

СОВРЕМЕННАЯ GERM-LINE BIOTEХНОЛОГИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ФОТОСИНТЕЗА И УРОЖАЙНОСТИ У ПШЕНИЦЫ

О.И. КЕРШАНСКАЯ, доктор биологических наук;
А.С. НУРМАГАМБЕТОВА; А.М. ЕСПЕМБЕТОВА;
Л.А. СКВОРЦОВА; Т.М. МУХАНОВ

Институт биологии и биотехнологии растений, Национальный центр биотехнологии
Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

Введение

Для того, чтобы накормить 9 миллиардов людей в ближайшем будущем, необходимо сочетание традиционных технологий селекции и генетического улучшения культурных растений путем внедрения рекомбинантных ДНК-технологий [4-9]. Растения, использующие традиционный путь фиксации углерода C_3 , а среди них многие важные сельскохозяйственные виды, такие как пшеница и рис, страдают от кислородного ингибирования фотосинтеза и ассоциированного с ним фотодыхания, демонстрируют низкую эффективность фотосинтеза, особенно в современных условиях высокой инсоляции, роста температуры и засухи. С целью активизации фотосинтеза было сделано несколько попыток генетической модификации фотосинтеза путем переноса генов, кодирующих ферменты C_4 метаболизма в C_3 растения [4, 6-9]. Этот многообещающий подход был успешно продемонстрирован на рисе [6, 8-9], в настоящее время необходима разработка стратегии C_3 - C_4 генетической инженерии для другой важнейшей сельскохозяйственной культуры – пшеницы [5], а также для представителя бобовых – сои.

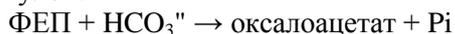
Разработка новой germ-line-биотехнологии-создания трансгенных растений пшеницы (генетической трансформации посредством половых элементов растения – пыльцы, яйцеклетки, зародышей и семян) открывает возможность интродукции новых целевых генов, которые могут повысить устойчивость пшеницы к болезням и абиотическим стрессам, улучшить качество зерна, увеличить уровень микроэлементов и витаминов в растении, модифицировать фотосинтез и повысить продуктивность [1, 3].

Целью настоящего исследования является разработка эффективной биотехнологии генетической трансформации и определение подходов к генетической модификации фотосинтеза у пшеницы для повышения ее урожайности до 30% путем введения генов кукурузы, кодирующих ферменты C_4 метаболизма фотосинтеза.

Объекты и методы исследования

В исследованиях использовано около 4600 предположительно трансгенных семян пшеницы с геном PEPС, полученных из 5 сортов яровой пшеницы селекции северо-запада США, и 25 сортов и форм яровой и озимой пшеницы казахстанской селекции с контрастными характеристиками фотосинтеза, продуктивности и засухоустойчивости.

Ген фосфоенолпируват карбоксилазы (PEPС) из кукурузы и Т-плазида pSB 130/ PEPС, содержащая ген PEPС, любезно предоставлены для проведения совместных и самостоятельных исследований профессором М. Ку из Университета штата Вашингтон (США) [7]. Ген PEPС кодирует фермент C_4 метаболизма из кукурузы ФОСФОЕНОЛ пируват карбоксилазу (ФЕПК), функция которого описывается формулой:



Выращивание суспензии агробактерий для пипетирования проводили в среде LB (Lauri-Bertini) и инкубировали 1-1,5 суток при 28°C, дважды очищали центрифугированием при 4500 g по 10 мин. Оптимальная плотность агробактерий для трансформации пипетированием составляет 10^{10} клеток/мл.

Методика проведения агробактериальной трансформации способом агробактериального пипетирования включала оптимизацию суспензии агробактерий с целевым геном агентами трансформации: 1%-ной плурониковой кислотой и/или ацетосирингоном [1]. Отработывали технику пипетирования и определяли оптимальную фазу развития растения для трансформации. Суспензию агробактерий на рыльце пестика цветка пшеницы наносили очень аккуратно (в среднюю часть рыльца за 1 -4 сут до оплодотворения).

Выделение ДНК проводили микро- и макрометодами [1]. Нуклеотидную последовательность генов *np1ll*, *hp1ll* определяли в базе генов с помощью web.site NCTI. С использованием компьютерной программы «Vector NTI» были рассчитаны и подготовлены праймеры к маркерным генам, входящим в конструкцию гена PEPС. *EcoRI* фрагмент гена PEPС размером 1,0 кб использовали в качестве положительного контроля при проведении ПЦР.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторах BioRad (США) и Eppendorf (Германия). Использовали реактивы СибЭнзим (Россия). Для анализа продукта ПЦР проводили горизонтальный электрофорез ДНК в 1%-ном агарозном геле. Полученные результаты электрофореза анализировали в гель-документирующей системе BioRad.

Определение активности ФЕПК проводили спектрофотометрически по убыли субстрата ФЕП [6].

Интенсивность фотосинтетического поглощения CO_2 [2] измеряли с использованием портативного газоанализатора CIRAS-1, PP-system (Великобритания). Измерения CO_2 -газообмена и устьичной проводимости образцов с использованием CIRAS-1 проводили в условиях реальной (от 120 до 600) и потенциальной $1500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ фотосинтетически активной радиации и концентрации CO_2 0,03 PPM.

Сравнительный анализ структуры урожая предположительно трансгенных и исходных форм пшеницы проводили по методам ВИР им. Н.И. Вавилова [2].

Результаты и обсуждение

Разработан новый простой, дешевый, близкий к естественному половому скрещиванию эффективный метод генетической трансформации пшеницы посредством агробактериального пипетирования рыльца пестиков цветков пшеницы на основе механизма дистанционного трансфера пыльцы [3] - метод germ-line-трансформации, который не требует длительных дорогостоящих этапов культуры тканей, регенерации растений, является независимым и может быть использован для интродукции любых целевых генов в пшеницу при создании новых высокопродуктивных, устойчивых к стрессам форм пшеницы в дополнение к традиционной селекции. Метод агробактериального пипетирования включает 5 этапов и 7 подэтапов (рис. 1).

Использование данного метода позволило получить около 4600 предположительно трансгенных семян пшеницы с геном PEPС.

Проведен ПЦР-анализ с растительной ДНК 64 предположительно трансгенных линий пшеницы и их нетрансгенных контролей (рис. 2). Частота трансформации по результатам ПЦР-анализа составила 2,3%.

Проведен анализ фотосинтетической функции трансгенных растений пшеницы. На рис. 3 показано, что трансгенные растения с интродуцированным геном PEPС, наряду с повышением экспрессии PEPС-активности, характеризуются увеличением интенсивности фотосинтетического CO_2 -газообмена листьями. 17 трансгенных линий пшеницы из 24 показали увеличение интенсивности фотосинтеза на 17% у большинства растений и до 35% у отдельных линий. Увеличение интенсивности фотосинтеза у трансгенных форм коррелировало с повышением устьичной проводимости на 25% у тех же линий.

Анализ взаимосвязи интенсивности фотосинтеза и устьичной проводимости в трансгенных растениях показал положительные корреляции между этими параметрами. Коэффициент корреляции (r^2) был равен 0.574. Известно, что устьичная проводимость тесно коррелирует с внутриклеточной концентрацией CO_2 .



Рис. 1. Схема метода агробактериального пипетирования

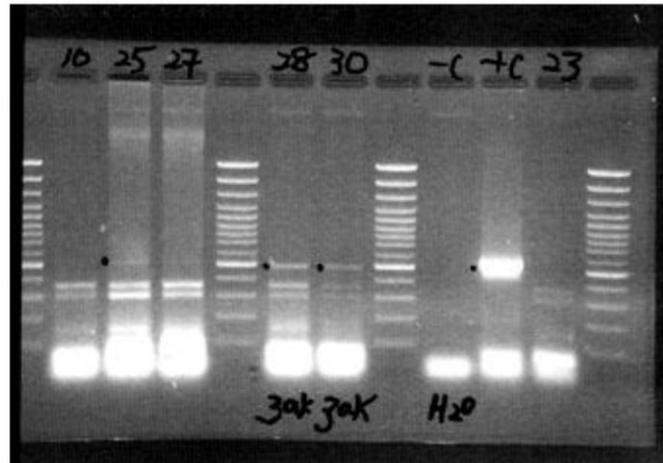


Рис. 2. ПЦР-анализ трансгенных растений пшеницы с пробой гена PERC. Слева направо: маркер → 25, 27 – номера трансгенных линий → маркер → 28, 30 → номера трансгенных линий → С – отрицательный контроль вода → +С – положительный контроль – интактный ген PERC → 10, 23 – нетрансгенные линии

Поэтому высокая интенсивность фотосинтеза трансгенных растений может частично зависеть от способности этих растений создавать повышенную внутриклеточную концентрацию CO₂ в листьях, обусловленную увеличением открытия устьиц. Немедленным результатом повышения концентрации внутриклеточной CO₂ является увеличение фиксации CO₂ из атмосферы, подавление оксигеназной активности РБФК и связанным с этим подавлением фотодыхания.

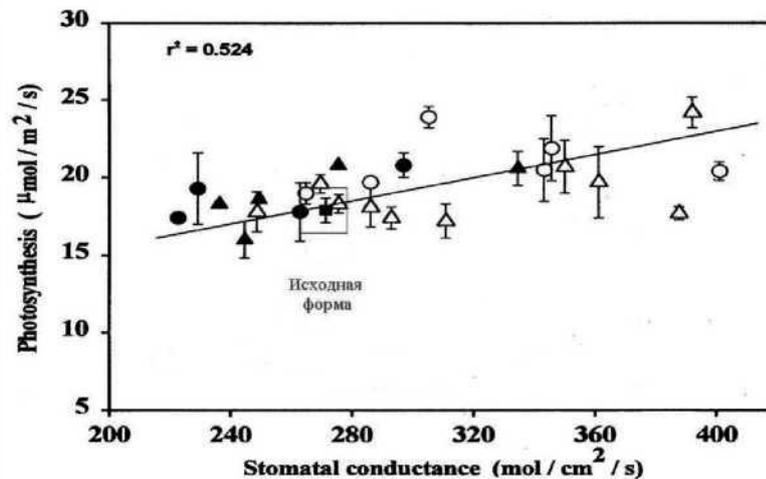


Рис. 3. Трансгенные растения пшеницы с высокой фотосинтетической активностью и устьичной проводимостью

Исследованы 419 семян 21 линии предположительно трансгенной пшеницы по элементам структуры урожая: высота растения, длина колоса главного и бокового побегов, число стеблей/число колосьев, число колосков в колосе, число зерен в колосе, масса зерна с 1 колоса, масса зерна с 1 растения. Обнаружено, что 17 из 22 трансгенных линий пшеницы T_1 и T_2 отличались высоким урожаем зерна, превосходящим на 25-30% и более урожай зерна с 1 растения в контроле – исходной форме (табл.).

Таблица

Урожай зерна трансгенных линий пшеницы T_2 и исходного сорта Хаунс, средние данные за 2006-2008 гг.

Форма	Масса зерна с 1 растения, г	Трансген / контроль по Ухоз., %
Контроль 'Houis'	0,56 ± 0,07	
H50PC-26, T_1	0,70 ± 0,06	25
HPC-26, T_2	0,71 ± 0,05	26
H 25PC-26, T_1	0,67 ± 0,05	20
HPC-22, T_1	0,89 ± 0,05	59
HPC-96, T_1	0,56 ± 0,02	
H 25PC-19, T_2	0,78 ± 0,01	39
H 25PC-24, T_1	0,57 ± 0,06	
H 25PC-18, T_1	0,78 ± 0,01	39

Выводы

Разработан новый простой, дешевый, близкий к естественному половому скрещиванию эффективный метод генетической трансформации пшеницы посредством агробактериального пипетирования рыльца пестиков цветков на основе механизма дистанционного переноса пыльцы.

Проведена трансформация пшеницы методом агробактериального пипетирования. Получено около 4600 предположительно трансгенных семян пшеницы.

Проведено молекулярно-биологическое подтверждение интродукции гена PEPС из кукурузы в геном пшеницы по результатам ПЦР-анализа. Идентифицированы 17 трансгенных линий пшеницы на наличие гена PEPС. Частота трансформации по результатам данного этапа детекции трансгенов составила 2,3% от общего числа полученных семян.

Трансгенная пшеница с экспрессией ключевого фермента метаболизма C_4 карбоновых

кислот из кукурузы – РЕРС демонстрировала повышение интенсивности фотосинтетического CO_2 - газообмена на 25-30% и увеличение урожая зерна с одного растения на 25-50%.

Список литературы

1. Кершанская О.И. Генетическая инженерия растений. Практический подход. – Алматы: Доива, 2007. – 152 с.
2. Кершанская О.И. Фотосинтетические основы продукционного процесса у пшеницы. – Алматы: Доива, 2007. – 252 с.
3. Новый способ генетической трансформации пшеницы посредством агробактериального пипетирования: А. с. 60040. Казахстан. 19.KZ13A4.11. 21165/ Кершанская О.И., Джангалина Э.Д. – № 21165; Заявл. 05.05.2008; Бюл. № 9. – 4 с.
4. Hausler R.E., Hirsch H.-J., Kreuzaler F., Peterhansel C. Overexpression of C_4 -cycle enzymes in transgenic C_3 plants: a biotechnological approach to improve C_3 -photosynthesis // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 591-607.
5. Kershanskaya O.I., Ku M.S.B. Genetic modification of Photosynthesis as a first step to wheat transformation for increased yield // Biotechnology: Theory and Practice. – 2005. – N 4. – P. 10-22.
6. Ku M.S.B., Cho D., Ranade U., Hsu T.-P., Li X., Jiao D.-M., Ehleringer J., Miyao M., Matsuoka M. Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C_4 photosynthesis enzymes // Redesign Rice Photosynthesis / Ed. J. Sheehy. – Manila: IRRI Press, 2000. – 236 p.
7. Leegood R.C. C_4 photosynthesis: principles of CO_2 concentration and prospects for its introduction into C_3 plants // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 581-590.
8. Matsuoka M., Furbank R.T., Fukayama H., Miyao M. Molecular engineering of C_4 photosynthesis // Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. – 2001. – V. 52. – P. 297-314.
9. Miyao M. Molecular evolution and genetic engineering of C_4 photosynthetic enzymes // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54 (381), N 2. – P. 179-189.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.