

# УЛУЧШЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЗЕРНОВОГО СОРГО НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ СОВРЕМЕННОЙ ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Эльконин Л.А.<sup>1\*</sup>, Панин В.М.<sup>1</sup>, Кенжегулов О.А.<sup>1</sup>,  
Герашенков Г.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока,  
410010 Россия, г. Саратов, ул. Тулайкова, д. 7;  
✉ \*elkonin@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биохимии и генетики,  
Уфимский федеральный исследовательский центр РАН,  
450054 Россия, г. Уфа, просп. 60-летия Октября, д. 71;

Представлен обзор работ по использованию методов генетической инженерии и геномного редактирования для улучшения питательной ценности зерна сорго. За последние 5-7 лет в результате экспериментов, выполненных несколькими группами исследователей, созданы трансгенные линии, несущие генетические конструкции для РНК-сайленсинга разных подклассов кафринов (проламинов зерна сорго). В экспериментах по геномному редактированию с использованием системы CRISPR/Cas9 получены мутанты с делециями и инсерциями в сигнальной последовательности гена, кодирующего 22 кДа  $\alpha$ -кафрин сорго. Такие линии и мутанты характеризуются улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, измененной ультраструктурой белковых телец и повышенным содержанием лизина. РНК-сайленсинг  $\alpha$ -кафрина повышал перевариваемость белков сырой муки, а также муки, подвергшейся кипячению, тогда как сайленсинг  $\gamma$ -кафрина приводил к улучшению перевариваемости белков только сырой муки. Зерновки линий с сайленсингом  $\alpha$ -кафрина имеют мучнистый тип эндосперма, что снижает их ценность для прямого коммерческого использования поскольку рыхлый мучнистый эндосперм уменьшает механическую прочность зерновок и способствует их контаминации микрофлорой; однако эти линии могут быть использованы в качестве доноров высокой перевариваемости запасных белков при скрещивании с линиями сорго, адаптированными к местным условиям, для улучшения их питательной ценности. Зерновки линий с сайленсингом  $\gamma$ -кафрина характеризуются разными типами эндосперма: мучнистым, стекловидным или модифицированным типом с вкраплениями стекловидного эндосперма в мучнистый. Этот факт указывает на возможность получения агрономически-ценных линий сорго с высокой перевариваемостью кафринов и твердым эндоспермом. Повышенное содержание лизина в зерновках линий сорго с подавленным синтезом кафринов может быть связано с балансировкой уровня белка в эндосперме за счет синтеза других белков, в том числе, с более высоким содержанием незаменимых аминокислот. Наряду с улучшением перевариваемости кафринов, генно-инженерный подход позволил создать линии сорго с увеличенным содержанием в зерне провитамина А и его повышенной стабильностью при хранении. Результаты работ свидетельствуют о перспективности использования методов РНК-интерференции и геномного редактирования для создания линий сорго с улучшенной питательной ценностью зерна.

**Ключевые слова:** кафрины, РНК-сайленсинг, геномное редактирование, перевариваемость белка *in vitro*, эндосперм, *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

**Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of the financial activities** Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

**Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work**

**Дополнительная информация / Additional information**

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2019-3-06>

**Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer. Все авторы одобрили рукопись. / All authors approved the manuscript. Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest**

## IMPROVEMENT OF GRAIN SORGHUM NUTRITIVE PROPERTIES USING MODERN GENETIC AND BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Elkonin L.A.<sup>1\*</sup>, Panin V.M.<sup>1</sup>, Kenzhegulov O.A.<sup>1</sup>,  
Gerashchenkov G.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Agricultural Research Institute of South-East Region,  
7, Tulaiakov St., Saratov, 410010, Russia,  
✉ \*elkonin@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Genetics,  
Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
71, October 60th Anniversary Ave., Ufa, 450054, Russia

The paper presents a review of the studies on the use of genetic engineering and genome editing tools for improving nutritional properties of sorghum grain. As a result of experiments performed over the past 5-7 years by several research groups, the created transgenic lines carry genetic constructs for RNA silencing of different kafirin sub-classes (prolamins of sorghum grain). The CRISPR/Cas9 genome editing experiments have yielded mutants with deletions and insertions in the signal sequence of the gene encoding the 22 kDa  $\alpha$ -kafirin in sorghum. These lines and mutants were characterized by improved *in vitro* digestibility of grain proteins, altered ultrastructure of protein bodies and an increased content of lysine. RNA silencing of  $\alpha$ -kafirin increased the digestibility of proteins of both raw and cooked flour, while silencing of  $\gamma$ -kafirin led to improved digestibility of proteins of only raw flour. The lines with  $\alpha$ -kafirin silencing have kernels with the floury endosperm type that discourages their direct commercial use because of fragility and reduced tolerance to fungal contamination; however, these lines can be used as donors of high digestibility trait when crossed with sorghum lines adapted to local conditions to improve their nutritional value. Kernels of the lines with  $\gamma$ -kafirin silencing may have different endosperm types: floury, vitreous, or a modified type with vitreous endosperm interspersed in the floury endosperm. This fact indicates the possibility of producing agronomically important sorghum lines with high kafirin digestibility and hard endosperm. The increased lysine level in kernels of sorghum lines with the suppressed synthesis of kafirins may be caused by rebalancing of protein synthesis in endosperm of developing kernels due to the synthesis of other proteins, including those with a higher content of essential amino acids. Alongside with improving the digestibility of kafirins, the genetic engineering approach allowed the creation of sorghum lines with a high content of provitamin A in grain and its increased stability during long-term storage. The results of these works show that it is promising to use RNA-interference and genome editing for creating sorghum lines with improved nutritional value of grain.

**Key words:** kafirins, RNA silencing, genome editing, *in vitro* protein digestibility, endosperm, *Sorghum bicolor* (L.) Moench.

**Для цитирования:** Эльконин Л.А., Панин В.М., Кенжегулов О.А., Герашенков Г.А. Улучшение питательных свойств зернового сорго на основе методов современной генетики и биотехнологии. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(3):41-48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-06

**For citation:** Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Gerashchenkov G.A. Improvement of grain sorghum nutritive properties using modern genetic and biotechnological methods. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(3):41-48. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-06

**ORCID:**

Elkonin L.A. <https://orcid.org/0000-0003-3806-5697>

**УДК** 581.169(063):633.174

**Поступила в редакцию:** 18.11.2019

**Принята к публикации:** 29.12.2019

## Введение

Улучшение питательной ценности зерна – одно из наиболее актуальных направлений селекции злаков. Эта задача особенно важна для сорго – высокоурожайной жаростойкой и засухоустойчивой культуры, зерно которой обладает значительным содержанием белка (в среднем, 10-12%, а у некоторых линий до 15%) и крахмала (в среднем, 70-72%, а у некоторых линий до 78%) (Bean et al., 2018). Сорго входит в число пяти наиболее широко возделываемых злаковых культур мирового сельскохозяйственного производства и является источником питания для сотен миллионов людей во многих странах мира (Mudge et al., 2016). В связи с глобальным потеплением климата и связанной с ним устойчивой тенденцией к увеличению среднегодовой температуры Земли на протяжении последних 150 лет (Hansen et al., 2006), значение этой культуры будет неуклонно возрастать. Кроме того, благодаря отсутствию в составе запасных белков сорго глютеинов, его зерно может использоваться для приготовления продуктов питания для людей, больных целиакией (непереносимостью глютенa) и вынужденных соблюдать безглютеновую диету.

Однако большинство существующих сортов и гибридов сорго характеризуются более низкой питательной ценностью по сравнению с другими зерновыми культурами. Так, перевариваемость белков зерна сорго в желудке у крупного рогатого скота составляет 63-65%, тогда как у кукурузы этот показатель достигает 76%, а у ячменя и пшеницы – 95-98% (Godwin et al., 2009). В основе низкой питательной ценности сорго лежит устойчивость запасных белков зерна (кафиринов) к действию протеаз, а также низкая питательная ценность самих кафиринов, содержащих незначительное количество незаменимых аминокислот (Oria et al., 1995; Henley et al., 2010; Bean et al., 2018). Такая устойчивость кафиринов к протеолитическому расщеплению не только снижает их усвояемость животными и человеком, но и уменьшает перевариваемость крахмала зерна и муки сорго, поскольку непереваренные кафирины препятствуют полноценному амилолитическому расщеплению крахмальных гранул (Zhang, Namaker, 1998; Ezeogu et al., 2005; Wong et al., 2009).

Устойчивость кафиринов к протеолитическому расщеплению имеет многофакторную природу. В ее основе лежит (1) аминокислотный состав кафиринов, богатых серосодержащими аминокислотами, способными образовывать внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи, «цементирующие» молекулы белков; (2) взаимодействие кафиринов с некафириновыми белками и небелковыми компонентами, в частности, с танинами, снижающими активность протеаз, и полисахаридами, входящими в состав крахмальных гранул клеток эндосперма; (3) пространственная организация различных кафиринов в белковых телах клеток эндосперма; (4) способность  $\gamma$ -кафирина к формированию олиго- и полимеров с высокой

молекулярной массой, устойчивых к расщеплению протеазами (Belton et al., 2006; De Mesa-Stonestreet et al., 2010).

Как известно, у злаков запасные белки, накапливающиеся в клетках эндосперма в процессе созревания зерновок, депонируются в специальных структурах – белковых тельцах, формирующихся из мембран эндоплазматического ретикулюма (Shewry, 2007). У сорго процесс формирования белковых телец начинается с накопления в них проламинов:  $\gamma$ - и  $\beta$ -кафиринов (28 и 18 kDa, соответственно). В дальнейшем, запускается синтез  $\alpha$ -кафиринов (25 и 22 kDa), составляющих основную массу (до 80%) кафиринов. При этом происходит депонирование  $\alpha$ -кафиринов во внутренних слоях белковых телец, что отодвигает  $\gamma$ -кафирин в периферийную зону. Считается, что  $\gamma$ -кафирин, имеющий в своем составе значительную долю цистеина, образующего внутримолекулярные S-S связи, отличается наиболее высокой устойчивостью к протеолитическому расщеплению. Занимая периферийное положение в белковых тельцах клеток эндосперма,  $\gamma$ -кафирин блокирует доступ протеаз к  $\alpha$ -кафиринам, которые располагаются внутри белковых телец (Belton et al., 2006; De Mesa-Stonestreet et al., 2010; Bean et al., 2018).

Важным аргументом в пользу этой гипотезы стали данные, полученные при исследовании мутанта P721Q, индуцированного с помощью химического мутагенеза и характеризующегося повышенной перевариваемостью кафиринов (Mohan, 1975 цит. по Weaver et al., 1998). У этого мутанта белковые тельца клеток эндосперма имеют неправильную форму, отличаясь значительными впадинами и инвагинациями. При этом,  $\gamma$ -кафирин располагался только на дне таких впадин, не образуя непрерывного слоя, затрудняющего доступ протеаз к  $\alpha$ -кафиринам (Weaver et al., 1998; Oria et al., 2000). Данная мутация ведет к формированию зерновок с мучнистым типом эндосперма и повышенным содержанием лизина, в связи с чем для ее обозначения был введен символ *hdhl* (*high digestibility high lysine*). Последующие исследования, однако, позволили установить, что ген, кодирующий 22 кДа  $\alpha$ -кафирин, присутствует в геноме сорго в количестве 10 копий, которые образуют генный кластер в хромосоме 5. Было показано, что у мутанта P721Q в нуклеотидной последовательности одной из этих 10 копий имеется точковая мутация в сигнальной последовательности, ответственной за упаковку  $\alpha$ -кафирина внутри белкового тельца (Wu et al., 2013). Очевидно, что эта мутация изменяет ультраструктуру белковых телец, повышая их перевариваемость.

Решение проблемы улучшения перевариваемости запасных белков и питательной ценности зерна сорго возможно с помощью различных методов современной генетики и биотехнологии: экспериментальной индукции мутантов с нарушенным синтезом или измененным аминокислотным составом кафиринов (Mehlo et al., 2013); выявления существующих в природе аллельных вариантов кафиринов (Laidlaw et al., 2010; Cremer et al., 2014;

Chiquito-Almanza et al., 2016); введения генетических конструкций, вызывающих сайленсинг генов  $\gamma$ - и/или  $\alpha$ -кафиринов (Da Silva et al., 2011a; Kumar et al., 2012; Elkonin et al., 2016; Grootboom et al., 2014); редактирования нуклеотидных последовательностей генов  $\gamma$ - и/или  $\alpha$ -кафиринов с целью их нокаута (Li et al., 2018). Кроме того, улучшение питательной ценности может быть достигнуто путем введения генетических конструкций, кодирующих синтез белков с повышенным содержанием лизина или усиливающих синтез или нарушающих катаболизм аминокислот или витаминов. Данный обзор посвящен анализу работ, в которых на основе использования таких подходов были получены новые генотипы сорго с улучшенной питательной ценностью.

### Повышение перевариваемости кафиринов на основе технологии РНК-интерференции

Как известно, в основе технологии РНК-интерференции лежит взаимодействие коротких РНК, транскрибированных с введенных в геном генетических конструкций, и мРНК целевых генов, функционирование которых желательно подавить. Двухцепочные РНК, возникающие в результате такого взаимодействия, подвергаются ферментативному гидролизу, что ведет к разрушению мРНК целевого гена и, тем самым, к подавлению его экспрессии.

В последние годы технология РНК-интерференции интенсивно использовалась для подавления синтеза запасных белков у разных видов злаков (см. обзор: Elkonin et al., 2016a). Эти эксперименты способствовали получению новой информации о механизмах формирования белковых телец, а также роли различных классов проламинов и глютеинов в развитии эндосперма и их влиянии на технологические свойства муки и теста.

У сорго интенсивные исследования по индукции РНК-сайленсинга генов кафирина были предприняты несколькими исследовательскими группами (Da Silva et al., 2011; Kumar et al., 2012; Grootboom et al., 2014). Основной целью этих экспериментов было улучшение перевариваемости протеазами в результате подавления синтеза различных подклассов кафиринов. При этом, в зависимости от структуры генетической конструкции уровень перевариваемости кафиринов значительно различался (см. Таблицу). Так, генетические конструкции, созданные в процессе реализации проекта ABS (Africa Biofortified Sorghum) содержали инвертированные повторы нескольких генов кафиринов ( $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -), разделенных последовательностью интрона гена алкогольдегидрогеназы (*ADHI*) (DaSilva et al., 2011). мРНК, транскрибированная с такой конструкции, образует двухцепочную «шпильку» и подвергается распаду. Созданные конструкции управлялись промотором 19-kDa  $\alpha$ -зеина кукурузы. В другом исследовании (Kumar et al., 2012)

генетическая конструкция, использованная для индукции сайленсинга  $\gamma$ -кафирина, состояла из полной последовательности гена  $\gamma$ -кафирина под контролем собственного промотора. В качестве терминатора использовали последовательность гена рибозима вируса табачной мозаики, экспрессия которого должна была разрушать мРНК  $\gamma$ -кафирина. В другой конструкции для индукции сайленсинга  $\alpha$ -кафирина, использовали инвертированные повторы  $\alpha$ -кафирина, разделенные последовательностью интрона гена арабидопсиса, кодирующего белок сплайсосомы D1; эта конструкция управлялась промотором  $\alpha$ -кафирина (Kumar et al., 2012). Позже для получения трансгенных растений сорго с сайленсингом кафиринов была использована другая сложная конструкция, состоящая из инвертированных фрагментов генов  $\gamma$ 1-,  $\gamma$ 2- и  $\delta$ -кафиринов (Grootboom et al., 2014).

В экспериментах каждой из этих групп были получены линии трансгенного сорго с подавленным синтезом  $\gamma$ - и/или  $\alpha$ -кафиринов и эндоспермом мучнистого типа. К сожалению, наличие мучнистого эндосперма является существенным недостатком полученных линий, поскольку отсутствие стекловидного слоя увеличивает хрупкость зерновки и снижает ее устойчивость к поражению грибными заболеваниями.

В наших экспериментах для индукции сайленсинга гена  $\gamma$ -кафирина, была использована генетическая конструкция, управлявшаяся 35S-промотором, в которой инвертированные фрагменты  $\gamma$ -кафирина были разделены между собой интроном гена убиквитина кукурузы (*ubi1*) (Elkonin et al., 2016b). Использование такой конструкции позволило получить трансгенные растения, которые имели зерновки с разными типами эндосперма: наблюдался либо обычный эндосперм с толстым или тонким стекловидным слоем, мучнистый эндосперм или модифицированный тип эндосперма, в котором стекловидный слой развивался в виде секторов или пятен, окруженных мучнистым эндоспермом. Эти зерновки по текстуре эндосперма напоминали зерновки рекомбинантных линий сорго, полученных путем гибридизации мутанта *hdhl* с линиями сорго с обычным стекловидным типом эндоспермом (Tesso et al., 2006). Ранее трансгенные растения с вкраплениями стекловидного эндосперма, окруженными мучнистым эндоспермом, наблюдали также у трансгенной линии сорта Tx430, содержащей генетическую конструкцию для сайленсинга  $\alpha$ - и  $\gamma$ -кафиринов (DaSilva et al., 2011). В то же время, ко-супрессия подклассов  $\delta$ -кафирина и  $\gamma$ -кафиринов не изменяла фенотип эндосперма у этого сорта. По-видимому, образование разных типов эндосперма обусловлено особенностями экспрессии генетических конструкций в геноме реципиентной линии.

Наиболее важным следствием сайленсинга кафиринов у трансгенных растений сорго является повышенная перевариваемость кафиринов, которая наблюдалась при обработке муки пепсином. Так, трансгенные растения сорта Tx430, несущие генетическую конструк-

цию для сайленсинга  $\alpha$ - и  $\gamma$ -кафирина, характеризовались улучшенной перевариваемостью белков в системе *in vitro*, при этом уровень перевариваемости при обработке пепсином сырой муки и муки, подвергшейся процедуре варки, составлял, соответственно, 78% и 61%, тогда как в нетрансгенном контроле эти показатели варьировали в пределах 40-50% и 34-40% соответственно (DaSilva, 2012). Генетическая конструкция для сайленсинга  $\delta$ - и  $\gamma$ -кафиринов также вызывала улучшение перевариваемости сырой муки, но не влияла на перевариваемость муки, подвергшейся процедуре варки. В экспериментах Т. Кумара с соавт. (Kumar et al., 2012), мука из зерновок трансгенных растений, несущих генетическую конструкцию для подавления  $\gamma$ -кафирина, подвергшаяся процедуре варки, не отличалась от нетрансгенного контроля, тогда как подавление  $\alpha$ -кафирина улучшало перевариваемость такой муки.

Трансгенные растения, полученные в наших экспериментах с использованием генетической конструкции для сайленсинга  $\gamma$ -кафирина, также имели значительно улучшенную перевариваемость белков муки в системе *in vitro* (Elkonin et al., 2016b). Сравнение электрофоретических спектров до и после расщепления пепсином показало, что в трансгенном растении количество непереваренных мономеров  $\alpha$ -кафирина и общего непереваренного белка было значительно меньше (в 1,7-1,9 раза, согласно количественному анализу SDS-PAGE), чем у исходной нетрансгенной линии. Уровень перевариваемости достигал 85,4%, тогда как в исходной линии это значение составляло около 60%. Примечательно, что у зерновок трансгенного растения № 94-3-08 ( $T_2$ ) с толстым стекловидным эндоспермом различия в переваривании кафиринов были более выраженными: количество непереваренных мономеров было в 17,5 раз меньше, а количество общего непереваренного белка – в 4,7 раза меньше, чем в исходной линии, при этом уровень перевариваемости достигал 92%.

Растения из поколения  $T_3$  наследовали улучшенную перевариваемость кафиринов. У этих растений зерновки имели либо мучнистый, либо модифицированный тип эндосперма, либо эндосперм с хорошо выраженным стекловидным слоем. Уровень перевариваемости белков эндосперма у этих растений составлял 83-90%, значительно превышая аналогичный показатель у исходной нетрансгенной линии. По-видимому, снижение уровня  $\gamma$ -кафирина повышает перевариваемость  $\alpha$ -кафиринов. Это увеличение может быть связано с химическими причинами (снижение количества полимеров) и/или физическими причинами (изменение пространственного расположения  $\alpha$ -кафиринов в белковых телах, которые увеличивают их доступность для расщепления пепсином). Эффект повышенной перевариваемости кафиринов наблюдался также у растений из поколения  $T_4$ , однако в некоторых случаях он исчезал, возможно, из-за нестабильности введенной генетической конструкции, либо из-за ее сайленсинга (см. ниже).

## Балансировка протеома зерновки и улучшение ее питательной ценности

Важным следствием сайленсинга генов проламинов у злаков является усиление синтеза других белков, в том числе, с более высоким содержанием незаменимых аминокислот, лизина и треонина. Так, у растений трансгенной кукурузы с сайленсингом  $\alpha$ -зеинов наблюдалось удвоенное содержание незаменимых аминокислот триптофана и лизина (Huang et al., 2006). На рисе было показано, что сайленсинг генов 13 кДа-проламина увеличивает общее содержание лизина до 56% в результате компенсаторного повышения синтеза лизин-богатого глютелина, глобулинов и шаперонов (Kawakatsu et al., 2010). Значительное увеличение содержания лизина (до 3,3 г/100 г белка, по сравнению с 2,1 г/100 г белка в нетрансгенном контроле) было обнаружено у трансгенных растений сорго, несущих сложные генетические конструкции для РНК-сайленсинга  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -кафиринов и гена лизин-кетоглутарат-редуктазы, контролирующего катаболизм свободного лизина (DaSilva, 2012).

У полученных нами трансгенных растений, характеризующихся высокой перевариваемостью кафиринов в системе *in vitro*, общее содержание аминокислот в зерновках растений поколения  $T_2$  снизилось на 22,8-40,2% по сравнению с исходной, нетрансгенной линией (Elkonin et al., 2016b). В то же время, относительное содержание двух основных незаменимых аминокислот, лизина и треонина, значительно увеличилось. Доля лизина увеличилась в 1,6-1,7 раза: с 1,54% от общего содержания аминокислот в муке исходной нетрансгенной линии до 2,41-2,63% у трансгенных растений. Такое увеличение в сочетании со значительным снижением общего уровня аминокислот, по-видимому, было вызвано снижением содержания  $\alpha$ -кафиринов, бедных лизином и треонином, тогда как синтез других белков оказался не нарушен. Соответственно, относительные пропорции лизина и треонина увеличились. Возможно, подавление синтеза  $\gamma$ -кафирина препятствует накоплению  $\alpha$ -кафиринов, но не влияет на синтез других белков, более богатых лизином и треонином.

Восстановление белкового баланса эндосперма является частым явлением у трансгенных растений с генетическими конструкциями для РНК-сайленсинга запасных белков семян. Было высказано предположение, что кукуруза имеет компенсаторный механизм, который чувствителен к содержанию белка, при этом, нарушение синтеза зеина в развивающихся зерновках усиливает трансляцию других мРНК (Wu, Messing, 2014). Примечательно, что у трансгенных растений сои с подавленным синтезом основных запасных белков, в семенах сохранялся почти идентичный уровень общего белка, свойственный нетрансформированным сортам сои (Schmidt et al., 2011). Эти данные свидетельствуют о том, что восстановление баланса протеома может быть довольно распространенным явлением, обеспечивающим постоянный приток азота во время созревания семян.

## Нестабильность генетической конструкции для РНК-сайленсинга гена $\gamma$ -кафирина

В наших экспериментах мы обнаружили, что потомство трансгенных растений с высокой перевариваемостью белков эндосперма в системе *in vitro* иногда теряет этот признак. Даже разные метелки одного и того же растения имели разные значения перевариваемости. ПЦР-анализ растений поздних поколений ( $T_4$ ,  $T_5$ ) пока-

зал, что в ходе онтогенеза у некоторых растений происходит элиминация конструкции для РНК-сайленсинга. Тем не менее, у других растений из того же потомства конструкция была стабильной. Кроме того, у растений из поколений  $T_4$  была обнаружена элиминация *nos*-промотора, управляющего экспрессией маркерного гена *bar*, присутствовавшего в генетической конструкции для сайленсинга гена  $\gamma$ -кафирина (рисунок). Таким образом, эти растения фактически оказались функционально безмаркерными трансгенными растениями.

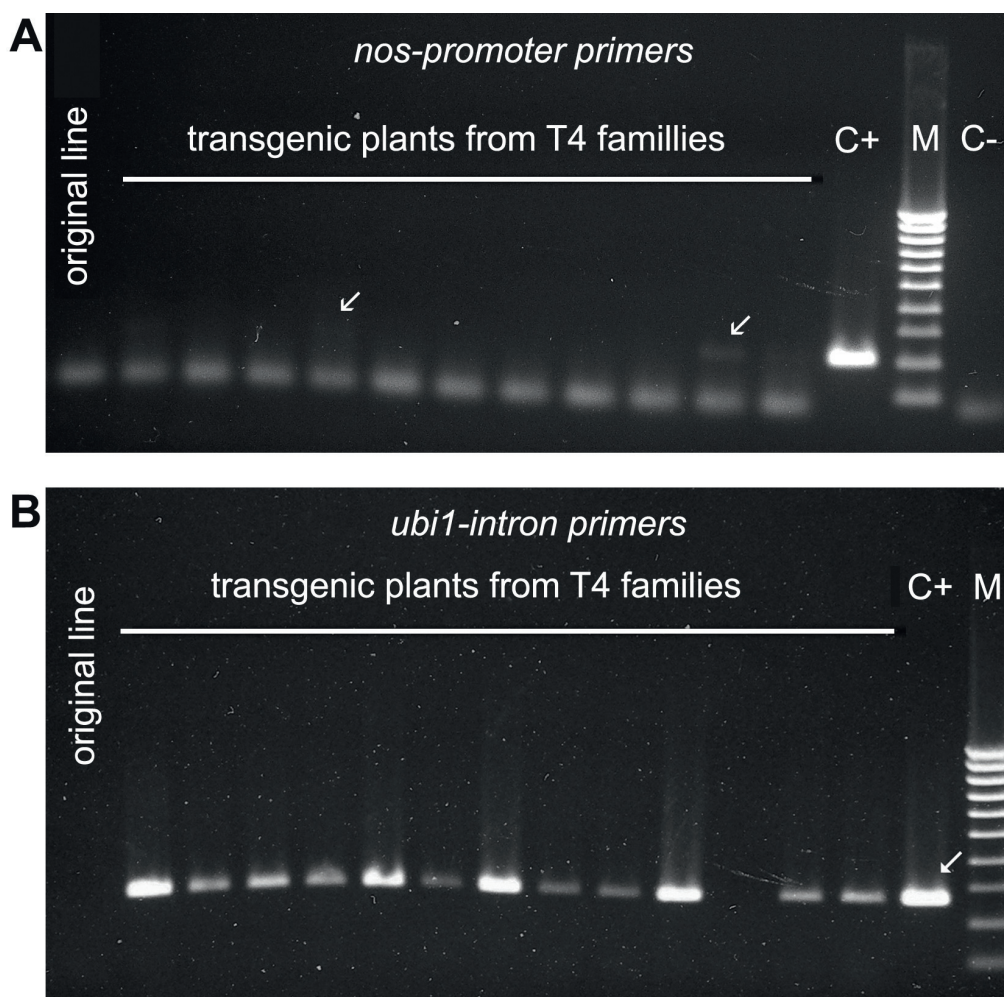


Рис. ПЦР-анализ трансгенных растений сорго (поколение  $T_4$ ), несущих генетическую конструкцию для сайленсинга  $\gamma$ -кафирина (Elkonin et al., 2016b) с праймерами, амплифицирующими фрагмент *nos*-промотора, расположенного в составе конструкции перед маркерным геном *bar* (A), и *ubi1*-интрона, расположенного в конструкции между инвертированными фрагментами гена  $\gamma$ -кафирина (B). C+ ДНК *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pNRKAF (положительный контроль); C – отрицательный контроль (нет ДНК); M – маркеры длины фрагментов ДНК. Специфические фрагменты отмечены стрелками.

Fig. PCR analysis of transgenic sorghum plants ( $T_4$  generation) carrying a genetic construct for silencing  $\gamma$ -kafirin (Elkonin et al., 2016b) with primers amplifying a *nos* promoter fragment located in the construct in front of the *bar* marker gene (A) and *ubi1*-intron located in the construct between the inverted fragments of the  $\gamma$ -kafirin gene (B). C+ DNA of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101/pNRKAF (positive control); C – negative control (no DNA); M – markers of DNA fragment length. Specific fragments are marked with arrows.

## Редактирование нуклеотидных последовательностей генов кафиринов

В приведенных выше примерах подавление синтеза кафиринов осуществляется посредством механизма РНК-сайленсинга, включающего синтез коротких интерферирующих РНК (siРНК), последующего расщепления мРНК гена-мишени и ингибирования трансляции – то-есть, в результате функционирования ряда важных эпигенетических механизмов. Однако известно, что эпигенетические механизмы у растений проявляют высокую чувствительность к условиям выращивания и факторам окружающей среды (температура, влажность почвы и воздух и т.д.). Сообщалось, что температура может оказывать существенное влияние на РНК-сайленсинг (Tuttle et al., 2008). Также было показано, что деградация мРНК, индуцированная посредством микро-РНК, и ингибирование трансляции зависят от температуры роста растений (von Born et al., 2018). Следовательно, эффективность подавления синтеза кафирина конструкциями для РНК-сайленсинга может быть чувствительна к условиям выращивания растений. У полученных нами трансгенных растений с генетической конструкцией для сайленсинга  $\gamma$ -кафирина, выращенных на экспериментальном участке, перевариваемость запасных белков в системе *in vitro* была значительно ниже, чем у растений из той же семьи, выращенных в вегетационных сосудах в климатической камере (Elkonin, Italyanskaya, 2017). Кроме того, сама генетическая конструкция, введенная в геном для индукции РНК-сайленсинга, может подвергаться «замолчанию» (своего рода, «сайленсинг сайленсера» – Reihel et al., 2011). В этой связи, индукция мутаций, которые нарушают функционирование генов кафирина на генетическом уровне, может быть более эффективным подходом для изменения содержания разных подклассов кафиринов в зерновках сорго.

Разработка методов редактирования генома, и, прежде всего, использование системы редактирования CRISPR/Cas9, открывает новые перспективы в решении проблемы увеличения питательной ценности зерна сорго, поскольку позволяет направленно индуцировать мутации в генах, контролируемых нужные признаки.

Подробное рассмотрение CRISPR/Cas-технологии геномного редактирования дано во множестве обзоров (Xing et al., 2014; Xu et al., 2015; Kuluev et al., 2019). В системе редактирования на основе нуклеазы Cas9 узнаваемая первой последовательность, соседствующая с протоспейсером (мишенью) (Protospacer Adjacent Motif, PAM), расположена вслед за протоспейсером. Классический вариант нуклеазы Cas9 узнает PAM-последовательность NGG-3', которая, тем самым, служит опознавательным знаком мишени в редактируемой геномной ДНК. Протяженность спейсерных последовательностей гРНК (guide RNA) этих нуклеаз составляют 20 нуклеотидов. Наиболее важную для узнавания протоспейсе-

ра часть спейсерной последовательности, прилегающую к PAM-участку, называют “seed sequence” или “якорный участок”. Ее длина для нуклеаз из группы Cas9 составляет 8–12 нуклеотидов. Эндонуклеаза Cas9 производит двунитевые разрывы в ДНК-мишени, расположенные на 3 нуклеотида выше PAM-последовательности. В результате таких разрывов в целевом сайте возникают инсерции или делеции, которые могут приводить к сдвигам рамки считывания и нуль-мутациям.

Недавно, используя инструмент редактирования генома CRISPR/Cas9, Ли с коллегами (Li et al., 2018) индуцировали мутации в консервативной области генов, кодирующих сигнальный пептид 22 кДа  $\alpha$ -кафирина, ответственный за упаковку  $\alpha$ -кафирина в белковые тельца. Мутации сайта-мишени были получены в каждом из 20 генов семейства k1C и представляли собой небольшие делеции (1-33 пн), и – реже – инсерции (1-16 пн). В зерновках растений T<sub>1</sub> и T<sub>2</sub> наблюдалось снижение уровня  $\alpha$ -кафирина, сопровождавшееся измененной ультраструктурой белковых телец и модификацией текстуры эндосперма. У некоторых растений из поколения T<sub>2</sub> отмечена повышенная перевариваемость белка и содержание лизина. Вполне очевидно, что этот подход открывает новые перспективы в создании линий сорго с улучшенной питательной ценностью зерна.

## Обогащение аминокислотами и витаминами

Многочисленные исследования, опубликованные до настоящего времени, четко продемонстрировали, что методы генной инженерии могут быть весьма перспективны для обогащения зерна злаков незаменимыми аминокислотами (лизином, триптофаном, метионином) и микроэлементами (см. обзор: Elkonin et al., 2016a). При использовании эндосперм-специфичных промоторов экспрессия вводимых генов обеспечивается именно в зерновках, а не в соматических тканях растения. К сожалению, на сегодняшний день опубликовано лишь одно сообщение о получении трансгенных растений сорго с повышенным содержанием лизина (до 40-60%) (Zhao et al., 2003). Очевидно, что развитие работ в этом направлении сдерживалось отсутствием до недавнего времени высокоэффективных методов получения трансгенных растений сорго. По мере развития технологий генетической трансформации, исследования в этом направлении будут развиваться.

Во многих странах Азии и Африки, в которых сорго является основным продуктом питания, люди страдают от нехватки  $\beta$ -каротина (провитамина А). В зерне сорго его содержание составляет 0.5 мг/кг, причем оно резко падает в процессе хранения зерна из-за его окисления. Для увеличения содержания  $\beta$ -каротина в зерне сорго и обеспечения его стабильности при хранении в генотип

сорта Тх430 было введено три генетические конструкции, кодирующие ферменты, участвующие в его биосинтезе (Che et al., 2016), а также ген ячменя *HGGT*, кодирующий геранил-трансферазу, участвующую в синтезе витамина *E*, препятствующего окислению  $\beta$ -каротина. В результате были получены трансгенные линии, у которых содержание  $\beta$ -каротина значительно возросло: до 7.3–12.3 мкг/г против 0.5 мкг/г в нетрансгенной контрольной линии, при этом время его полураспада увеличилось с 4 до 10 недель. Это исследование является ярким примером эффективности подхода генной инженерии для изменения метаболизма растений для удовлетворения потребностей человека.

### Заключение

Результаты экспериментов, выполненных несколькими группами исследователей, убедительно свидетельствуют о возможности улучшения питательной ценности зернового сорго с помощью инструментов современной генетики и биотехнологии. Полученные линии и мутанты характеризуются улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, повышенным содержанием незаменимых аминокислот (лизина) или витаминов (каротина). При этом, наиболее перспективным подходом представляется использование методов геномного редактирования, которые позволяют вносить изменения

в структуру генов, кодирующих ключевые процессы биосинтеза, но не изменять их экспрессию на эпигенетическом уровне, что имеет место при использовании РНК-интерференции.

Дальнейший прогресс в данном направлении связан с совершенствованием методов генетической трансформации сорго, а именно, с использованием питательных сред для эффективной индукции соматического эмбриогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* (Elkonin, Pakhomova, 2000; Nirwan, Kothari, 2003; Belide et al., 2017); «гипервирулентных» штаммов с дополнительными копиями *vir*-генов на специально сконструированных Ti-плазмидах («супербинарных» векторах), либо на дополнительных («хелперных») плазмидах (Wu et al., 2014; Che et al., 2018); векторов, содержащих гены морфогенетических регуляторов *Baby boom* (*Bbm*) и *Wuschel* (*Wus*) (Lowe et al., 2016; Mookkan et al., 2017). При этом включение в состав генетических конструкций гена рекомбиназы *Cre* и сайтов *loxP*, фланкирующих гены *Bbm* и *Wus*, позволяет получать трансгенные растения, несущие только целевой ген и не содержащие генов *Bbm*, *Wus* и *Cre*. Применение данного подхода может быть перспективным для получения безмаркерных трансгенных растений и, что особо значимо, трансгенных линий, которые могут быть использованы в пищевых целях.

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

### References / Литература

- Bean S.R., Iorger B.P., Wilson J.D., Tilley M., Rhodes D., Herald T.J. Structure and chemistry of sorghum grain. In: Rooney W. (ed.). *Achieving sustainable cultivation of sorghum*. Vol. 2. Sorghum utilization around the world. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing Limited; 2018. p.3-29. DOI: 10.19103/as.2017.0015.21
- Belide S., Vanhercke T., Petrie J.R., Singh S.P. Robust genetic transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos. *Plant Methods*. 2017;13:109. DOI: 10.1186/s13007-017-0260-9
- Belton P.S., Delgadillo I., Halford N.G., Shewry P.R. Kafirin structure and functionality. *Journal of Cereal Science*. 2006;44:272-286. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.004
- Che P., Zhao Z.-Y., Glassman K. et al. Elevated vitamin E content improves all-trans  $\beta$ -carotene accumulation and stability in biofortified sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113:11040-11045. DOI: 10.1073/pnas.1605689113
- Che P., Anand A., Wu E., Sander J.D., Simon M.K., Zhu W., et al. Developing a flexible, high-efficiency *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation system with broad application. *Plant Biotechnology J*. 2018;16:1388–1395. DOI: 10.1111/pbi.12879
- Chiquito-Almanza E., Ochoa-Zarzosa A., Lypez-Meza J.E., Pecina-Quintero V., Nuñez-Colin C.A., Anaya-López J.L. A new allele of  $\gamma$ -kafirin gene coding for a protein with high lysine content in Mexican white sorghum germplasm. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016;96(10):3342-3350. DOI: 10.1002/jsfa.7513
- Cremer J.E., Bean S.R., Tilley M.M., Iorger B.P., Ohm J.B., Kaufman R.C. et al. Grain Sorghum Proteomics: Integrated Approach toward Characterization of Endosperm Storage Proteins in Kafirin Allelic Variants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014;62:9819-9831. DOI: 10.1021/jf5022847
- De Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *Journal of Food Science*. 2010;75:90-104. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x
- Da Silva L.S. Transgenic sorghum: Effects of altered kafirin synthesis on kafirin polymerisation, protein quality, protein body structure and endosperm texture [PhD Thesis]. South Africa: University of Pretoria, Department of Food Science, Faculty of Natural and Agricultural Sciences; 2012. 144 p.
- Da Silva L.S., Jung R., Zhao Z.-Y., Glassman K., Taylor J., Taylor J.R. 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. *Journal of Cereal Science*. 2011;54:160-167. DOI: 10.1016/j.jcs.2011.04.009
- Elkonin L.A., Pakhomova N.V. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2000;61:115-123. DOI: 10.1023/A:1006472418218
- Elkonin L.A., Domanina I.V., Italiyanskaya Yu.V. Genetic engineering as a tool for modification of seed storage proteins and improvement of nutritional value of cereal grain. *Agricultural Biology*. 2016a;51(1):17-30 [In Russian] (Эльконин Л.А., Доманина И.В., Итальянская Ю.В. Генетическая инженерия как инструмент модификации состава запасных белков и улучшения питательной ценности зерна злаков. *Сельскохозяйственная биология*. 2016a;51(1):17-30). DOI: 10.15389/agrobiol.2016.1.17rus
- Elkonin L.A., Italiyanskaya 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. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2016b;63:678-689. DOI: 10.1134/S1021443716050046
- Elkonin L.A., Italyanskaya Yu.V. *In vitro* digestibility of storage endosperm proteins of transgenic sorghum plants carrying genetic construct for silencing of the gamma-kafirin gene. *Advances in Current Natural Sciences*. 2017;12:96-100 [In Russian] (Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В. Перевариваемость *in vitro* запасных белков эндосперма трансгенных растений сорго, несущих генетическую конструкцию для сайленсинга гена гамма-кафирина. *Успехи современного естествознания*. 2017;12:96-100.). DOI: 10.17513/use.36612
- Ezeogu L.I., Duodu K.G., Taylor J.R.N. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the *in vitro* starch digestibility of sorghum and maize flours. *Journal of Cereal Science*. 2005;42:33-44. DOI: 10.1016/j.jcs.2005.02.002
- 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 Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2009;45:383-399. DOI: 10.1007/s11627-008-9175-5
- Grootboom A.W., Mkhonza N.L., Mbambo Z., O'Kennedy M.M., da Silva L.S., Taylor J. et al. Co-suppression of synthesis of major  $\alpha$ -kafirin sub-class together with  $\gamma$ -kafirin-1 and  $\gamma$ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Reports*. 2014;33:521-537. DOI: 10.1007/s00299-013-1556-5
- Hansen J., Sato M., Ruedy R., Lo K., Lea D.W., Medina-Elizade M. Global temperature change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006;103:14288-14293. DOI:10.1073/pnas.0606291103
- 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. In: Taylor S.L. (ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Burlington, USA: Academic Press, 2010; Vol.60. p.21-52. DOI: 10.1016/S1043-4526(10)60002-2
- Huang S., Frizzi A., Florida C.A., Kruger D.E., Luethy M.H. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD  $\alpha$ -zeins. *Plant Molecular Biology*. 2006;61:525-535. DOI: 10.1007/s11103-006-0027-6
- Kawakatsu T., Hirose S., Yasuda H., Takaiwa F. Reducing rice seed storage protein accumulation leads to changes in nutrient quality and storage organelle formation. *Plant Physiology*. 2010;154:1842-1854. DOI: 10.1104/pp.110.164343
- Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R. et al. Delivery of CRISPR/Cas components into higher plant cells for genome editing. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019;66(5):694-706. DOI: 10.1134/S102144371905011X
- Kumar T., Dweikat I., Sato S., Ge Z., Nersesian N., Chen H. et al. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnology Journal*. 2012;10:533-544. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x
- Laidlaw H.K.C., Mace E.S., Williams S.B., Sakrewski K., Mudge A.M., Prentis P.J. et al. Allelic variation of the beta-, gamma- and delta-kafirin genes in diverse Sorghum genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 2010;121(7):1227-1237. DOI: 10.1007/s00122-010-1383-9
- Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S.J., Zhang C. et al. Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiology*. 2018;177(4):1425-1438. DOI: 10.1104/pp.18.00200
- Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.-J. et al. Morphogenic regulators Baby boom and Wuschel improve monocot transformation. *Plant Cell*. 2016;28:1998-2015. DOI: 10.1105/tpc.16.00124
- Mookkan M., Nelson-Vasilchik K., Hague J., Zhang Z.J., Kausch A.P. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL2. *Plant Cell Reports*. 2017;36:1477-1491. DOI: 10.1007/s00299-017-2169-1
- Mehlo L., Mbambo Z., Bado S., Lin J., Moagi S.M., Buthelezi S. et al. Induced protein polymorphisms and nutritional quality of gamma irradiation mutants of sorghum. *Mutation Research*. 2013;749(1-2):66-72. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.05.002
- Mudge S.R., Campbell B.C., Mustapha N.B., Godwin I.D. Genomic Approaches for Improving Grain Quality of Sorghum. In: Rakshit S., Wang Y.-H. (eds.). *The Sorghum Genome*. Springer International Publishing AG; 2016. p.189-205. DOI: 10.1007/978-3-319-47789-3\_10
- Nirwan R.S., Kothari S.L. High copper levels improve callus induction and plant regeneration in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2003;39:161-164. DOI: 10.1079/IVP2002385
- Oria M.P., Hamaker B.R., Shull J.M. Resistance of sorghum  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -kafirins to pepsin digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1995;43(8):2148-2153.
- Oria M.P., Hamaker B.R., Axtell J.D., Huang C.P. A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000;97:5065-5070. DOI: 10.1073/pnas.080076297
- Reichel M., Li J., Millar A.A. Silencing the silencer: strategies to inhibit microRNA activity. *Biotechnology Letters*. 2011;33(7):1285-1292. DOI: 10.1007/s10529-011-0590-z
- Schmidt M.A., Barbazuk W.B., Sandford M., May G., Song Z., Zhou W. et al. Silencing of soybean seed storage proteins results in a rebalanced protein composition preserving seed protein content without major collateral changes in the metabolome and transcriptome. *Plant Physiology*. 2011;156(1):330-345. DOI: 10.1104/pp.111.173807
- Shewry P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *Journal of Cereal Science*. 2007;46(3):239-250. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.06.006
- Tesso T., Ejeta G., Chandrashekar A., Huang C.-P., Tandjung A., Lewamy M. et al. A novel modified endosperm texture in a mutant high-protein digestibility/high-lysine grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Cereal Chemistry*. 2006;83:194-201. DOI: 10.1094/CC-83-0194
- Tuttle J.R., Idris A.M., Brown J.K., Haigler C.H., Robertson D. Geminivirus-Mediated Gene Silencing from Cotton Leaf Crumple Virus Is Enhanced by Low Temperature in Cotton. *Plant Physiology*. 2008;148(1):41-50. DOI: 10.1104/pp.108.123869
- Von Born P., Bernardo-Faura M., Rubio-Somoza I. An artificial miRNA system reveals that relative contribution of translational inhibition to miRNA-mediated regulation depends on environmental and developmental factors in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0192984. DOI: 10.1371/journal.pone.0192984
- Weaver C.A., Hamaker B.R., Axtell J.D. Discovery of grain sorghum germplasm with high uncooked and cooked *in vitro* protein digestibility. *Cereal Chemistry*. 1998;75:665-670.
- Wong J.H., Lau T., Cai N., Singh J., Pedersen J.F., Vensel W.H. et al. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *Journal of Cereal Science*. 2009;49:73-82. DOI: 10.1016/j.jcs.2008.07.013
- Wu Y., Messing J. Proteome balancing of the maize seed for higher nutritional value. *Front Plant Sci*. 2014;5:240. DOI: 10.3389/fpls.2014.00240
- Wu Y., Yuan L., Guo X., Holding D.R., Messing J. Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum. *Nature Communications*. 2013;4:2217. DOI: 10.1038/ncomms3217
- Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants // *BMC Plant Biology*. 2014;14:327. DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y
- Xu K., Ren C., Liu Z., Zhang T., Zhang T., Li D. et al. Efficient genome engineering in eukaryotes using Cas9 from *Streptococcus thermophilus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72:383-399. DOI: 10.1007/s00018-014-1679-z
- Zhang G., Hamaker B.R. Low  $\alpha$ -amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal Chemistry*. 1998;75:710-713. DOI: 10.1094/CCHEM.1998.75.5.710
- Zhao Z.-Y., Glassman K., Sewalt V., Wang N., Miller M., Chang S. et al. Nutritionally improved transgenic sorghum. In: Vasil I.K. (ed.). *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2003. p.413-416. DOI: 10.1007/978-94-017-2679-5\_85