

ПОВЫШЕНИЕ ПРИРОДНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К БОЛЕЗНЯМ ПУТЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЕНИЛПРОПАНОИДНОГО ЦИКЛА: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Кершанская О.И.¹, Абдулжанова М.А.¹, Есенбаева Г.Л.¹, Нелидова Д.С.¹,
Зернова О.В.², Лозовая В.В.², Видхолм Дж.М.²

¹ Институт биологии и биотехнологии растений
ул. Тимирязева, 45, 050040, Алматы, Казахстан

² Университет Иллинойса в Урбане-Шампэйн, Лаборатория Эдвард Р. Мэдиган,
1201 Грегори Драйв, Урбана, 61801, Иллинойс, США

gen_o.kersh@mail.ru

АБСТРАКТ

Болезни сои в Казахстане являются одной из серьезных проблем, снижающих ее урожайность до 15%. Генетическая инженерия компонентов метаболических циклов позволяет получать биотехнологические продукты второго поколения, отличающиеся широким спектром действия – улучшающие комплексную устойчивость растений к стрессам и повышающие урожайность. Одним из важнейших метаболических путей создания вторичных метаболитов является фенилпропаноидный цикл, в частности, формирование лигнина и флавоноидов. Попытки усилить природные защитные системы, такие как биосинтез лигнина методами генетической инженерии, могут помочь лимитировать колонизацию микропатогенов. Лигнин – наиболее значительный полимер на Земле, после целлюлозы. Применение генов биосинтеза лигнина для генетической трансформации только разрабатывается, для сои неизвестны вообще. Целью данного исследования является разработать подходы к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам и создать устойчивую сою путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла – повышения биосинтеза лигнина – натурального антимикробного компаунда улучшения борьбы с микропатогенами, вызывающими болезни. Основные результаты и их новизна: оптимизированы и применены генетические конструкции транскрипционного фактора *Cs/MYB4sens.*, основных генов лигнификации *35S/PAL*, *C₄H/F₃H*, гена антиокислительного стресса *FeSOD*. Оптимизирована биотехнология *germ-line* генетической трансформации растений сои, интродуцированы ключевые гены биосинтеза лигнина и устойчивости к биотическим стрессам. Получены и подтверждены методами ПЦР и ОТ-ПЦР трансгенные растения сои первого T₁ и второго T₂ поколений с встроенными в геном генами лигнификации с эффективностью трансформации 5,63% в первом поколении T₁ и более 75% – во втором поколении T₂.

Ключевые слова: болезни, лигнин, *germ-line* агробактериальная генетическая трансформация, молекулярная детекция, соя.

IMPROVEMENT OF INNER SOYBEAN DISEASE RESISTANCE BY GENETIC ENGINEERING OF THE PHENYLPROPANOIC ACID CYCLE: MOLECULAR DETECTION OF TRANSGENIC PLANTS

Kershanskaya O.I.¹, Abdulzhanova M.A.¹, Esenbaeva G.L.¹, Nelidova D.S.¹,
Zernova O.V.², Lozovaya V.V.², Widholm J.M.²

¹Institute Plant Biology and Biotechnology
45 Timiryazev str., 050040, Almaty, Kazakhstan

²University of Illinois at Urbana-Champaign, Edward R. Madigan Laboratory
1201 W. Gregory Drive, Urbana, 61801, IL, USA

gen_o.kersh@mail.ru

ABSTRACT

Soybean diseases in Kazakhstan are a serious problem that reduces soybean yield up to 15%. However, information is lacking on these diseases. Plant resistance is an economical and sustainable disease management option. Genetic engineering of the key metabolic pathway components, which result in a broad range of products, including improving complex plant resistance to stress and increasing yield, is needed. One of the most important metabolic pathways of secondary metabolism in the plant is the phenylpropanoid cycle, which involves, in particular, the formation of lignin and flavonoids. Efforts to increase the strength of the innate defense systems, including lignin biosynthesis, would help limit the colonization of these pathogens. Lignin is the most significant polymer on Earth after cellulose. The use of lignin biosynthesis genes for genetic transformation is only developing now, and it is unknown for soybeans. The objective of this study was to establish approaches to improve the innate resistance of soybeans to biotic stresses and to create resistant soybeans through genetic engineering of the phenylpropanoid pathway to increase the biosynthesis of lignin, which is a natural antimicrobial compound, in order to improve management of micro-pathogens-caused diseases. The main results and novelty of the study were that genetic constructions of valuable genes, including transcription factor *Cs/MYB4sens* and the main genes of the lignification process (*35S/PAL*, *C₄H/F₃H*, and the antioxidative stress anti-ROX gene *FeSOD*) have been optimized and used for soybean genetic transformation. Transgenic soybean plants of the first T₁ and second T₂ generations with lignification genes integrated into the genome were confirmed by PCR and RT-PCR methods with a transformation efficiency of 5.63% in the first T₁ and 75% in the second T₂ generations.

Keywords: diseases, lignin, germ-line genetic transformation, molecular detection, soybean.

ВВЕДЕНИЕ

Метаболизм фенилпропаноидов генерирует огромное множество вторичных метаболитов на основе нескольких промежуточных шикиматных циклов. В последние годы различные обзоры обобщают современные знания о структуре генов, вовлеченных в фенилпропаноидный цикл, в особенности, формирование лигнина и флавоноидов, регуляторные транскрипционные факторы, гормональный контроль путей жасмонатов или ауксинов и эволюции циклов генов первичного метаболизма [1-8].

Многочисленные биотические и абиотические стрессовые факторы негативно влияют на различные аспекты роста, развития и продуктивности растений. Растение, как прикрепленный к месту произрастания организм, в процессе эволюции развил эффективные стратегии избегания, толерантности и адаптации к различным типам стрессовых ситуаций [9-13].

Актуальным многообещающим подходом к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам является повышение биосинтеза лигнина как естественного антимикробного компаунда путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла [14-22]. Лигнин – наиболее значительный полимер на Земле после целлюлозы. Лигнин базируется на фенилпропаноидных компонентах, образуемых из окислительной полимеризации гидроксинамоил алкоголь дериватов. Различные аспекты лигнин и лигнан образования обобщены в недавних обзорах. Они также иллюстрируют прогресс в изучении структуры разных форм у однодольных и двудольных растений (соя). В связи с его экономическим значением в качестве лесоматериалов и биотоплива, биосинтез лигнина и его манипуляции имеют центральное научное значение [23-25].

Имеется около 10 специфических и 3-5 неспецифических ферментов, вовлеченных в биосинтез лигнина у различных видов растений [24]. Фенилаланин аммония лиаза (*PAL*) – первый фермент фенилпропаноидного цикла, катализирующий деаминацию фенилаланина до получения транс-цинамиковой кислоты. В различных видах растений *PAL* кодируется маленькой семьей генов, которая регулирует разнообразие ответных реакций в разных условиях среды [26-27].

Многие базовые аспекты биосинтеза лигнина до сих пор слабо изучены [23]. Применение генов биосинтеза лигнина для генетической трансформации только разрабатывается, для сои неизвестно вообще.

Трансгенный подход позволяет перейти от изучения механизмов устойчивости к стрессам – к улучшению устойчивости растения. На сегодня успех генетического улучшения растений к стрессам включает манипуляции единичных или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или генов, кодирующих ферменты важнейших метаболических циклов. Для генетической трансформации, однако, необходимо разработать наиболее подходящую методику трансформации. Подобные исследования совершенно новы для Казахстана, а также будут обладать высокой степенью новизны в мире.

Целью данного исследования является разработка подходов к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам и создание устойчивой сои путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла – повышения биосинтеза лигнина – натурального антимикробного компаунда улучшения борьбы с микропатогенами, вызывающими болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Растительный материал: 10 Казахстанских и США сортов сои с контрастными характеристиками продуктивности и устойчивости к стрессам.

Генетический материал: конструкции транскрипционного фактора лигнификации *Cs/MYB4**; ключевого гена биосинтеза лигнина – *35S/PAL* (фенилаланин аммония лиазы)*; гена *C₄H/F₅H*, кодирующего важнейший продукт лигнификации ферулат-5-гидроксилазу; гена антиокислительного стресса *FeSOD*, *A.tumefaciens*, штамм ЕНА 105.

Примечание: * – генетические конструкции генов лигнификации любезно предоставлены сотрудниками UIUC, USA.

Методы

Методы молекулярного клонирования генов: выделение фрагментов ДНК из агарозного геля; подготовку компетентных клеток бактерий; бактериальную трансформацию плазмидной ДНК с компетентными клетками; рестрикцию плазмидной ДНК осуществляли по классическим общеизвестным методам [28-29].

Для проведения генетической трансформации сои оптимизировали разработанный и запатентованный нами способ germ-line генетической трансформации сои [30].

Приготовление суспензии агробактерий для пипетирования: Одну колонию агробактерий из чашки Петри переносили в 3 мл среды LB и инкубировали 1-1,5 суток при 28°C на шейкере, с частотой 250 оборотов/мин. Далее проводили очистку агробактерий осаждением на центрифуге при 4500g 10 мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 3 мл среды LB без антибиотика. Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 600 нм. Оптимальная плотность агробактерий для трансформации пипетированием составляла 10¹⁰ клеток/мл. К суспензии добавляли сурфактант плюроник F68, или ацетосирингон в качестве агентов трансформации. Данную суспензию использовали для проведения агробактериальной трансформации методом пипетирования.

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием QIA prep Spin Mini prep Kit QIAGEN по прилагаемой инструкции.

Выделение геномной ДНК из растений: Буфер для экстракции геномной ДНК готовили перед употреблением. Состав буфера на 10 мл: гидрохлорид трис (гидроксиметил) аминометана (TrisHCl), pH=8.0, 1M (1 мл), этилендиамин тетрауксусная кислота (EDTA), pH=8.0, 0,5 M (1 мл), хлорид натрия (NaCl) 2M (2,5 мл), додецилсульфат натрия (SDS) 10% (1 мл), фенантролин (20 мг), H₂O (4,25 мл), β-меркаптоэтанол (250 мкл).

Листья предположительно трансгенных растений сои фиксировали в жидком азоте, высушивали с помощью лиофильной сушки на приборе Flexi-Dry MP microprocessor Freeze-dryer, USA, размлачивали на мельнице Fast Prep FS120 Bio 101 Savant machine, USA. К высушенным образцам добавляли по 750 мкл буфера для экстракции. Полученную смесь нагревали до 65°C 10 мин. Добавляли 250 мкл заранее приготовленного 3М ацетата калия, pH=5,4; оставляли на льду на 20 минут. Осаждали на микроцентрифуге при максимальной скорости около 13000 об/мин., в течение 10 мин. Супернатанты переносили в новые пробирки Эппендорф и добавляли по 500 мкл охлажденного изопропанола. Центрифугировали при 13000 об/мин. в течение 10 минут. К полученному осадку добавляли 1 мл охлажденного 70% этанола и центрифугировали 10 минут при 13000 об/минуту. Осадок высушивали, добавляли 50 мкл бидистиллированной H₂O. Выделенную ДНК (100 нг) использовали для проведения ПЦР анализа.

Методика проведения ПЦР

Использовали следующие условия проведения реакции амплификации на ПЦР амплификаторе «Mastercycler® personal», Eppendorf, Germany и Applied Biosystem, USA.

Для генов *Cs/MYB4sens.*, *35S/PAL5*, *C4H/F5H* программа амплификации составляла: 94°C – 5 мин, 94°C – 1 мин. 48°C или 54°C – 40 сек, 72°C – 1 мин.30 сек, 72°C – 10 мин., хранение продукта ПЦР при -10°C.

Для гена *FeSOD*: 94°C – 3 мин, 94°C – 45 сек, 60°C – 45 сек, 72°C – 1 мин.30 сек, 72°C – 10 мин., хранение продукта ПЦР при -10°C.

Подготовку проб для амплификации проводили на холоде, последовательно добавляли необходимые реактивы фирмы Promega, USA (в расчете на пробу, мкл): H₂O – 18,5, буфер – 2,5, dNTP mix – 2, Праймеры P₁ и P₂ (Integrated DNA Technologies, USA) – по 0,5 мкл каждого, Taq-полимеразу USA – 0,5 мкл/пробу. Следили, чтобы Taq-полимеразы оставалась охлажденной.

В ПЦР пробирки Эппендорфа 0,2 мл для каждого анализируемого образца добавляли реакционную смесь и 2-3 мкл геномной ДНК (приблизительно 100 нг). Пробирки устанавливали в ячейки амплификатора и запускали реакцию по заданным выше параметрам, следуя инструкциям прибора.

Протокол проведения ОТ-ПЦР (RT – reverse transcription – PCR) с обратной транскриптазой. Для подтверждения экспрессии интродуцированных генов проводили обратную (reverse) ПЦР с обратной транскриптазой (Promega, USA). РНК экстрагировали из молодых листьев сои с использованием RN easy Plant Mini Kit, QIAGEN, USA. Одноцепочечную молекулу РНК превращали в реакции обратной транскрипции в комплементарную ДНК (кДНК) – реакция первой цепочки. Для превращения последовательности РНК в комплементарную ДНК использовали обратную транскриптазу (Promega, USA). Комплементарная ДНК (кДНК) образуется на матрице мРНК из dNTP ферментом обратной транскриптазой. Компоненты реакции смешивали с ДНК-праймерами и буфером с обратной транскриптазой на один час при 37°C.

Далее амплифицировали одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР – 35 циклов по описанным выше программам.

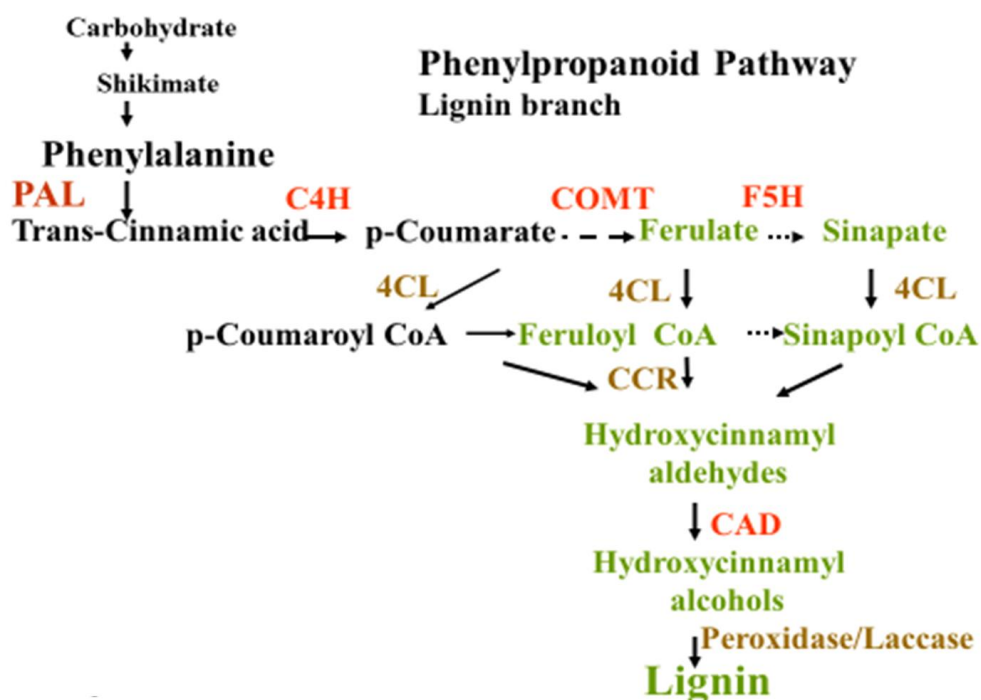
Электрофорез продуктов ПЦР проводили в 0,8% агарозном геле в TE буфере.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика генетических конструкций

Имеется около 10 специфических и 3-5 неспецифических ферментов, вовлеченных в биосинтез лигнина у различных видов растений (рисунок 1) [20, 25].

***CsVMV/PtMyb4sens.* – транскрипционный фактор**



MYB – семейство транскрипционных факторов; *PAL* – фенилаланин аммониялиаза, *C₄H/F₅H* – цинамат-4-гидроксилаза/ферулат-5-гидроксилаза; *FeSOD* – Fe-зависимая супероксиддисмутаза

Рис. 1. Схема биосинтеза лигнина в сое

MYB – family of transcription factors; *PAL* – phenylalanine ammonia lyase, *C₄H/F₅H* – cinnamate 4-hydroxylase/ferulate 5-hydroxylase; *FeSOD* – Fe-dependent superoxiddismutase

Fig. 1. The scheme of lignin biosynthesis in soybean

PtMYB – семейство R2R3-MYB генов из ксилемы сосны. кДНК, кодирующая семейство транскрипционных факторов R2R3-MYB, была клонирована из РНК ксилемы сосны *Pinus taeda* [33-34]. Рекомбинантный *PtMYB* протеин вовлечен в регуляцию генов, кодирующих ферменты биосинтеза лигнина. *PtMYB* также способен индуцировать ген фенилаланин аммония лиазу (*Pal*) из фасоли *Phaseolus vulgaris*, и активировать транскрипцию *Pal* в растительной клетке, как показано анализом транзиторной (временной) транскрипционной активации генов при биобаллистической трансформации табака. Суммируя полученные данные, была доказана гипотеза, что *PtMYB* может регулировать транскрипцию *cis*-acting AC элементов в ксилеме сосны, а данный ген был использован в генетической трансформации сои для регулирования биосинтеза лигнина. Исползованная для трансформации сои конструкция *CsVMV/PtMYB4sens.* содержит мощный конституционный промотор из кассавы – *Cassava vein mosaic virus (CsVMVp – CVP2)*, трансформированный в плазмиду *PILTAB357*. В наших исследованиях использован ген *CsVMV/PtMYB4sens.* (чувствительный), повышающий активность биосинтеза лигнина (рисунок 2).

Agrobacterium tumefaciens of soybean transformation

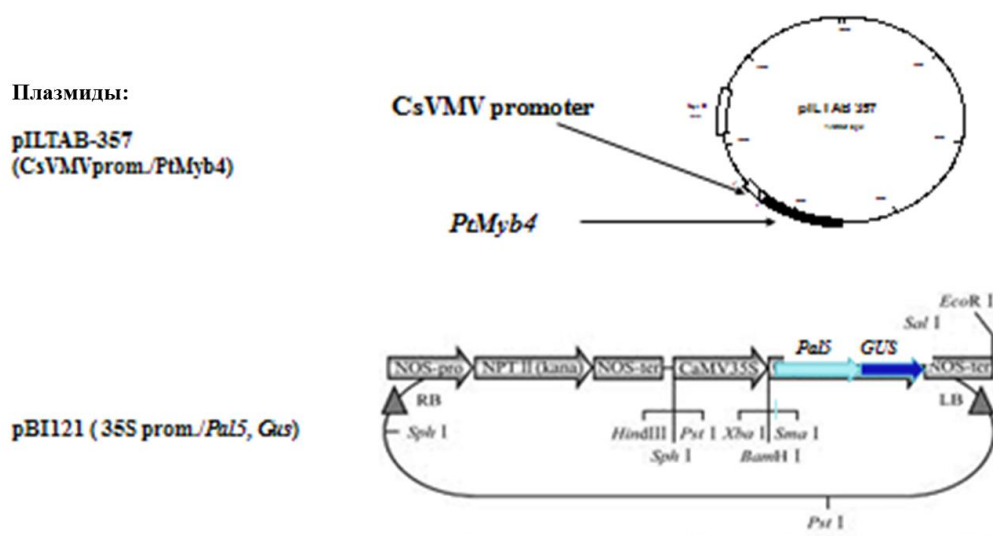


Рис. 2. Схемы конструкций транскрипционного фактора лигнификации *CsVMV/PtMYB4sens.* и ключевого гена биосинтеза лигнина *35S/Pal5*

Fig. 2. The schemes of transcription factor of lignification *CsVMV/PtMYB4sens.* and key gene of lignin biosynthesis *35S/Pal5*

Фенилаланин аммониализа (*Pal*) – первый фермент фенилпропаноидного цикла, катализирующий деаминацию фенилаланина до получения транс-цинамиковой кислоты. В различных видах растений *Pal* кодируется маленькой семьей генов, которая позволяет регуляторное разнообразие в разных условиях среды. В оптимизированную генетическую конструкцию добавлен *GUS*-ген в качестве репортерного гена, проведены многочисленные процедуры трансформации генетической конструкции в плазмиды; выделения плазмид; подготовки компетентных клеток; агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, штамм ЕНА-105 для трансформации методом germ-line агробактериального пипетирования сои. В генетической конструкции *Pal* гена использован конституционный промотор из вируса табачной мозаики 35S, маркер *nptII*, репортер *GUS*, плаزمида *PBII21* [35-40].

C₄H/F₅H ген – Cinnamate-4-hydroxylase/Ferulate-5-hydroxylase из *Arabidopsis thaliana*, продукт – протеин (ферулат-5 гидроксилаза) определяет новую семью монооксигеназ, зависимых от цитохрома *P450* в фенилпропаноидном цикле. В растениях два цитохрома *P450* катализируют реакции основного фенилпропаноидного цикла: cinnamate-4-hydroxylase (*C₄H*) и ferulate-5-hydroxylase (*F₅H*).

Данные продукты фенилпропаноидного цикла критичны для жизни растения и включают поглощающие ультрафиолет вторичные метаболиты, такие как флавоноиды, эфиры гидроксицинамиковой кислоты, а также лигнин – основной структурный компонент вторичного метаболизма клеточной стенки, защищающий растения от проникновения микроорганизмов и болезней в том числе. Лигнин составляет более 20% сухого вещества клеточной стенки растений и является, после целлюлозы, вторым

наиболее распространенным полимером в природе. В конструкцию гибридного гена *C₄H/F₃H* входят *NOS*-терминатор, маркер *nptII*, плазида *PBI121*. Регуляция генов также осуществляется транскрипционным фактором MYB.

Использованы промоторы:

35SVTM – конституционный промотор из вируса табачной мозаики;

Lectin – специфический промотор из семян сои;

CsVMV – конституционный промотор из *Cassava vein mosaic virus*;

C₄H – специфический промотор из васкулярной ткани арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*.

Оптимизация биотехнологии *germ-line* генетической трансформации сои с использованием *Agrobacterium tumefaciens*

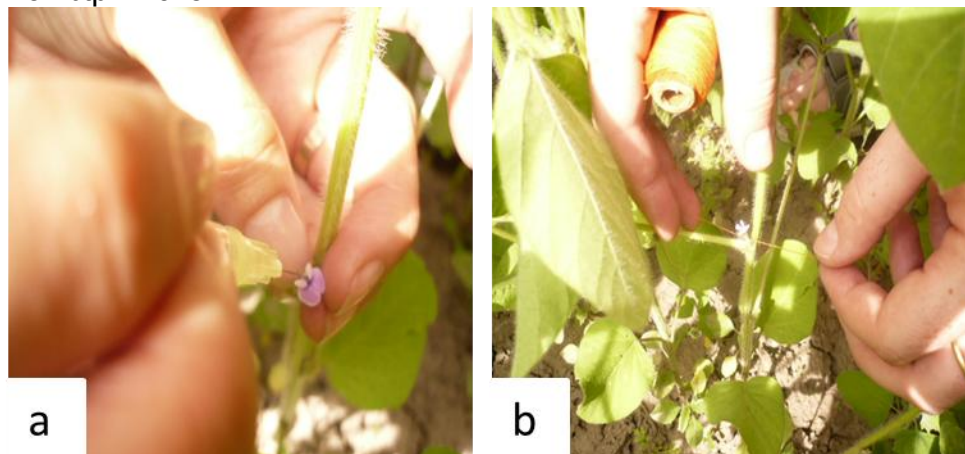
Оптимизирован разработанный и запатентованный ранее способ *germ-line* генетической трансформации сои с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и естественных пыльцевых трубок для переноса генетического материала в зиготу [30, 43]. Способ оптимизирован для интродукции ключевых генов, вовлеченных в биосинтез лигнина в сою с целью улучшения устойчивости к биотическим стрессам и повышения урожайности. Способ *germ-line* генетической трансформации сои оптимизирован по следующим позициям:

– проведена соответствующая подготовка генетических конструкций ключевых генов лигнификации: подбор промоторов, усилителей или ингибиторов целевых генов в зависимости от цели исследования; маркерные и/или репортерные гены; выбор плазмиды; выбор штамма *A. tumefaciens*, подготовка компетентных клеток методом электропорации; бактериальная трансформация; размножение агробактериальных клеток с плазмидами, содержащими целевые гены – выращивание ночной культуры агробактерий и *E. coli*, создание глицерольных стоков для продолжительного хранения данных генов; выделение плазмидной ДНК и проведение ПЦР для подтверждения бактериальной трансформации плазмид и бактериальных клеток. Использован штамм *A. tumefaciens EHA105*;

– оптимизирована процедура подготовки суспензии агробактерий с целевыми генами для трансформации сои. Ночную культуру агробактерий выращивали на *LB*-среде с 1% канамицином (или другим антибиотиком, соответствующим маркерному гену), осаждали, осадок ресуспендировали в *LB*-среде без канамицина, концентрацию доводили до 0,8-1,0 на спектрофотометре Beckman Coulter DU 800 при длине волны 600 нм. Добавляли в суспензию агенты трансформации – 1 мкл/мл 1% сурфактант плуроник F68 (в отдельных случаях – ацетосирингон) [24];

– оптимизирована техника трансформации – пипетирование дозатором на 2 мкл в центр рыльца пестика цветка с эффективностью завязываемости бобов 90%. Использование шприца значительно повреждало ткани цветка и снижало завязываемость и развитие бобов до 50-10%. Наилучшим инструментом среди шприцев являлся шприц диабетический 0,5 мл. Оптимальное место пипетирования – рыльце пестика цветка сои, достигается маленьким надрезом чашелистиков перед пипетированием с учетом данных о развитии элементов цветка в семена и стручок (рисунок 3);

– точнее определена стадия развития цветка сои для пипетирования. У цветка сои определяют 8 стадий развития. Возможными для успешного пипетирования являются 3 и 4 стадии, когда полностью формируются пыльники и происходит нарастание пыльцевых трубок в сформированную, но еще не делящуюся зиготу. Визуально бутоны цветков выглядят полностью сомкнутыми, в специальных очках или невооруженным глазом можно видеть часть чашелистиков, цветки закрыты. Наилучшее время для пипетирования – 9-12 часов дня в условиях теплицы при постоянно поддерживаемой температуре 28°C. В полевых условиях оптимальное время будет зависеть от температуры и солнечной радиации.



а – процесс пипетирования цветков сои; б – маркирование обработанного растения цветными нитями

Рис. 3. Оптимизация техники germ-line *Agrobacterium tumefaciens* – генетической трансформации пипетированием на рыльце пестика цветка сои

a – the process of soybean flowers pipetting; b – marking of treated plants by colored threads

Fig. 3. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* – mediated germ-line transformation technique by stigma flower pipetting in soybean

Таким образом, оптимизирован способ germ-line генетической трансформации сои с использованием *A. tumefaciens* и естественных пыльцевых трубок в качестве вектора переноса рекомбинантной ДНК в зиготу, а также проведена генетическая трансформация около 1000 цветков.

Интродуцированы ключевые гены лигнификации – транскрипционный фактор *Cs/MYB4 sens.*, гены лигнификации *35S/PAL5*, *C₄H/F₅H*, ген *35S/FeSOD*, для усиления природного естественного барьера сои к заражению микропатогенами.

Генетическая трансформация растений сои методом агробактериального пипетирования для интродукции генов лигнификации

Проведена генетическая трансформация растений сои – интродукция генетических конструкций, связанных с лигнификацией и устойчивостью к стрессам: *Cs/MYB4sens.* из сосны с промотором *Cassava vein mosaic virus (CsVMVp – CVP2)*, плазмидой *PILTAB357*, с маркерным геном *nptII*; *35S/PAL5* ген из гороха с промотором *35S*, плазмидой *PBI121*, маркерным геном *nptII*, репортером *gus*-ген; *C₄H/F₅H* ген, плазида *PBI121*, маркер *nptII*; *FeSOD* ген, плазида *PBI121*, маркерный ген *nptII*.

Пипетирование проведено с использованием оптимизированной биотехнологии, описанной выше, дозатором на 2 мкл или диабетическим шприцем. В качестве маркеров трансгенов, трансформированных генами лигнификации, использовали нити разного цвета: *Cs/MYB4sens.* – светло-серый, *35S/PAL5* – черный, *C₄H/F₅H* – зеленый, *FeSOD* – желтый и т.д.

Характеристика количества бобов и семян нулевого поколения T₀, полученных в результате оптимизированной генетической трансформации germ-line методом, представлена в таблице 1. Для интродукции генов лигнификации использованы 10 сортов сои, 3 из которых селекции США: устойчивые Jack и Jack x 4, чувствительный к заражению микропатогенами – Spenser, J x 4; 7 сортов казахстанской селекции: Казахстанская, Эврика, Вита, Тажан, Зара, Перизат, Данная. Проведено агробактериальное пипетирование около 1000 цветков сои. Завязалось примерно 900 бобов с эффективностью в среднем 90%. Получено около 2000 предположительно

трансгенных семян сои T_0 . Эффективность формирования семян в результате агробактериального пипетирования цветков сои в среднем для изученных сортов составила 187%. Принципиальных отличий размеров бобов и предположительно трансгенных семян T_0 от контроля не обнаружено. Наблюдалась тенденция к уменьшению количества семян в бобе в T_0 . Зависимость количества семян в трансгенах от интродуцируемого гена также не выявлена. В среднем отмечено 2,5 семени на боб у трансгенов в нулевом поколении T_0 .

Семена T_0 были посеяны для получения растений первого поколения T_1 – для проведения экспериментов по скринингу на антибиотики и ПЦР геномной ДНК.

Таблица 1. Количество трансгенных растений сои нулевого поколения T_0 , полученных методом germ-line агробактериального пипетирования

Table 1. The harvest of transgenic soybean plants of zero generation T_0 , obtained by germ-line *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation

Исходный сорт сои Parental cultivar	Количество пипетированных цветков, шт. Number of flowers pipetted, n.	Число сформированных бобов, шт. Number of pods forming, n.	Эффективность формирования бобов, % Pods forming efficiency, %	Количество полученных семян, шт. Number of seeds obtained, n.	Эффективность формирования семян, % Seeds forming efficiency, %
Джек Jack	95	88	93	304	320
Вита Vita	95	86	91	190	200
Эврика Eurika	60	52	90	116	193
Тажан Tazhan	60	54	91	84	140
Казахстанская Kazakhstanskaya	56	50	89	78	139
Перизат Perizat	40	34	88	78	195
Спенсер Spenser	23	20	92	88	383
Данная Dannaya	30	24	88	52	173
Зара Zara	25	22	87	56	224
Всего Total	484	436	90	904	187

Молекулярная детекция трансгенных растений сои первого поколения T_1 методом ПЦР и РТ-ПЦР

Из трансгенных растений сои первого поколения T_1 выделена ДНК и проведена молекулярная детекция трансгенных растений сои первого поколения T_1 методом ПЦР и РТ-ПЦР.

Праймеры к генам приведены в таблице 2.

Таблица 2. Праймеры к генам, используемым для генетической трансформации сои

Table 2. The primers for genes constructs used for soybean genetic transformation

Генетическая конструкция Gene construct	Направленность праймера Primer direction	Олигонуклеотидный состав праймера Primer structure
--	---	---

<i>Cs/MYB4 sens.</i>	Прямой праймер Forward primer	5' - agg ata caa cag aga - 3'
	Обратный праймер Reverse primer	5' - gga tcc tca cag aag ccg tgg aag ata - 3'
<i>35S/PAL5</i>	Прямой праймер Forward primer	5' - tgg cag aca tca ctt cag aca gca cag c -3'
	Обратный праймер Reverse primer	5' - aag ccg ctc att tca gtt cca t - 3'
<i>C4H/F5H</i>	Прямой праймер Forward primer	5' - cca tta tag ttt gtg tat ccg - 3'
	Обратный праймер Reverse primer	5' - ctt aca aga aat ttt cga -3'
<i>nptII</i>	Прямой праймер Forward primer	5' - atc tca cct tgc tcc tgc - 3'
	Обратный праймер Reverse primer	5' - ata ccg taa agc acg agg - 3'
<i>FeSOD</i>	Прямой праймер Forward primer	5' - acc tcc att cgc act gga tgc ttt - 3'
	Обратный праймер Reverse primer	5' - ttc ggt gat gca gaa ctc act gt - 3'

В качестве положительного контроля для проведения ПЦР предположительно трансгенных растений сои использовали плазмидную ДНК, выделенную из каждой использованной для трансформации генетической конструкции целевых, маркерных и репортерных генов (рисунок 4). В качестве отрицательного контроля при проведении ПЦР использовали геномную ДНК исходных нетрансформированных сортов.

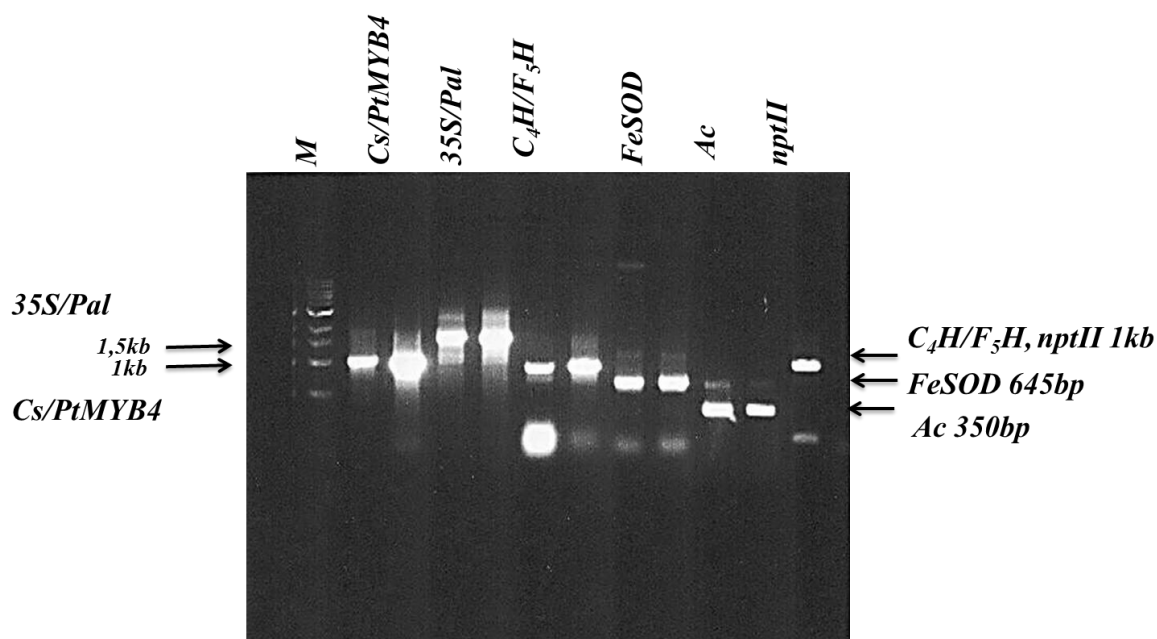
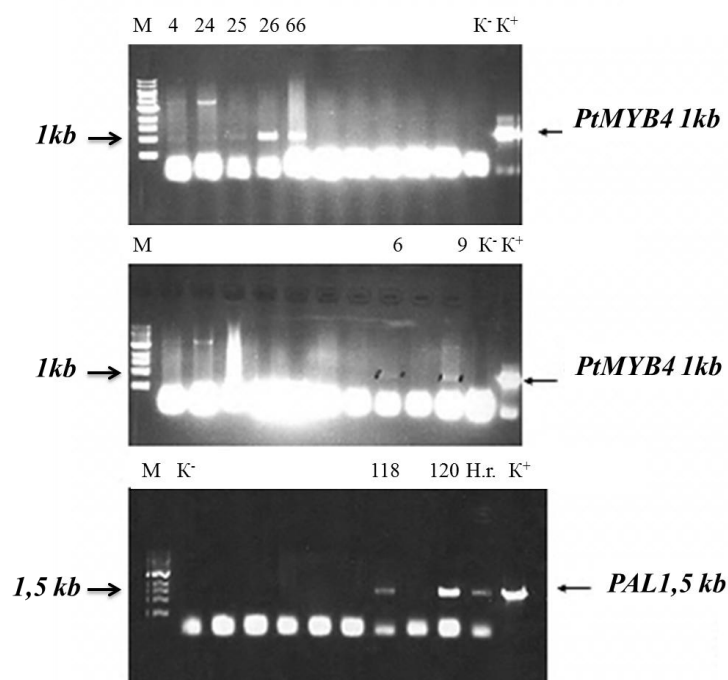


Рис. 4. ПЦР-анализ плазмидной ДНК генетических конструкций генов *Cs/PtMYB₄sens.*, *35S/Pal*, *C₄H/F₅H*, *FeSOD*, *Ac*, *nptII*

Fig. 4. PCR-analysis of plasmid DNA of genetic constructions *Cs/PtMYB₄sens.*, *35S/Pal*, *C₄H/F₅H*, *FeSOD*, *Ac*, *nptII* genes

Результаты ПЦР анализа на встраивание генов в геном растений сои первого поколения, T₁ представлены на рисунках 5, 6, 8-9. На рисунке 5 показаны результаты стандартного ПЦР анализа встраивания генов *Cs/PtMYB₄sens.* и *35S/Pal* в геном сои у предположительно трансгенных форм T₁, полученных в результате germ-line генетической трансформации. Также подтверждено встраивание в геном трансформированной сои репортерного гена *Gus*, включенного в генетическую конструкцию целевого гена *35S/Pal*, и маркерного гена *nptII*, входящего в конструкции всех целевых генов, у первоначально доказанных трансгенов сои первого поколения, T₁. Нр – ДНК, выделенная из генетически трансформированной модельной системы – культивируемые *in vitro* волосяные корни («Hairy roots») (специальные эксперименты), использована в качестве дополнительного положительного контроля при проведении ПЦР.



Слева направо: М – маркер; 4, 24, 25, 26, 66, 6, 9 – трансгенные линии сорта Джек со вставкой в геном гена *CsVMV/PtMYB4*; 118 – трансгенная линия сорта Джек; 120 – трансгенная линия сорта Тажан, со вставкой гена *PAL*; К⁻ – отрицательный контроль сорт Джек; К⁺ – положительный контроль, плазмида

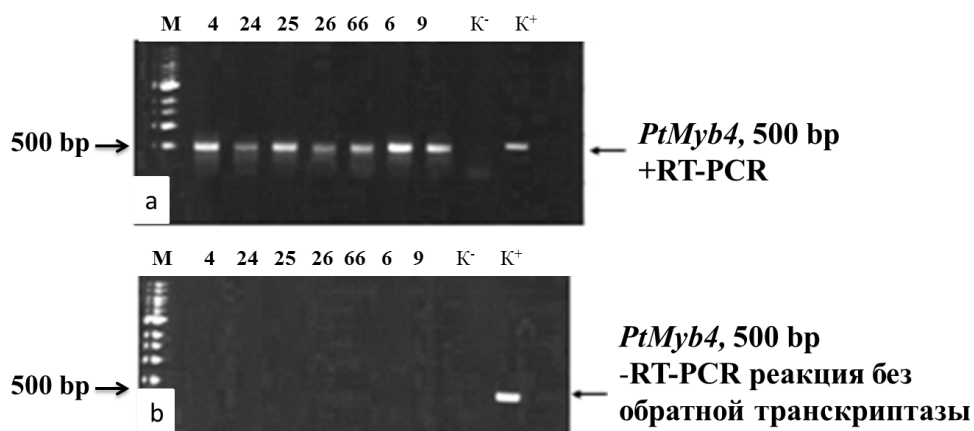
Рис. 5. ПЦР-анализ трансгенных растений сои первого поколения T₁ с интродуцированными генами *Cs/PtMYB₄sens.* и *35S/Pal*

From left to right: M – marker; 4, 24, 25, 26, 66, 6, 9 – transgenic lines of Jack cultivar with gene *CsVMV/ PtMYB4* introduction into genome; 118 – transgenic lines of Jack; 120 – transgenic lines of Tazhan with gene *PAL* introduction; K⁻ – negative control cultivar Jack; K⁺ – positive control, plasmid

Fig. 5. PCR-analysis of transgenic soybean plants of first generation T₁ with genes *Cs/PtMYB₄ sens.* and *35S/Pal* introduction

На рисунке 6 представлены результаты экспериментов по проведению ОТ-ПЦР – ПЦР с ферментом обратная (reverse) транскриптаза (RT-PCR). ОТ-ПЦР используют как индикатор экспрессии интродуцированных генов при генетической трансформации. В результате наших исследований методом ОРТ-ПЦР подтверждена экспрессия на уровне РНК целевых генов в геноме форм сои (рисунок 6а), у которых доказаны вставки ДНК в геном методом обычного ПЦР с Taq-полимеразой (рисунок 5). В отсутствие обратной транскриптазы бенды отсутствовали (рисунок 6б), что доказывает ее работоспособность и экспрессию генов на уровне РНК у трансгенных форм сои.

RT-PCR листьев T₁ растений, трансформированных с
плазмидой pILTAB-357, *CsVMV/PtMYB4*



Слева направо: М – маркер; 4, 24, 25, 26, 66, 6, 9 – трансгенные линии сорта Джек с экспрессией гена *CsVMV/PtMYB4*; K⁻ – отрицательный контроль сорт Джек; K⁺ – положительный контроль, плаزمида; а – реакция в присутствии реверс транскриптазы; б – реакция в отсутствие реверс транскриптазы

Рис. 6. ОТ-ПЦР анализ трансгенных растений сои первого поколения T₁ с геном *CsVMV/PtMYB4 sens*

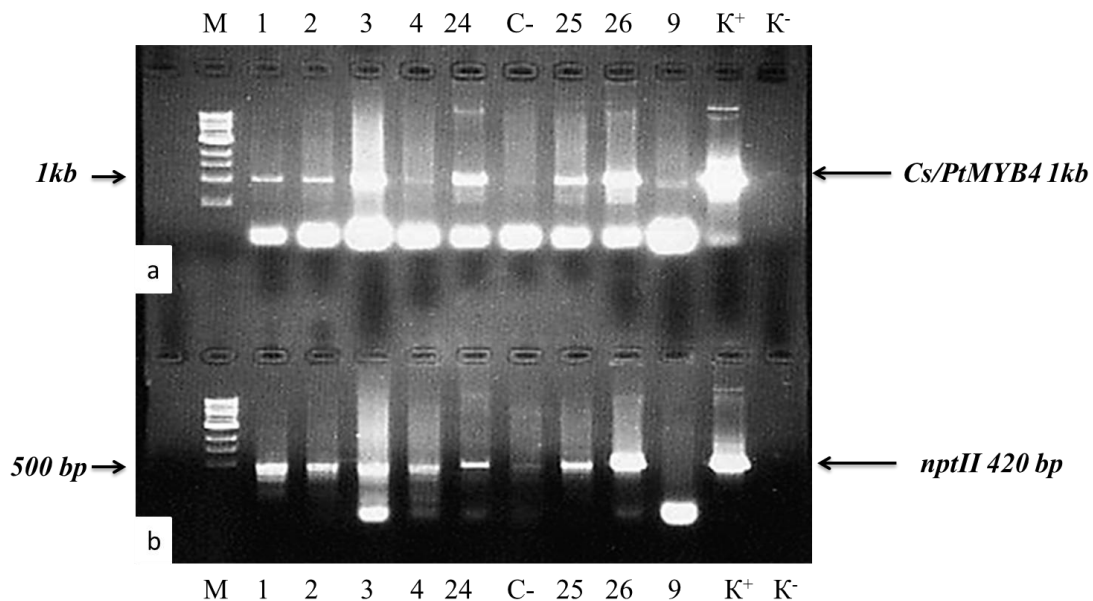
From left to right: M – marker; 4, 24, 25, 26, 66, 6, 9 – transgenic lines with gene *CsVMV/PtMYB4* expression; K⁻ – negative control cultivar Jack; K⁺ – positive control, plasmid; а – reaction in presence of reverse transcriptase; б – reactions without reverse transcriptase

Fig. 6. RT-PCR analysis of transgenic soybean plants of first generation, T₁, transformed with gene *CsVMV/PtMYB4sens*

На рисунках 7, 8 показано большое количество генотипов трансгенной сои первого поколения T₁, у которых подтверждена трансформация целевых генов *Cs/PtMYBsens.* и *35S/Pal* (а, верхняя часть рисунков), а также маркерного гена *nptII* (б, нижняя часть рисунков), входящего в конструкции данных целевых генов.

Всего подтверждено наличие вставки гена *Cs/PtMYBsens.* у 20 растений, гена *35S/Pal* – у 20 растений, гена *C₄H/F₃H* – у 8 растений, гена *FeSOD* – у 20 растений сои. Доказана интродукция данных генов в геном сои у 52 из выборки 924 скринированных предположительно трансгенных растений сои первого поколения T₁ с эффективностью трансформации 5,63%.

Семена трансгенных растений сои первого поколения T₁ были посеяны для получения растений второго поколения T₂ для подтверждения стабильной трансформации во втором поколении методами молекулярной биологии и последующего исследования физиологических и биохимических последствий интродукции генов лигнификации (в данной статье не рассматривается).

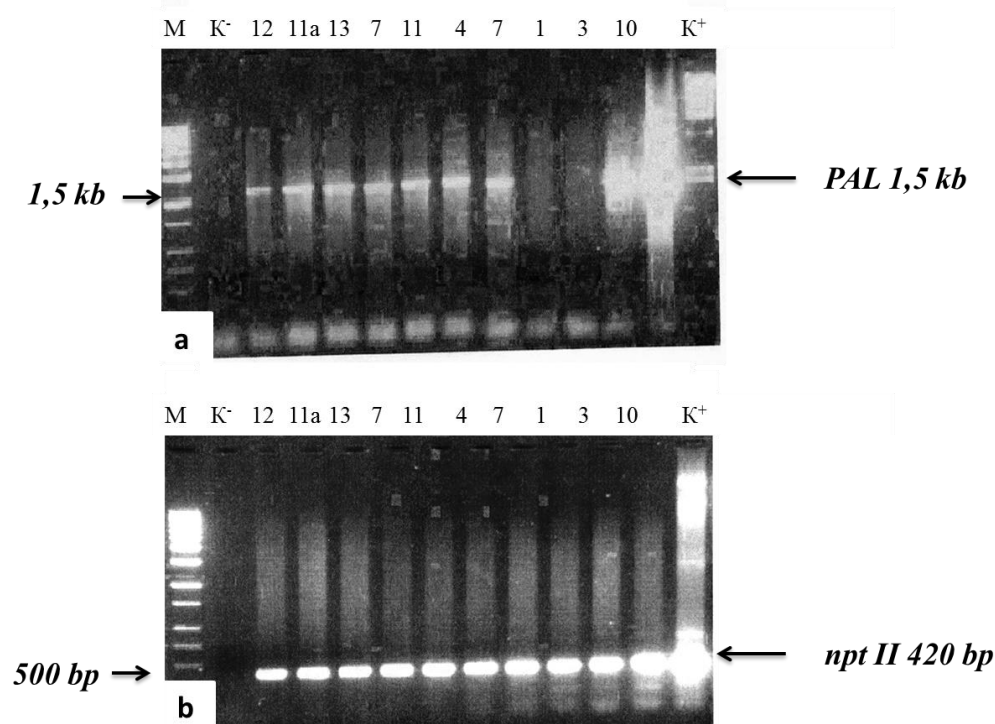


Слева направо: М – маркер; 1-4, 24 – трансгенные линии сорта Джек; 25-26, 9 – трансгенные линии сорта Спенсер; К⁻ – отрицательный контроль сорт Джек; К⁺ – положительный контроль, плаزمид

Рис. 7. ПЦР-анализ трансгенных растений сои Т₁ с целевым геном *Cs/PtMYB₄sens.*, 1 kb (a) и маркерным геном *nptII*, 420 bp (b)

From left to right: M – marker; 1-4, 24 – transgenic lines of Jack; 25-26, 9 – transgenic lines of Spenser; К⁻ – negative control cultivar Jack; К⁺ – positive control, plasmid

Fig. 7. PCR analysis of transgenic soybean plants Т₁ with valuable gene *Cs/PtMYB₄sens.*, 1 kb (a) and marker gene *nptII*, 420 bp (b)



Слева направо: М – маркер; К⁻ – отрицательный контроль сорт Джек; 12, 11a, 13, 7, 11 – трансгенные линии сорта Джек; 4, 7, 1, 3, 10 – трансгенные линии сорта Спенсер; К⁺ – положительный контроль, плаزمид

Рис. 8. ПЦР анализ трансгенных растений сои T₁ с целевым геном 35S/Pal, 2 kb (a) и маркерным геном *nptII*, 420 bp (b)

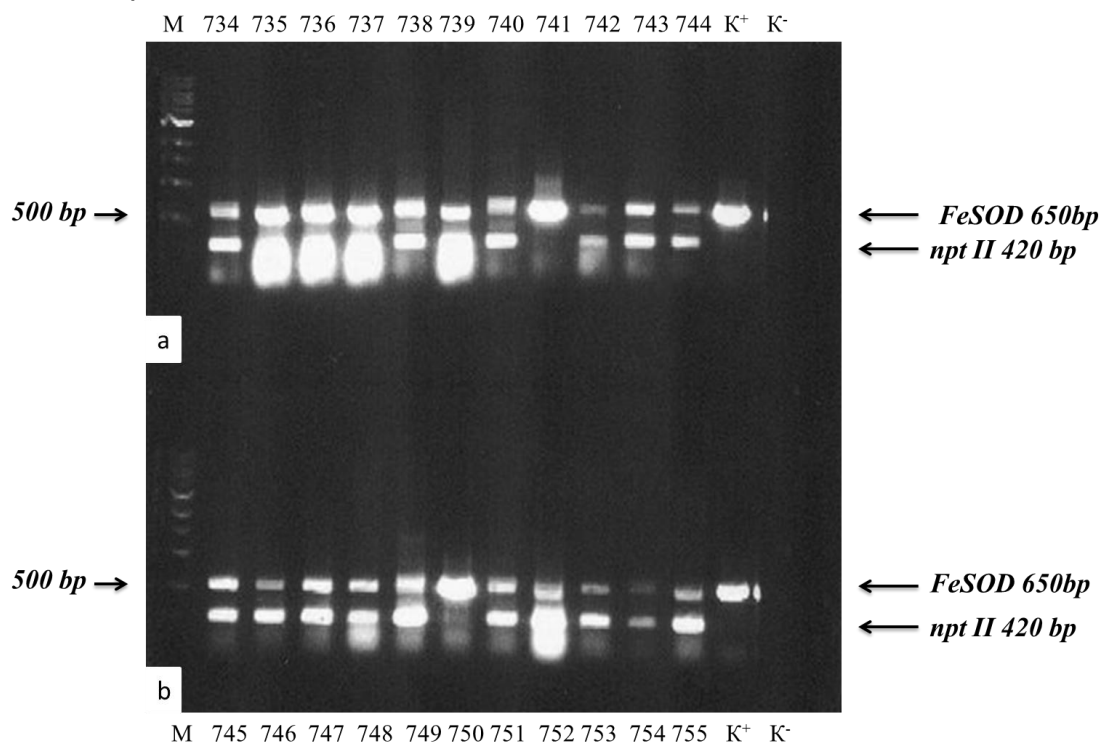
From left to right: M – marker; K⁻ – negative control cultivar Jack; 12, 11a, 13, 7, 11 – transgenic lines of Jack cultivar; 4, 7, 1, 3, 10 – transgenic lines of Spenser cultivar; K⁺ – positive control, plasmid

Fig. 8. PCR analysis of transgenic soybean plants T₁ with valuable gene 35S/Pal, 2 kb (a) and marker gene *nptII*, 420 bp (b)

Молекулярная детекция трансгенных растений сои второго поколения T₂ методом ПЦР

Около 1000 трансгенных растений сои второго поколения T₂, полученных из подтвержденных методом ПЦР геномной ДНК трансгенных растений первого поколения T₁, отобраны методом случайной выборки и скринированы методами ПЦР и РТ-ПЦР.

На рисунке 9 в качестве примера показана мультиплексная ПЦР, проведенная одновременно с праймерами к целевому гену *FeSOD* и маркерному гену *nptII*, выровненными по температуре отжига, по программе, разработанной для гена *FeSOD*. Показано более 90% подтверждения встраивания данного гена в геном сои во втором поколении T₂, что доказывает стабильную трансформацию трансгенов сои. Трансгенные растения второго поколения T₂ с другими интродуцированными генами также демонстрировали высокую эффективность трансформации, близкую к ожидаемой сегрегации Г. Мендель 3:1.



Слева направо: М – маркер; 745-755 – трансгенные линии сорта Джек; K^+ – положительный контроль, плаزمид; K^- – отрицательный контроль сорт Джек

Рис. 9. Мультиплексный ПЦР-анализ трансгенных растений сои второго поколения (образцы: а – 734-744, б – 745-755) T_2 , с встроенным в геном целевым геном *FeSOD*, 650 bp и маркерным геном *nptII*, 420 bp

From left to right: М – marker; 745-755 – transgenic lines of Jack cultivar; K^+ – positive control, plasmid; K^- – negative control cultivar Jack

Fig. 9. Multiplex PCR – analysis of transgenic soybean plants of second generation, T_2 , (samples: a – 734-744, b – 745-755) with integrated into the genome the target gene *FeSOD*, 650 bp and marker gene *nptII*, 420 bp

В целом подтверждены трансгенные растения сои второго поколения T_2 с встроенными в геном генами лигнификации *Cs/PtMYBsens.* и *35S/Pal5* с эффективностью трансформации около 50%, с геном антиокислительного стресса *FeSOD* – с эффективностью трансформации более 75%.

ВЫВОДЫ

Оптимизированы и применены в генетической трансформации сои генетические конструкции транскрипционного фактора лигнификации *Cs/MYB4sens.* с мощным конституционным промотором из кассавы – *Cassava vein mosaic virus* (*CsVMVp* – *CVP2*), маркер *nptII*, плазмиды *PILTAB357*; ключевого гена лигнификации *35S/PAL5*, кодирующего фенилаланин аммония лиазу, плазмиды *PBI121*, маркер *nptII*, репортер *Gus*-ген; геналигнификации *C₄H/F₅H*, кодирующий важнейший продукт лигнификации – ферулат-5-гидроксилазу, плазмиды *PBI121*, маркер *nptII*, гена *FeSOD*, кодирующего Fe-зависимую супероксиддисмутазу – первого фермента в каскаде нейтрализации активных форм кислорода, предотвращающий окислительный стресс и придающий неспецифическую устойчивость растений к действию стрессов.

Оптимизирована биотехнология germ-line генетической трансформации сои с использованием *Agrobacterium tumefaciens* для улучшения устойчивости к биотическим стрессам и повышения урожайности.

Интродуцированы ключевые гены, вовлеченные в биосинтез лигнина, в сою. Эффективность формирования бобов в растениях нулевого поколения при трансформации растений сои составляла около 90%, эффективность получения семян $T_0 = 187\%$.

Из трансгенных растений сои первого и второго поколений T_1 и T_2 выделена ДНК и проведена молекулярная детекция трансгенных растений методом ПЦР и РТ-ПЦР. В первом поколении подтверждено наличие вставки в геном сои: гена *Cs/PtMYBsens.* – у 20 растений, гена *35S/Pal5* – у 20 растений, гена *C₄H/F5H* – у 8 растений, гена *FeSOD* – у 20 растений сои. Доказана интродукция данных генов в геном сои у 52 растений из выборки 924 предположительно трансгенных растений сои первого поколения T_1 с эффективностью трансформации 5,63%.

Получены и подтверждены методами ПЦР и РТ-ПЦР трансгенные растения сои второго поколения T_2 с встроенными в геном генами лигнификации *Cs/PtMYBsens.* И *35S/Pal5*, гена антиокислительного стресса *FeSOD* с эффективностью трансформации более 75%.

Благодарность

Выражаем глубокую благодарность сотрудникам University of Illinois at Urbana – Champaign, USA, за предоставленные генетические конструкции генов лигнификации, участие и содействие в проведении экспериментов.

Финансирование

НИР финансирована по проекту «Улучшение устойчивости сои к биотическим стрессам путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла», выполненному в рамках подпрограммы 101 «Грантовое финансирование научных исследований». Приоритет «Интеллектуальный потенциал страны», 2013-2015 гг.

А также Грантом Фулбрайт, Госдепартамент США, для проведения научных исследований в Университете Иллинойса в Урбане-Шампэйн, в Лаборатории проф. Дж.М. Видхолма, 2013-2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kliebenstein D.J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses // *Plant Cell and Environ.* – 2004. – Vol. 27. – P. 675-684.
2. Ahuja I., Kissen R., Bones A. Phytoalexins in defense against pathogens // *Trends in Plant Science.* – 2012. – Vol. 17. – P. 73-90.
3. Grobinsky D.K., van der Graaff E., Roitsch T. Phytoalexintransgenics in crop protection – Fairy tale with happy end? // *Plant Sci.* – 2012. – Vol. 195. – P. 54-70.
4. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Widholm J.M. Genetic engineering of plant; disease resistance by modification of the phenylpropanoid pathway // *Plant Biosystems.* – 2005. – Vol. 139. – P. 20-23.
5. Aharoni A., Galili G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface // *Current Opin in Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 239-244.
6. Jeandet P., Clement C., Courout E., Cordelier S. Modulation of PhytoalexinBiosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 14136-14170.

7. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Biochemical response of soybean roots to *Fusariumsolani* f. sp. *glycines* infection // Crop Sci. – 2004. – Vol. 44. – P. 819-826.

8. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Ulanov A.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase // Planta. – 2007. – Vol. 225. – P. 665-679.

9. Lygin A.V., Li S., Vital R., Widholm J.M., Hartman G.L., Lozovaya V.V. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsorapachyrhizi* // Phytopathol. – 2009. – Vol. 99. – P. 1412-1420.

10. Lygin A.V., Hill C.B., Zernova O.V., Crull L., Widholm J.M., Hartman G.L., Lozovaya V.V. Response of Soybean Pathogens to Glyceollin // Phytopathol. – 2010. – Vol. 100. – P. 897-903.

11. Lygin A.V., Zernova O.V., Hill C.B., Kholina N.A., Widholm J.M., Hartman G.L., Lozovaya V.V. Glyceollin is an important component of soybean plant defense against *Phophthorasojae* and *Macrophominaphaseolina* // Phytopathol. – 2013. – Vol. 103. – P. 984-994.

12. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusariumsolani*// Plant Physiol. Biochem. – 2004. – Vol. 42. – P. 671-679.

13. Zernova O.V., Lygin A.V., Widholm J.M., Lozovaya V.V. Modification of isoflavones in soybean seeds via expression of multiple phenolic biosynthetic genes // Plant Physiol. Biochem. – 2009. – Vol. 47. – P. 769-777.

14. Zernova O.V., Lygin A.V., Pawlowski M.L., Kershanskaya O.I., Hill C.B., Hartman G.L., Widholm J. M., Lozovaya V.V. Regulation of Plant Immunity Through Modulation of Phytoalexin Synthesis // Phytopathology. – 2014. – Vol. 104. – P. 843-850.

15. Wilson R.F. The role of genomics and biotechnology in achieving global food security for high-oleic vegetable oil // Functional and Integrative Genomics. – 2012. – P. 447-462.

16. Hall R.D., Hardy N.W. Practical Applications of Metabolomics in Plant Biology // In Book: Plant Metabolomics: Methods and Protocols. – Series: Methods in Molecular Biology. – 2012. – Vol. 860. – P. 1-10.

17. Iwase A., Matsui K., Ohme-Takagi M. Manipulation of plant metabolic pathways by transcription factors // Plant Biotechnology. – 2009. – Vol. 26. – P. 29-38.

18. Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F.L. Biotechnological approaches to study plant responses to stress // BioMed Research International. – 2013. – Vol. 2013. – 10 p.

19. Tran L.S., Mochida. K. Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions // Journal of Oleo Science. – 2010. – Vol. 61. – P. 357-367.

20. Morgenthal K., Wienkoop S., Wolschin F., Weckwerth W. Integrative Profiling of Metabolites and Proteins // In Metabolomics. Methods in Molecular Biology. – 2007. – Vol. 358. – P. 57-75.

21. Li Z., Nelson R.L., Widholm J.M., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway // Soybean Genet Newsl. – 2002. – Vol. 29. – P. 1-11.

22. Dixon R.A., Lamb C.J., Masoud S., Sewalt V. J.H., Paiva N.L. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses // A review. Gene. – 1996. – Vol. 179. – P. 61-71.

23. Fumiko H., Shin'ya K., Tomonori S., Mikiko U., et al. Manipulation of phenylpropanoid-biosynthetic pathway by genetic engineering with bacterial genes // Accession number 02A0204744. Proceedings of the Lignin Symposium. – 2001. – Vol. 46. – P. 115-118.

24. Chapple C.C.S. Manipulation of lignin composition in plants using a tissue-specific promoter / Patent USA. – №6610908. – 2003.

REFERENCES

1. Kliebenstein D.J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Plant Cell and Environ.*, 2004, vol. 27, pp. 675-684.
2. Ahuja I., Kissen R., Bones A. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 2012, vol. 17, pp. 73-90. doi: 22209038. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>.
3. Grobinsky D.K., van der Graaff E., Roitsch T. Phytoalexintransgenics in crop protection – Fairy tale with a happy end? *Plant Sci.*, 2012, vol. 195, pp. 54-70. doi: 22920999. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.06.008>.
4. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Widholm J.M. Genetic engineering of plant; disease resistance by modification of thephenylpropanoid pathway. *PlantBiosystems*, 2005, vol. 139, pp. 20-23.
5. Aharoni A., Galili G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface.*Current Opin in Biotechnol.*, 2011, vol. 22, pp. 239-244. doi: 21144730. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.004>.
6. Jeandet P., Clement C., Courot E., Cordelier S. Modulation of PhytoalexinBiosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, pp. 14136-14170. doi: 23880860. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140714136>.
7. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Biochemical response of soybean roots to *Fusariumsolani* f. sp. *glycines*infection. *Crop Sci.*, 2004, vol. 44, pp. 819-826.
8. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Ulanov A.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase. *Planta*,2007, vol. 225, pp. 665-679. doi: 16924535. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-006-0368-z>.
9. Lygin A.V., Li S., Vital R., Widholm J.M., Hartman G.L., Lozovaya V.V. The importance of phenolic metabolism to limit the growth of *Phakopsorapachyrhizi*.*Phytopathol.*, 2009, vol. 99, pp. 1412-1420.
10. Lygin A.V., Hill C.B., Zernova O.V., Crull L., Widholm J.M., Hartman G.L., Lozovaya V.V. Response of Soybean Pathogens to Glyceollin. *Phytopathol.*, 2010, vol. 100, pp. 897-903. doi: 20701487. Available at: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0897>.
11. Lygin A.V., Zernova O.V., Hill C.B., Kholina N.A., Widholm J.M., Hartman G.L., Lozovaya V.V. Glyceollin is an important component of soybean plant defense against *Phophthorasojae* and *Macrophominaphaseolina*. *Phytopathol.*, 2013, vol. 103, pp. 984-994. doi: 23617338. Available at: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0328-R>.
12. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusariumsolani*. *Plant Physiol. Biochem.*, 2004, vol. 42, pp. 671-679. doi: 15331097. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.06.007>.
13. Zernova O.V., Lygin A.V., Widholm J.M., Lozovaya V.V. Modification of isoflavones in soybean seeds via expression of multiple phenolic biosynthetic genes.*Plant Physiol. Biochem*, 2009, vol. 47, pp. 769-777. doi: 19539487. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.05.006>.
14. Zernova O.V., Lygin A.V., Pawlowski M.L., Kershanskaya O.I., Hill C.B., Hartman G.L., Widholm J. M., Lozovaya V.V. Regulation of Plant Immunity Through Modulation of

Phytoalexin Synthesis. *Phytopathology*, 2014, vol. 104, pp. 843-850. doi: 24914895. Available at: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19067480>.

15. Wilson R.F. The role of genomics and biotechnology in achieving global food security for high-oleic vegetable oil. *Functional and Integrative Genomics*, 2012, pp. 447-462. doi: 22790166. Available at: <http://dx.doi.org/10.5650/jos.61.357>.

16. Hall R.D., Hardy N.W. Practical Applications of Metabolomics in Plant Biology. *In Book: Plant Metabolomics: Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology*, 2012, vol. 860, pp. 1-10. doi: 22351167. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7-1>.

17. Iwase A., Matsui K., Ohme-Takagi M. Manipulation of plant metabolic pathways by transcription factors. *Plant Biotechnology*, 2009, vol. 26, pp. 29-38.

18. Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F.L. Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed Research International*, 2013, vol. 2013, p.10. doi: 23509757. Available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/654120>.

19. Tran L.S., Mochida K. Functional genomics of soybean for improvement of productivity in adverse conditions. *Journal of Oleo Science*, 2010, vol. 61, pp. 357-367. doi: 20582712. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-010-0178-z>.

20. Morgenthal K., Wienkoop S., Wolschin F., Weckwerth W. Integrative Profiling of Metabolites and Proteins. *In Metabolomics. Methods in Molecular Biology*, 2007, vol. 358, pp. 57-75. doi: 17035680. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-244-1-4>.

21. Li Z., Nelson R.L., Widholm J.M., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. *Soybean Genet Newslett*, 2002, vol. 29, pp. 1-11.

22. Dixon R.A., Lamb C.J., Masoud S., Sewalt V. J.H., Paiva N.L. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses. *A review. Gene*, 1996, vol. 179, pp. 61-71. doi: 8955630. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00327-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00327-7).

23. Fumiko H., Shinya K., Tomonori S., Mikiko U., et al. Manipulation of phenylpropanoid-biosynthetic pathway by genetic engineering with bacterial genes. *Proceedings of the Lignin Symposium*, 2001, vol. 46, pp. 115-118.

24. Chapple C.C.S. Manipulation of lignin composition in plants using a tissue-specific promoter / Patent USA, N 6610908, 2003.

25. Hatakava R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. *Genetics and Molecular Biology*, 2005, vol. 28, p. 12.

**МАЙ БҰРШАҒЫНЫҢ АУРУЛАРҒА ҚАРСЫ ТАБИҒИ ТӨЗІМДІЛІГІН
ФЕНИЛПРОПАНОИДТЫ ЦИКЛДІ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ИНЖЕНЕРИЯСЫ
АРҚЫЛЫ АРТТЫРУ: ТРАНСГЕНДІ ӨСІМДІКТЕРДІҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ
ДЕТЕКЦИЯСЫ**

**Кершанская О.И.¹, Абдулжанова М.А.¹, Есенбаева Г.Л.¹, Нелидова Д.С.¹,
Зернова О.В.², Лозовая В.В.², Видхолм Дж.М.²**

¹ Өсімдіктердің биология және биотехнология институты

ул. Тимирязева, 45, 050040, Алматы, Қазақстан

² Универстет Иллинойса в Урбане-Шампэйн, Лаборатория Эдвард Р. Мэдиган,

1201 Грегори Драйв, Урбана, 61801, Иллинойс, США

gen_o.kersh@mail.ru

Қазақстанда май бұршағының аурулары, өнімділігін 15% дейін төмендететін, аз зерттелген негізгі мәселелердің бірі. Кең ауқымды әсер ететін метаболитті цикл компоненттерінің генетикалық инженериясы – өсімдіктің стресстерге төзімділігін және өнімділігін арттыратын биотехнологиялық өнімнің екінші ұрпағын алуға мүмкіндік береді. Фенилпропаноидты цикл, оның ішінде лигнин мен флавоноидтар - өсімдіктердегі екінші ретті метаболиттердің құрұлуының маңызды жолдарының бірі болып табылады. Лигнин биосинтезі сияқты табиғи қорғаныс кешенін генетикалық инженерия әдісімен күшейту, микропатогендердің өсуін тежеуге өз септігін тигізеді. Лигнин – жер шарындағы целлюлозадан кейінгі маңызды полимердің бірі. Лигнин биосинтезі генін генетикалық трансформациялау жұмыстары енді ғана жүргізіле бастады, ал май бұршағы дақылы үшін мүлдем жүргізілмеген. Орындалып отырған ғылыми ізденістің мақсаты, өсімдіктердің биотикалық стресстерге табиғи төзімділігін арттыру жолдарын іздестіру және май бұршағының ауру тудыратын микро –патогендермен күресуін жақсартатын табиғи анти-микробты компаунд – лигнин биосинтезін арттыратын – фенилпропаноидного циклдің генетикалық инженериясын құрастыру. Негізгі нәтижелер және олардың жаңалығы: транскрипті *Cs/MYB4sens.* факторының, лигнификациялану *35S/PAL*, *C4H/F5H* негізгі генінің және қышқылдық стреске төзімді *FeSOD* генінің генетикалық конструкциясы құрылды және май бұршағының генетикалық тасымалдауына пайдаланылды. Өсімдіктер биотехнологиясында май бұршағына *Agrobacterium tumefaciens* germ-line генетикалық тасымалдануы қолайландырылды және биотикалық стреске төзімді лигнин биосинтезінің негізгі гендері интродуцирленді. Трансформациялану тиімділігі трансгендерінің T₁ бірінші ұрпағында 5,63%, T₂ екінші ұрпағында 75% артық болатын май бұршағы геномына лигнификация гені енген бірінші T₁ және екінші T₂ ұрпақтары алынды және ПЦР и РТ-ПЦР әдісімен дәлелденді.

Кілтті сөздер: аурулар, лигнин, агробактериалық germ-line генетикалық трансформация, молекулярды детекция, май бұршақ.