УДК 633.17:573.6:577.21

ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬ IN VITRO ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ЭНДОСПЕРМА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ СОРГО, НЕСУЩИХ ГЕНЕТИЧЕСКУЮ КОНСТРУКЦИЮ ДЛЯ САЙЛЕНСИНГА ГЕНА ГАММА-КАФИРИНА**Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В.***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», Саратов,
e-mail: lelkonin@gmail.com*

Одним из перспективных направлений использования генетической инженерии в селекции является улучшение питательной ценности возделываемых культур. Это направление имеет особую актуальность для сорго – высокоурожайной засухоустойчивой злаковой культуры, отличающейся более низкой, по сравнению с другими злаками, питательной ценностью зерна, в основе которой лежит устойчивость его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению. В данной работе исследовали перевариваемость кафиринов у потомства трансгенных растений сорго (поколения T_3 – T_4), полученных посредством агробактериальной трансформации со штаммом *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущим генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена гамма-кафирина. Муку, полученную из цельносмолотых зерновок, обрабатывали пепсином в условиях *in vitro*, образцы подвергали SDS-электрофорезу в ПААГ, для оценки количества непереваренного белка электрофореграммы сканировали и подвергали компьютерному анализу. Выявлено, что у растений из трех изученных семей перевариваемость белков эндосперма достигает 85–90% (против 52–53% у исходной нетрансгенной линии Желтозерное 10). Установлено, что данный признак проявляется у растений, выращиваемых как в искусственных тепличных условиях, так и в естественных условиях внешней среды. Выявлены растения, у которых высокая перевариваемость кафиринов сочетается с формированием модифицированного эндосперма, в котором стекловидный слой представлен в виде тонкого «серпика», а также нормально развитого стекловидного эндосперма. Данный факт свидетельствует о возможности получения агрономически ценных линий сорго с высокой перевариваемостью кафиринов и твердым эндоспермом.

Ключевые слова: кафирины, трансгенные растения, перевариваемость белка *in vitro*, сорго**IN VITRO DIGESTIBILITY OF STORAGE ENDOSPERM PROTEINS OF TRANSGENIC SORGHUM PLANTS CARRYING GENETIC CONSTRUCT FOR SILENCING OF THE GAMMA-KAFIRIN GENE****Elkonin L.A., Italyanskaya Yu.V.***Agricultural Research Institute of the South-East Region, Saratov, e-mail: lelkonin@gmail.com*

Improvement of the nutritional value of cultivated crops is one of the promising areas for application of plant genetic engineering in plant breeding. This direction is of particular relevance for sorghum – a high-yielding drought-resistant cereal crop, which is characterized by a lower nutritional value of the grain, in comparison with other cereals. The basis of such a feature of sorghum grain is stability sorghum storage protein (kafirins) to proteolytic digestion. In this paper, we studied the digestibility of kafirins in offspring of transgenic sorghum plants (T_3 – T_4 generations) obtained by transformation with *Agrobacterium* strain carrying a genetic construct for the RNA-silencing of the gamma-kafirin gene. The flour obtained from the whole-ground kernels was treated with pepsin under *in vitro* conditions, after that the samples were subjected to SDS-PAGE electrophoresis, to evaluate the amount of undigested protein; the electrophoregrams were scanned and subjected to computer analysis. It was revealed that in most plants of the three studied families, the digestibility of endosperm proteins reaches 85–90% (versus 52–53% in the original non-transgenic line of Zheltozernoe 10). It has been established that this trait manifested in plants grown both under artificial greenhouse conditions and in the experimental plot in natural environmental conditions. The plants have been found in which the high digestibility of kafirins is combined with the formation of a modified endosperm, in which the vitreous layer resembling a thin «sickle», as well as a normally developed vitreous endosperm. This fact indicates the possibility of obtaining of agronomically valuable sorghum lines with high digestibility of kafirins and hard endosperm.

Keywords: kafirins, transgenic plants, *in vitro* protein digestibility, sorghum

Создание сортов и гибридов, обладающих нужными для человека признаками и свойствами, является основной целью селекции растений. С развитием методов генетической инженерии возможности селекционеров и генетиков по созданию новых сортов и гибридов значительно расширились. Одним из перспективных направлений использования генетической инженерии в селекции является улучшение

питательной ценности возделываемых культур, а именно изменение содержания белка, крахмала, незаменимых аминокислот, подавление синтеза аллергенов и различных веществ, обладающих антипитательными свойствами [1, 2].

Особенно актуальны эти работы для сорго – высокоурожайной засухоустойчивой злаковой культуры. Сорго входит в число пяти наиболее широко возделываемых

злаковых культур мирового сельскохозяйственного производства. С потеплением климата и увеличением посевных площадей, подвергающихся воздействию засухи, эта культура будет получать все большее распространение. В то же время, по сравнению с другими видами злаков, большинство ныне возделываемых сортов и гибридов сорго имеют более низкую питательную ценность [3].

Одной из причин сравнительно низкой питательной ценности зерна сорго является устойчивость его запасных белков (кафиринов) к расщеплению протеазами. При этом считается, что наибольшей устойчивостью к протеолитическому расщеплению обладает гамма-кафирин, занимающий периферийное положение в белковых тельцах клеток эндосперма и тем самым блокирующий доступ протеаз к альфа-кафиринам, располагающимся внутри белковых телец [4, 5].

Развитие методов генетической инженерии открывает возможность решения этой проблемы с помощью технологии РНК-интерференции, позволяющей целенаправленно «выключать» экспрессию отдельных генов. В последние годы технология РНК-интерференции стала широко использоваться для изменения состава запасных белков и крахмала у разных видов злаков, в том числе и у сорго [6–8].

Нами ранее сообщалось о получении трансгенных растений сорго, несущих генетическую конструкцию, способную к индукции РНК-сайленсинга гена гамма-кафирина [9]. В данной статье представлены результаты исследования перевариваемости запасных белков в системе *in vitro* у потомства полученных трансгенных растений.

Материалы и методы исследования

Исследовали потомство (поколения T_3 – T_4) трансгенных растений, полученных ранее в опыте по генетической трансформации незрелых зародышей линии Желтозерное-10 (Ж10) с использованием штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущего бинарный вектор pNRKafSil, созданный в Центре биотехнологии РАН [9]. Данный вектор содержит в составе Т-ДНК селективный маркерный ген *bar* под контролем *nos*-промотора и целевую вставку, представляющую собой инвертированный повтор последовательности внутренней области гена гамма-кафирина сорго, разделенный последовательностью интрона гена *ubi1* кукурузы, под контролем 35S-промотора.

У зерновок, завязавшихся на растениях, исследовали текстуру эндосперма (рассекая скальпелем зерновку на две половины), а также перевариваемость запасных белков. Для изучения перевариваемости белков использовали метод обработки муки пепсином в условиях *in vitro*, широко применявшийся ранее в ряде исследований [10–12]. Мука (20 мг), получен-

ная от цельносмолотых зерновок трансгенных растений и исходной нетрансгенной линии Ж10, подвергалась обработке 0,15% раствором пепсина (Р7000 Sigma-Aldrich) в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 2,0) в течение 2 час при 37°C [10]. Контрольные образцы инкубировали в калий-фосфатном буфере без добавления пепсина при тех же условиях.

Для количественной оценки перевариваемости белков использовали информативный метод, основанный на SDS-электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей денситометрией полученных спектров [12]. Для этой цели образцы подвергали электрофорезу в редуцирующих условиях (2% SDS, 5% 2-меркаптоэтанол) в 13,0% ПААГ в соответствии с методом Лэммли [13]. Гели окрашивали Кумасси ярко-синим R-250, сканировали и оцифровывали с помощью компьютерной программы Скэнгел (д-р А.Ф. Равич, ФГБНУ «НИИСХ Юго-Востока»), учитывавшей число пикселей в отдельных фракциях электрофоретического спектра белков. Величину перевариваемости вычисляли как процентное отношение разницы между числом пикселей в контрольном и опытном образце к числу пикселей в контрольном образце. Эксперименты проводили в двух-четырёх повторениях.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли с использованием пакета программ AGROS, версия 2.09 (д-р С.П. Мартынов, ИОГен РАН).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ перевариваемости запасных белков в системе *in vitro* у потомства полученных ранее трансгенных растений показал, что некоторые из них отличаются более высокой перевариваемостью, по сравнению с исходной нетрансгенной линией, Ж10. Так, у растений поколения T_3 из семей 94-2-04 и 94-3-04, выращенных в вегетационных сосудах, уровень перевариваемости достигал 85–90% (рис. 1, табл. 1). При этом в семье 94-2-04 зерновки с более высокой перевариваемостью (83–87%) отличались модифицированным типом эндосперма, в котором стекловидный слой был представлен в виде тонкого «серпика» (рис. 2), тогда как сегрегант с обычным стекловидным эндоспермом имел низкую перевариваемость (43–55%, табл. 1). Однако у растений из семьи 94-3-04 высокая перевариваемость наблюдалась у зерновок, как со стекловидным (рис. 1, треки 9–12), так и с мучнистым типом эндосперма (рис. 1, треки 5–8). Следует отметить, что мучнистый тип эндосперма характерен для трансгенных растений кукурузы и сорго с сайленсингом гамма-проламинов [2, 7, 8].

В потомстве трансгенных растений из других семей наблюдалось значительное варьирование перевариваемости запасных белков, связанное, по-видимому, с условия-

ми выращивания. Так, в потомстве растения 94-6 с высокой перевариваемостью кафиринов все четыре изученных растения T_2 (94-6-1, 94-6-2, 94-6-3, 94-6-4), выращенные в условиях климатокамеры, не отличались по уровню перевариваемости от исходной нетрансгенной линии. Однако среди растений из этой семьи, выращенных на опытной грядке, обнаружили растения с почти полной перевариваемостью запасных белков, которая обычно наблюдается у пшеницы или ржи, но не у сорго (рис. 3, треки 10, 12). Данный факт заслуживает дальнейшего детального исследования. Учитывая, что зерновки у таких растений имели обычную текстуру эндосперма с выраженным стекловидным слоем, то данный генотип представляет высокую ценность для возможного использования в селекции. У растений из другой трансгенной семьи, 94-2-04 (поколение T_4), выращенных в условиях опытной грядки, уровень перевариваемости также значимо превышал показатели исходной нетрансгенной линии Желтозерное-10 (табл. 2), что свидетельствует о проявлении

данного признака не только в искусственных тепличных условиях, но и в естественных условиях внешней среды.

Таблица 1
Перевариваемость *in vitro* белков эндосперма трансгенных растений сорго (семьи T_3)

Образец	Тип эндосперма	Перевариваемость, % ¹
Желтозерное-10, исходная линия	Стекловидный	52,3 а
T_3 94-3-04-1	Мучнистый	83,1 cd
	Модифицированный	90,3 d
T_3 94-02-4-2	Мучнистый	85,2 d
T_3 94-02-4-3	Стекловидный	49,3 а
HCP ₀₅		10,9
F		34,105*

Примечание. ¹ Данные, обозначенные разными буквами, значимо отличаются при $p < 0,05$ в соответствии с Тестом множественных сравнений Дункана; * $p < 0,05$.

Рис. 1. Перевариваемость кафиринов в системе *in vitro* у разных зерновок растения T_3 94-3-04-1. 1–4 – исходная нетрансгенная линия Желтозерное-10 со стекловидным эндоспермом; 5–8 – зерновки с мучнистым эндоспермом; 9–12 – зерновки со стекловидным эндоспермом; 1, 3, 5, 7, 9, 11 – контроль без обработки пепсином; 2, 4, 6, 8, 10, 12 – после обработки пепсином; М – маркеры молекулярной массы

Рис. 2. Поперечные срезы зерновок трансгенных растений сорго. А – зерновка с нормально развитым слоем стекловидного эндосперма, Б – зерновка с мучнистым эндоспермом, В – зерновка с модифицированным типом эндосперма, в котором стекловидный слой представлен в виде «серпика»

Рис. 3. SDS-электрофорез белков из зерновок трансгенных растений из семьи 94-6 (поколение T_3), выращенных в опытной грядке, до (1, 3, 5, 7, 9, 11) и после обработки пепсином (2, 4, 6, 8, 10, 12). 1–4 – исходная нетрансгенная линия Желтозерное 10, 5–8 – растение из семьи T_3 (№ 217-4) с низкой перевариваемостью белков эндосперма, 9–12 – растение из семьи T_3 (№ 217-3) с почти 100% перевариваемостью белков эндосперма; M – маркеры молекулярной массы

Таблица 2
Перевариваемость в условиях *in vitro*
запасных белков трансгенных
растений сорго (поколение T_4)

Образец	Условия вегетации	Перевариваемость, %	
		$x \pm s_x^1$	Lim
Ж10 ²	Опытная грядка	$53,3 \pm 4,4$	40,0–65,0
94-2-04-2	Опытная грядка	$73,2 \pm 3,2^{**}$	64,9–81,6
94-2-11-3	Вегетацион- ные сосуды, открытый воздух	$75,0 \pm 4,1^{**}$	63,5–86,5
94-2-11-3	Вегетацион- ные сосуды, климатокамера	$67,7 \pm 8,4$	47,4–81,8

Примечание. ¹ s_x – ошибка средней;
² исходная нетрансгенная линия Желтозерное 10;
^{**}значимо отличается от исходной линии при
 $p < 0,01$, в соответствии с *t*-тестом Стьюдента.

Заключение

Высокая перевариваемость кафиринов, выявленная нами ранее у трансгенных растений сорго, несущих генетическую конструкцию для индукции сайленсинга гена гамма-кафирина [9], наследуется в их потомстве и проявляется как у растений, выращиваемых в искусственных тепличных условиях, так и в естественных условиях внешней

среды. Эндосперм у трансгенных растений с высокой перевариваемостью кафиринов может быть как мучнистым, так и стекловидным, имеющим более высокую ценность в селекции. Данный факт свидетельствует о возможности получения агрономически ценных линий сорго с высокой перевариваемостью кафиринов и твердым эндоспермом.

Список литературы/References

- Godwin I.D., Williams S.B., Pandit P.S., Laidlaw H.K.C. Multifunctional grains for the future: genetic engineering for enhanced and novel cereal quality // *In Vitro Cell & Dev. Biol. – Plant.* – 2009. – vol. 45. – P. 383–399.
- Elkonin L.A., Domanina I.V., Italyanskaya Yu.V. Genetic engineering as a tool for modification of seed storage proteins and improvement of nutritional value of cereal grain // *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2016. – vol. 51. – P. 17–30.
- Henley E.C., Taylor J.R.N., Obukosia S.D. The Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum // *Advances in Food and Nutrition Research* / ed. by S.L. Taylor. – Burlington: Academic Press, 2010. – vol. 60. – P. 21–52.
- Oria M.P., Hamaker B.R., Shull J.M. Resistance of sorghum α -, β - and γ -kafirins to pepsin digestion // *J. Agric. Food Chem.* – 1995. – vol. 43. – P. 2148–2153.
- De Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins // *J. Food Sci.* – 2010. – vol. 75. – P. 90–104.
- Younis A., Siddique M.I., Kim C.-K., Lim K.-B. RNA Interference (RNAi) induced gene silencing: a promising approach of Hi-tech plant breeding // *Int. J. Biol. Sci.* – 2014. – vol. 10. – P. 1150–1158.

7. Da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R.N. Transgenic sorghum with altered kafirin synthesis: kafirin solubility, polymerization and protein digestion // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – vol. 59. – P. 9265–9270.
8. Kumar T., Dweikat L., Sato S., Ge Z., Nersesian N., Elthon T., Bean S., Ioerger B.P., Tiley M., Clemente T. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) // *Plant Biotechnol. J.* – 2012. – vol. 10. – P. 533–544.
9. Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Y., Rakitin A.L., Ravin N.V. Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by agrobacterium-mediated transformation. *Russ // J. Plant Physiol.* – 2016. – vol. 63. – P. 678–689.
10. Aboubacar A., Axtell J.D., Huang C.P., Hamaker B.R. A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines // *Cereal Chem.* – 2001. – vol. 78. – P. 160–165.
11. Nunes A., Correia I., Barros A., Delgadillo I. Sequential in vitro pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – vol. 52. – P. 2052–2058.
12. Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Fadeeva I.Yu., Bychkova V.V., Kozhemyakin V.V. In vitro protein digestibility in grain sorghum: effect of genotype and interaction with starch digestibility. *Euphytica.* – 2013. – vol. 193. – P. 327–337.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* – 1970. – vol. 227. – P. 680–685.