

УДК 577.2:631.5:633.34

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ СОИ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

О.И. Кершанская

РГП Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, г. Алматы
gen_o.kersh@mail.ru

Молекулярные механизмы контроля устойчивости растений к абиотическим стрессам базируются на активации и регуляции специфических генов, таких как *C₄-pepc*, *C₄-ppdk* из кукурузы (засуха), *desA12licBM3* из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (холод), *FeSOD* из *Arabidopsis thaliana* (окислительный стресс). Создана генетическая конструкция целевого гена *ppdk* и использован ген *desA12licBM3*.

Существующие методы генетической трансформации сои имеют ряд существенных недостатков: они генотип-зависимы, включают этапы культивирования клеток в культуре *in vitro* и регенерации растений, применяются только 1-2 генетические конструкции целевых и репортерных генов, позволяют получать слабые химерные растения с низкой эффективностью трансформации; процесс создания трансгенов составляет 320-380 дней. Разработанный нами способ *germ-line* генетической трансформации сои с использованием прорастающих пыльцевых трубок позволяет избежать получения химерных неоднородных растений, генотип независим, экономичен, быстр, близок к естественному половому размножению, относительно эффективен.

Используя 5 коммерческих сортов США и 25 казахстанских и зарубежных разновидностей сои, районированных в Казахстане, мы интродуцировали данные гены в сою, используя собственный разработанный и запатентованный способ *germ-line* пипетирования *Agrobacterium*, с последующим молекулярным подтверждением и изучением физиолого-биохимических особенностей устойчивости к стрессам полученных трансгенов.

Получено около 5000 семян трансгенных растений сои со вставкой в геном и экспрессией генов *ppdk* и *desA12licBM3*. Результаты ПЦР анализа трансгенных растений сои первого поколения T₁ подтвердили наличие бендов, соответствующих молекулярной массе 645 нп (ген *ppdk*) и 692 нп (ген *desA12licBM3*) с эффективностью трансформации 1,73 и 1,89% от числа изначально скринированных семян. Подтверждена стабильная трансформация сои во втором поколении, T₂. Высокий уровень экспрессии данных генов в трансгенной сое подтвержден повышением урожая до 148%, увеличением содержания воды в листьях на 7-13%, содержания пролина в листьях на 11-39%, активизацией фермента супероксид дисмутазы на 85-110% в условиях засухи и на 40-200% в условиях низких положительных температур. Радикальное улучшение сельскохозяйственных культур, такое как генетическая инженерия устойчивости растений к абиотическим стрессам, необходимо для обеспечения продовольственной безопасности.

Ключевые слова: гены *ppdk* и *desA12licBM3*, метод генетической *germ-line* трансформации, абиотические стрессы, соя

Введение

Имеется большое количество работ по генетической трансформации сои *Glycine max*, L., которые основаны на использовании таких методов трансформации как биобаллистическая [1], кокультивирование каллусов с суспензией агробактерий [2] с использованием зрелых или незрелых эксплантов [3] и различных агентов трансформации [4]. Однако эти методы имеют ряд существенных недостатков: они включают этапы культивирования клеток в культуре *in vitro* и регенерации растений, занимают 12-16 недель от изоляции экспланта до трансфера молодого растения в почву, позволяют получать слабые химерные растения с низкой эффективностью трансформации, применяются только для одного или ограниченного числа сортов сои, интродуцируют 1-2 генетические конструкции целевых генов устойчивости к болезням или вредителям (такие как фосфинотрицин, репортерные гены [5], [6]) – то есть позволяют получать ограниченный биотехнологический продукт первого поколения, а весь процесс создания трансгенов составляет 320-380 дней. Можно заключить, что используемые методы генотип-зависимы, требуют больших затрат времени, оборудования/реагентов и средств на этапы культуры тканей и регенерацию растений, используют ограниченное количество генетических

конструкций одного-двух целевых генов устойчивости к гербицидам, имеют относительно невысокую эффективность получения здорового продуктивного растения.

В последнее время получили развитие методы генетической трансформации растений с использованием пыльцы, яйцеклетки, зародышей, семян, других половых элементов, - натуральные и естественные, приближенные к половому размножению, или так называемые, методы *germ-line* генетической трансформации. Такие методы генетической трансформации сои занимают 90-120 дней – длину вегетационного периода сои от цветения до созревания, экономичны, позволяют получать здоровые растения, относительно эффективны [7], [8], [9], [10], [11], [12].

Цель: Получение трансгенной сои *Glycine max*, L., устойчивой к абиотическим факторам в Казахстане.

Прототипами разработанного нами способа генетической трансформации сои являются запатентованные в США способ *germ-line* трансформации Martinell В.Ж. и др. [13] и способ генетической трансформации сои с использованием пыльцевых трубок Li Z., Widholm J.M. и др. [14], [15]. Данные способы описывают *Agrobacterium*-зависимую *germ-line* генетическую трансформацию сои. Первый способ основывается на доставке генов к индивидуальным клеткам свежесозревшей меристемы сои; данные клетки могут непосредственно индуцировать формирование наземной части побега, из которой вырастают трансгенные растения. Второй способ основан на использовании естественных пыльцевых трубок для переноса в зиготу рекомбинантной ДНК интереса. Преимущества способов – отсутствие необходимости в этапах культуры тканей и регенерация растений, экономия времени, реагентов и средств, а также использование природных механизмов интродукции целевых генов, сходных с естественным половым размножением. Способ генетической трансформации сои с использованием прорастающих пыльцевых трубок позволяет избежать получения химерных неоднородных растений и дает высокий выход семян, сравнимый с контрольными нетрансформированными формами.

Существенными признаками прототипа, совпадающими с признаками разработанного нами способа, являются: объект – соя; метод – *germ-line* трансформация (трансформация с использованием герм-элементов: пыльцы, яйцеклетки, незрелых и зрелых зародышей, меристем, семян), не требующий дорогостоящих и длительных этапов культуры тканей, относительно простой, экономичный и эффективный; естественный вектор доставки рекомбинантных ДНК в яйцеклетку на свежооплодотворенные, но неделящиеся клетки зиготы являются прорастающие сразу же после опыления естественные пыльцевые трубки; агробактериальное пипетирование. Данный способ является наиболее близким к естественному половому размножению, и биологичным, поскольку добавляет к генетическому материалу данной формы сои при оплодотворении целевую рекомбинантную ДНК.

Недостатки прототипа: 1) генотипическая зависимость, способ разработан для 4 конкретных сортов сои селекции США: Williams 82, Macon, Clark 63 и Iroguis; 2) время и способы агробактериального пипетирования определялись конкретными погодными условиями среднего запада США, штата Иллинойс и должны быть разработаны для условий Казахстана; 3) исследования биологии развития сои не были проведены; 4) генетическими конструкциями являлись общеизвестные плазмиды *pBI221*, *pUC19pBI0122* и *bar* ген, сообщающий устойчивость к гербициду фосфинотрицин (*phosphinotricin*) – типичному гену для получения биотехнологического продукта первого поколения (один ген – устойчивость к одному биотическому фактору); 5) не оптимизирована подготовка агробактериальной суспензии с целевыми генами и агентами трансформации, не уточнена техника нанесения агробактериальной суспензии, не уточнена оптимальная стадия, цветок, нодия, время суток для агробактериального пипетирования, не приведено молекулярно-биологическое подтверждение получения трансгенных растений методом ПЦР.

Материалы и методы

Растительный материал: 10 казахстанских и зарубежных разновидностей сои, районированных в Казахстане. Уход, выращивание, фенологические наблюдения и анализ урожая сои проведены по стандартной методике [16] на производственных участках ИББР КН МОН РК и в условиях оранжереи НИИПББ МОН РК.

Генетический материал: гены устойчивости к стрессу засухи (*ppdk* из кукурузы) и воздействию низкой температуры (*desA12licBM₃* из *Synechocystis* sp. PCC 6803). Генетические конструкции генов *ppdk* и *desA12licBM₃* основаны на двух базовых экспрессионных векторах ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН в плаزمиде *pBI121*, *pBIN19*, и содержат *CaMV35S* – сильный конститутивный промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, способный контролировать экспрессию целевого гена в двудольную культуру – сою; *nrpII* – ген, кодирующий неомифосфотрансферазу II, которая обеспечивает устойчивость растений к селективному

агенту канамицину; *LicBM3* – последовательность репортерного гена, который кодирует термостабильную β -1,3-1,4-глюканазу (лихеназу) *Clostridium thermocellum* [17].

Методы: Подготовку эффективной суспензии агробактерий с агентами трансформации осуществляли следующим образом. Одну колонию агробактерий переносили в 3 мл среды LB и инкубировали 1-1,5 суток при 28°C на шейкере с частотой оборотов 250 обор./мин. Очистку агробактерий проводили осаждением на центрифуге при 4500g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 3 мл среды LB (LB – питательная среда для экспериментов по культуре тканей Luria-Bertini) без антибиотика, измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 600 нм.

Оптимизация стадии развития растения и цветка сои. Для оптимизации стадии развития растения и цветка сои проводили изучение биологии развития сои. Подбор цветка и нодии, определение времени суток для успешного внедрения агробактерий с генами интереса по пыльцевой трубке в зародышевый мешок и оплодотворения сои с участием целевого гена проводили на основе анализа особенностей роста пыльцевых трубок во времени.

Отработка техники нанесения агробактериальной суспензии с целевыми генами на рыльце пестика цветка сои предполагает подготовку цветка, определение количества наносимой суспензии и области ее нанесения в цветок вручную. Проведены эксперименты с удалением разных частей лепестков и рыльца цветка, наносимого количества суспензии, подбор инструментов и проверка обработанных суспензией цветков.

Молекулярно-биологическая детекция интеграции целевых генов в геном трансгенных линий сои в первом и втором поколениях (T_1 и T_2) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР проводили с целью идентификации интродуцированных генов *ppdk* и *desA12licBM3* в геноме сои. Рассчитывали праймеры к целевым генам: к гену *ppdk*, прямой – 5'-ACC TCC ATT CGC ACT GGA TGC TT-3', обратный – 5'-TTC GGT GAT GCA GAA CTC ACT GT-3', с экспрессирующей областью 645 нп, и для гена *desA12licBM3*, прямой – 5'-GGG ATC CCT GGA GTG TGG AA-3', обратный – 5'-TCC CAC TGA CTG GAG TCA AAG TTC-3', с экспрессирующей областью 690 нп, включающей область с 425 нп до 1115 нп.

Определяли программу для проведения ПЦР на амплификаторе Eppendorf MasterCycler, Germany, путем расчета T_m (температуры плавления ДНК прямого и обратного праймеров) для гена *PPDK*: 68°C для прямого и 68°C для обратного праймеров, для гена *desA12licBM3* – 64°C и 68°C для прямого и обратного праймеров соответственно.

Оптимизировали условия проведения реакции амплификации: температуру отжига, продолжительность синтеза ДНК, концентрацию растительной ДНК. В результате выбраны следующие условия амплификации, пригодные также для проведения мультиплексного ПЦР, при выравнивании всех праймеров по температуре отжига: 94°C – 2 мин., 94°C – 30 сек., 62°C – 30 сек., 72°C – 1 мин., 35 циклов, 72°C – 5 мин., сохранение продукта при -4°C. Проводили анализ продуктов ПЦР методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с применением маркера молекулярных масс 1 kb или 100 bp (Fermentas).

Анализ структуры урожая трансгенных растений в сравнении с исходными формами проводили по элементам: высота растения, см; высота прикрепления нижнего боба, см; количество продуктивных узлов, шт.; количество бобов с 1 растения, шт.; количество семян с 1 растения, шт.; масса семян с 1 растений, г; масса 1000 семян, г.

Устойчивость трансгенных растений сои к абиотическим стрессам. В условиях абиотических стрессов физиолого-биохимические реакции растения тестировали по следующим параметрам: определение относительного содержания воды в листьях; суммарное содержание хлорофилла, содержание пролина; активность фермента-антиоксиданта супероксид дисмутазы (СОД). Использование этих параметров в качестве индексов устойчивости к абиотическим стрессам позволяет раскрыть потенциальные адаптационные механизмы засухоустойчивости трансгенных растений. Параметры определяли по общепринятым методам [18], [19], [20], [21].

Результаты и обсуждение

Для получения трансгенной сои, устойчивой к абиотическим факторам, была разработана эффективная технология генетической трансформации сои посредством пипетирования рыльца пестика цветков агробактериальной суспензией с целевыми генами с использованием *germ-line* элементов – естественных пыльцевых трубок, прорастающих сразу после опыления и используемых в качестве вектора доставки рекомбинантной ДНК для интеграции в только что оплодотворенные, но еще не делящиеся клетки зиготы.

Разработка способа *germ-line* генетической агробактериальной трансформации сои включает следующие основные этапы: 1) разработку генетических конструкций целевых генов; 2) подготовку эффективной суспензии агробактерий с агентами трансформации; 3) оптимизацию стадии развития растения и цветка сои, подбор цветка и нодии, определение времени суток для успешного внедрения агробактерий с целевыми генами по пыльцевой трубке в зародышевый

мешок и оплодотворения сои с участием целевого гена; 4) отработку техники нанесения агробактериальной суспензии с геном интереса на цветок; 5) молекулярно-биологическую детекцию интродукции трансгенов в геном сои в первом и втором поколениях; 6) определение продуктивности трансгенов и устойчивости к стрессовым факторам.

Функции ключевых хозяйственно-ценных генов *ppdk* и *desA12licBM₃*. В статье приведены данные о создании и интродукции в сою ключевых генов устойчивости растений к абиотическим стрессам – *ppdk* и *desA12licBM₃*. Один из ключевых генов C_4 метаболизма растений при фотосинтезе – ген *ppdk* (пируват ортофосфат дикиназа), способствует высвобождению субстрата ФЕП (фосфоенол пирувата) и участвует в фосфорном обмене, высвобождая АТФ (аденозинтрифосфат – энергетическую монету клетки) и Pi (неорганический фосфат). Гены, контролирующие C_4 ферменты, участвуют в основных энергетических и восстановительных процессах в растениях и действуют подобно транскрипционным факторам, сообщая растениям способность устойчивости к различным стрессам среды обитания и повышая их фотосинтетическую способность и урожай. Интродукция ключевого C_4 гена – *ppdk*, в C_3 растения, к которым относится соя, обуславливает повышение ее урожайности и устойчивости к абиотическим стрессам, в частности, к стрессу засухи и действию высоких температур [22].

Способность растительных клеток к адаптации в условиях стресса связывают с их способностью изменения текучести мембран посредством изменения количества ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидах. Знания биохимии и молекулярной биологии десатураз жирных кислот позволяет создание генов для интродукции в сельскохозяйственные растения, способствующих их устойчивости к абиотическим факторам. Ген *desA12licBM₃* сообщает растениям устойчивость к низким температурам и засолению [17].

Подготовка эффективной суспензии агробактерий. В ходе исследований установлено, что оптимальная плотность агробактерий для трансформации сои пипетированием составляет $6-8 \cdot 10^9$ клеток/мл, что соответствует оптической плотности суспензии агробактерий 0,6-0,8 на спектрофотометре при оптической плотности 600 нм. К 1,5 мл суспензии агробактерий с целевым геном добавляют 1,5 мкл 1% плурониковой кислоты в качестве агента трансформации для повышения агрессивности *Vig*-зоны T-плазмид. Известно, что двудольные культуры, к которым относится соя, вырабатывают ацетосирингон в клетках. Поэтому проводят часть опытов в отсутствие агентов трансформации.

Оптимизация стадии развития растения и цветка сои. Показано, что развитие цветка и завязи включает восемь фаз, подготовка к опылению проходит в течение первой и второй фаз, а созревание тычинок, высыпание пыльцы на клейкое рыльце и оплодотворение – в третьей и четвертой фазах, когда лепестки венчика еще плотно сомкнуты. Пыльники лопаются и пыльца, попадая на рыльце, начинает формировать пыльцевую трубку (рис. 1).



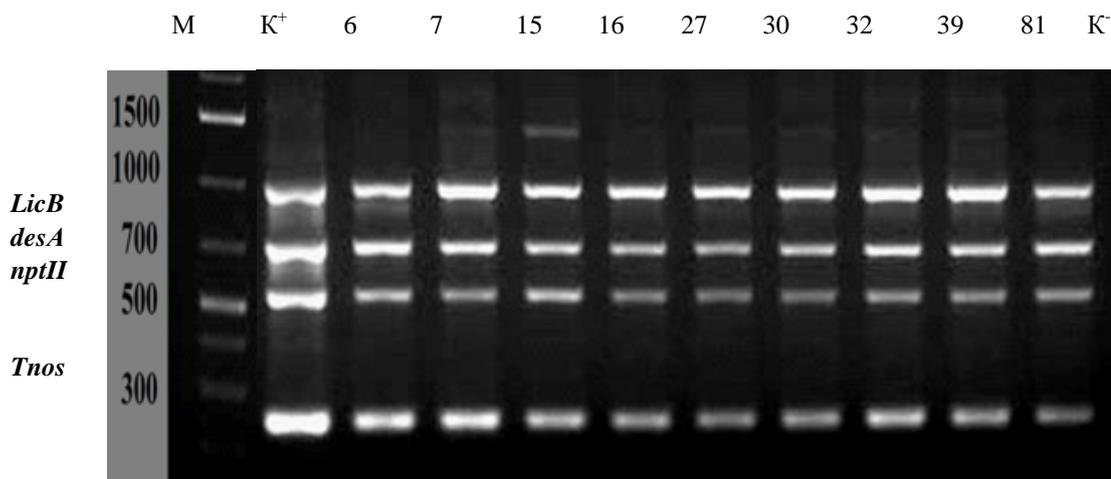
а - выбор цветка; б - открытый цветок; в - структура и генеративный аппарат цветка; г - генеративный аппарат цветка с завязью, увеличение 8

Таблица 1 - Эффективность трансформации сои T₁, полученной новым способом germ-line генетической трансформации, в результате скрининга на антибиотики и ПЦР-анализа

Трансгены сои с интродуцированными генами	Скрининг на антибиотик канамицин, 160 мг/л			ПЦР-анализ			
	исходное количество семян, T ₀ , шт.	количество выживших растений, T ₁ , шт.	эффективность трансформации, %	исходное количество растений, T ₁ , шт.	количество растений сои T ₁ со вставкой интродуцированных генов в геном, шт.	эффективность трансформации, % от числа выживших растений после скрининга	эффективность трансформации, % от исходного количества семян
<i>ppdk</i>	1101	87	7,9	87	19	21,8	1,73
<i>desA12licBM₃</i>	1536	169	11,0	169	29	17,2	1,89

Результаты ПЦР анализа трансгенных растений сои первого поколения T₁ подтвердили наличие бендов, соответствующих молекулярной массе 645 нп (ген *ppdk*) и 692 нп (ген *desA12licBM₃*). В первом поколении трансгенов сои T₁ методом ПЦР подтверждена интродукция гена *ppdk* в геном 19 трансгенных растений из 87; и гена *desA12licBM₃* - в геном 29 из 169 трансгенных растений сои, предварительно прошедших скрининг на антибиотик канамицин. Эффективность трансформации по результатам ПЦР-анализа составила 21,8 и 17,2% соответственно от числа выживших после скрининга на антибиотики растений и 1,73 и 1,89% соответственно от общего числа семян, полученных методом агробактериального пипетирования сои с использованием естественных пыльцевых трубок (таблица 1, рисунок 3).

ПЦР-анализом подтверждена вставка интродуцированных генов в геном трансгенных растений сои второго поколения T₂ с эффективностью трансформации 3% в среднем (данные не показаны). Наличие вставки интродуцированных генов в геном сои во втором поколении подтверждает стабильную генетическую трансформацию сои.



Слева: *LicB* – последовательность репортерного гена, который кодирует термостабильную β-1,3-1,4 - глюконазу (лихеназу) из *Clostridium thermocellum*; *desA* – целевой ген *desA* *Synechocystis* sp. PCC 6803; *nptII* - маркерный ген, кодирующий неомицинтрансферазу II, которая обеспечивает устойчивость растений к селективному агенту антибиотику канамицин; *Tnos* – pos-терминатор генетической конструкции целевого гена.

Слева направо: М – маркер Gene ruler 1000 bp DNA Ladder, Fermentas; K⁺ - положительный контроль; 6 – 81 – трансгенные растения сои сортов Гибридная 670 (6, 7), Эврика (15, 16), Казахстанская 2309 (27), Надежда (30,32), Вита (39), Нина (81); K⁻ - отрицательный контроль (бидистиллированная вода)

Рис. 3. Мультиплексная полимеразная цепная реакция трансгенов сои с основными структурными элементами гена *desA12licBM₃*

Продуктивность трансгенов. Для подтверждения эффективности генетической модификации трансгенной сои с генами *ppdk* и *desA12licBM₃* проводили анализ структуры урожая трансгенных линий, получивших молекулярно-биологическое подтверждение на встраивание данных генов в геном сои.

По всем элементам структуры урожая трансгенные растения превосходили контрольные образцы. Высота растения трансгенов по сравнению с контролем увеличивалась на 30-75%, по признаку «количеству бобов с растения» превышение трансгенов составляло 55-100%, по признаку «количество семян с одного растения» разница между контролем и трансгенами достигала 40-100%. Эффективность трансформации по признаку «масса семян с одного растения» у трансгенов разных сортов возрастала на 0,04-3,37 г, или на 14-248%, а масса 1000 семян увеличивалась на 1-59 г или на 0,7-43% по сравнению с нетрансформированным контролем. Достоверность различий трансгенных от контрольных растений по признаку «масса семян с 1 растения» была статистически доказана по t-критерию Стьюдента на уровне значимости 0,05 у 19 трансгенов первого поколения, подтвержденных ПЦР, с интродуцированным геном *ppdk*, производных сортов Радость, Вита, Надежда, Риза и Белгородская 6 и у 21 трансгена первого поколения с интродуцированным геном *desA12licBM₃*, подтвержденных ПЦР, производных сортов и форм Эврика, Гибридная 670, Тажан, Казахстанская 2309, Надежда, Вита и Нина.

Устойчивость трансгенных растений сои к абиотическим стрессам

Относительное содержание воды в листьях трансгенов было на 7-13% выше в условиях почвенной засухи по сравнению с поливом, в то время как у нетрансформированного контроля этот показатель был ниже на 8-19%.

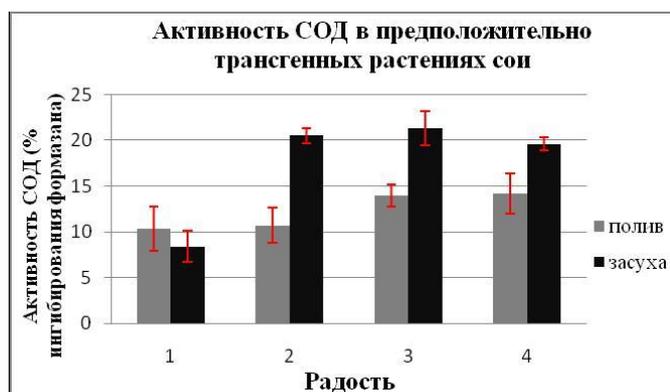
Суммарное содержание хлорофилла в расчете на 1 г сырой массы и соотношение хлорофиллов *a/b* у трансгенов было выше и составляло 2,27–2,68, у контролей отношение хлорофиллов *a/b* было несколько ниже (1,95–2,42).

Содержание пролина в листьях трансгенов сои под действием стресса засухи по сравнению с контролем повышалось на 11-39%. В благоприятных условиях полива содержание пролина как у контроля, так и у трансгенов составляло 0,17-0,18 мг/г сырой массы.

В условиях абиотических стрессов холода и почвенной засухи показана значительная активизация основного фермента антиоксидантной защиты – СОД у трансгенов. Активность СОД у контроля сои сорта Нина в целом понижалась в условиях холода в сравнении с благоприятными условиями до 30-70%. У 5 трансгенов с геном *desA12licBM₃* активность СОД снижалась в меньшей степени в условиях действия низких положительных температур, а у 4-го трансгена даже увеличивалась. В условиях холода у 4-х трансгенов из 6 наблюдали большую активность СОД. У трансгенов это преимущество было выражено в большей степени – на 40–200%, в сравнении с 25% у контроля.

Активность СОД у контроля сои сорта Гибридная 670 практически не повышалась в условиях почвенной засухи. Трансгены данного сорта со встроенным геном *desA12licBM₃* в геном характеризовались значительным повышением активности СОД в условиях почвенной засухи, чем в условиях полива – на 85–110%. В условиях стресса трансгены превосходили контроль по активности СОД на 15–30%, в то время как на поливе уступали контролю на 65%.

Активность СОД у контроля сои сорта Радость повышалась в условиях почвенной засухи до 40%. У трансгенных растений сои сорта Радость с геном *ppdk* активность СОД в условиях засухи возрастала на 250-275% и превосходила активность СОД контроля на 135-190% у разных трансгенных форм. При этом в условиях полива активность трансгенов уступала контролю на 20% (рис. 4).



Ось абсцисс: 1 – контроль сорт Радость, 2-4 – трансгенные растения сои сорта Радость с интродуцированным геном *ppdk*; ось ординат: активность СОД в % ингибирования формазана

Рис. 4. Активность супероксид дисмутазы у трансгенов сои с геном *ppdk* в условиях стресса засухи

Таким образом, способ генетической трансформации сои с использованием естественных пыльцевых трубок обеспечивает трансфер (доставку) ДНК целевых генов с *Agrobacterium t.* путем подрезания рыльца пестика с последующим естественным опылением. Трансформированные семена получают непосредственно без предварительной подготовки клеточной культуры и регенерации растения (рис. 5).

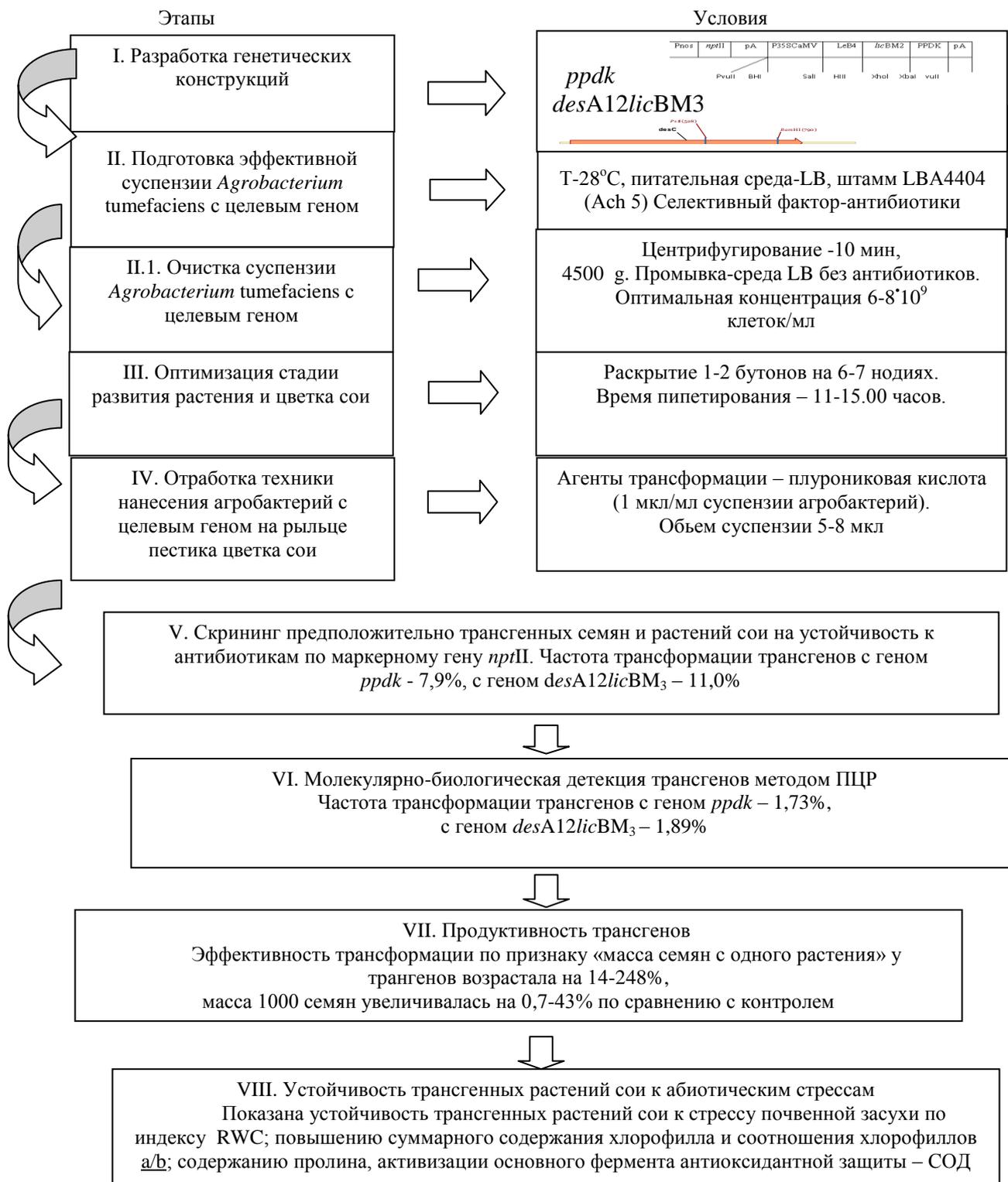


Рис. 5. Схема агробактериальной *germ-line* генетической трансформации сои

Механизм данного способа основан на использовании естественного процесса прорастания пыльцевых трубок, которые формируются после оплодотворения яйцеклетки для проникновения спермия к зародышевому мешку, для транспорта хозяйственно-ценного генетического материала при трансформации. По пыльцевой трубке целевая ДНК достигает зиготы. Интересующий нас ген встраивается в геном культурного сорта растения. ДНК достигает яйцеклетку через прорастающие пыльцевые трубки сразу же после опыления, и затем интегрируется в только что оплодотворенные, но еще не делящиеся клетки зиготы [22], [23], [24].

Выводы

Разработан генотип независимый, экономичный, быстрый, близкий к естественному половому размножению, относительно эффективный способ генетической *germ-line* трансформации сои.

Создана генетическая конструкция целевого гена *ppdk*, кодирующего пируват-ортофосфат дикаиназу - фермент C_4 метаболизма из кукурузы, способствующий повышению урожайности и устойчивости к засухе, а также использован ген *desA12licBM₃* из *Synechocystis* sp. PCC 6803 (с репортером *licBM₃*, кодирующим термостабильную β -1,3-1,4 - глюканазу (лихеназу) *Clostridium thermocellum*), регулирующий степень ненасыщенности жирных кислот в растении, и, тем самым, устойчивость к действию низких положительных температур.

Получено около 5000 семян трансгенных растений сои со вставкой в геном и экспрессией генов *ppdk* и *desA12licBM₃*.

Проведен скрининг предположительно трансгенных семян сои, несущих гены *ppdk* и *desA12licBM₃*, по маркерному гену *nptII*, кодирующему устойчивость к канамицину с эффективностью трансформации у трансгенов с геном *ppdk* – 7,9%, с геном *desA12licBM₃* – 11,0%. Разработаны праймеры, программа ПЦР для целевых генов и их структурных элементов.

Результаты ПЦР-анализа трансгенных растений сои первого поколения T_1 подтвердили наличие бендов, соответствующих молекулярной массе 645 нп (ген *ppdk*) и 692 нп (ген *desA12licBM₃*) с эффективностью трансформации 21,8% и 17,2% соответственно, или 1,73 и 1,89% от числа изначально скринированных семян. Подтверждена стабильная трансформация сои во втором поколении, T_2 .

Доказано, что масса семян с одного растения у трансгенов сои разных сортов в T_1 достоверно возросла на 14-148%, а масса 1000 семян увеличивалась на 0,7-43% по сравнению с нетрансформированным контролем. Отмечено повышение относительного содержания воды на 7-13%, содержания пролина на 11-39%, увеличение активности основного фермента антиоксидантной защиты – супероксид дисмутазы (СОД) на 85-110% в листьях трансгенов сои T_1 в условиях почвенной засухи. Отмечена тенденция к увеличению активности фермента СОД на 40-200%, в листьях трансгенов в сравнении с контролем в условиях холодового стресса.

Таким образом, разработан способ генетической трансформации сои и получена трансгенная соя, устойчивая к абиотическим факторам. Значимость применения данного способа заключается в развитии нового направления в биотехнологии и генетической инженерии – разработке агробактериальной *germ-line* (с использованием герм – элементов: пыльцы, яйцеклетки, незрелых и зрелых зародышей, меристем, семян) генетической трансформации сои.

Предлагаемый способ – оригинальный, осуществляется путем агробактериального пипетирования цветков сои после оплодотворения с использованием естественных пыльцевых трубок. Способ исключает дорогостоящие, малоэффективные и длительные этапы культуры тканей и регенерации растений, генотип независим, сходен с естественным для растения половым оплодотворением, быстр, экономичен и сравнительно эффективен (эффективность трансформации = 3% во втором поколении T_2).

Данный способ может превратить генетическую трансформацию сои в рутинный процесс, успешно используемый селекционерами и исследователями для повышения урожайности, устойчивости к болезням и абиотическим стрессам данной культуры.

НИР профинансированы и выполнены по проекту 02.02.01.P2: «Получение трансгенной сои, устойчивой к абиотическим факторам» в рамках НТП О.0489 «Научно-техническое обеспечение государственного регулирования оборота генетически модифицированных объектов в Республике Казахстан на 2009-2011 годы».

Генетическая конструкция гена *perc* из кукурузы была любезно предоставлена для совместных и самостоятельных экспериментов проф. М. Ку, WSU, USA. Выражаю глубокую благодарность сотрудникам Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Россия, во главе с д.б.н. проф. Голденковой-Павловой И.В. за предоставление генетической конструкции *desA12licBM₃* для исследований по генетической трансформации сои, а также за помощь в разработке гена *ppdk*. Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории генетической инженерии ИБР КН МОН РК, принявшим участие в обеспечении растительным материалом, проведении экспериментов и публикации патента «Способ *germ-line* генетической трансформации сои».

Литература

1. McCabe D.E., Swain W.F., Martinelli B.J., Christou P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration // *Biotechnology*. - 1988. – Vol. 6. - P. 923–926.
2. Martinell B.J., Julson L.S., Emler C.A., Yong H., McCabe D.E., Williams E.J. Soybean *Agrobacterium* transformation method, 2002. U.S. Patent №6384301.
3. Yan B., Srinivasa Reddy M.S., Collins G.B., Dinkins R.D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants // *Plant Cell Report*, 2000. – Vol. 19. - P. 1090–1097.
4. Zhang Z., Xing A., Staswick P., Clemente T. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean // *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 1999. – Vol. 56. - P. 37–46.
5. Paz M.M., Martinez J.C., Kalvig A.B., Fonger T.M., Wang K. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium* mediated soybean genetic transformation // *Plant Cell Report*. - 2005. - P. 206-213.
6. Wang A., Fan H., Singsit C., Ozias-Akins P. Transformation of peanut with a soybean vspB promoter-uidA chimeric gene: I. Optimization of a transformation system and analysis of *GUS* expression in primary transgenic tissues and plants // *Physiol. Plant*. -1998. – Vol. 102. - P. 38–48.
7. Shou H., Palmer R.G. and Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure, 2011. Web site.
8. Zhou G., Weng J., Gong Z., Yang W., Shen W., Wang Z., Tao Q., Huang J., Qian S., Liu G., Ying M., Xue D., Hong A., Xu Y., Chen B., Duan X. Molecular breeding of agriculture: a technique for introducing exogenous DNA into plants after self-pollination // *Scientia Agricultura Sinica*, 1988. – Vol. 21. - P. 1-6.
9. Hui L., Tian-long W. Transforming *agrobacterium* into soybean by means of pollen tube pathway induced by CaCl₂ Agriculture & Biology College, Shanghai Jiaotong University. Shanghai, 2011. Web site.
10. Olhoft P.M., Fligel L.E., Donovan C.M., Somers D.A. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*. - 2003. - P. 35-43.
11. Trick H.N., Dinkins R.D., Santarem E.R., Di R., Samoylov V., Meurer C., Walker D., Parrott W.A., Finer J.J., Collins G.B. Recent advances in soybean transformation // *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* - 1997. - Vol. 3. - P. 9–26.
12. Liu J., Su Q., An L. and Yang A. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free smGFP cassette into soybean via ovary-drip transformation // *Biotechnol. Lett.* - 2009. – Vol. 31(2). - P. 295-303.
13. Martinell B.J., Julson L.S., Emler C.A., Huang Y., McCabe D.E., Williams E.J. Soybean transformation method, 2009. Patent USA №20090077694.
14. 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.
15. Li Z., Nelson R., Widholm J., Bent A. Soybean transformation via the pollen tube pathway. University of Illinois, Urbana. et al., 2009. Web site.
16. McWilliams D.A., Berglund D.R., Endres G.J. Soybean Growth and Management. Quick Guide: North Dakota State University and University of Minnesota, 2004. Web site.
17. Голденкова-Павлова И.В., Мирахорли Н., Мали А.П., Исаенко Е., Картель Н.А., Лурьева Н.О., Абдеева И.А. Экспериментальные методы для создания трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам // *Цитология и генетика*. - 2007. - Т. 41, №3. - С. 44-49.
18. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant response to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. - 2003. - Vol. 218. - P. 1-14.
19. Bates L.S., Waldern R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies // *Plant Biol.* - 1973. - P. 205-207.
20. “SOD assay Kit” (Sigma) для определения активности супероксид дисмутаза, 2011. Web site: Superoxide Dismutase Kit - BioVision.com
21. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutases occurrence in higher plants // *Plant Physiol.* - 1977. – Vol. 59. - P. 309-314.
22. Kershanskaya O.I., Teixeira da Silva J.A. Photosynthetic Basis for Wheat Crop Improvement: Genetic Modification of Photosynthesis. *Global science book, AAJPSB*, 2010. – №4 (SI 1). – P. 27-34.
23. Кершанская О.И., Дидоренко С.В., Есенбаева Г.Л. Способ germ-line генетической трансформации сои. Инновационный патент РК, 2012. - №25950.
24. Кершанская О.И. Генетическая инженерия растений. Практический подход. - Алматы, 2007. – 152 с.

Түйін

Өсімдіктердің абиотикалық стрестерге төзімділігінің молекулярлық механизмін қадағалау *C₄-pepc*, *C₄-ppdk* genes, *desA12licBM₃*, *FeSOD* спецификалық гендерінің белсенділігі мен реттелуіне негізделеді. Бұл гендер өсімдіктердің стрестерге, оның ішінде құрғақшылыққа, жоғары тұздылық пен температураға (жүгеріден алынған *pepc*, *ppdk* гендері); төмен температураға (*Synechocystis* sp. PCC 6803-тен алынған *desA12licBM₃*) және тотығу стрессіне (*Arabidopsis thaliana*-ден алынған *FeSOD*) жауап береді. Май бұршағының 5 Американдық және Қазастанда аудандастырылған 25 қазақстандық және шетелдік сорттарына, аталған гендер өзіміз құрастырған және патенттелген *Agrobacterium* germ-line пипеттеу әдісін пайдалана отырып интродуцирленді, молекулярлы растанды және алынған трансгендердің стрестерге төзімділігінің физиолого-биохимических ерекшеліктері зерттелді. Аталған гендердің интродукциясы және экспрессиясының жоғары деңгейі, трансгендердің 1-2 ұрпағында ПЦР-анализін пайдалану арқылы расталды, өнімділігі, пролин мөлшері артты, өсімдіктердің абиотикалық стрестерге төзімділігін реттейтін супероксид дисмутаза ферменттері белсенділенді. Өсімдіктердің абиотикалық стрестерге төзімділігін арттырудың генетикалық инженериясын пайдалану арқылы ауыл шаруашылық дақылдарын жақсату, азық түлік қауіпсіздікті қамтамасыз ету үшін қажет.

Кілтті сөздер: *ppdk* және *desA12licBM₃* гендері, germ-line генетикалық трансформация әдісі, абиотикалық стрестер, май бұршағы

Summary

Molecular control mechanisms for abiotic stress tolerance are based on the activation and regulation of specific stress-related genes such as *C₄-pepc*, *C₄-ppdk* from maize (high temperature, drought), *desA12licBM₃* from *Synechocystis* sp. PCC 6803 (low temperature), *FeSOD* from *Arabidopsis thaliana* (oxidative stress). Genetic construct of the target *ppdk* gene has been created and *desA12licBM₃* gene has been used.

Existing methods for genetic transformation of soybean have some significantly disadvantages: they genotype dependent, include the stages of cell culture in vitro and plant regeneration, apply only 1-2 genetic structures of target and reporter genes, produce weak chimeric plants with low efficiency of transformation; the creation of transgenes is 320-380 days. Our developed method of soybean germ-line genetic transformation by using germinating pollen tubes prevents chimeric plants creation, genotype independent, economical, effective, and closed to the natural sexual reproduction.

Using plant material: 5 of USA commercial and 25 Kazakhstan and foreign soybean varieties, we have introduced these genes into soybean by own elaborated and patented germ-line *Agrobacterium* pipetting technique, followed by molecular confirmation and analysis of physiology-biochemical consequences for stress resistance determination.

About 5000 of transgenic soybean seeds with insertion into genome and high expression level of *ppdk* and *desA12licBM₃* genes have been produced. PCR analysis of transgenic soybean plants of first generation T₁ confirmed the band, corresponding to a molecular weight of 645 bp (gene *ppdk*) and 692 bp (gene *desA12licBM₃*) with the efficiency of transformation 1,73 and 1,89% of initially screened seeds. Stable transformation of soybean in the second generation T₂ has been confirmed. High level of expression of introduced genes in transgenic soybean was determined by increasing of yield up to 148%, leaf water content on 7-13%, leaf proline content on 11-39%, superoxide dismutase enzymes activity on 85-110% in soil drought and up to 40-200% in cold (low temperature 2–4°C). Radical improvement in crop productivity, such as genetic engineering of plant abiotic stress resistance is necessary to ensure continued food security.

Keywords: *ppdk* and *desA12licBM₃* genes, method germ-line genetic transformation, abiotic stresses, soybean