

ISSN 1991-3494

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ

Х А Б А Р Ш Ы С Ы

ВЕСТНИК

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

THE BULLETIN

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

1944 ЖЫЛДАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С 1944 ГОДА
PUBLISHED SINCE 1944

1

АЛМАТЫ
АЛМАТЫ
ALMATY

2016

ҚАҢТАР
ЯНВАРЬ
JANUARY

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі

М. Ж. Жұрынов

Р е д а к ц и я а л қ а с ы :

биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Айтхожина Н.А.**; тарих ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байпақов К.М.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Байтулин И.О.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Берсімбаев Р.И.**; хим. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Газалиев А.М.**; а.-ш. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Дүйсенбеков З.Д.**; а.-ш. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Елешев Р.Е.**; физ.-мат. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Қалменов Т.Ш.**; фил. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА академигі **Нысанбаев А.Н.**; экон. ғ. докторы, проф., ҰҒА академигі **Сатубалдин С.С.**; тарих ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Әбжанов Х.М.**; физ.-мат. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Әбішев М.Е.**; техн. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Әбішева З.С.**; техн. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Абсадықов Б.Н.** (бас редактордың орынбасары); а.-ш. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Баймұқанов Д.А.**; тарих ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Байтанаев Б.А.**; физ.-мат. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Давлетов А.Е.**; физ.-мат. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Қалимолдаев М.Н.**; геогр. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Медеу А.**; техн. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Мырхалықов Ж.У.**; биол. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Огарь Н.П.**; техн. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Таткеева Г.Г.**; а.-ш. ғ. докторы, проф., ҚР ҰҒА корр. мүшесі **Үмбетаев И.**

Р е д а к ц и я к е ñ е с і :

Ресей ҒА академигі **Велихов Е.П.** (Ресей); Әзірбайжан ҰҒА академигі **Гашимзаде Ф.** (Әзірбайжан); Украинаның ҰҒА академигі **Гончарук В.В.** (Украина); Армения Республикасының ҰҒА академигі **Джрбашян Р.Т.** (Армения); Ресей ҒА академигі **Лаверов Н.П.** (Ресей); Молдова Республикасының ҰҒА академигі **Москаленко С.** (Молдова); Молдова Республикасының ҰҒА академигі **Рудик В.** (Молдова); Армения Республикасының ҰҒА академигі **Сагян А.С.** (Армения); Молдова Республикасының ҰҒА академигі **Тодераш И.** (Молдова); Тәжікстан Республикасының ҰҒА академигі **Якубова М.М.** (Тәжікстан); Молдова Республикасының ҰҒА корр. мүшесі **Лупашку Ф.** (Молдова); техн. ғ. докторы, профессор **Абиев Р.Ш.** (Ресей); техн. ғ. докторы, профессор **Аврамов К.В.** (Украина); мед. ғ. докторы, профессор **Юрген Аппель** (Германия); мед. ғ. докторы, профессор **Иозеф Банас** (Польша); техн. ғ. докторы, профессор **Гарабаджиу** (Ресей); доктор PhD, профессор **Ивахненко О.П.** (Ұлыбритания); хим. ғ. докторы, профессор **Изабелла Новак** (Польша); хим. ғ. докторы, профессор **Полещук О.Х.** (Ресей); хим. ғ. докторы, профессор **Поняев А.И.** (Ресей); профессор **Мохд Хасан Селамат** (Малайзия); техн. ғ. докторы, профессор **Хрипунов Г.С.** (Украина)

Главный редактор

академик НАН РК

М. Ж. Журинов

Редакционная коллегия:

доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Н.А. Айтхожина**; доктор ист. наук, проф., академик НАН РК **К.М. Байпаков**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **И.О. Байтулин**; доктор биол. наук, проф., академик НАН РК **Р.И. Берсимбаев**; доктор хим. наук, проф., академик НАН РК **А.М. Газалиев**; доктор с.-х. наук, проф., академик НАН РК **З.Д. Дюсенбеков**; доктор сельскохоз. наук, проф., академик НАН РК **Р.Е. Елешев**; доктор физ.-мат. наук, проф., академик НАН РК **Т.Ш. Кальменов**; доктор фил. наук, проф., академик НАН РК **А.Н. Нысанбаев**; доктор экон. наук, проф., академик НАН РК **С.С. Сатубалдин**; доктор ист. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Х.М. Абжанов**; доктор физ.-мат. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.Е. Абишев**; доктор техн. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **З.С. Абишева**; доктор техн. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Б.Н. Абсадыков** (заместитель главного редактора); доктор с.-х. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Д.А. Баймуканов**; доктор ист. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Б.А. Байтанаев**; доктор физ.-мат. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **А.Е. Давлетов**; доктор физ.-мат. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **М.Н. Калимолдаев**; доктор геогр. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **А. Медеу**; доктор техн. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Ж.У. Мырхалыков**; доктор биол. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Н.П. Огарь**; доктор техн. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **Г.Г. Таткеева**; доктор сельскохоз. наук, проф., чл.-корр. НАН РК **И. Умбетаев**

Редакционный совет:

академик РАН **Е.П. Велихов** (Россия); академик НАН Азербайджанской Республики **Ф. Гашимзаде** (Азербайджан); академик НАН Украины **В.В. Гончарук** (Украина); академик НАН Республики Армения **Р.Т. Джрбашян** (Армения); академик РАН **Н.П. Лаверов** (Россия); академик НАН Республики Молдова **С. Москаленко** (Молдова); академик НАН Республики Молдова **В. Рудик** (Молдова); академик НАН Республики Армения **А.С. Сагиян** (Армения); академик НАН Республики Молдова **И. Тодераш** (Молдова); академик НАН Республики Таджикистан **М.М. Якубова** (Таджикистан); член-корреспондент НАН Республики Молдова **Ф. Лупашку** (Молдова); д.т.н., профессор **Р.Ш. Абиев** (Россия); д.т.н., профессор **К.В. Аврамов** (Украина); д.м.н., профессор **Юрген Аппель** (Германия); д.м.н., профессор **Иозеф Банас** (Польша); д.т.н., профессор **А.В. Гарабаджиу** (Россия); доктор PhD, профессор **О.П. Ивахненко** (Великобритания); д.х.н., профессор **Изабелла Новак** (Польша); д.х.н., профессор **О.Х. Полещук** (Россия); д.х.н., профессор **А.И. Поняев** (Россия); профессор **Мохд Хасан Селамат** (Малайзия); д.т.н., профессор **Г.С. Хрипунов** (Украина)

«Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан». ISSN 1991-3494

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5551-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 2000 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18.

www: nauka-nanrk.kz, bulletin-science.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2016

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

M. Zh. Zhurinov,
academician of NAS RK

Editorial board:

N.A. Aitkhozhina, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **K.M. Baipakov**, dr. hist. sc., prof., academician of NAS RK; **I.O. Baitulin**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **R.I. Bersimbayev**, dr. biol. sc., prof., academician of NAS RK; **A.M. Gazaliyev**, dr. chem. sc., prof., academician of NAS RK; **Z.D. Dyusenbekov**, dr. agr. sc., prof., academician of NAS RK; **R.Ye. Yeleshev**, dr. agr. sc., prof., academician of NAS RK; **T.Sh. Kalmenov**, dr. phys. math. sc., prof., academician of NAS RK; **A.N. Nysanbayev**, dr. phil. sc., prof., academician of NAS RK; **S.S. Satubaldin**, dr. econ. sc., prof., academician of NAS RK; **Kh.M. Abzhanov**, dr. hist. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.Ye. Abishev**, dr. phys. math. sc., prof., corr. member of NAS RK; **Z.S. Abisheva**, dr. eng. sc., prof., corr. member of NAS RK; **B.N. Absadykov**, dr. eng. sc., prof., corr. member of NAS RK (deputy editor); **D.A. Baimukanov**, dr. agr. sc., prof., corr. member of NAS RK; **B.A. Baytanayev**, dr. hist. sc., prof., corr. member of NAS RK; **A.Ye. Davletov**, dr. phys. math. sc., prof., corr. member of NAS RK; **M.N. Kalimoldayev**, dr. phys. math. sc., prof., corr. member of NAS RK; **A. Medeu**, dr. geogr. sc., prof., corr. member of NAS RK; **Zh.U. Myrkhalykov**, dr. eng. sc., prof., corr. member of NAS RK; **N.P. Ogar**, dr. biol. sc., prof., corr. member of NAS RK; **G.G. Tatkeeva**, dr. eng. sc., prof., corr. member of NAS RK; **I. Umbetayev**, dr. agr. sc., prof., corr. member of NAS RK

Editorial staff:

E.P. Velikhov, RAS academician (Russia); **F. Gashimzade**, NAS Azerbaijan academician (Azerbaijan); **V.V. Goncharuk**, NAS Ukraine academician (Ukraine); **R.T. Dzhrbashian**, NAS Armenia academician (Armenia); **N.P. Laverov**, RAS academician (Russia); **S.Moskalenko**, NAS Moldova academician (Moldova); **V. Rudic**, NAS Moldova academician (Moldova); **A.S. Sagiyan**, NAS Armenia academician (Armenia); **I. Toderas**, NAS Moldova academician (Moldova); **M. Yakubova**, NAS Tajikistan academician (Tajikistan); **F. Lupaşcu**, NAS Moldova corr. member (Moldova); **R.Sh. Abiyev**, dr.eng.sc., prof. (Russia); **K.V. Avramov**, dr.eng.sc., prof. (Ukraine); **Jürgen Appel**, dr.med.sc., prof. (Germany); **Joseph Banas**, dr.med.sc., prof. (Poland); **A.V. Garabadzhiu**, dr.eng.sc., prof. (Russia); **O.P. Ivakhnenko**, PhD, prof. (UK); **Isabella Nowak**, dr.chem.sc., prof. (Poland); **O.Kh. Poleshchuk**, chem.sc., prof. (Russia); **A.I. Ponyaev**, dr.chem.sc., prof. (Russia); **Mohd Hassan Selamat**, prof. (Malaysia); **G.S. Khripunov**, dr.eng.sc., prof. (Ukraine)

Bulletin of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

ISSN 1991-3494

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of Information and Archives of the Ministry of Culture and Information of the Republic of Kazakhstan N 5551-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 2000 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,

<http://nauka-nanrk.kz/>, <http://bulletin-science.kz>

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2016

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

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. Исакова², ¹Чиркин А. П.,
¹Ю. 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 трансформированных растений использовали котрансформацию с пшеничным геном фермента ацетогидроксиацетатсинтазы, кодирующей 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/urozhaj-2014/214771-kazahstancamudalos-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, обуславливают большую часть хитинолитической активности растительных клеток. Это относится к хитиназам I класса, характеризующимся четырьмя доменами: 1) гидрофобным варибельным N-концевым сигнальным пептидом, 2) цистеин-богатым доменом, 3) чрезвычайно варибельным 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 – *цисгенная* 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 имеющих 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 пшеницы 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 *SpeI* 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 ацетогидроксиацетилсинтазы (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, ресуспендированных 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- ACCCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGC; 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 стереоскопного 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 эксплант выдерживали на среде, индуцирующей каллусогенез, до появления достаточного количества эмбрионного 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 эмбрионный каллус, полученный при более длительном культивировании. Отчасти увеличение сроков производства эмбрионного 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 эмбрионного каллуса за счет его роста, и при этом получить возможность отсечь не-эмбрионный, 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 остова 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-*Bsr*GI из клонирующего вектора, в котором проходила его наработка в бактериальных

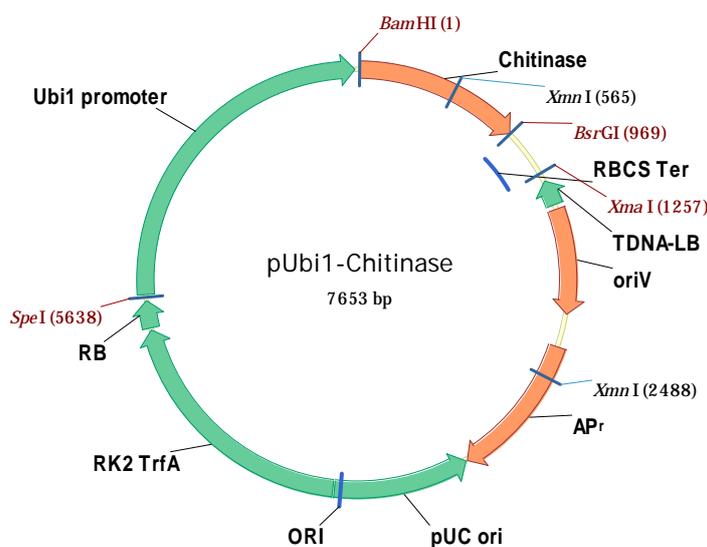


Рисунок 1 – Векторная конструкция с геном хитиназы пшеницы I класса

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 искомого вставки.

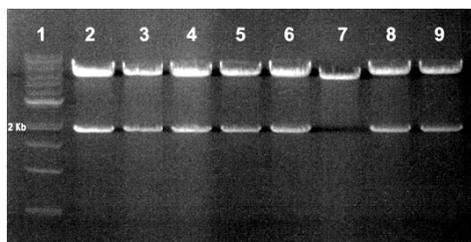


Рисунок 2 – Электрофореграмма рестрикционного анализа клонов хемокомпетентных клеток *E.coli* после лигирования с геном хитиназы. Дорожка 1 – маркер молекулярного веса (1 kb), дорожки 2 – 9 – плазмидная ДНК клонов *E.coli* после рестрикции *XmnI*

Для дальнейшего селективного отбора была проведена котрансформация минимальной единицы экспрессии гена хитиназы и пшеничного гена ацетогидроксиацетатсинтазы (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 именно 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 *pmi*, 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 ацетогидроксиацетатсинтазы.

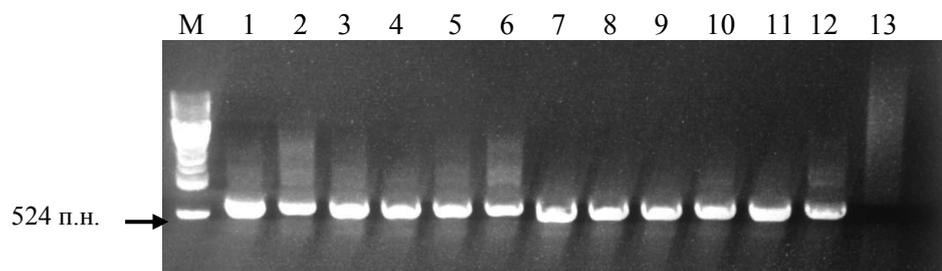


Рисунок 3 – Электрофореграмма ДНК растений-регенерантов после ПЦР со специфическими праймерами, подтверждающими вставку гена ацетогидроксиацетатсинтазы (AHAS). Дорожка М – маркер молекулярного веса (1 kb), дорожка 1 – положительный контроль, дорожки 3-12 – экспериментальные растения, дорожка 13 – отрицательный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

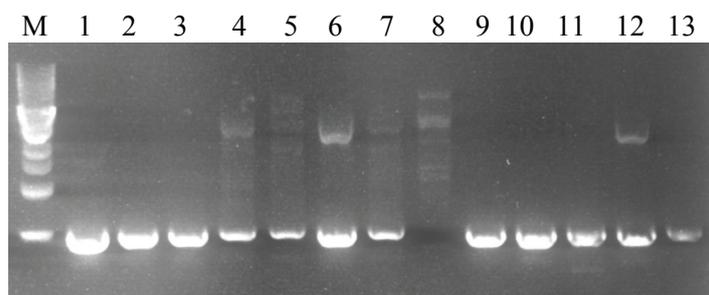


Рисунок 4 – Электрофореграмма ДНК растений-регенерантов после ПЦР, на вставку гена хитиназы I класса. Дорожка М – маркер молекулярного веса (1 kb), дорожка 1 – положительный контроль, дорожки 3-13 – экспериментальные растения

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] М. Койшыбаев, В. П. Шаманин, А. И. Моргунов. Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням. Методические указания // Анкара. ФАО-СЕК. 2014.
- [2] A. Kasprzewska. 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. Lörz. 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. Intragenesis 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. Brogini. 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. Biolistic Transformation of Wheat with Centrophenoxine 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, сс. 28–31.
- [21] C. J. Thompson, N. R. Moyal, 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] М. Койшыбаев, В. П. Шаманин, А. И. Моргунов. Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням. Методические указания // Анкара. ФАО-СЕК. 2014.
- [2] A. Kasprzewska. 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. *Æ. 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. Lörz*. 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*. Intragenesis 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. Broggin*. 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*. Biolistic Transformation of Wheat with Centrophenoxine 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, сс. 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.

ГЕНОМ ХИТИНАЗАСЫНЫҢ I КЛАССЫНДАҒЫ БИДАЙДЫҢ САРАТОВСКАЯ 29 СОРТЫНЫҢ ЦИСТГЕНДІК ТРАНСФОРМАЦИЯСЫ

Э. Р. Мальцева¹, А. Ж. Исмагул², Г. А. Исакова², Чиркин А. П.,
Ю. А. Скиба¹, Г. А. Исмагулова¹, С. Елибай², Н. А. Айтхожина¹

¹ҚР БЖҒМ ҒК, М. А. Айтхожин атындағы молекулярлық биология және биохимия институты,
Алматы, Қазақстан,

²Өсімдіктер функционалды геномикасының Австралиялық орталығы, Аделаида, Австралия

Тірек сөздер: хитиназа, биобаллистикалық трансформация, жұмсақ бидай.

Аннотация. Саңырауқұлақ ауруларына өсімдіктердің тұрақтылығы белгілі көп мөлшердегі гендермен реттеледі, атап айтқанда PR- ақуыздар (PR – pathogenesis related). Қорғаныс ансамблінде маңызды бөлім бұл, гидролитикалық ферменттерді кодтайтын, саңырауқұлақтардың клеткалық қабырғасын бөлшектемелейтін гендер болып табылады. Осы зерттеу объектісі ретінде бидайдың I классындағы хитиназа таңдалды. Жұмыс мақсаты цистгендік алу, яғни тек бидай гендерін білдіру, өсімдіктердің белгілі хитиназа гендерін бейнелеу. Бұл мақсатқа жету үшін Саратовская 29 бидай сортынан алынған толық піспеген эмбриондардан каллустарды биобаллистикалық тұрақты трансформациялау жүргізілді. Трансформанттарды тандап алуға бидайдың гендік ферменті ацетогидроксиацидсинтазаны, гербицидке имазетапирге тұрақтылықты кодтауға котрансформацияны қолданды. Тексерілген х өсімдіктердің 59 трансформацияланған өсімдіктер айқындалды, оның ішінде 58 имазетапирге тұрақты гендерді алып жүреді, ал 51 өсімдік 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.

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

[www:nauka-nanrk.kz](http://www.nauka-nanrk.kz)

<http://www.bulletin-science.kz/index.php/ru/>

Редакторы *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 16.02.2016.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
12,0 п.л. Тираж 2000. Заказ 1.