

А.Т. Жұмабек^{1,2}
Е.М. Раманкулов^{1,2}
Ш.А. Манабаева^{1,2}

¹ ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы», Нұр-Сұлтан, Қазақстан
² Д.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан
(e-mail: ^{1,2} zh.aiganym91@gmail.com, ^{1,2} ramankulov@biocenter.kz, ^{1,2} manabayeva@biocenter.kz)

Тары өсімдігінің *Agrobacterium*-жанама трансформациясының параметрлерін оңтайландыру

Аңдатпа. Тары өсімдіктерін (*Panicum virgatum* L.) агробактерия көмегімен трансформациялаудың қарапайым және тиімді әдісі жасалып оңтайландырылды. Зерттеудің мақсаты Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee және Trailblazer сұрыптарындағы тары өсімдігінің *Agrobacterium* – жанама трансформация жағдайларын оңтайландыру болды. Генетикалық трансформация үшін тары өсімдігінің эмбриогендік каллустары қолданылды. Вируленттілік генінің индукторының, сурфактанттың әсерін зерттеу нәтижесінде, бактериялар суспензиясының оптикалық тығыздығы және ко-культивация уақыты анықталды, нәтижесінде қоректік ортада силвет-L77 бар ацетосирингон, бактериялық суспензияның оптикалық тығыздығы 0.6 және 8 күндік ко-культивациялау тарының эмбриогенді каллустарының *Agrobacterium* – жанама трансформациясы үшін оңтайлы екендігі анықталды. Алынған нәтижелер тары өсімдігінің трансгенді өсімдіктерін құрудың негізін қалайды.

Түйін сөздер: *Agrobacterium* – жанама трансформациясы, жасуша культурасы, тары өсімдігі, тікелей емес регенерация, эмбриогенді каллус.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-32-43>

Кіріспе. Дүние жүзі халқының өсу динамикасы, сонымен қатар, өндіріс қарқынының өсуіне әкелген экономикадағы процестердің индустриялануы энергия ресурстарын тұтынудың өсуіне әкелді. Қазіргі уақытта біздің планетамыздағы табиғи отынның қоры негізінен сарқылуда және оларды пайдалану экономикалық тұрғыдан да, экологиялық тұрғыдан да тиімсіз болып келеді. Сондықтан адамзат үшін, ең алдымен, өсімдіктерде жинақталатын қалпына келетін қуат көздерін, яғни биоэнергияны игеру қажет және мүмкін болады. Көптеген елдердегі экологиялық және экономикалық қауіпсіздіктің маңызды мәселелерінің бірі - қазба қалдықтарын тиімді пайдалану ғана емес, сонымен қатар, жаңа баламалы энергия көздерін іздеу. Соңғылардың ішінде органикалық шикізаттан және көпжылдық дәнді дақылдардың арнайы өсірілген биомассасынан алынатын жаңартылатын энергия көздеріне көп көңіл бөлінеді. Осыған байланысты биоотын өндірумен айналысатын ғалымдардың назары кез келген жерде өсетін, минималды суару мен тыңайтқышты қажет ететін, сыртқы әсерлерге төзімді және жақсы өнімділікпен сипатталатын дақылдарға аударылады.

Ғалымдар тары өсімдігіне көп көңіл бөледі. Бұл Солтүстік Америкадан шыққан С4 көпжылдық шөпті өсімдік. Тары биомассаның жоғары өнімділігі целлюлозалық биоотынды өндіруге арналған биоэнергетикалық дақыл ретінде қант қамысы мен жүгеріні алмастыра алды [1-5].

Тары өсімдігі екі таксономиялық әртүрлі экотиптерді қамтиды: ойпатты және таулы сұрыптар [1, 3]. Тары өсімдігі хромосомалары негізгі санға ие екендігі белгілі ($x = 9$). Төменгі сұрыптар тетраплоидты ($2n = 4x = 36$ хромосома) ретінде анықталады және сирек жағдайларда, октоплоидты ($2n = 8x = 72$ хромосома) түрінде кездеседі [6]. Тары өсімдігінің СЗ өсімдіктерінен және басқа шөптерден көптеген агротехникалық артықшылықтары бар, оның ішінде: зиянкестер мен ауруларға, топырақ пен ауа құрғақшылығына төзімділік [7]. Алайда биоотынға шикізат алу үшін тарының жоғарыда көрсетілген сипаттамалары жеткіліксіз.

Тары өсімдігінің зиянкестер мен ауруларға табиғи төзімділігі құрамында лигниннің жоғары болуына байланысты, бұл биомассаны биоотынға айналдырудағы энергия шығынын көбейтеді, экономикалық жағынан тиімсіз болып келеді. Гендік инженерияның заманауи әдістерін пайдалану арқылы ғана құрамында лигнин мөлшері аз трансгенді өсімдіктер алуға болады, осылайша бұл мәселе де шешіледі. Мысалы, өсімдіктердегі лигниннің сахарификациясын жақсарту үшін лигнин биосинтезінің жолын өзгерту қолданылады. Мысал ретінде гималай тегіндегі (*Populus ciliata* Wall.) лигнин мөлшерін төмендету агробактериалдық трансформация арқылы даршын спиртінің дегидрогеназа генін (CAD) посттранскрипция жолымен бәсеңдету арқылы жүргізіледі [8]. Manal M. Abdel-Rhman биобаллистикалық трансформация әдісін қолдана отырып, Caffeoyl-CoA реттеуді басу арқылы лигнин деңгейі төмен трансгенді жүгері өсімдіктерін алды [2]. Алайда, трансгенді өсімдіктерді алу үшін *Agrobacterium* – жанама трансформацияны қолдану генетикалық инженерияның таңдаулы әдісіне айналды, өйткені бұл әдіс реципиент геномына трансгеннің аз көшірмесін енгізуге бейім.

Бүгінгі күні трансгенді тары өсімдіктерінде лигнин құрамын төмендету үшін гендік инженерия әдістері қолданылады [9]. Мысал ретінде өсімдіктердің лигнификациясына жауап беретін PvKN1 генінің мақсатты түрдегі жоғары экспрессиясы [10]. Басқа зерттеулер көрсеткендей, эндогенді кофеин қышқылы О-метилтрансферазаның белсенділігін тежеу арқылы лигнин құрамының төмендеуіне және трансгенді тарыдан этанол шығымының жоғарылауына қол жеткізуге болады [11]. Yanrong Liu және оның командасы miR319 жоғары экспрессиясына қол жеткізді, бұл PvPCF5 генін басу арқылы тары биомассасының шығымы мен шикізат сапасын жақсартты. miR319 жоғары экспрессиясы трансгенді тары өсімдіктерінде лигнин құрамын төмендетіп, жабайы типтегі өсімдіктерге қарағанда ферментативті гидролиздің жоғары тиімділігін көрсетті [12].

Биоотын шикізаты ретінде тары өсімдіктерін жақсарту үшін модельдік өсімдік ретінде негізінен Alamo сұрыптары қолданылады. Бұрын *Agrobacterium* – жанама трансформацияны қолдана отырып, PvMYB4 генінің жоғары экспрессиясында құрамында лигнин мөлшері аз Alamo сұрыпының трансгенді тары өсімдіктері алынған. PvMYB4 монолигнолды гендері AC-I, AC-II және AC-III элементтерімен байланысады және бұл гендерді *in vivo*-да бәсеңдетеді. Авторлар лигниннің құрамын төмендетіп, жасуша қабырғасының қалдықтарынан қант шығару тиімділігін үш есе арттыруға қол жеткізді [13].

Біздің зерттеуіміздің мақсаты Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee және Trailblazer сұрыптарындағы тары өсімдіктерінің *Agrobacterium* – жанама трансформациясын оңтайландыру болды.

Биоэнергетикалық қуат көзі ретінде Қазақстанда лигнин мөлшері төмен тары өсімдігін өсіру мүмкіндігі туралы зерттеулердің маңызы зор. Орындалған жұмыс құрамында лигнині аз тарының трансгенді өсімдіктерін алуға арналған платформа құруға және целлюлоза-қағаз өнеркәсібінің технологиясын жасауға мүмкіндік береді.

Материалдар мен әдістер. *Өсімдік материалы.* Эмбриогендік каллус алу үшін бастапқы өсімдік материалы ретінде USDA, ARS, Plant Genetic Resources Conservation Unit (Гриффин, Джорджия) ұсынған тарының шетелдік сұрыптарының (*Panicum virgatum* L.) – Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee және Trailblazer тұқымдары пайдаланылды. *In vitro* жағдайына енгізу және каллус ұлпасын алу біз бұрын жасаған хаттамаға сәйкес жүзеге асырылды [14].

PvMYB4 трансформациялауға арналған ген және векторлық құрылым. 777 н.ж. тұратын *PvMYB4* генінің нуклеотидтер тізбегі NCBI мәліметтер базасынан алынды (GenBank: JF299187.1). *PvMYB4* генінің *de novo* нуклеотидтік тізбегін алу үшін олигонуклеотидті праймерлерді жобалау Vector NTI 10.3.0 компьютерлік бағдарламасының көмегімен жүзеге асырылды және оны Eurofins Genomics (Финляндия) синтездеді.

pSRB-UbiP бинарлы векторы *PvMYB4* генінің жоғары экспрессиясы үшін агробактерия көмегімен трансформациялауға пайдаланылды. pSRB-UbiP-ті доктор Огава Т. ұсынды (Institute of Agrobiological Sciences, NARO, Жапония). Вектор құрамында конституциялық NOS промоторының бақылауымен фосфонитрицинге төзімділік (*bar*) үшін таңдалатын маркер гені, сондай-ақ, жүгері полиубиквитин промоторы басқаратын Gateway-кассета және мақсатты гендердің жоғары экспрессиясы үшін интрон бар. *PvMYB4* генінің кодтау тізбегі Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix ферменттік қоспасын (Invitrogen, 11791020, Carlsbad, CA, USA) қолдана отырып, pSRB-UbiP экспрессивті бинарлы векторына рекомбинация мен pENTR™ / D-TOPO®, аралық векторына клондалды. Гендік-инженерлік құрылымдардың дұрыс құрастырылуын растау ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, USA) автоматты секвенаторында Big Dye 3.1 жиынтықтарын қолдану арқылы клондалған фрагменттердің ДНҚ-ның нуклеотидтік тізбегін анықтау арқылы жүзеге асырылды. Өсімдіктің трансформациясы үшін мақсатты генді кодтайтын бинарлы вектор LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* штаммының жасушаларына электропорация арқылы трансформацияланды.

Тары өсімдігінің трансформациясы бойынша эксперименттер агробактерия суспензиясымен каллусты инокуляциялау және ко-культивациялау әдісімен жүргізілді. Агробактериялардың түнгі культурасы pSRB-UbiP бинарлы векторы үшін 25 мг/л және 40 мг/л концентрациясында тиісті селективті антибиотиктермен толықтырылған 30 мл LB сұйық ортасында 28 °C температурада, тербеліс жиілігі 70 айн/мин инкубаторлық шейкерде, 12 сағат ішінде қажетті оптикалық тығыздыққа дейін өсті (O.T.=0.6-1). Бактерия жасушалары центрифугалау арқылы тұндырылды (4000 айн/мин, 10 мин), бактериялық жасушалардың тұнбасы 5 мл, 10 mM MgSO₄ ерітіндісінде шайылып, центрифугаланды (4000 айн/мин, 10 мин). Тұнба құрамында АВ ортасының тұздары бар (NH₄Cl-20 г/л, MgSO₄×7H₂O - 6 г/л, KCl - 3 г/л, CaCl₂×2H₂O - 0,264 г/л, FeSO₄×7H₂O - 50мг/л), 2 mM натрий фосфат буфері, 1% глюкоза және ацетосирингон 100 μM концентрациясында ресуспензияланды.

Трансформация үшін шетелдік тары сұрыптарының каллустары қолданылды. *In vitro* жағдайының барлық кезеңдерінде негізгі қоректік орта ретінде Мурасиг пен Скута (МС) және МСБ (МС тұзы және В5 дәрумендері бар) құрамы бойынша минералды негіздер пайдаланылды. Әр түрлі концентрациялардағы және комбинациялардағы ауксиндер мен цитокининдер қоректік ортаға культураға енгізу сатысында өсу мен дамуды реттегіш ретінде қосылды. Мальтоза 30 г/л көміртегі көзі ретінде пайдаланылды. *Agrobacterium* – жанама трансформация параметрлерін оңтайландыру үшін тары каллустары 10 мл агробактерия жасушалары суспензиясына, үш нұсқада ацетосирингон, сильвет-Л77 және ацетосирингон+сильвет-Л77 100 μM ацетосирингон және 0,01% сильвет-Л77 концентрациясында, қалыпты тербеліспен 28 °C температурада инкубаторлық шейкерде 10 минутқа қойылды. Содан кейін каллустарды ко-культивирлеу үшін ацетосирингон және қоректік ортаға сәйкес келетін гормондар мен дәрумендер бар МС қатты қоректік ортасына сүзгі қағазымен, 19±2 °C температурада 4-тен 8 күнге дейін инкубацияланды. Ко-культивация кезеңінен кейін каллустарды дистилденген суда 3 рет және антибиотик қосып 1 рет шайып, 3 қабатты сүзгі қағазда кептіріп, эксплант-трансформанттарды іріктеу, сатылы және қатаң селекция (РРТ) үшін 3 мг/л, 5 мг/л және 10 мг/л фосфинотрицин бар селективті ортаға ауыстырылды, агробактерияларды жою үшін антибиотик және 100 μM концентрациясында ацетосирингон қосылды.

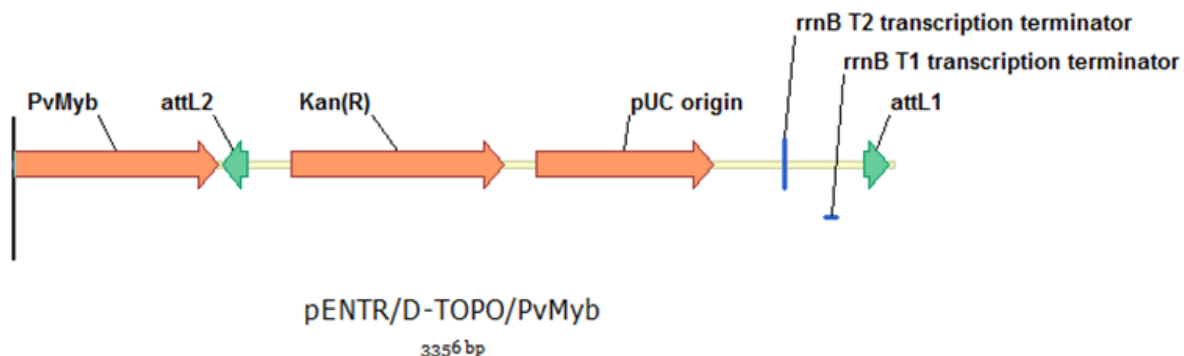
Агробактериалды трансформациядағы маңызды сәт - тиісті антибиотиктермен бактериялардың көбеюін тежеу. Бұл жұмыста *A.tumefaciens* жасушаларын жою үшін 250 мг/л және 500

мг/л концентрациясындағы цефотаксим, сондай-ақ 50 мг/л концентрациядағы меропенем қолданылды.

Трансформанттарды селективті іріктеу фосфинотрицин гербицидінің көмегімен *in vitro* жағдайында жүргізілді (фосфинотрицин ацетилтрансфераза, Fluka, 45520, St. Louis Mo, USA). 3 мг/л, 5 мг/л және 10 мг/л тиісті концентрациялар каллусты агробактериямен ко-культивациялағаннан кейін қоректік ортаға қосылды. Заттың әр концентрациясы үшін кем дегенде 20 эксплант (каллус ұлпалары) қолданылды, эксперименттер үш қайталауда жүргізілді. Селективті агенттің жасушалардың өміршеңдігіне әсер ету нәтижелері 4-8 аптадан кейін бағаланды.

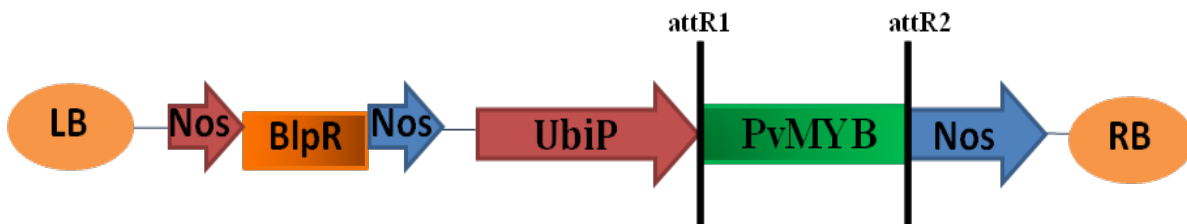
Нәтижелер мен талқылаулар. *Өсімдік материалы.* Тары өсімдігінен эмбриогендік каллус және одан регенерант өсімдіктерді алудың тиімді жүйесін жасалды, сондықтан трансформация жасау үшін эмбриогендік каллустар эксплант ретінде қолданылды [15].

Мақсатты ген, клондау және экспрессия векторын құру. Жұмыстың бірінші кезеңінде химиялық синтезделген гендерді клондау үшін ТОРО технологиясын қолданатын лигазсыз клондау әдісі қолданылды. Бұл әдіс рестрикциялық фермент пен ДНҚ-лигаза функцияларын орындайтын топоизомераза I ферментін қолдануға негізделген [16]. ТОРО сериясының векторлық плазмидасына кірістіруді клондау топоизомераза I таныған нақты сайттар арқылы жүзеге асырылады, праймерлердің көмегімен *pentr* / D-ТОРО векторын тану сайттары бар мақсатты фрагменттер жасалды. Клондау өндірушінің хаттамасы бойынша жүргізілді (сурет 1), мақсатты гендері бар плазмидтік ДНҚ секвенирлеу әдісімен нуклеотидтік реттілікті талдау және экспрессиялық векторға одан әрі клондау үшін XL-Blue *Escherichia coli* штаммын қолдана отырып жасалды.



Сурет 1 - attL1 және attL2 аймақтары арасында орналастырылған мақсатты PvMYB гені бар рекомбинантты pENTR / D-ТОРО + PvMYB құрылымы

pENTR / D-ТОРО векторынан мақсатты генді pSRB-UbiP экспрессия векторына клондау Gateway LR CLONASE II Enzyme Mix көмегімен жүргізілді (сурет 2).



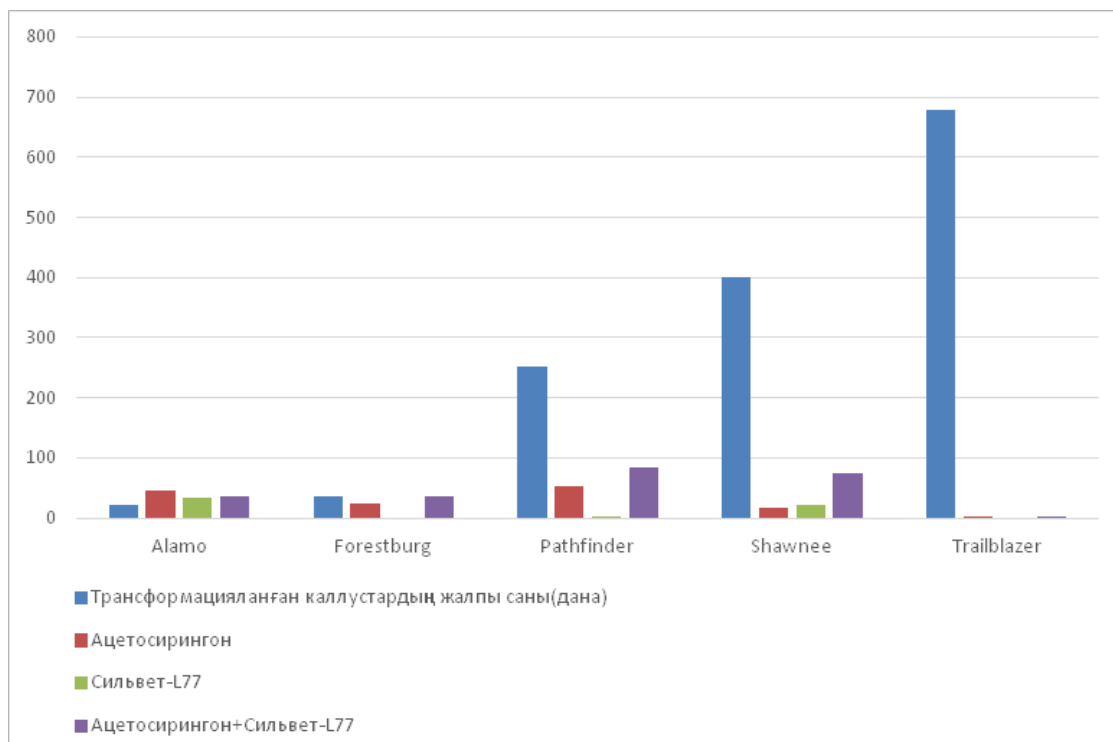
Сурет 2 - өсімдіктерде мақсатты геннің экспрессиясын қамтамасыз ететін конституциялық промотор убиквитин (UbiP) бақылауына қойылған, PvMYB кодтайтын мақсатты генді қамтитын рекомбинантты pSRB-PvMYB құрылымы

Agrobacterium – жанама трансформация. Генетикалық трансформацияның тиімділігі көптеген факторларға байланысты екені белгілі. *Agrobacterium*-жанама трансформация әдісін қолданған кезде трансформация жүргізілген температура, инокуляция ортасының құрамы, бактерия жасушаларының концентрациясы, вируленттілік генінің индукторларын қолдану, агробактерия штаммы, векторлық құрылым түрі және өсімдік генотипі үлкен маңызға ие [17]. Тары өсімдіктерінің шетелдік сұрыптарын *Agrobacterium*-жанама трансформациясы бойынша эксперименттер каллуска трансгенді өсімдіктердің гербицидке тұрақтылығын қамтамасыз ететін, убиквитин промоторы және фосфинотрицин ацетилтрансфераза генінің құрамында МҮВ4 гені бар рSRB бинарлы векторын тасымалдайтын *A.tumefaciens* LBA4404 штаммын жұқтыру арқылы жүргізілді.

Каллустың агробактериалды трансформациясы *A.tumefaciens* жасушалары әртүрлі оптикалық тығыздықпен, ко-культивация кезеңімен, вируленттілік гендерінің индукторы ретінде ацетосирингон және инфекцияның тиімділігін арттыру үшін ортаға сурфактант ретінде силвет-L77 қосу арқылы жүргізілді.

Ко-культивация кезеңінен кейін бактерияларды жою трансформацияның маңызды мәселесі болып табылады. Біздің жұмысымызда *A.tumefaciens* жасушаларына 250 мг/л және 500 мг/л концентрациясында цефотаксим, сондай-ақ, 50 мг/л концентрациясында меропенем қолданылды, соңғысы агробактерияға қатысты ең тиімді болды, сонымен қатар, каллус өміршеңдігін және морфогенетикалық потенциалын сақтап қалды, бұл аталған антибиотиктің тары өсімдігінің каллусогенезі мен регенерациясына ингибиторлық әсерінің жоқтығын көрсетеді. Алайда, цефотаксим бактерияларды жою үшін сәтті қолданылған жұмыстар да бар [18], [19].

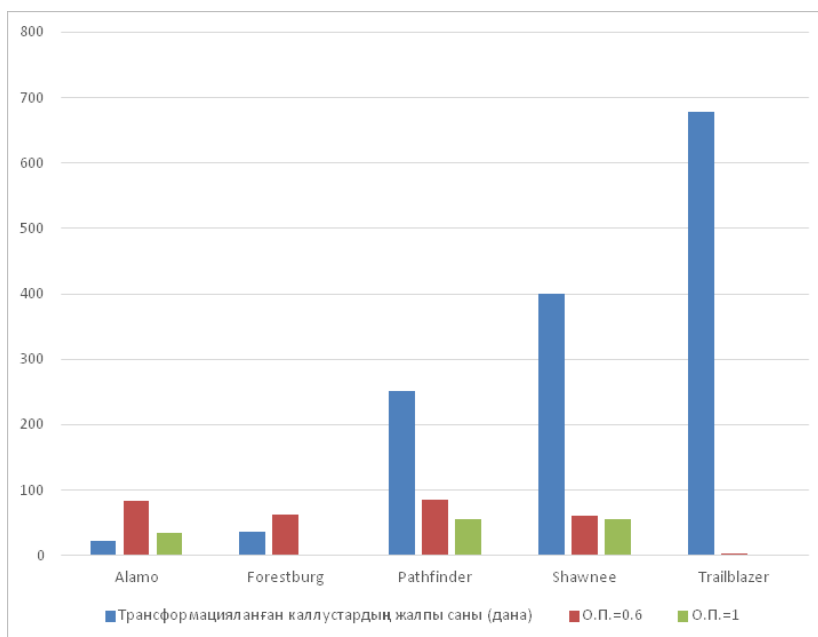
Сонымен қатар, трансформацияланған тары өсімдігінің каллус жасушаларының массасын селективті ортада өлшеу арқылы талданды. Өлшеу нәтижесінде 3 өлшемді өсу индексі Alamo – 2.502 мг, Forestburg – 2.204 мг, Pathfinder – 2.801 мг, Shawnee – 3.291 мг, Trailblazer – 5.2035 мг құрады.



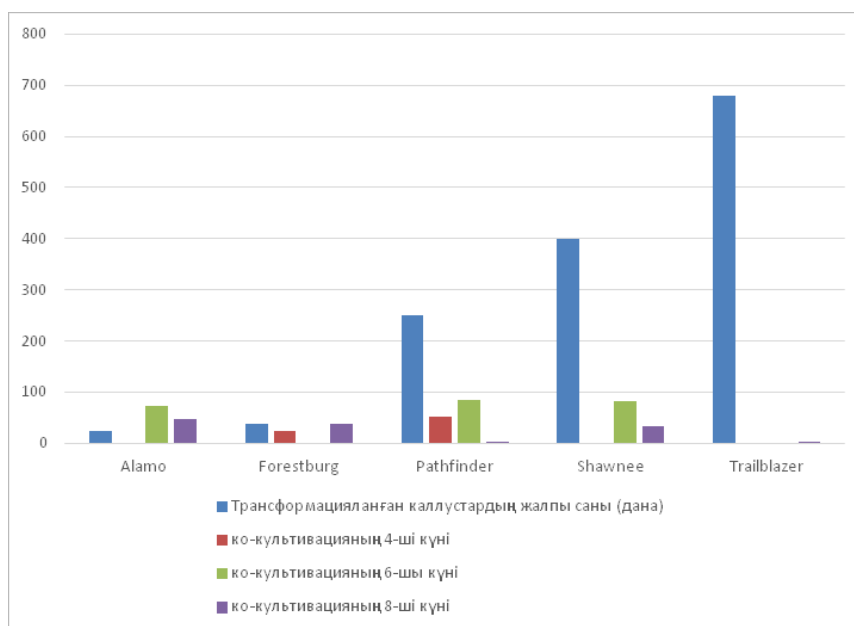
Сурет 3 - Вируленттілік гендерінің индукторының, сурфактанттың трансформацияланған каллустардың регенерация потенциалына әсері

Селективті іріктеу нәтижесінде морфогенез аймақтары болып табылатын, регенерант өсімдіктерін құрайтын құрылымдалған, күңгірт, хлорофилл жасыл аймақтары бар эмбрио-гендік каллустар алынды. Alamo сұрыпында 23 каллус орта есеппен бір каллуста 20 жасыл аймақ болды, Forestburg – 37 каллус, Pathfinder – 251 каллус, Trailblazer – 679 каллус, Shawnee – 400 каллус.

A.tumefaciens оптикалық тығыздығының әсері, ко-культивация уақыты, ацетосирингон мен сильвет-L77 меристематикалық жасыл аймақтары бар тарының каллус жасушаларын индукциялауға арналған эксперименттердің нәтижелері төмендегі суреттерде келтірілген (сурет 3,4,5).



Сурет 4 - Бактерия суспензиясының оптикалық тығыздығының трансформацияланған каллустардың регенерация потенциалына әсері



Сурет 5 - Ко-культивация уақытының трансформацияланған каллустардың регенерация потенциалына әсері

Жалпы, *Agrobacterium* – жанама трансформациясы шетелдік селекцияның тары сұрыптарының 1367 каллусын қолдану арқылы жүзеге асырылды. Вируленттілік генінің индукторының, сурфактанттың, бактериялар суспензиясының оптикалық тығыздығының және ко-культивация уақытының әсерін зерттеу ко-культивацияның 8-ші күні және бактерия суспензиясының $O.D. = 0.6$ болатын, сильвет-L77 + ацетосирингон қоспасы бар қоректік орта тары каллусының *Agrobacterium* – жанама трансформациясына оңтайлы екенін көрсетті.

Трансформация параметрлерін оңтайландыру үшін T-ДНҚ-ны жеткізу үшін *A.tumefaciens*-тің әртүрлі штамдары салыстырылады. Мысалы, Аламо сұрыпының соматикалық эмбриогендік каллусының *Agrobacterium*-жанама трансформация хаттамалары AGL1, C58, EHA105 және GV3101 штамдарын қолдана отырып оңтайландырылды, онда AGL1 гендерді жеткізу үшін ең жоғары тиімділігі көрсетілді [20, 21]. Басқа зерттеулерде EHA105 штаммы LBA4404 немесе GV3101s қарағанда ең тиімді екендігі айтылады [19]. Зерттеулеріміздің нәтижелері біз зерттеген сұрыптарды LBA4404 штаммымен трансформациялау кезінде жақсы нәтиже көрсетеді.

Тары сұрыптарының регенеративті потенциалы зерттелді (кесте 1).

Кесте 1.

Тарының шетелдік сұрыптарының регенерация потенциалын талдау

Сұрып	Трансформацияланған каллустардың жалпы саны, %	Меристематикалық жасыл аймақтар, %	Некротизация, %
Alamo	23	119	34
Forestburg	37	105	25
Pathfinder	251	867	44
Shawnee	400	106	41
Trailblazer	679	6	2

Атқарылған жұмыстардың қорытындысы бойынша Alamo сұрыпының трансгенді регенерантты өсімдіктері алынды (сурет 4), Pathfinder – 53 %, Shawnee – 23% сұрыптарында жақсы регенерациялық потенциал байқалды.



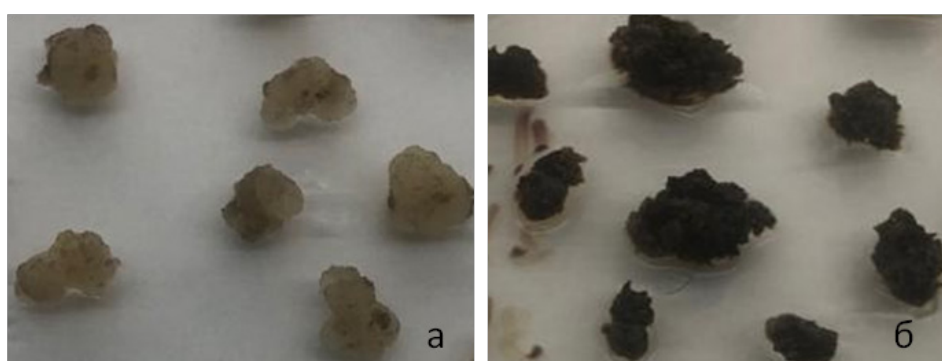
Сурет 6 - Аламо сұрыпының трансгенді регенерант өсімдіктері

Фосфинитрициннің әртүрлі концентрациясы бар селективті ортада трансформанттарды іріктеу. Трансформанттарды селективті іріктеу *in vitro* жағдайында фосфинотрицин гербицидінің

көмегімен жүргізілді (фосфинитрицин ацетилтрансфераза, Fluka, 45520, St. Louis Mo, USA). 3 мг/л, 5 мг/л және 10 мг/л тиісті концентрациялары каллусты агробактериямен ко-культивациялағаннан кейін қоректік ортаға қосылды.

Содан соң трансформацияланған тары каллус жасушаларының тіршілік қабілеті селективті агенті бар қоректік ортада талданды. Нәтижесінде, трансформация процесі және 10 мг/л PPT қатаң іріктеу кезінде селективті жағдайда трансгенді тары жасушаларын одан әрі ұзақ өсіру барлық дерлік сұрыптардағы жасушалардың морфогендік қабілетін едәуір төмендететіні анықталды, 5 мг/л концентрациядағы PPT трансформацияланған каллустардың өсуін тежеуге қабілетті.

Сондықтан трансгенді өсімдіктерді алу үшін селективті агенттің бастапқы концентрациясы 3 мг/л болатын сатылы таңдау оңтайлы болып саналады, бұл трансгенді жасушалардың тиімді іріктелуін қамтамасыз етеді және сонымен бірге, морфогенезге және одан әрі өсімдіктердің регенерациясына кедергі болмайды (сурет 5).



Сурет 7 - Селективті агенттің әртүрлі концентрациясындағы трансформацияланған тары каллустары: а) PPT селективті агенті қосылған тары каллустары - 3 мг/л; б) PPT селективті агенті қосылған тары каллустары - 10 мг/л

Біздің зерттеулерімізде селективті агент болған кезде ең үлкен некротизация Pathfinder және Shawnee сұрыптарының трансформацияланған жасушаларында байқалды, бұл көрсеткіштер сәйкесінше 44% және 41% құрады. Сонымен қатар, сұрыпталған жасушалардан жасыл нүктелердің ең көп популяциясын тудырған Pathfinder трансформацияланған жасушаларының морфогенетикалық потенциалын атап өткен жөн. Селекцияланған жасушалардың ең аз некротизациясы Trailblazer сұрыпынан алынды, ол 2% көрсетті.

Қаржыландыру. Бұл жұмыс Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің қаржылық қолдауымен 2018-2020 жылдарға арналған № AP05130387 ғылыми жобасы шеңберінде орындалды.

Әдебиеттер тізімі

1. Hoang N.V., Furtado A., Botha F.C., Simmons B.A. and Henry R.J. (2015) Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3. P. 1-15.
2. Abdel-Rhman M.M. (2015) Genetic Modification of Lignin to Improve Biofuel Production from Maize Zea Mays L. Using Particle Bombardment, *International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering (BCEE-2015)*, P. 1-6.
3. Vogel K.P., Sarath G., Saathoff A.J. and Mitchell R.B. (2011) Switchgrass, *Royal Society of Chemistry Energy and Environment Series*. No. 3, Energy Crops Chap 17. P. 341-380.

4. Samson R.A. and Omielan J.A. (1992) Switchgrass: a potential biomass energy crop for ethanol production, The Thirteenth North American Prairie conference. P. 253-258.
5. Lemežienė N., Norkevičienė E., Liutikas Ž., Dabkevičienė G., Cecevičienė J. and Butkutė B. (2015) Switchgrass from North Dakota - an adaptable and promising energy crop for northern regions of Europe, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*. Vol. 2. P. 118-124.
6. Casler M.D. (2015) Switchgrass breeding, genetics, and genomics, A. Monti (ed.), *Switchgrass, Green Energy and Technology* Chap 2. P. 29-53.
7. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1993, Proceedings: First Biomass Conference of the Americas - Energy, Environment, Agriculture, and Industry, NREL/CP-200-5768.
8. Thakur A. K., Aggarwal G. and Srivastava G.K. (2012) Genetic Modification of Lignin Biosynthetic Pathway in *Populus ciliata* Wall. via *Agrobacterium*-Mediated Antisense CAD Gene Transfer for Quality Paper Production, *National Academy Science Letters*. Vol. 2. P. 79-84.
9. Chen F. and Dixon R.A. (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production, *National Biotechnology*. Vol. 7. P. 759-761.
10. Wuddineh W., Mazarei M., Zhang J., Turner G., Sykes R., Decker S.R., Davis M., Udvardi M. and Stewart N. (2016) Identification and overexpression of a Knotted1-like transcription factor in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for lignocellulosic feedstock improvement. *Frontiers in plant science*. Vol. 7. P. 1-15.
11. Fu C., Mielenz J.R., Xiao X., Ge Y., Hamilton C.Y., Rodriguez M. Jr., Chen F., Foston M., Ragauskas A., Bouton J., Dixon R.A., and Wang Z.Y. (2010) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 9. P. 3803-3808.
12. Liu Y., Yan J., Wang K., Li D., Han Y. and Zhang W. (2020) Heteroexpression of Osa-miR319b improved switchgrass biomass yield and feedstock quality by repression of PvPCF5, *Biotechnology for Biofuels*. Vol. 13. P. 1-13.
13. Shen H., He X., Poovaiah C. R., Wuddineh, W. A., Ma J., Mann D. G., Wang H., Jackson L., Tang Y., Stewart C. N., Jr, Chen F., and Dixon R. A. (2012) Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks, *The New phytologist*. Vol. 193. P. 121-136.
14. Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Zhumabek A.T., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2018) In vitro culture of foreign and local *Panicum virgatum* and *Panicum miliaceum* cultivars, *Eurasian journal of applied biotechnology*. Vol. 3. P. 28-34.
15. Zhumabek A.T., Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2020) Somatic embryogenesis and plant regeneration from upland switchgrass cultivars, *Research on Crops*. Vol. 21. P. 1-6.
16. pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the Gateway® System, 2012, Catalog number K2400-20, Publication part number 25-0434, MAN0000245.
17. Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture, *Plant Physiology*. Vol. 15. P. 473-497.
18. Chen Q. and Song G. Q. (2019) Protocol for *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Transgenic Plant Production of Switchgrass, *Methods in molecular biology*. P. 105-115.
19. Song G., Hancock J.F., and Walworth A., 2012, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass cultivars, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 108. P. 445-453.
20. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T. M., Ye X. and Armstrong C.L. (2004) Invited review: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Vol. 40. P. 31-45.
21. Chen X., Equi R., Baxter H., Berk K., Han J., Agarwal S. and Zale J. (2010) A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings, *Biotechnology Biofuels*. Vol. 3. P. 1-10.

А.Т. Жұмабек^{1,2}, Е.М. Раманкулов^{1,2}, Ш.А. Манабаева^{1,2}

¹ РГП "Национальный центр биотехнологии" КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

² Евразийский Национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан

Оптимизация параметров *Agrobacterium*-опосредованной трансформации проса прутьевидного

Аннотация. Разработан и оптимизирован простой и эффективный метод агробактериальной трансформации растений проса прутьевидного (*Panicum virgatum* L.). Целью исследования являлось оптимизация условий *Agrobacterium*-опосредованной трансформации проса прутьевидного у сортов Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee и Trailblazer. Для генетической трансформации использованы эмбриогенные каллусы проса прутьевидного. В результате изучения эффекта индуктора гена вирулентности, сурфактанта, оптической плотности суспензии бактерий и времени ко-культивации выявлено, что наличие ацетосирингона с силвет-L77 в среде, суспензии бактерий при оптической плотности 0.6 и 8 дневной ко-культивации с бактерией является оптимальными для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации эмбриогенных каллусов проса. Полученные результаты могут служить основой для создания трансгенных растений проса прутьевидного.

Ключевые слова: *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, культура клеток и тканей, непрямая регенерация, просо прутьевидное, эмбриогенный каллус

A.T. Zhumabek^{1,2}, Y.M. Ramankulov^{1,2}, S.A. Manabayeva^{1,2}

¹ National Center for Biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan

² L.N.Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan

Optimization of the parameters of *Agrobacterium*-mediated transformation of bar-shaped millet

Abstract. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation method has been developed and optimized for switchgrass (*Panicum virgatum* L.). The aim of this study is to optimize the conditions for agrobacterial transformation of upland switchgrass cultivars Alamo, Forestburg, Pathfinder, Shawnee, and Trailblazer. For genetic transformation, the authors have used embryogenic calli of switchgrass cultivars. As a result of the study the effect of the virulence gene inducer, surfactant, optical density of bacterial suspension and co-cultivation time, it has been revealed that the presence of acetosyringone with silwet-L77 in the medium, bacterial suspension at an optical density of 0.6 and 8 days of co-cultivation with bacteria is optimal for *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of switchgrass. The results obtained can serve as a basis for the creation of transgenic plants of switchgrass.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, tissue culture, *Panicum virgatum*, indirect regeneration, embryogenic calli

References

1. Hoang N.V., Furtado A., Botha F.C., Simmons B.A. and Henry R.J. (2015) Potential for Genetic Improvement of Sugarcane as a Source of Biomass for Biofuels, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 3. P. 1-15.
2. Abdel-Rhman M.M. (2015) Genetic Modification of Lignin to Improve Biofuel Production from Maize Zea Mays L. Using Particle Bombardment, *International Conference on Biological, Civil and Environmental Engineering (BCEE-2015)*, P. 1-6.
3. Vogel K.P., Sarath G., Saathoff A.J. and Mitchell R.B. (2011) Switchgrass, *Royal Society of Chemistry Energy and Environment Series*. No. 3, Energy Crops Chap 17. P. 341-380.

4. Samson R.A. and Omielan J.A. (1992) Switchgrass: a potential biomass energy crop for ethanol production, The Thirteenth North American Prairie conference. P. 253-258.
5. Lemežienė N., Norkevičienė E., Liatukas Ž., Dabkevičienė G., Cecevičienė J. and Butkutė B. (2015) Switchgrass from North Dakota - an adaptable and promising energy crop for northern regions of Europe, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil&Plant Science*. Vol. 2. P. 118-124.
6. Casler M.D. (2015) Switchgrass breeding, genetics, and genomics, A. Monti (ed.), *Switchgrass, Green Energy and Technology* Chap 2. P. 29-53.
7. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1993, *Proceedings: First Biomass Conference of the Americas - Energy, Environment, Agriculture, and Industry*, NREL/CP-200-5768.
8. Thakur A. K., Aggarwal G. and Srivastava G.K. (2012) Genetic Modification of Lignin Biosynthetic Pathway in *Populus ciliata* Wall. via *Agrobacterium*-Mediated Antisense CAD Gene Transfer for Quality Paper Production, *National Academy Science Letters*. Vol. 2. P. 79-84.
9. Chen F. and Dixon R.A. (2007) Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production, *National Biotechnology*. Vol. 7. P. 759-761.
10. Wuddineh W., Mazarei M., Zhang J., Turner G., Sykes R., Decker S.R., Davis M., Udvardi M. and Stewart N. (2016) Identification and overexpression of a Knotted1-like transcription factor in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for lignocellulosic feedstock improvement. *Frontiers in plant science*. Vol. 7. P. 1-15.
11. Fu C., Mielenz J.R., Xiao X., Ge Y., Hamilton C.Y., Rodriguez M. Jr., Chen F., Foston M., Ragauskas A., Bouton J., Dixon R.A., and Wang Z.Y. (2010) Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 9. P. 3803-3808.
12. Liu Y., Yan J., Wang K., Li D., Han Y. and Zhang W. (2020) Heteroexpression of Osa-miR319b improved switchgrass biomass yield and feedstock quality by repression of PvPCF5, *Biotechnology for Biofuels*. Vol. 13. P. 1-13.
13. Shen H., He X., Poovaiah C. R., Wuddineh, W. A., Ma J., Mann D. G., Wang H., Jackson L., Tang Y., Stewart C. N., Jr, Chen F., and Dixon R. A. (2012) Functional characterization of the switchgrass (*Panicum virgatum*) R2R3-MYB transcription factor PvMYB4 for improvement of lignocellulosic feedstocks, *The New phytologist*. Vol. 193. P. 121-136.
14. Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Zhumabek A.T., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2018) In vitro culture of foreign and local *Panicum virgatum* and *Panicum miliaceum* cultivars, *Eurasian journal of applied biotechnology*. Vol. 3. P. 28-34.
15. Zhumabek A.T., Rakhimzhanova A.O., Bekkuzhina S.S., Ramankulov Ye.M. and Manabayeva Sh.A. (2020) Somatic embryogenesis and plant regeneration from upland switchgrass cultivars, *Research on Crops*. Vol. 21. P. 1-6.
16. pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits, Five-minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the Gateway® System, 2012, Catalog number K2400-20, Publication part number 25-0434, MAN0000245.
17. Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture, *Plant Physiology*. Vol. 15. P. 473-497.
18. Chen Q. and Song G. Q. (2019) Protocol for *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Transgenic Plant Production of Switchgrass, *Methods in molecular biology*. P. 105-115.
19. Song G., Hancock J.F., and Walworth A., 2012, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of switchgrass cultivars, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Vol. 108. P. 445-453.
20. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T. M., Ye X. and Armstrong C.L. (2004) Invited review: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Vol. 40. P. 31-45.
21. Chen X., Equi R., Baxter H., Berk K., Han J., Agarwal S. and Zale J. (2010) A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings, *Biotechnology Biofuels*. Vol. 3. P. 1-10.

Авторлар туралы мәліметтер:

Жұмабек А.Т. – корреспондентия үшін автор, ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» Өсімдіктердің генетикалық инженерия зертханасының ғылыми қызметкері, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті жалпы биология және геномика кафедрасы «6D060700 Биология» мамандығының 3 курс докторанты, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Раманкулов Е.М. – PhD, ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» Бас директоры, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті жалпы биология және геномика кафедрасының профессоры, Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Манабаева Ш.А. – биология ғылымдарының кандидаты, ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы» Өсімдіктердің генетикалық инженерия зертханасының меңгерушісі, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті жалпы биология және геномика кафедрасының доценті. Нұр-Сұлтан, Қазақстан.

Zhumabek A.T. – *corresponding author*, Researcher of Plants Genetic Engineering Laboratory, National Center for Biotechnology, The 3rd Ph.D. student in Biology at L.N.Gumilyov Eurasian National University.

Ramankulov E.M. – Ph.D, Professor, General Director of the National Center for Biotechnology, Professor of General Biology and Genomics Department at L.N.Gumilyov Eurasian National University.

Manabayeva S.A. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Plants Genetic Engineering Laboratory, National Center for Biotechnology, Associate Professor of General Biology and Genomics Department at L.N.Gumilyov Eurasian National University.