

УДК 581.169(063):633.174

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СОРТОВ СОРГО С УЛУЧШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ БЕЛКОВ ЗЕРНА**Л.А. Эльконин, В.М. Панин, О.А. Кенжегулов, С.Х. Сарсенова***Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока, Саратов, Россия*

Среди разнообразных направлений современной биотехнологии улучшение питательной ценности сельскохозяйственных культур методами генетической инженерии и геномного редактирования является одним из наиболее востребованных и интенсивно разрабатываемых. Особую актуальность это направление имеет для зернового сорго – высокоурожайной злаковой культуры, отличающейся высокой засухоустойчивостью, способной давать устойчивые урожаи зерна в условиях минимальной влагообеспеченности. Значение этой культуры особенно велико в регионах, регулярно подвергающихся действию засухи, в которых стабильное производство традиционных злаковых культур – пшеницы, кукурузы, ячменя – представляет серьезную проблему. Сорго входит в число пяти важнейших злаковых культур, возделываемых на Земном шаре. В связи с глобальным потеплением климата значение этой культуры будет неуклонно возрастать. Кроме того, зерно сорго не содержит клейковины и может служить источником белка для людей, больных целиакией и вынужденных соблюдать безглютеновую диету.

Однако зерно сорго, по сравнению с другими злаковыми культурами, характеризуется устойчивостью запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению и низкой питательной ценностью самих кафиринов, которые бедны ценными аминокислотами – лизином, треонином, триптофаном (Bean et al., 2018). Слабая перевариваемость кафиринов протеолитическими ферментами (пепсином, трипсином) снижает перевариваемость крахмала, поскольку непереваренные белки уменьшают доступность амилолитических ферментов к крахмальным гранулам.

Причины устойчивости кафиринов к протеолитическому расщеплению имеют многофакторную природу (Belton et al., 2006; De Mesa-Stonestreet et al., 2010). К числу таких факторов относятся химическая структура молекул кафиринов, некоторые из которых (гамма- и бета-кафирины) изобилуют серо-содержащими аминокислотами, образующими S-S связи, препятствующими их расщеплению протеазами; взаимодействие кафиринов с веществами фенольной природы и полисахаридами; пространственная организация разных кафиринов в белковых телецах клеток эндосперма. При этом считается, что гамма-кафирин, занимающий наружный слой белковых телец и наиболее устойчивый к протеолитическому расщеплению, препятствует расщеплению основного запасного белка – α -кафирина, располагающегося внутри белковых телец.

Решение проблемы улучшения перевариваемости запасных белков у сорго возможно с помощью разных биотехнологических подходов: экспериментальной индукции мутантов с нарушенным синтезом или измененным аминокислотным составом кафиринов; выявления существующих в природе аллельных вариантов кафиринов (Laidlaw et al., 2010; Cremer et al., 2014; Chiquito-Almanza et al., 2015; Duressa et al., 2020); введения генетических конструкций, вызывающих сайленсинг генов гамма- и / или альфа-кафиринов (da Silva et al., 2011; Kumar et al., 2012; Grootboom et al., 2014); редактирования нуклеотидных последовательностей генов гамма- и / или альфа-кафиринов с целью их нокаута (Li et al., 2018).

Нами была поставлена цель получения линий зернового сорго с улучшенной перевариваемостью кафиринов, путем введения в геном генетической конструкции, способной к индукции РНК-сайленсинга гена γ -кафирина. Эта конструкция состояла из фрагментов гена 28 кДа γ -кафирина в прямой и инвертированной ориентации, которые были разделены последовательностью гена *ub1*-интрона кукурузы (Elkonin et al., 2016). Этой конструкцией управлял 35S-промотор. Такая конструкция должна подавлять экспрессию гена γ -кафирина с помощью РНК-интерференции, поскольку мРНК, транскрибируемая с этой последовательности, благодаря комплементарности прямой и инвертированной последовательностей, образует шпильчатую конфигурацию.

Данная конструкция была введена в геномы двух сортов зернового сорго – Желтозерного 10 и Аванса – посредством агробактериальной трансформации. В качестве эксплантов использовали незрелые зародыши, которые после сокультивирования с агробактериальной клеточной суспензией формировали эмбриогенный каллус на среде с селективным агентом (глюкофосинатом аммония). Из отобранных устойчивых каллусов были получены растения-регенеранты.

В экспериментах с сортом Желтозерное 10 было получено одно ПЦР-положительное растение. Потомство этого растения наследовало введенную генетическую конструкцию в течение нескольких поколений, что было подтверждено с помощью ПЦР-анализа с праймерами для маркерного гена *bar* и *ubi*-интрона, входящего в состав генетической конструкции для сайленсинга. SDS-электрофорез в нередуцирующих условиях показал, что в зерновках трансгенных растений уровень синтеза белка, соответствующего по молекулярной массе гамма-кафирину (28 kDa) был снижен, по сравнению с исходной нетрансгенной линией, что следовало ожидать в случае сайленсинга гена гамма-кафирина. Кроме того, у исходной нетрансгенной линии Желтозерное 10 содержание полипептидов с $M_r \approx 66$ и 45 kDa, возникающих в результате полимеризации гамма-кафирина, было значительно выше, чем у трансгенных растений.

Анализ эндосперма зерновок, развившихся на метелках растений T_1 , выявил, что у трансгенных растений наряду с зерновками, в которых присутствовал стекловидный эндосперм нормальной толщины, присутствовали зерновки с мучнистым эндоспермом, у которых стекловидный слой был почти полностью редуцирован, либо зерновки, в которых эндосперм имел модифицированную текстуру: стекловидный слой был в значительной мере редуцирован или развивался в виде секторов или пятен, окруженных мучнистым эндоспермом. Возможно, формирование разных типов эндосперма, по-видимому, отражает особенности экспрессии встроеной генетической конструкции в процессе развития зерновки.

Наиболее значительным следствием сайленсинга гена гамма-кафирина является повышенная перевариваемость белков эндосперма (Elkonin et al., 2016). Трансгенные растения сорта Желтозерное 10 характеризовались значительно улучшенной перевариваемостью кафиринов *in vitro*. Сравнение электрофоретических спектров до и после действия пепсина показало, что у трансгенных растений поколения T_2 перевариваемость запасных белков достигла 94 % и была значительно выше, чем в исходного сорта (50–60 %). Примечательно, что растения поколения T_3 с толстым стекловидным эндоспермом также имели высокий уровень перевариваемости кафиринов (83–90 %). Таким образом, повышенная перевариваемость белков эндосперма у трансгенных растений сорго с сайленсингом гена γ -кафирина может не быть связана с полной редукцией стекловидного эндосперма, как это наблюдалось у растений с сайленсингом α -кафиринов. В этой связи, полученные нами трансгенные линии сорта Желтозерное 10 могут представлять особый интерес, поскольку они сочетают высокую перевариваемость со стекловидным или модифицированным типом эндосперма, имеющим более высокую ценность в селекции. По-видимому, снижение уровня γ -кафирина повышает перевариваемость α -кафиринов. Это увеличение может быть обусловлено как химическими причинами (такими как снижение полимеризации), так и физическими причинами (изменение пространственного расположения α -кафиринов в белковых телах, которые становятся более доступными для действия пепсина).

Важным следствием сайленсинга генов проламинов у злаков является повышенный синтез других белков, в том числе белков с высоким содержанием незаменимых аминокислот (лизина, треонина). В наших исследованиях у зерновок трансгенных растений поколения T_2 с высокой перевариваемостью кафиринов, как с модифицированным эндоспермом, так и с нормальным стекловидным эндоспермом, общее содержание аминокислот значительно уменьшилось (на 22–40 %) по сравнению с исходным нетрансгенным сортом. В то же время, относительное содержание двух основных незаменимых аминокислот, лизина и треонина, значительно увеличилось (Elkonin et al., 2016). Доля лизина увеличилась в 1,6–1,7 раза. Такое увеличение относительного содержания лизина и треонина в сочетании со значительным снижением общего уровня аминокислот, вероятно, было вызвано снижением содержания кафиринов, бедных лизином и треонином, тогда как синтез других белков оставался неизменным. Соответственно, относительные пропорции лизина и треонина увеличились.

Примечательно, при анализе более поздних поколений полученных трансгенных линий Желтозерного 10 нами было обнаружено, что у растений поколения T_4 , сохранивших высокую перевариваемость кафиринов, четко наблюдалась амплификация целевого фрагмента *ubi*-интрона, тогда как амплификация целевого фрагмента *pos*-промотора, управляющего в генетической конструкции маркерным геном *bar*, отсутствовала. У некоторых растений наблюдались только следы этого фрагмента *pos*-промотора. Мы предполагаем, что эти растения не содержали функционального *pos*-промотора. Учитывая, что *pos*-промотор регулирует экспрессию маркерного генного бара, эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы, что полученные трансгенные растения являются функционально безмаркерными.

Возможно, это является следствием разрушения генетической конструкции в процессе онтогенеза, поскольку у некоторых растений следы амплификации последовательности pos-промотора наблюдались в ДНК, выделенной из первого побега, но не из последующих побегов.

После экспериментов с модельным сортом Желтозерное 10, нами была поставлена задача получить трансгенные растения с улучшенной перевариваемостью кафиринов у нового коммерческого сорта Аванс, отличающегося комплексом улучшенных хозяйственно-ценных признаков. В результате экспериментов нами были получены 14 ПЦР-положительных растений, у которых наблюдалась амплификация целевых фрагментов как *ubi*-интрона, так и *pos*-промотора и, при этом отсутствовала амплификация целевого фрагмента гена *chvA*, которая имела бы место в случае агробактериальной контаминации. Частота трансформации варьировала в разных экспериментах от 6,7 до 12 %. ПЦР-анализ потомства T_1 одного из этих растений (# 1–1) показал амплификацию последовательностей-мишеней *pos*-промотора и *ubi*-интрона и подтвердил наследование введенной генетической конструкции (рис. 1).

Анализ перевариваемости белков эндосперма у зерновок, завязавшихся на этом растении, показал значительно более высокий уровень перевариваемости кафиринов у этого мутанта по сравнению с исходным нетрансгенным сортом (93 % против 57 %, по результатам денситометрии электрофореграмм) (рис. 2). Такая высокая перевариваемость запасных белков наблюдалась и в следующем поколении T_1 . Анализ текстуры эндосперма трансгенных зерновок показал полное исчезновение стекловидного эндосперма (рис. 3). Примечательно, что стекловидный эндосперм у зерновок сорта Аванс имеет темный цвет, что свидетельствует о наличии танинов, которые снижают питательную ценность зерна. Таким образом, два фактора – удаление стекловидного эндосперма, содержащего танины, и улучшение перевариваемости кафиринов – указывают на потенциально более высокую питательную ценность зерна полученного мутанта по сравнению с зерном исходного сорта Аванс.

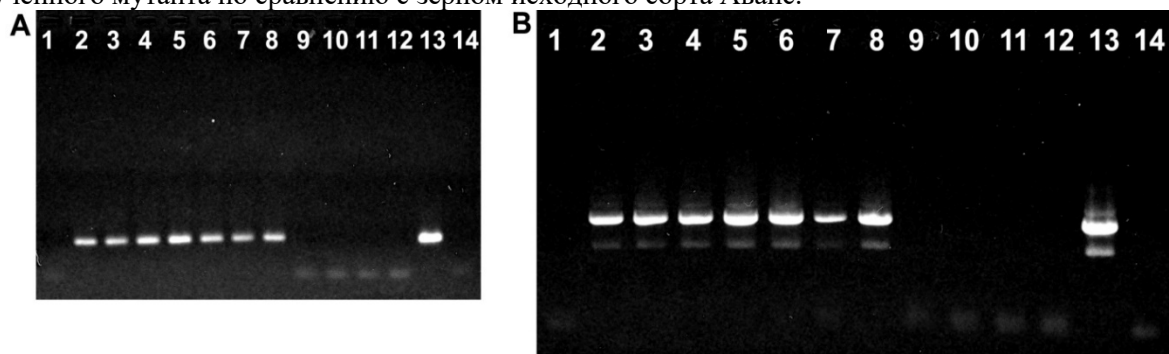


Рис. 1. Результат ПЦР-анализа поколения T_1 , полученного от ПЦР-положительного растения T_0 № 1–1 с праймерами к *pos*-промотору (А) и *ubi*-интрону (В), входящим в состав Т-ДНК. 1, 9–12 – растения исходного нетрансгенного сорта сорго Аванс; 2–6 – растения из поколения T_1 ; 7, 8 – родительское растение T_0 № 1–1 (образцы ДНК из разных листьев); 13 – положительный контроль (GV3101/pNRKAF); 14 – отрицательный контроль (нет ДНК).

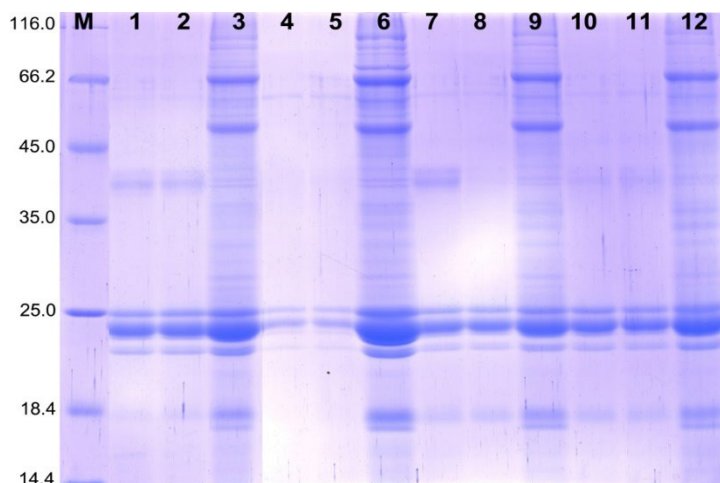


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков муки из зерновок сорго сорта Аванс (треки 1–3), трансгенного растения № 1–1 (4–6) и нетрансгенных растений № 5–1 (7–9) и № 6–4 (10–12), полученных в одном из экспериментов по агробактериальной трансформации. М – маркеры молекулярной массы белков. В треках 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11 – спектры белков, выделенных из муки, обработанной пепсином в тесте на перевариваемость в системе *in vitro*; в треках 3, 6, 9, 12 – спектры белков из муки, не обработанной пепсином (контроль)

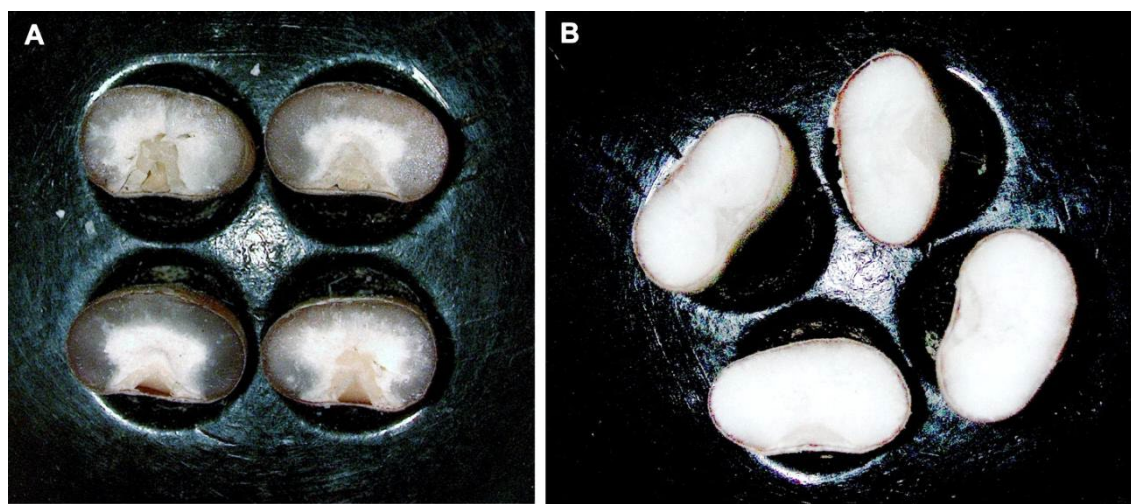


Рис. 3. Поперечные срезы зерновок исходного сорта Аванс (А) и трансгенного растения № 1–1 (В).

Таким образом, нами у коммерческого сорта зернового сорго Аванс получена трансгенная линия с улучшенной перевариваемостью кафиринов. У трансгенных линий сорта Желтозерное-10, с улучшенной перевариваемостью кафиринов, зафиксирована нестабильность введенной генетической конструкции, которая привела к элиминации промотора маркерного генного *bar*, вследствие чего растения этой линии стали функционально безмаркерными.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 19-016-00117.

ЛИТЕРАТУРА

- Bean S.R., Ioerger B.P., Wilson J.D. et al. (2018) Structure and chemistry of sorghum grain // In: W Rooney (ed.). Achieving sustainable cultivation of sorghum. Vol. 2: Sorghum utilization around the world. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing. p. 1–27.
- Belton P.S., Delgadillo I., Halford N.G., Shewry P.R. (2006) Kafirin structure and functionality. *J. Cereal Sci.* 44: 272–286. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.004
- da Silva L.S., Jung R., Zhao Z. – Y., Glassman K., Taylor J., Taylor J.R. (2011) Effect of suppressing the synthesis of different kafirin sub-classes on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. *J. Cereal. Sci.* 54: 160–167. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.04.009
- Duressa D., Bean S., Amand P. St. et al. (2020) Identification of variant α -kafirin alleles associated with protein digestibility in grain sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench]. *Crop Sci.* Doi: 10.1002/csc2.20198
- Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Y., Rakitin A.L., Ravin N.V. (2016) Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by Agrobacterium-mediated transformation. *Russ. J. Plant Physiol.* 63: 678–689. DOI: 10.1134/S1021443716050046
- Grootboom A.W., Mkhonza N.L., Mbambo Z. et al. (2014) Co-suppression of synthesis of major α -kafirin sub-class together with γ -kafirin-1 and γ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Rep.* 33: 521–537. DOI: 10.1007/s00299-013-1556-5.
- Kumar T., Dweikat I., Sato S. et al. (2012) Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol. J.* 10: 533–544. DOI: 10.1111/j. 1467-7652.2012.00685.x
- Laidlaw H., Mace E., Williams S., et al. (2010) Allelic variation of the beta-, gamma – and delta-kafirin genes in diverse Sorghum genotypes. *Theor Appl Genet.* 121: 1227–1237.
- Li A., Jia S., Yobi A. et al. (2018) Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiol.* 177(4): 1425–1438. DOI: 10.1104/pp.18.00200