стадии развития зародыши отбирали визуально и выкладывали на питательную среду для

индукции каллуса, остальные отбраковывали. Тщательный отбор первоначального материала позволяет уменьшить последующую выбраковку материала, выбираемого для проведения биобаллистических экспериментов.

Для этой же цели выделенный эксклант выдерживали на среде, индуцирующей каллусогенез, до появления достаточного количества эмбриогенного каллуса. Одним из традиционных подходов в подобных экспериментах является использование каллусов, полученных из незрелых зародышей в течение 2–7 дней после индукции каллусогенеза [9, 17, 18]. В нашей работе мы использовали эмбриогенный каллус, полученный при более длительном культивировании. Отчасти увеличение сроков производства эмбриогенного каллуса было обусловлено сортоспецифическими особенностями выбранной в качестве объекта пшеницы сорта Саратовская 29. В то же время длительное культивирование каллусов на питательной среде позволило более точно провести скрининг материала для последующей трансформации. Наш подход позволил увеличить массу эмбриогенного каллуса за счет его роста, и при этом получить возможность отсечь не-эмбриогенный, а, например, рыхлый обводненный каллус.

Ген хитиназы, используемый для трансформации, был выделен из казахстанской пшеницы сорта Степная 15 [19]. Принадлежность гена к хитиназам I класса подтверждена выравниванием подобных нуклеотидных последовательностей, найденных в международной базе данных, по степени гомологии к данным секвенирования [20]. Выявленные замены в полученном гене проанализированы: из 27 обнаруженных замен 22 являются синонимичными, и еще 5 приводят к изменениям в аминокислотной последовательности белка хитиназы.

Данный эксперимент соответствует условиям цисгенности. Более того, выбранный метод доставки целевого гена в геном растения – биобаллистическая трансформация – полностью исключает внедрение нежелательных последовательностей ДНК за счет использования только минимальных единиц экспрессии, в отличие от агробактериальной трансформации, при которой возможны вставки остава самого вектора (Т-ДНК).

Минимальные единицы экспрессии включают в себя только промотор, ген интереса и терминатор, позволяя обойтись наиболее необходимыми для экспрессии последовательностями. Подготовка минимальных единиц экспрессии проводилась нами в векторе pUBI1-Chitinase (рисунок 1). В качестве промотора для конститутивной экспрессии целевого гена в клетках пшеницы был выбран кукурузный убиквитиновый промотор Ubiquitin-1 (Ubi1). Этот промотор хорошо зарекомендовал себя в стабильной трансформации однодольных и широко используется в исследованиях по сверхэкспрессии генов интереса в пшенице [5, 8, 9, 17].

Смысловая последовательность вектора – ген хитиназы – вырезался рестриктазами *Bam*HI (1) из клонирующего вектора, в котором проходила его наработка в бактериальных

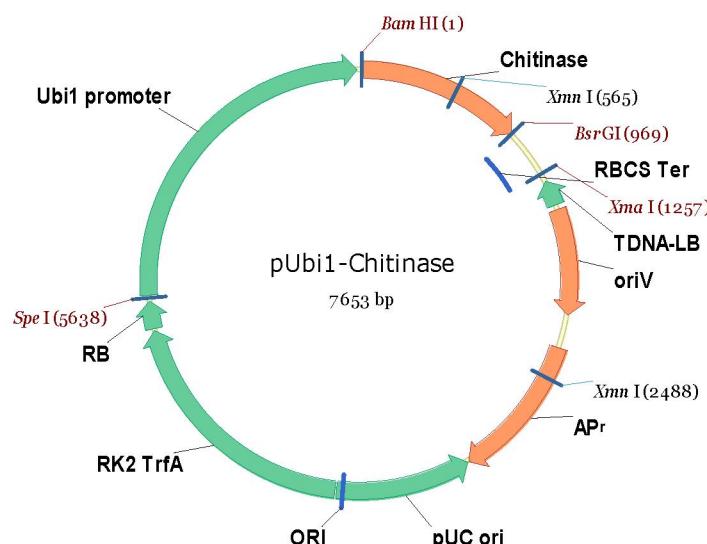


Рисунок 1 – Векторная конструкция с геном хитиназы пшеницы I класса

клетках *E.coli*, и лигировался в вектор pUbi1-Chitinase. Отбор трансформированных клонов контролировали с помощью эндонуклеазы рестрикции *XmnI*. Данный фермент режет нуклеотидную последовательность вектора в двух местах (сайты узнавания *XmnI* также показаны на рисунке 1), образуя два фрагмента длиной 1923 и 5730 п.н. Результаты рестрикционного анализа выделенной плазмидной ДНК на наличие вставки гена хитиназы представлены на рисунке 2. Как видно на снимке проведенного электрофореза, все образцы из 8 отобранных клонов показали присутствие искомого гена, за исключением образца 7, который не имел искомой вставки.

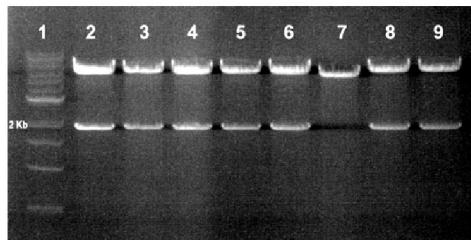


Рисунок 2 – Электрофореграмма рестрикционного анализа клонов хемокомпетентных клеток *E.coli* после лигирования с геном хитиназы. Дорожка 1 – маркер молекулярного веса (1 kb), дорожки 2 – 9 – плазмидная ДНК клонов *E.coli* после рестрикции *XmnI*

Для дальнейшего селективного отбора была проведена котрансформация минимальной единицы экспрессии гена хитиназы и пшеничного гена ацетогидроксиацидсинтазы (AHAS), обеспечивающего устойчивость к гербицидам имидазолинонового ряда. Выбор в пользу данного селективного гена был сделан для обеспечения условий цисгенности эксперимента, так как чаще всего в экспериментах по трансформации пшеницы в качестве селективного маркера используют гены, изначально полученные из других организмов. Наиболее используемым является ген *bar*, обуславливающий устойчивость к гербициду биалафосу [21]. Большинство опытов по интродукции генов защитного ответа в геном пшеницы основаны на использовании именного этого гена [5, 8, 9, 22]. Цисгенный подход к трансформации пшеницы был использован только для улучшения хлебопекарских качеств, однако и в этом случае цисгенным был только целевой ген, в то время как ген *rpti*, используемый для селекции трансформированных клеток, был выделен из *Escherichia coli* [18].

Растения-регенеранты пшеницы, выросшие на селективной питательной среде с имазетапиром и потенциально несущие ген AHAS, были проверены на наличие данного гена. Анализ ПЦР со специфическими праймерами к гену AHAS установил, что из 59 полученных растений у 58 присутствует необходимый ампликон в 524 п.н. (рисунок 3), т.е. одно растение имеет устойчивость к гербициду, не зависящее от продукта гена ацетогидроксиацидсинтазы.

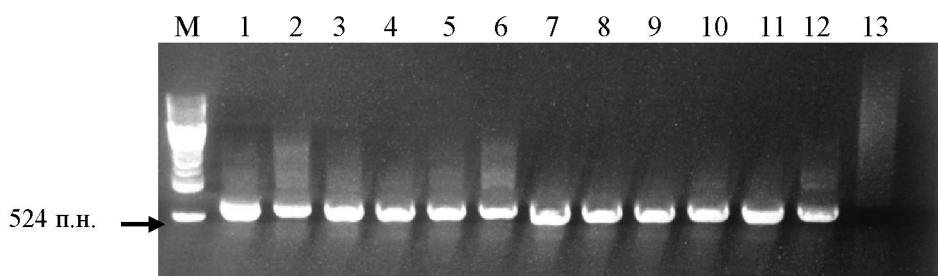


Рисунок 3 – Электрофореграмма ДНК растений-регенерантов после ПЦР со специфичными праймерами, подтверждающими вставку гена ацетогидроксиацидсинтазы (AHAS). Дорожка М – маркер молекулярного веса (1 kb), дорожка 1 – положительный контроль, дорожки 3-12 – экспериментальные растения, дорожка 13 – отрицательный контроль

Растения-регенеранты были также проверены на наличие вставки гена хитиназы с помощью ПЦР. При подборе праймеров для детекции вставки целевого гена в цисгенных работах нужно учитывать наличие этих же либо близких по нуклеотидной последовательности генов в геноме самого объекта. В нашем случае, так как внедряемый ген в геноме пшеницы уже присутствует,

специфичные праймеры были подобраны так, чтобы амплифицировать участок на границе между промотором *Ubi1* и кодирующей последовательностью хитиназы. На рисунке 4 представлены результаты ПЦР со специфичными праймерами. В качестве положительного контроля использовалась плазмидная ДНК, несущая минимальную единицу экспрессии. Во всех экспериментальных растениях, представленных на данном снимке, кроме номера 8, присутствует необходимый ампликон в 529 п.н. В дорожке 8 искомая последовательность не амплифицируется, что говорит об отсутствии вставки целевого гена. В результате проведенного ПЦР анализа была подтверждена вставка гена хитиназы пшеницы I класса в 51 растении пшеницы сорта Саратовская 29.

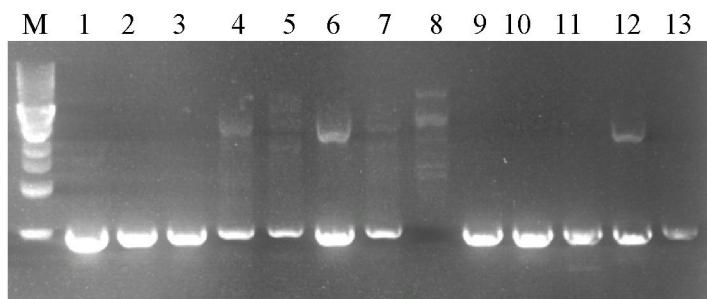


Рисунок 4 – Электрофорограмма ДНК растений-регенерантов после ПЦР, на вставку гена хитиназы I класса.

Дорожка М – маркер молекулярного веса (1 kb), дорожка 1 – положительный контроль, дорожки 3-13 – экспериментальные растения

Таким образом, из 59 регенерированных растений в 51 произошла котрансформация двумя генами, семь растений несут вставку только гена AHAS, и еще одно растение свободно от вставок целевых генов, и, скорее всего, успешно прошло селективный отбор благодаря другим механизмам устойчивости либо случайным факторам.

Одно из ограничений биобаллистического метода – это низкая эффективность трансформации. Она зависит от количества и генотипа клеток, их регенерационной способности, количества покрытых ДНК частиц металла, количества и качества самой ДНК-конструкции, физических параметров бомбардмента и т.п., и составляет около 0.002-0.01% [17, 18].

Нами было проведено четыре серии экспериментов с общим количеством каллусов 2299 штук. Результаты по эффективности трансформации каждой серии эксперимента представлены в таблице.

Эффективность трансформации каллусов пшеницы сорта Саратовская 29 геном хитиназы I

Серия эксперимента	Кол-во эмбрионов (каллусов)	Кол-во трансгенных растений	Эффективность трансформации, %
1	703	24	3.4
2	488	4	0.82
3	336	1	0.3
4	772	22	2.85

Средняя эффективность трансформации составила 1.84% с максимальным значением (3.4%) в первой серии экспериментов и минимальным (0.3%) в третьей. Материал для всех серий биобаллистической трансформации подбирали среди индуцированных каллусов, руководствуясь одинаковыми критериями, а процедуру биобаллистики проводили по одному протоколу. Следовательно, разница в эффективности трансформации между различными сериями экспериментов, скорее всего, объясняется различием генотипов взятых в эксперимент каллусных клеток. Это подтверждает общее мнение о том, что ключевым недостатком трансформации пшеницы является зависимость от генотипа [25]. Тем не менее, полученные нами результаты превосходят средние значения эффективности трансформации, установленные для биобаллистической трансформации в целом, и показывают перспективность использования данного подхода к улучшению качеств яровой мягкой пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *M. Коитышбаев, В. П. Шаманин, А. И. Моргунов.* Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням. Методические указания // Анкара. ФАО-СЕК. 2014.
- [2] *A. Kasprowska.* Plant chitinases - regulation and function // Cell. Mol. Biol. Lett., 2003. vol. 8, no. 3, pp. 809–824.
- [3] *R. S. Patil, V. Ghormade, and M. V. Deshpande.* Chitinolytic enzymes: An exploration // Enzyme Microb. Technol., 2000. vol. 26, no. 7, pp. 473–483.
- [4] *N. G. Halford.* Toward two decades of plant biotechnology: successes, failures, and prospects // Food Energy Secur., July 2012. vol. 1, no. 1, pp. 9–28.
- [5] *S. Shin, C. A. Mackintosh, J. Lewis, S. J. Heinen, and L. Radmer.* Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum* // J. Exp. Bot., 2008. vol. 59, no. 9, pp. 2371–2378.
- [6] *I. A. Rana, H. Loerz, W. Schaeffer, and D. Becker.* Over Expression of Chitinase and Chitosanase Genes from *Trichoderma harzianum* under Constitutive and Inducible Promoters in order to Increase Disease Resistance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) // Molecular Plant Breeding. 2012. vol. 3, no. 4, pp. 37–49.
- [7] *J. J. A. Z. K. Punja.* Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens // Plant Cell Reports. 2007. vol. 26. pp. 1539–1546.
- [8] *K. H. Oldach, D. Becker, and H. Lötz.* Heterologous Expression of Genes Mediating Enhanced Fungal Resistance in Transgenic Wheat // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2001. vol. 14, no. 7, pp. 832–838.
- [9] *A. Anand, T. Zhou, H. N. Trick, B. S. Gill, W. W. Bockus, and S. Muthukrishnan.* Greenhouse and Field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum* // J. Exp. Bot. vol. 2003. vol. 54, no. 384, pp. 1101–1111.
- [10] *Q. Ji, X. Xu, and K. Wang.* Genetic transformation of major cereal crops // Int. J. Dev. Biol. Jan. 2013. vol. 57, no. 6–8, pp. 495–508.
- [11] *T. Tzfira and V. Citovsky.* Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology // Curr. Opin. Biotechnol. Apr. 2006. vol. 17, no. 2, pp. 147–54.
- [12] *H. Mielby, P. Sandoe, and J. Lassen.* The role of scientific knowledge in shaping public attitudes to GM technologies // Public Underst. Sci. 2012. 0 (0): pp. 1–14.
- [13] *I. B. Holme, T. Wendt, and P. B. Holm.* Intragensis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development // Plant Biotechnol. J. 2013. vol. 11, no. 4, pp. 395–407.
- [14] *I. Holme, T. Wendt, and P. Holm.* Current Developments of Intragenic and Cisgenic Crops // Isb News Reports. July, 2013.
- [15] *T. Vanblaere, H. Flachowsky, C. Gessler, and G. a L. Broggini.* Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the *Rvi6* scab resistance gene // Plant Biotechnol. J. 2014. vol. 12, no. 1, pp. 2–9.
- [16] *A. Ismagul, G. Iskakova, J. C. Harris, and S. Eliby.* Biostatic Transformation of Wheat with Centrophenoxyne as a Synthetic Auxin // Crop Breeding. Methods and Protocols. 2014. Humana Press, p. 255.
- [17] *C. Tamás, B. N. Kisgyörgy, M. Rakszegi, M. D. Wilkinson, M.-S. Yang, L. Láng, L. Tamás, and Z. Bedo.* Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality // Plant Cell Rep., Jul. 2009. vol. 28, no. 7, pp. 1085–94.
- [18] *A. Gadaleta, A. Giancaspro, A. E. Blechl, and A. Blanco.* A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses *IDy10* // J. Cereal Sci. 2008. vol. 48, no. 2, pp. 439–445.
- [19] *Н. П. Малахова.* Сравнительный анализ экспрессии некоторых генов защитного ответа и структурная характеристика клонированного гена хитиназы пшеницы и продукта его экспрессии // Диссертация. 2010.
- [20] *Н. П. Малахова, Г. А. Исмагулова, Ю. А. Скиба, и Н. А. Айтхожина.* Биоинформационный анализ кДНК гена хитиназы, полученного из Казахстанского сорта пшеницы Степная 15 // Известия НАН РК. Серия биологическая. 2010. no. 5, cc. 28–31.
- [21] *C. J. Thompson, N. R. Moval, R. Tizard, R. Cramer, J. E. Davies, M. Lauwereys, and J. Botterman.* Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus* // EMBO J. 1987. vol. 6, no. 9, pp. 2519–2523.
- [22] *L. Chen, Z. Zhang, H. Liang, H. Liu, L. Du, H. Xu, and Z. Xin.* Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat // J. Exp. Bot. 2008. vol. 59, no. 15, pp. 4195–4204.
- [23] *A. L. Rivera, M. Gómez-Lim, F. Fernández, and A. M. Loske.* Physical methods for genetic plant transformation // Phys. Life Rev. Sep. 2012. vol. 9, no. 3, pp. 308–45.
- [24] *N. J. Taylor and C. M. Fauquet.* Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology // DNA Cell Biol. 2002. vol. 21, no. 12, pp. 963–977.
- [25] *W. a. Harwood.* Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat // J. Exp. Bot. 2012. vol. 63, no. 5, pp. 1791–1798.

REFERENCES

- [1] *M. Коитышбаев, В. П. Шаманин, А. И. Моргунов.* Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням. Методические указания // Анкара. ФАО-СЕК. 2014.
- [2] *A. Kasprowska.* Plant chitinases - regulation and function // Cell. Mol. Biol. Lett., 2003. vol. 8, no. 3, pp. 809–824.
- [3] *R. S. Patil, V. Ghormade, and M. V. Deshpande.* Chitinolytic enzymes: An exploration // Enzyme Microb. Technol., 2000. vol. 26, no. 7, pp. 473–483.
- [4] *N. G. Halford.* Toward two decades of plant biotechnology: successes, failures, and prospects // Food Energy Secur., July 2012. vol. 1, no. 1, pp. 9–28.
- [5] *S. Shin, C. A. Mackintosh, J. Lewis, S. J. Heinen, and L. Radmer.* Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum* // J. Exp. Bot., 2008. vol. 59, no. 9, pp. 2371–2378.
- [6] *I. A. Rana, H. Loerz, W. Schaeffer, and D. Becker.* Over Expression of Chitinase and Chitosanase Genes from *Trichoderma harzianum* under Constitutive and Inducible Promoters in order to Increase Disease Resistance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) // Molecular Plant Breeding. 2012. vol. 3, no. 4, pp. 37–49.

- aestivum* L.) // Molecular Plant Breeding. 2012. vol. 3, no. 4, pp. 37–49
- [7] J. J. A. Z. K. Punja. Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens // Plant Cell Reports. 2007. vol. 26. pp. 1539–1546.
- [8] K. H. Oldach, D. Becker, and H. Lötz. Heterologous Expression of Genes Mediating Enhanced Fungal Resistance in Transgenic Wheat // Mol. Plant. Microbe. Interact. 2001. vol. 14, no. 7, pp. 832–838.
- [9] A. Anand, T. Zhou, H. N. Trick, B. S. Gill, W. W. Bockus, and S. Muthukrishnan. Greenhouse and Field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum* // J. Exp. Bot. vol. 2003. vol. 54, no. 384, pp. 1101–1111.
- [10] Q. Ji, X. Xu, and K. Wang. Genetic transformation of major cereal crops // Int. J. Dev. Biol. Jan. 2013. vol. 57, no. 6–8, pp. 495–508.
- [11] T. Tzfira and V. Citovsky. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology // Curr. Opin. Biotechnol. Apr. 2006. vol. 17, no. 2, pp. 147–54.
- [12] H. Mielby, P. Sandoe, and J. Lassen. The role of scientific knowledge in shaping public attitudes to GM technologies // Public Underst. Sci. 2012. 0 (0): pp. 1–14.
- [13] I. B. Holme, T. Wendt, and P. B. Holm. Intragensis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development // Plant Biotechnol. J. 2013. vol. 11, no. 4, pp. 395–407.
- [14] I. Holme, T. Wendt, and P. Holm. Current Developments of Intragenic and Cisgenic Crops // Isb News Reports. July, 2013.
- [15] T. Vanblaere, H. Flachowsky, C. Gessler, and G. a L. Broggini. Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the Rvi6 scab resistance gene // Plant Biotechnol. J. 2014. vol. 12, no. 1, pp. 2–9.
- [16] A. Ismagul, G. Iskakova, J. C. Harris, and S. Eliby. Biostatic Transformation of Wheat with Centrophenoxyne as a Synthetic Auxin // Crop Breeding. Methods and Protocols. 2014. Humana Press, p. 255.
- [17] C. Tamás, B. N. Kisgyörgy, M. Rakszegi, M. D. Wilkinson, M.-S. Yang, L. Láng, L. Tamás, and Z. Bedo. Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality // Plant Cell Rep., Jul. 2009. vol. 28, no. 7, pp. 1085–94.
- [18] A. Gadaleta, A. Giancaspro, A. E. Blechl, and A. Blanco. A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses IDy10 // J. Cereal Sci. 2008. vol. 48, no. 2, pp. 439–445.
- [19] N. Malakhov. Comparative analysis of expression of some genes protective response and structural characteristics of the cloned gene chitinase wheat and its expression product // Thesis. 2010.
- [20] Н. П. Малахова, Г. А. Исмагулова, Ю. А. Скиба, и Н. А. Айтхожина. Биоинформационный анализ кДНК гена хитиназы, полученного из Казахстанского сорта пшеницы Степная 15 // Известия НАН РК. Серия биологическая. 2010. no. 5, cc. 28–31.
- [21] C. J. Thompson, N. R. Moval, R. Tizard, R. Cramer, J. E. Davies, M. Lauwereys, and J. Boterman. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus* // EMBO J. 1987. vol. 6, no. 9, pp. 2519–2523.
- [22] L. Chen, Z. Zhang, H. Liang, H. Liu, L. Du, H. Xu, and Z. Xin. Overexpression of TiERF1 enhances resistance to sharp eyespot in transgenic wheat // J. Exp. Bot. 2008. vol. 59, no. 15, pp. 4195–4204.
- [23] A. L. Rivera, M. Gómez-Lim, F. Fernández, and A. M. Loske. Physical methods for genetic plant transformation // Phys. Life Rev. Sep. 2012. vol. 9, no. 3, pp. 308–45.
- [24] N. J. Taylor and C. M. Fauquet. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology // DNA Cell Biol. 2002. vol. 21, no. 12, pp. 963–977.
- [25] W. a. Harwood. Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat // J. Exp. Bot. 2012. vol. 63, no. 5, pp. 1791–1798.

ГЕНОМ ХИТИНАЗАСЫНЫң И КЛАССЫНДАҒЫ БИДАЙДЫҢ САРАТОВСКАЯ 29 СОРТЫНЫң ЦИСТГЕНДІК ТРАНСФОРМАЦИЯСЫ

Э. Р. Мальцева¹, А. Ж. Исмагул², Г. А. Искакова², ¹Чиркин А. П.,
Ю. А. Скиба¹, Г. А. Исмагулова¹, С. Елибай², Н. А. Айтхожина¹

¹ҚР БжФМ ФК, М. А. Айтхожин атындағы молекулярлық биология және биохимия институты,
Алматы, Қазақстан,

²Өсімдіктер функционалды геномикасының Австралиялық орталығы, Аделаїда, Австралия

Тірек сөздер: хитиназа, биобаллистикалық трансформация, жұмсақ бидай.

Аннотация. Санырауқұлақ ауруларына есімдіктердің тұрактылығы белгілі көп мөлшердегі гендермен реттеледі, атап айтқанда PR- ақуыздар (PR – pathogenesis related). Қорғаныс ансамблінде маңызды бөлім бұл, гидролитикалық ферменттерді кодттайтын, санырауқұлактардың клеткалық қабырғасын бөлшектемелейтін гендер болып табылады. Осы зерттеу объектісі ретінде бидайдың I классындағы хитиназа таңдалды. Жұмыс мақсаты цисгендік алу, яғни тек бидай гендерін білдіру, есімдіктердің белгілі хитиназа гендерін бейнелеу. Бұл мақсатқа жету үшін Саратовская 29 бидай сортынан алынған толық піспеген эмбриондардан каллустарды биобаллистикалық тұракты трансформациялау жүргізілді. Трансформанттарды таңдауға бидайдың гендік ферменті ацетогидроксицидсингазаны, гербицидке имазетапирге тұрактылықты кодтауға котрансформацияны қолданды. Тексерілген х есімдіктердің 59 трансформацияланған есімдіктер айқындалды, оның ішінде 58 имазетапирге тұракты гендерді алғып жүреді, ал 51 есімдік еңгізген I классындағы хитиназасы бар. Трансформацияның ораша нәтижелілігі 1.84% құрады, ең жоғарғы маңыздылығы 3.4% және ең азы – 0.3%.

Поступила 10.02.2016 г.