

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Проявление селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина

Л.А. Эльконин¹✉, Н.В. Борисенко¹, Т.Е. Пылаев^{2,3}, О.А. Кенжегулов¹, С.Х. Сарсенова¹, Н.Ю. Селиванов², В.М. Панин¹

¹ Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

³ Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия

✉ elkonin@gmail.com

Аннотация. Улучшение питательной ценности зернового сорго – засухоустойчивой и жаростойкой зерновой культуры, служащей источником кормового и продовольственного зерна во многих засушливых регионах мира, – важная задача селекции в условиях глобального потепления климата. Одной из причин низкой питательной ценности зерна сорго является устойчивость его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению, обусловленная, в том числе структурной организацией белковых телец, в которых наиболее устойчивый к действию протеаз γ -кафирин располагается по периферии, инкапсулируя более легко перевариваемые α -кафирины. Введение генетических конструкций, способных к индукции РНК-сайленсинга гена γ -кафирина (*gKAF1*), открывает перспективы для решения этой проблемы. Нами у сорта зернового сорго Аванс посредством агробактериальной трансформации с использованием штамма, несущего в составе Т-ДНК генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*, получен мутант с улучшенной перевариваемостью белков эндосперма (до 92 %). Цель настоящей работы – изучение стабильности наследования введенной генетической конструкции в поколениях T_2 – T_4 , установление числа ее копий, а также проявления важнейших селекционно-ценных признаков у потомства полученного мутанта. Мутантные линии выращивали на экспериментальном участке Федерального аграрного научного центра Юго-Востока в трех рендомизированных блоках. Исследуемые линии характеризовались улучшенной перевариваемостью кафиринов, модифицированным типом эндосперма, полностью или частично лишенным стекловидного слоя, повышенным процентным содержанием лизина (на 75 %), сниженной высотой растений, длиной подметельчатого междоузлия, массой 1000 зерен и урожаем зерна с метелки. В поколении T_2 отобрана линия с моногенным контролем устойчивости к глюфосинату аммония. Анализ qPCR показал, что у разных растений из поколений T_3 и T_4 генетическая конструкция присутствует в двух-четыре копии. В поколении T_3 отобрана линия с высокой перевариваемостью белков эндосперма (81 %) и минимальным снижением селекционно-ценных признаков (на 5–7 %).
Ключевые слова: *Sorghum bicolor*; трансгенные растения; РНК-сайленсинг; кафирины; qPCR; качество зерна; текстура эндосперма.

Для цитирования: Эльконин Л.А., Борисенко Н.В., Пылаев Т.Е., Кенжегулов О.А., Сарсенова С.Х., Селиванов Н.Ю., Панин В.М. Проявление селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):63-73. DOI 10.18699/vjgb-24-08

Manifestation of agronomically valuable traits in the progeny of a sorghum mutant carrying the genetic construct for RNA silencing of the γ -kafirin gene

L.A. Elkonin¹✉, N.V. Borisenko¹, T.E. Pylaev^{2,3}, O.A. Kenzhegulov¹, S.Kh. Sarsenova¹, N.Yu. Selivanov², V.M. Panin¹

¹ Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Federal Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Saratov, Russia

³ Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, Russia

✉ elkonin@gmail.com

Abstract. Improving the nutritional value of grain sorghum, a drought- and heat-tolerant grain crop, is an important task in the context of global warming. One of the reasons for the low nutritional value of sorghum grain is the resistance of its storage proteins (kafirins) to proteolytic digestion, which is due, among other things, to the structural organization of protein bodies, in which γ -kafirin, the most resistant to proteases, is located on the periphery, encapsulating more easily digested α -kafirins. The introduction of genetic constructs capable of inducing RNA silencing

of the γ -kafirin (*gKAF1*) gene opens up prospects for solving this problem. Using *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of immature embryos of the grain sorghum cv. Avans we have obtained a mutant with improved digestibility of endosperm proteins (up to 92 %) carrying a genetic construct for RNA silencing of the *gKAF1* gene. The goal of this work was to study the stability of inheritance of the introduced genetic construct in T₂–T₄ generations, to identify the number of its copies, as well as to trace the manifestation of agronomically valuable traits in the offspring of the mutant. The mutant lines were grown in experimental plots in three randomized blocks. The studied lines were characterized by improved digestibility of kafirins, a modified type of endosperm, completely or partially devoid of the vitreous layer, an increased percentage of lysine (by 75 %), reduced plant height, peduncle length, 1000-grains weight, and grain yield from the panicle. In T₂, a line with monogenic control of GA resistance was selected. qPCR analysis showed that in different T₃ and T₄ plants, the genetic construct was present in 2–4 copies. In T₃, a line with a high digestibility of endosperm proteins (81 %) and a minimal decrease in agronomically valuable traits (by 5–7 %) was selected.

Key words: *Sorghum bicolor*; transgenic plants; RNA silencing; kafirins; qPCR; grain quality; endosperm texture.

For citation: Elkonin L.A., Borisenko N.V., Pylaev T.E., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh., Selivanov N.Yu., Panin V.M. Manifestation of agronomically valuable traits in the progeny of a sorghum mutant carrying the genetic construct for RNA silencing of the γ -kafirin gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):63–73. DOI 10.18699/vjgb-24-08

Введение

РНК-интерференция – один из важнейших природных механизмов регуляции экспрессии генов и противовирусной защиты клетки. Как известно, в основе механизма РНК-интерференции лежит деградация одноцепочечной мРНК в присутствии комплементарной ей короткой двуцепочечной РНК, что ведет к нарушению синтеза белка и замолчанию экспрессии соответствующего гена. Такие короткие интерферирующие РНК (siRNA) длиной 20–25 нуклеотидов транскрибируются с присутствующих в геноме природных последовательностей ДНК или искусственно созданных генетических конструкций, кодирующих шпилечные РНК (hpRNA) (Guo et al., 2016; Muhammad et al., 2019). Такая конструкция состоит из смысловой и антисмысловой последовательностей части мРНК гена-мишени в виде инвертированных повторов, которые разделены между собой спейсерной последовательностью. Нередко в генетических конструкциях в качестве спейсера используется способный к сплайсингу интрон, поскольку он улучшает эффективность сайленсинга РНК у растений (Smith et al., 2000).

Смысловая и антисмысловая последовательности в транскрибируемой РНК комплементарны друг другу и образуют hpRNA, которая процессируется Dicer-подобными белками (DCL). Белки DCL генерируют siRNA из предшественника, hpRNA. Одна цепь siRNA-дуплекса включена в белок Argonaute (AGO), образуя РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC). Молекула siRNA направляет RISC к комплементарной области одноцепочечной РНК, после чего AGO расщепляет мРНК-мишень (Журавлев и др., 2022; Bharathi et al., 2023).

Технология РНК-интерференции весьма интенсивно используется в функциональной геномике и геномной инженерии растений, поскольку позволяет создавать мутанты, устойчивые к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, а также регулировать экспрессию генов, вовлеченных в цепи синтеза и распада важных метаболитов и запасных питательных веществ, включая белки, углеводы и липиды (Bharathi et al., 2023). Этот подход использовали для получения мутантов с измененным спектром запасных белков у возделываемых видов злаков, включая кукурузу, пшеницу, рис, сорго (Elkonin et al., 2016a).

Особое значение технология РНК-интерференции имеет для сорго, поскольку считается, что одна из причин сравнительно низкой питательной ценности зерна сорго – это устойчивость его запасных белков (кафиринов) к протеолитическому расщеплению, обусловленная в том числе структурной организацией белковых телец, в которых наиболее устойчивый к действию протеаз γ -кафирин располагается по периферии, инкапсулируя более легко перевариваемые α -кафирины (Oria et al., 2000; de Mesa-Stonestreet et al., 2010; Duressa et al., 2018). Показано, что подавление синтеза разных классов кафиринов ведет к модификации структуры белковых телец эндосперма, снижению устойчивости кафиринов к расщеплению протеазами, компенсаторному синтезу других белков с более высоким содержанием лизина (da Silva et al., 2011a, b; Kumar et al., 2012; Grootboom et al., 2014; Elkonin et al., 2016b).

Ранее нами посредством агробактериальной трансформации генетическая конструкция, способная к индукции РНК-сайленсинга гена γ -кафирина (*gKAF1*), входящая в состав Т-ДНК вектора pNRKAFSIL, была введена в геном коммерческого сорта зернового сорго Аванс. У одного из растений поколения T₀ все зерновки имели мучнистый тип эндосперма и характеризовались высоким уровнем перевариваемости кафиринов (до 93 %), который кардинально отличался от такового у сорта Аванс (57 %) (Elkonin et al., 2021). Растения из поколения T₁ наследовали эти признаки, так же как и устойчивость к глюфосинату аммония, обусловленную геном *bar*, также входящим в состав Т-ДНК вектора pNRKAFSIL (Borisenko et al., 2022).

Цель настоящей работы – изучение стабильности наследования введенной генетической конструкции в поколениях T₂–T₄, ее копийности, а также проявления важнейших селекционно-ценных признаков у потомства полученного мутанта, включая аминокислотный состав муки и перевариваемость ее белков в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Исходный мутант с высокой перевариваемостью белков зерна (Аванс-1/18) был получен в эксперименте по агробактериальной трансформации нового коммерческого сорта Аванс зернового сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) штаммом *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущим

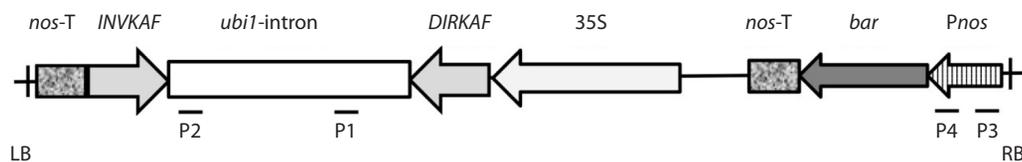


Рис. 1. Схема Т-ДНК вектора pNRKAFSIL (Elkonin et al., 2016b).

DIRKAF, *INVKAF* – фрагменты гена γ -кафирина сорго (GenBank Acc. No. M73688) в прямой и инвертированной ориентации; *ubi1* – интрон кукурузы; 35S – 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты; *Pnos* – *nos*-промотор; *nos-T* – *nos*-терминатор; P1–P4 – позиции праймеров, использованных для ПЦР-анализа.

бинарный вектор pNRKAFSIL (Elkonin et al., 2021). Этот вектор содержит генетическую конструкцию, состоящую из фрагмента (309 п. н.) гена γ -кафирина (GenBank Acc. No. M73688) в прямой и инвертированной ориентации, которые разделены последовательностью *ubi1*-интрона кукурузы (рис. 1) (Elkonin et al., 2016b). Такая конструкция должна подавлять экспрессию *gKAF1* посредством РНК-интерференции. В состав Т-ДНК этого вектора входит также ген *bar*, определяющий устойчивость к глюфосинату аммония (ГА), под контролем *nos*-промотора.

Потомство RNAi-мутанта Аванс-1/18 выращивали в климатической камере (фотопериод 16 ч день/8 ч ночь, t° 28/22 $^{\circ}$ C), в теплице и опытных делянках на изолированном участке Федерального аграрного научного центра Юго-Востока (г. Саратов, Россия).

Для изучения наследования генетической конструкции для сайленсинга метелки трансгенных растений перед цветением тщательно изолировали пергаментными изоляторами до начала цветения. Кроме того, их скрещивали в качестве отцовских родителей с линиями с цитоплазматической мужской стерильностью (ЦМС) А2 КВВ-181, А2 КВВ-114 и А2 О-1237.

Оценка устойчивости к глюфосинату аммония. Для изучения устойчивости потомства трансгенных растений к ГА зерновки после стерилизации «Доместосом» и $HgCl_2$ (0.1 %) замачивали в растворе ГА (2.5 мг/л) на 20 ч. Из замоченных зерновок извлекали зародыши и помещали на безгормональную питательную среду MS, содержащую стерилизованный фильтрованием ГА (2.5 мг/л). Зародыши культивировали в растительной камере (фотопериод 16 ч день/8 ч ночь; t° 26–28 $^{\circ}$ C) в течение трех недель. При таком режиме проростки, несущие ген *bar*, нормально развивались и достигали 10 см за три недели, тогда как развитие проростков, не несущих ген *bar*, тормозилось на стадии разворачивания coleoptilya.

Текстура эндосперма. Текстуру эндосперма определяли на поперечных сколах зрелых зерновок, которые делали с помощью острого скальпеля. При этом выделяли следующие типы эндосперма: модифицированный, к которому относили мучнистый, мучнистый с вкраплениями стекловидного эндосперма и мучнистый с тонким, часто «размытым» ободком стекловидного слоя и обычный с толстым стекловидным слоем.

ПЦР-анализ. Геномную ДНК выделяли из листьев модифицированным СТАВ-методом. Наличие генетической конструкции для РНК-сайленсинга проверяли с помощью ПЦР-анализа (полимеразная цепная реакция) с праймерами, амплифицирующими фрагмент *ubi1*-интрона куку-

рузы длиной 588 п. н. (P1 (5'→3'): *tgctctggtgtgatgatgtgctc*; P2 (5'→3'): *gcgatgaaggcagggctaaa*), который является важным компонентом конструкции, обеспечивая ее стабильность и эффективность функционирования (Smith et al., 2000), а также фрагмент *nos*-промотора, управляющего маркерным геном *bar*, длиной 201 п. н. (P3 (5'→3'): *tgagacttaattggataccgaggg*; P4 (5'→3'): *tttggactgacagaaccgcaac*) (позиции праймеров указаны на рис. 1). Полимеразную цепную реакцию осуществляли с использованием ДНК-амплификаторов MasterCycler (Eppendorf, Германия) и T100 (Bio-Rad, США). Условия ПЦР были следующими: для *nos*-промотора: 95 $^{\circ}$ C (2 мин); 40 циклов [95 $^{\circ}$ C (30 с), 64 $^{\circ}$ C (30 с); 72 $^{\circ}$ C (1 мин 10 с)]; 72 $^{\circ}$ C (7 мин). Для *ubi1*-интрона: 95 $^{\circ}$ C (2 мин); 40 циклов [95 $^{\circ}$ C (1 мин), 56 $^{\circ}$ C (1 мин), 72 $^{\circ}$ C (1 мин 30 с)]; 72 $^{\circ}$ C (10 мин). Амплифицированные фрагменты визуализировали с помощью электрофореза в 2.0 % агарозном геле. ПЦР-анализы каждого образца были выполнены в двух повторностях.

Количественная ПЦР для определения количества копий генетической конструкции для РНК-интерференции. Число копий генетической конструкции для РНК-интерференции определяли с помощью количественной ПЦР (qPCR) путем амплификации фрагментов *nos*-промотора и гена антранилат-фосфорибозил-трансферазы сорго (*APRT*, Sobic.002G303300), выбранного в качестве референсного гена. Реакционная смесь включала 2 мкл геномной ДНК (10 нг/мкл), 10 мкл готовой реакционной смеси для амплификации, содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green (2X HS-qSYBR-blue) («Биолаб-микс», Россия) и по 0.4 пмоль каждого праймера; общий объем реакционной смеси – 20 мкл; повторность трехкратная. Режим ПЦР: 1 цикл 95 $^{\circ}$ C (2 мин), затем 40 циклов [95 $^{\circ}$ C (15 с), 60 $^{\circ}$ C (20 с) + детекция на канале FAM, 72 $^{\circ}$ C (20 с)]. Анализ qPCR выполняли с использованием прибора для ПЦР в режиме реального времени LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Праймеры для гена *APRT* были следующими (F (5'→3'): *tgacacattcccaacctca* и R (5'→3'): *atctctctcctgagtgga*) (Wang et al., 2021); праймеры для *nos*-промотора описаны выше. Концентрацию геномной ДНК и праймеров определяли с использованием спектрофотометра УФ Nanodrop One C (Thermo Fisher Scientific, США) путем измерения поглощения на длинах волн 230/260/280 нм. Анализ данных и определение эффективности ПЦР проводили на сертифицированном программном обеспечении LightCycler® 96 Software, версия 1.1.0.1320.

Содержание общего белка в зерне у растений из поколений T₁ и T₂ анализировали с помощью метода Кельдаля.

Перевариваемость белков зерна в системе *in vitro*.

Для изучения перевариваемости белков зерна использовали метод обработки пепсином цельно-смолотой муки (Aboubacar et al., 2001; Nunes et al., 2004; Wong et al., 2009). При этом навеску муки (20 мг) инкубировали в 5 мл 0.15 % раствора пепсина (Carl Roth, Германия) (Art.-№. КК38.1, 2000 FIP-U/g) в 0.1 М калий-фосфатном буфере (рН 2.0) в течение 120 мин при 37 °С при периодическом встряхивании.

Для количественной оценки перевариваемости использовали метод, основанный на сканировании электрофоретических спектров белков, полученных в SDS-PAGE (Aboubacar et al., 2001; Wong et al., 2009; Elkonin et al., 2013). Из переваренных и контрольных образцов выделяли белки с помощью экстракционного буфера (0.0625 М TRIS·HCl, 2 % SDS, 5 % 2-меркаптоэтанол, рН 6.8). Образцы подвергали SDS-PAGE в 12.5 % (w/v) ПААГ; на каждую дорожку наносили по 10 мкл экстракта. В качестве стандартов использовали белковые маркеры молекулярной массы (14–116 кДа) (Thermo Scientific). Гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250. После электрофореза гели сканировали с помощью ChemiDocTM (Bio-Rad); количество белка определяли с применением программы Image Lab 6.1 (Bio-Rad). Величину перевариваемости рассчитывали как процентное отношение разницы между объемом белка в контрольном образце и в образце, подвергнутому обработке пепсином, к объему белка в контрольном образце. Эксперименты были выполнены в двух повторностях.

Анализ аминокислотного состава белков муки. Для анализа общего состава аминокислот исследовали по 10 зерновок с трансгенных растений T₁ 190-1, 190-3, 190-4 и исходного сорта Аванс. Муку (15 мг), полученную из зерновок, подвергали кислотному гидролизу путем обработки 1.5 мл 6N HCl (при 106 °С в течение 24 ч) в атмосфере азота. Идентификацию аминокислот осуществляли с применением предколониальной модификации 6-аминонафталин гидроксисукцинамидил карбаматом – AccQ по методу Waters AccQ-Tag с использованием набора реактивов WAT 052880. Анализ выполняли методом ВЭЖХ на хроматографе Knauer Smartline с помощью обратнотазовой хроматографии на колонке Kromasil – 110 C18/2.5 мкм, 2 мм × 150 мм. Детекция фотометрическая при λ 248 нм. Объем инъекции – 20 мкл. Анализ образцов проводили в трех повторностях. Количественный расчет содержания аминокислот в гидролизатах образцов осуществляли методом внешнего стандарта – 250 пмоль аналитического стандарта аминокислот (AAS18 Fluka).

Оценка селекционно-ценных признаков. Для изучения влияния использованной нами генетической конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* на проявление селекционно-ценных признаков потомства четырех трансгенных растений T₁, продвинутое до поколений T₃ и T₄, а также исходный сорт Аванс, – выращивали в четырех рядах в трех повторностях на делянках на изолированном участке Селекционного центра ФАНЦ Юго-Востока. Все метелки растений тщательно изолировали пергаментными изоляторами до начала цветения. Анализировали следующие признаки: «высота растения», «выдвигнутость подметельчатого междоузлия», «масса 1000 зерен», «урожай

зерна с метелки». В каждом повторении определяли среднее значение признака для 10–15 растений.

Методы биологической статистики. Для оценки различий в перевариваемости белков *in vitro* исследуемых образцов выполняли дисперсионный анализ с использованием пакета программ AGROS, версия 2.09 (С.П. Мартынов, ИОГен РАН), и Теста множественных сравнений Дункана. Данные по проявлению селекционно-ценных признаков обрабатывали посредством однофакторного дисперсионного анализа с помощью программного пакета AGROS.

Результаты и обсуждение

Анализ ПЦР растений из поколений T₂–T₄ с праймерами к *ubil*-интрону, разделяющему инвертированные фрагменты гена *gKAF1* в векторе pNRKAFSIL, а также к *nos*-промотору, управляющему экспрессией гена *bar*, показал стабильность наследования генетической конструкции в процессе самоопыления. В поколении T₂ анализировали потомство четырех растений из поколения T₁, каждое из которых было ПЦР-положительным по обоим исследованным локусам (№ 1-3, 190-1, 190-2, 190-4), а также потомство растения № 190-3, которое было ПЦР-отрицательным по *ubil*-интрону, но ПЦР-положительным по гену *bar* (Elkonin et al., 2021).

Обнаружено, что все 12 растений T₂ из семьи T₁ № 1–3 и все 8 проанализированных растений T₂ из семьи T₁ № 190-4 были ПЦР-положительны по обоим исследованным локусам (табл. 1). В то же время в семьях T₂ – потомствах растений 190-1 и 190-2 – наблюдалось расщепление и присутствовали ПЦР-отрицательные по обоим локусам растения. В поколениях T₃ и T₄ ПЦР-отрицательных растений не зарегистрировано, что указывает на стабильность наследования введенной конструкции.

ПЦР-анализ гибридов растений T₁ с ЦМС-линиями показал возможность передачи введенной генетической конструкции через пыльцу. Примечательно, что среди гибридов F₁ с ЦМС-линией A2 КВВ-114 обнаружено одно растение, ПЦР-положительное по *nos*-промотору, но ПЦР-отрицательное по *ubil*-интрону. Аналогичный случай выявлен нами ранее среди растений T₁ (Elkonin et al., 2021). Данные факты свидетельствуют, что в некоторых случаях могут иметь место нарушение целостности интегрированной Т-ДНК и элиминация генетической конструкции для сайленсинга. Значительное преобладание ПЦР-положительных растений в T₂, а также среди гибридов F₁ свидетельствовало в пользу наличия нескольких несцепленных копий генетической конструкции у растений T₁.

Устойчивость к глюфосинату аммония. Для изучения характера расщепления по гену *bar* потомство ряда растений из поколений T₁–T₃ было высажено на питательную среду, содержащую глюфосинат аммония. В результате были выявлены растения, в потомстве которых наблюдалось расщепление 15:1 (№ 182-3), свидетельствовавшее о наличии двух копий генетической конструкции; моногенное расщепление 3:1 (№ 124-3; 124-3-9; 124-3-10), подтверждающее наличие у них одной копии конструкции; а также предполагаемые гомозиготы (№ 150-15, 124-3-3, 190-4) (табл. 2). С учетом того что растение 124-3-3 получено из потомства растения 124-3, которое расщепи-

Таблица 1. Наследование генетической конструкции для РНК-сайленсинга гена *gKAF1* в потомстве RNAi-мутанта зернового сорго Аванс-1/18 при самоопылении и в скрещиваниях с ЦМС-линиями

Растение T ₁	Потомство	<i>ubi1</i> -интрон			<i>nos</i> -промотор		
		Всего	ПЦР		Всего	ПЦР	
			«+»	«-»		«+»	«-»
Самоопыление							
1-3 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	1-3/20 (T ₂)	12	12	–	12	12	–
	197/21 (T ₃)	6	6	–	–	–	–
	153/22 (T ₄)	7	7	–	–	–	–
190-1 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	181/21 (T ₂)	19	18	1	19	18	1
190-2 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	182/21 (T ₂)	15	12	3	15	12	3
	150/22 (T ₃)	14	14	–	–	–	–
190-3 (<i>ubi1-</i> ; <i>nos+</i>)	183/21 (T ₂)	–	–	–	3	–	3
190-4 (<i>ubi1+</i> ; <i>nos+</i>)	184/21 (T ₂)	8	8	–	8	8	–
	152/22 (T ₃)	11	11	–	–	–	–
Гибриды F ₁ с ЦМС-линиями							
A2 KBB-181/T ₁ 190-2		17	13	4	17	13	4
A2 O-1237/T ₁ 190-1		15	12	3	15	12	3
A2 KBB-114/T ₁ 190-1		18	16	2	18	17	1

Таблица 2. Расщепление по устойчивости к ГА в потомстве некоторых растений RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина сорго

Номер растения	Число растений в потомстве		Соотношение	χ^2	<i>p</i>	
	всего	устойчивых				чувствительных
Потомство растения T ₁ № 190-2 (<i>nos+</i>)						
124-3/21 (T ₂)	106	81	25	3:1	0.113	0.75 < <i>p</i> < 0.50
182-3/21 (T ₂)	110	101	9	15:1	0.701	0.50 < <i>p</i> < 0.25
150-15/22 (T ₃)	100	100	–	–	–	–
Потомство растения T ₂ № 124-3 (<i>nos+</i>)						
124-3-3 (T ₃)	35	35	–	–	–	–
124-3-9 (T ₃)	70	49	21	3:1	0.933	0.50 < <i>p</i> < 0.25
124-3-10 (T ₃)	29	21	6	3:1	0.111	0.75 < <i>p</i> < 0.50
Потомство растения T ₁ № 190-4 (<i>nos+</i>)						
190-4/21 (T ₁)	30	30	–	–	–	–
Потомство растения T ₁ № 190-3 (<i>nos-</i>)						
151-8/22 (T ₃)	30	–	30	–	–	–

лось как моногетерозигота (3:1), вполне очевидно, что у растения 124-3-3 генетическая конструкция для сайленсинга гена *gKAF1* представлена в виде одной копии, находящейся в гомозиготном состоянии. В потомстве 190-3 устойчивые растения полностью отсутствовали, как и у исходного сорта Аванс.

Текстура эндосперма. Анализ текстуры эндосперма в зерновках растений из разных поколений RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18 показал сохранение модифицированного типа эндосперма (мучнистого или с вкраплениями стекловидного) (рис. 2), присущего зерновкам мутанта,

вплоть до поколения T₄. На метелках растений T₁ и T₂ вследствие их гетерозиготности наблюдалось расщепление 3:1 или 15:1 (модифицированный тип эндосперма: обычный стекловидный эндосперм), которое указывало на наличие одной или двух копий генетической конструкции (табл. 3). В поколениях T₃ и T₄ выщепление зерновок со стекловидным эндоспермом, как правило, отсутствовало, что свидетельствовало о гомозиготизации введенной генетической конструкции.

Обращает на себя внимание, что во многих зерновках присутствовал комбинированный тип эндосперма, при ко-



Рис. 2. Поперечные срезы зерновок сорго из потомства RNAi-мутанта сорта Аванс 1/18 (а, б) и исходной нетрансгенного сорта Аванс (в).

Заметны толстый слой стекловидного эндосперма в зерновке исходного сорта Аванс (в) и полное отсутствие стекловидного эндосперма (а) или размытый слой стекловидного эндосперма в зерновках трансгенных растений T_1 (б).

Таблица 3. Расщепление по типу эндосперма в зерновках некоторых растений из разных поколений RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18

Номер растения, поколение	Число зерновок, тип эндосперма			Соотношение (модифицированный: обычный)	χ^2	p
	всего	мучнистый	с вкраплениями стекловидного			
№ 1 T_0 <i>ubi1+bar+</i>	18	13	5 (по периферии)	–	–	–
1-3, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	7	7	–	–	–	–
1-6, T_1 <i>ubi1-bar-</i>	8	–	–	8	–	–
190-1, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	72	58	–	14	3:1	1.185 0.50–0.25
190-2, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	87	58	16	13	3:1	4.693 < 0.05
190-3 T_1 <i>ubi1-bar+</i>	16	–	–	16	–	–
190-4, T_1 <i>ubi1+bar+</i>	29	29	–	–	–	–
1-3-5, T_2 (от T_1 1-3) <i>ubi1+bar+</i>	8	8	–	–	–	–
1-3-10, T_2 (от T_1 1-3) <i>ubi1+bar+</i>	8	4	4 (по периферии)	–	–	–
181-II-5, T_2 (от T_1 190-1) <i>ubi1+bar+</i>	353	99	152	102	3:1	2.856 0.05–0.01
182-I-8, T_2 (от T_1 190-2) <i>ubi1+bar+</i>	70	55	11	4	15:1	0.034 0.90–0.75
182-II-3, T_2 (от T_1 190-2) <i>ubi1+bar+</i>	288	114	149	24	15:1	2.133 0.25–0.10
182-I-10, T_2 (от T_1 190-2) <i>ubi1+bar+</i>	267	149	118	–	Гомозигота	
184-I-8, T_2 (от T_2 190-4) <i>ubi1+bar+</i>	407	148	229	–	Гомозигота	
184-I-2, T_2 (от T_2 190-4) <i>ubi1+bar+</i>	70	52	18	–	Гомозигота	
150a-1, T_3 (от T_2 182-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	93	26	17+50 (по периферии)	7	15:1	0.096 0.90–0.75
150a-12, T_3 (от T_2 182-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	100	16	26+58 (по периферии)	–	Гомозигота	
150a-15, T_3 (от T_2 182-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	100	26	52+22 (по периферии)	–	Гомозигота	
152a-10, T_3 (от T_2 184-I-8) <i>ubi1+bar+</i>	101	33	19+49 (по периферии)	–	Гомозигота	
197-6, T_3 (от T_2 1-3-5) <i>ubi1+bar+</i>	311	166	116+29 (по периферии)	–	Гомозигота	
153a-6, T_4 (от T_3 197-6) <i>ubi1+bar+</i>	100	33	9+58 (по периферии)	–	Гомозигота	
153a-4, T_4 (от T_3 197-6) <i>ubi1+bar+</i>	100	35	13+52 (по периферии)	–	Гомозигота	

тором в мучнистом эндосперме наблюдалось вкрапление секторов стекловидного эндосперма либо стекловидный эндосперм формировался в виде тонкого, нередко «размытого» периферийного слоя (см. рис. 2). Формирование таких типов эндосперма не зависело от числа копий кон-

струкции (см. ниже) и, возможно, отражало особенности ее экспрессии в условиях внешней среды, изменяющихся в ходе созревания зерновок.

Подобные «комбинированные» типы эндосперма описаны ранее в работах по введению генетических конструк-

ций для сайленсинга кафиринов (da Silva, 2012; Elkonin et al., 2016b), а также у рекомбинантных линий, полученных путем гибридизации мутанта P721Q, характеризовавшегося высокой перевариваемостью кафиринов и мучнистым типом эндосперма, с обычными линиями сорго с низкой перевариваемостью кафиринов и стекловидным типом эндосперма (Tesso et al., 2006). С учетом того что мучнистый тип эндосперма сопровождается рядом негативных агрономических признаков (Duressa et al., 2018), линии, сочетающие такие комбинированные типы эндосперма и улучшенную перевариваемость, имеют более высокую селекционную ценность.

Анализ числа копий конструкции. Для уточнения числа копий конструкции для сайленсинга у растений T_3 и T_4 был проведен количественный ПЦР-анализ с праймерами к *nos*-промотору, при этом в качестве референсного контроля брали собственный ген сорго *APRT*, который использовали ранее в экспериментах по выявлению числа копий трансгенов у разных видов растений, в том числе у сорго (Casu et al., 2012; Wang et al., 2021). Кроме того, число копий введенной генетической конструкции рассчитывали также при применении в качестве референсного контроля ДНК растения № 124-3-9 (T_4), расщеплявшегося как моногетерозигота (3:1) (см. табл. 2).

Обнаружено, что у растений, у которых по результатам анализа расщепления по устойчивости к глюфосинату аммония предполагалось наличие одной копии генетической конструкции, показатель копийности, по данным qPCR, был наиболее низким (0.6...0.9, в среднем 0.76 ± 0.06) (табл. 4). В то же время у растения № 124-3-3 – предполагаемой гомозиготы с двумя копиями генетической конструкции – показатель копийности, по данным qPCR, был в 2 раза выше (1.4 ± 0.2). Эти данные показывают, что проведенный нами qPCR-анализ достаточно точно отражает копийность анализируемой конструкции, и результаты, полученные с его использованием, заслуживают доверия.

Проведенный анализ выявил варьирование числа копий конструкции для сайленсинга у разных растений T_3 . Так, у растения № 150a-15 из семьи T_1 190-2 присутствовало две копии конструкции (см. табл. 2). С учетом отсутствия расщепления по устойчивости к ГА и типу эндосперма у формирующихся на нем зерновок (см. табл. 4) очевидно, что оно представляет собой моногетерозиготу. В то же время у растения № 150a-12 уровень копийности был значительно выше, что указывало на наличие трех-четырёх копий генетической конструкции. Наличие индивидуумов с двумя и четырьмя копиями конструкции из потомства одного и того же растения, T_1 , указывает на наличие у него двух независимых инсерций Т-ДНК. Данное предположение подтверждается дигибридным характером расщепления (15:1) по устойчивости к ГА и типу эндосперма в потомстве некоторых растений из семьи 190-2.

Таким образом, данные классической генетики и qPCR достаточно точно согласуются между собой и свидетельствуют о наличии минимум двух независимых копий генетической конструкции для РНК-сайленсинга у трансгенного растения T_0 . Обращает на себя внимание высокий уровень копийности у растений из семей T_1 190-4 и T_1 1-3 (поколения T_3 и T_4). Так, индивидуумы из потом-

Таблица 4. Число копий генетической конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* у разных растений из поколений T_3 и T_4 по результатам qPCR-анализа

Трансгенное растение	Копийность по отношению	
	к <i>APRT</i>	к <i>nos</i> -промотору ¹
Потомство растения T_1 190-2		
124-3-9 T_4 , моногетерозигота	0.8 ± 0.0	–
124-3-10 T_4 , моногетерозигота	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.3
124-3-4 T_4 , моногетерозигота	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2
124-3-8 T_4 , моногетерозигота	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.1
В среднем по моногетерозиготам	0.76 ± 0.06	
124-3-3 T_4 , моногетерозигота	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.2
150a-4 T_3	2.3 ± 0.1	2.9 ± 0.2
150a-12 T_3	2.9 ± 0.5	3.6 ± 0.7
150a-15 T_3	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Потомство растения T_1 190-4		
156-2 T_2	4.0 ± 0.5	5.1 ± 0.7
152a-3 T_3	4.1 ± 0.2	5.1 ± 0.4
152a-10 T_3	4.2 ± 0.3	5.3 ± 0.5
152a-14 T_3	3.3 ± 0.3	4.1 ± 0.5
Потомство растения T_1 1-3		
153a-4 T_4	4.0 ± 0.2	5.0 ± 0.4
153a-6 T_4	2.9 ± 0.2	3.7 ± 0.3
153a-3 T_4	3.3 ± 0.3	4.1 ± 0.4
153b-2 T_4	3.5 ± 0.7	4.4 ± 0.9
153b-1 T_4	2.0 ± 0.1	2.6 ± 0.2
159-5 нетрансгенный сегрегант	0.02 ± 0.0	0.03 ± 0.0
Аванс, исходный сорт	0.03 ± 0.0	0.04 ± 0.0

¹ Копийность рассчитывали по отношению к ДНК моногетерозиготы, № 124-3-9 (T_4).

ства растения T_1 190-4 несли минимум по четыре копии генетической конструкции. Эти факты свидетельствуют, что родительское растение T_0 могло нести минимум две независимые копии Т-ДНК, что, возможно, обусловило достаточно высокий фенотипический эффект введенной генетической конструкции.

Перевариваемость белков муки. Оценка перевариваемости белков муки, полученной из цельнозерновых семян, завязавшихся на растениях T_1 и T_2 , показала наследование высокого уровня перевариваемости, выявленного у растений поколений T_0 , хотя показатели у большинства растений T_2 были несколько ниже значений этого признака в T_1 . Растения, выращенные при искусственном поливе в период созревания зерна (2 раза по 7–8 л/м²), имели более высокую перевариваемость по сравнению с растениями, выращенными в отсутствие дополнительного полива (табл. 5). По-видимому, условия более высокой

Таблица 5. Перевариваемость белков зерна у растений из потомства мутанта Аванс-1/18 сорго, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*

Растение	Наличие полива ¹	Тип эндосперма	Перевариваемость, %	Содержание белка, %
T₁				
190-1 <i>ubi1+bar+</i>	+	Мучнистый	–	12.8 a
190-3 <i>ubi1–bar+</i>	+	Стекловидный	75.3 b	14.5 b
190-4 <i>ubi1+bar+</i>	+	Мучнистый	92.2 c	14.3 b
Аванс (контроль)	+	Стекловидный	52.3 a	15.5 c
<i>F</i>			558.946*	51.97*
<i>HCP</i> ₀₅			5.1	0.69
T₂ (от T₁ 190-4)				
184-I-8	+	Мучнистый	79.8 h	9.16 a
		С вкраплениями стекловидного	81.0 hi	
184-I-7	+	Мучнистый розовый	62.4 a	–
184-I-2	+	Мучнистый	75.0 efgh	11.13 de
116-4	–		71.0 bcde	–
116-5	–		72.2 def	9.36 a
182-I-8	+		76.1 efgh	11.63 ef
182-II-3	+	Мучнистый	79.3 h	–
		С вкраплениями стекловидного	77.6 gh	–
		Стекловидный	71.4 cdef	–
T₂ (от T₁ 190-2)				
124-3	–	Мучнистый	63.6 a	13.22 h
		Стекловидный	64.4 a	
T₃ (от T₁ 1-3)				
197-5	+	Мучнистый	80.3 h	11.88 f
197-6	+		78.8 gh	12.78 gh
Аванс (контроль)	+	Стекловидный	59.3 a	11.09 de
<i>F</i>			16.988**	37.257*
<i>HCP</i> ₀₅			5.735	0.618

¹ Дополнительный полив: 2 раза по 8 л/м² в период созревания зерна. Данные, обозначенные разными буквами, значимо различаются при * $p < 0.05$ и ** $p < 0.01$ в соответствии с Тестом множественных сравнений Дункана.

влагообеспеченности способствуют более эффективной экспрессии введенной генетической конструкции для сайленсинга. Зерновки с мучнистым типом эндосперма и эндоспермом, содержащим вкрапления стекловидного эндосперма, имели одинаковый уровень перевариваемости (рис. 3). В то же время зерновки со стекловидным типом эндосперма имели более низкую перевариваемость по сравнению с зерновками с мутантным типом эндосперма (мучнистым или с вкраплениями стекловидного).

Примечательно, что у растения 184-I-7 обнаружен необычный эндосперм мучнистого типа с розовой окраской, вызванной, возможно, веществами полифенольной природы, в норме обуславливающими окраску стекловидного слоя эндосперма в зерновках Аванса. Аналогичную окраску имела и мука, полученная от этого же растения. Перевариваемость белков у такой муки была несколько ниже, чем у муки из других растений, возможно, из-за ингибирования действия пепсина полифенолами.

Содержание белка в зерне у растений T₁ снизилось на 7.5–17.3 % по сравнению с исходным сортом Аванс: 12.8–14.3 % против 15.5 %, при этом процентное содержание лизина в зерновках растения № 190-4 возросло на 75 % (см. Приложение)¹, что, возможно, стало следствием балансировки синтеза белка в зерновках трансгенных растений и появления белков, более насыщенных лизином, по сравнению с γ -кафирином. Такая балансировка уровня белка описана ранее у многих RNAi-мутантов злаков с конструкциями для подавления синтеза проламинов (Elkonin et al., 2016a). Содержание белка в зерне разных растений T₂ варьировало от 9.2 до 12.8 % и у большинства изученных растений значимо не отличалось от исходного сорта Аванс (11.1 %). У двух растений из семьи № 190-4 (184-I-8 и 116-5), имеющих, очевидно, две копии генетической конструкции, количество белка было значимо

¹ Приложение см. по адресу:
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx3.pdf>

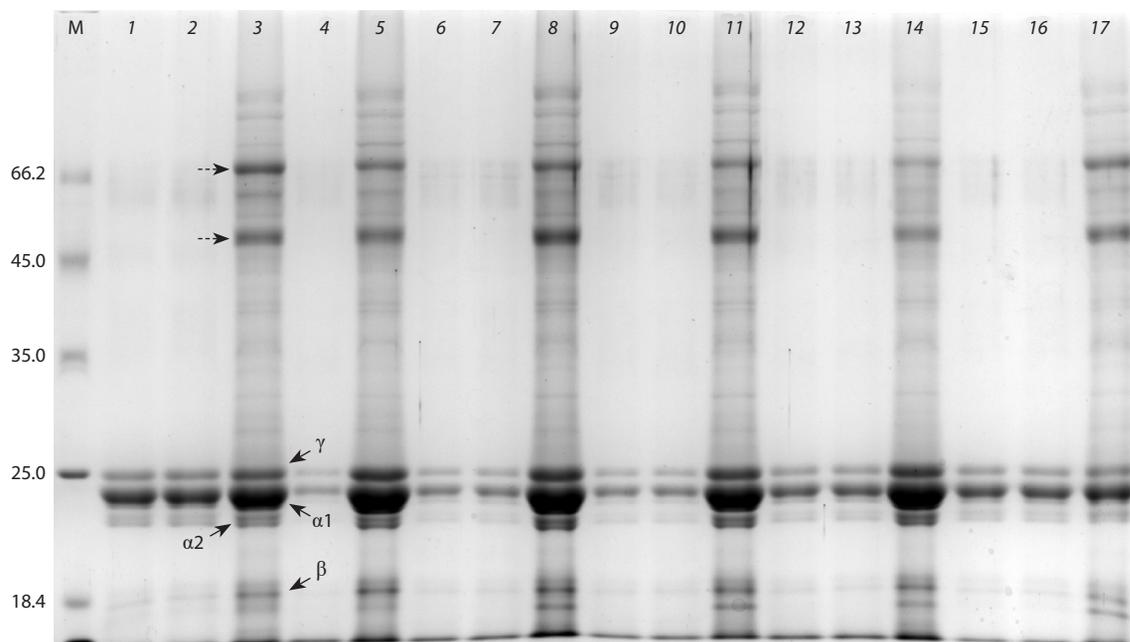


Рис. 3. SDS-электрофорез в ПААГ белков зерна исходного сорта Аванс и растений мутанта Аванс-1/18 после обработки пепсином.

1–3, 15–17 – исходный сорт Аванс; 4, 5 – T_1 190-4; 6–11 – T_2 184-1-8 (потомство 190-4); 6–8 – зерновки с мучнистым эндоспермом; 9–11 – зерновки с мучнистым эндоспермом с вкраплениями стекловидного эндосперма; 12–14 – T_2 184-1-7 (потомство 190-4) – зерновки с розовым мучнистым эндоспермом. 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 – после обработки муки пепсином; 3, 5, 8, 11, 14, 17 – без обработки пепсином (контроль). Позиции разных классов кафиринов отмечены стрелками. Пунктирными стрелками отмечены белки, относящиеся к фракции глобулинов.

Таблица 6. Проявление некоторых селекционно-ценных признаков в потомстве мутанта Аванс-1/18

Семья	Высота растения, см	Выдвинутость подметельчатого междоузлия, см	Масса 1000, г	Урожай зерна с метелки, г
Аванс	104.6 с	12.0 b	32.5 с	32.2 с
T_3 150 (от T_1 190-2) <i>ubi1</i> ⁺	91.6 ab	7.4 a	29.7 abc	24.6 a
T_3 151 (от T_1 190-3) <i>ubi1</i> ⁻	91.0 ab	7.4 a	31.8 bc	27.1 ab
T_3 152 (от T_1 190-4) <i>ubi1</i> ⁺	86.6 a	5.1 a	28.0 a	22.2 a
T_4 153 (от T_1 1-3) <i>ubi1</i> ⁺	97.9 bc	7.4 a	29.1 ab	26.0 b
<i>F</i>	10.764*	10.848*	3.446*	12.051*
HCP ₀₅	7.0	2.5	3.0	2.9

¹ Наличие конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* (по результатам ПЦР-анализа с праймерами на *ubi1*-интрон). Представлены средние от трех повторений. Данные, обозначенные разными буквами, значительно различаются при * $p < 0.05$ в соответствии с Тестом множественных сравнений Дункана.

ниже (9.2–9.4 %). Однако вопрос о влиянии числа копий конструкции для сайленсинга гена *gKAF1* на содержание белка в зерне требует дальнейших уточнений.

Анализ селекционно-ценных признаков. При выращивании растений T_1 на опытной делянке в полевых условиях в 2020 г. обнаружено, что эти растения отличаются сниженной высотой по сравнению с исходным сортом Аванс: 82.3 ± 1.7 и 100.8 ± 3.4 см соответственно ($p < 0.01$). Эти различия сохранились у растений поколения T_2 : 81.5–91.6 см в среднем для разных семей T_2 в сравнении с 104.1 см у исходного сорта ($p < 0.05$) (данные 2021 г.). В связи с этим для более детального исследования проявления основных селекционно-ценных признаков у

полученного мутанта поколение T_3 (потомство трех растений T_1 № 190-2, 190-3, 190-4, выращенных на опытной делянке), а также поколение T_4 (потомство растения T_1 № 1-3 из теплицы) выращивали в 2022 г. на опытной делянке в полевых условиях в 3-кратной повторности.

Обнаружено, что все изученные линии трансгенного происхождения, полученные на основе одного родительского мутантного растения T_0 , отличаются от исходного сорта Аванс пониженной высотой растения, укороченным подметельчатым междоузлем и более низким урожаем зерна с метелки (табл. 6). Такое снижение проявления этих признаков нами описано впервые у мутантов злаков, несущих конструкции для индукции РНК-сайленсинга ге-

нов проламинов. Однако оно вряд ли является следствием нецелевой экспрессии введенной нами генетической конструкции, поскольку у линии № 151 (потомство растения 190-3) эта конструкция элиминировалась, тогда как низкорослость и укороченность цветоножки сохранились. Такое изменение высоты растений и длины цветоножки может быть следствием как нецелевых эффектов экспрессии генетической конструкции для РНК-сайленсинга, которые хорошо известны и описаны в литературе (Jackson et al., 2003; Senthil-Kumar, Mysore, 2011), так и инсерционного мутагенеза в результате инсерции Т-ДНК в один из локусов, контролирующих высоту растений и длину цветоножки.

Подобные факты индукции мутаций в генах, кодирующих разные признаки растений, в результате инсерции Т-ДНК широко известны (Wilson et al., 2006; Deineko et al., 2007; Ram et al., 2019). В большинстве случаев такие инсерции ведут к делециям растительной ДНК, нарушающим функциональную активность генов. Ранее мутации низкорослости, в том числе в локусе, контролирующем синтез гиббереллина, участвующем в регуляции высоты растений, обусловленные инсерцией Т-ДНК, описаны у арабидопсиса (Feldmann et al., 1989; Chiang et al., 1995). По сорго сообщений о получении мутантов, индуцированных инсерцией Т-ДНК, в доступной литературе найти не удалось.

Масса 1000 зерен оказалась значимо снижена у двух линий, несущих конструкцию для РНК-сайленсинга (№ 152, 153). Очевидно, что такое снижение массы 1000 зерен – следствие модификации типа эндосперма, поскольку в рыхлом мучнистом эндосперме между крахмальными гранулами присутствуют воздушные полости. Примечательно, что у линии № 151 (потомство растения 190-3), у которой зерновки вследствие элиминации конструкции для РНК-сайленсинга имели обычный тип эндосперма с толстым стекловидным слоем, по этому признаку не было значимых отличий от исходного сорта Аванс. Отсутствие значимых различий между исходным сортом и линией № 150 также, возможно, объясняется наличием у этой линии гетерозиготных растений, на метелках которых присутствуют зерновки со стекловидным эндоспермом (см. табл. 3). Таким образом, снижение массы 1000 зерен – прямое следствие экспрессии конструкции для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*. Аналогичное снижение массы 1000 зерен описано у RNAi-мутантов сорго, полученных у африканского сорта P898012, несущих генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга двух генов γ -кафиринов, 27 и 50 кДа (Ndimba et al., 2017).

Такое снижение массы зерен не могло не вызвать снижения урожая зерна с метелки, которое наблюдалось у всех полученных нами трансгенных линий, и в связи с этим изменение данного признака также является следствием экспрессии введенной генетической конструкции. Вместе с тем падение урожая зерна может быть обусловлено также сниженной мощностью развития растений в результате инсерции Т-ДНК в один из локусов, контролирующих высоту растения, поскольку этот признак оказался также снижен у линии № 151, у которой конструкция для сайленсинга элиминировалась. Снижение урожая зерна

с метелки также может быть следствием инсерционного мутагенеза, индуцированного Т-ДНК.

Необходимо отметить, что наличие нескольких не сцепленных между собой копий генетической конструкции, интегрированных, по-видимому, в разные области генома, которые в силу эффекта положения генов могут различаться по влиянию на фенотипические признаки растений, открывает возможность для отбора линий, сочетающих улучшенную перевариваемость белков с нужным проявлением селекционно-ценных признаков. Так, обнаружена линия (№ 153, T₄ от T₁ 1-3), у которой высота растений и урожайность снижены на 5–6 %, тогда как уровень перевариваемости белков достигал 81 % (см. табл. 5). Данная линия в этом отношении может представлять более высокий интерес для практической селекции.

Заключение

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что генетическая конструкция для сайленсинга гена γ -кафирина сорго (*gKAF1*) представлена в геноме разных растений RNAi-мутанта Аванс-1/18 из поколений T₃ и T₄ в количестве 2–4 копий, которые, по-видимому, являются следствием двух независимых событий интеграции Т-ДНК. Эта конструкция стабильно наследуется и экспрессируется в поколениях T₃ и T₄, модифицируя текстуру эндосперма, улучшая перевариваемость белков зерна (до 81 % в сравнении с 52–59 % у исходного сорта) и повышая процентное содержание лизина (на 75 %). Вместе с тем зарегистрированы случаи нарушения целостности интегрированной Т-ДНК и элиминации генетической конструкции для сайленсинга. Трансгенные растения RNAi-мутанта сорта Аванс-1/18 характеризуются сниженной высотой растений, укороченным подметельчатым междоузлем, сниженной массой 1000 зерен и массой зерна с метелки. Отобрана линия (T₃) с высокой перевариваемостью белков эндосперма (81 %) и минимальным снижением селекционно-ценных признаков (на 5–7 %).

Список литературы / References

- Журавлев В.С., Долгих В.В., Тимофеев С.А., Ганнибал Ф.Б. Метод РНК-интерференции в защите растений от насекомых-вредителей. *Вестн. защиты растений*. 2022;105(1):28-39. DOI 10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219
- [Zhuravlyov V.S., Dolgikh V.V., Timofeev S.A., Gannibal F.B. RNA interference method in plant protection against insect pests. *Vestnik Zashchity Rastenij = Plant Protection News*. 2022;105(1):28-39. DOI 10.31993/2308-6459-2022-105-1-15219 (in Russian)]
- Aboubacar A., Axtell J.D., Huang C.P., Hamaker B.R. A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines. *Cereal Chem*. 2001;78(2):160-165. DOI 10.1094/CCHEM.2001.78.2.160
- Bharathi J.K., Anandan R., Benjamin L.K., Muneer S., Prakash M.A.S. Recent trends and advances of RNA interference (RNAi) to improve agricultural crops and enhance their resilience to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol. Biochem*. 2023;194:600-618. DOI 10.1016/j.plaphy.2022.11.035
- Borisenko N., Elkonin L., Kenzhegulov O. Inheritance of the genetic construct for RNA-silencing of the γ -kafirin gene (*gKAF1*) in the progeny of transgenic sorghum plants. *BIO Web Conf*. 2022;43: 03015. DOI 10.1051/bioconf/20224303015
- Casu R.E., Selivanova A., Perroux J.M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative

- PCR. *Plant Cell Rep.* 2012;31(1):167-177. DOI 10.1007/s00299-011-1150-7
- Chiang H.H., Hwang I., Goodman H.M. Isolation of the *Arabidopsis* *GA4* locus. *Plant Cell.* 1995;7(2):195-201. DOI 10.1105/tpc.7.2.195
- da Silva L.S. Transgenic sorghum: Effects of altered kafirin synthesis on kafirin polymerisation, protein quality, protein body structure and endosperm texture. Thesis. Pretoria: University of Pretoria South Africa, 2012
- da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R.N. Transgenic sorghum with altered kafirin synthesis: kafirin solubility, polymerization, and protein digestion. *J. Agric. Food Chem.* 2011a;59(17):9265-9270. DOI 10.1021/jf201878p
- da Silva L.S., Jung R., Zhao Z., Glassman K., Grootboom A.W., Mehlo L., O'Kennedy M.M., Taylor J., Taylor J.R.N. Effect of suppressing the synthesis of different kafirin subclasses on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. *J. Cereal Sci.* 2011b;54(1):160-167. DOI 10.1016/j.jcs.2011.04.009
- Deineko E.V., Zagorskaya A.A., Shumny V.K. T-DNA-induced mutations in transgenic plants. *Russ. J. Genet.* 2007;43(1):1-11. DOI 10.1134/S1022795407010012
- de Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J. Food Sci.* 2010;75(5):90-104. DOI 10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x
- Duressa D., Weerasoriya D., Bean S.R., Tilley M., Tesso T. Genetic basis of protein digestibility in grain sorghum. *Crop Sci.* 2018;58(6): 2183-2199. DOI 10.2135/cropsci2018.01.0038
- Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Fadeeva I.Yu., Bychkova V.V., Kozhemyakin V.V. *In vitro* protein digestibility in grain sorghum: effect of genotype and interaction with starch digestibility. *Euphytica.* 2013; 193:327-337. DOI 10.1007/s10681-013-0920-4
- Elkonin L.A., Domanina I.V., Ital'yanskaya Yu.V. Genetic engineering as a tool for modification of seed storage proteins and improvement of nutritional value of cereal grain. *Agricult. Biol.* 2016a;51(1): 17-30. DOI 10.15389/agrobiol.2016.1.17eng
- Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Y., Rakin A.L., Ravin N.V. Transgenic sorghum with improved digestibility of storage proteins obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016b;63(5):678-689. DOI 10.1134/S1021443716050046
- Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh. RNAi-mutants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench with improved digestibility of seed storage proteins. In: Jimenez-Lopez J.C. (Ed.). Grain and Seed Proteins Functionality. London: Intech Open Ltd., 2021;1-17. DOI 10.5772/intechopen.96204
- Feldmann K.A., Marks M.D., Christianson M.L., Quatrano R.S. A Dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science.* 1989;243(4896):1351-1354. DOI 10.1126/science.243.4896.1351
- Grootboom A.W., Mkhonza N.L., Mbambo Z., O'Kennedy M.M., da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R.N., Chikwamba R., Mehlo L. Co-suppression of synthesis of major α -kafirin sub-class together with γ -kafirin-1 and γ -kafirin-2 required for substantially improved protein digestibility in transgenic sorghum. *Plant Cell Rep.* 2014; 33(3):521-537. DOI 10.1007/s00299-013-1556-5
- Guo Q., Liu Q., Smith N.A., Liang G., Wang M.B. RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr. Genomics.* 2016;17(6):476-489. DOI 10.2174/1389202917666160520103117
- Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 2003;21(6): 635-638. DOI 10.1038/nbt831
- Kumar T., Dweikat I., Sato S., Ge Z., Nersesian N., Chen H., Elthon T., Bean S., Ioerger B.P., Tilley M., Clemente T. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol. J.* 2012;10:533-544. DOI 10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x
- Muhammad T., Zhang F., Zhang Y., Liang Y. RNA interference: a natural immune system of plants to counteract biotic stressors. *Cells.* 2019;8(1):38. DOI 10.3390/cells8010038
- Ndimba R.J., Kruger J., Mehlo L., Barnabas A., Kossmann J., Ndimba B.K. A comparative study of selected physical and biochemical traits of wild-type and transgenic sorghum to reveal differences relevant to grain quality. *Front. Plant Sci.* 2017;8:952. DOI 10.3389/fpls.2017.00952
- Nunes A., Correia I., Barros A., Delgadillo I. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52(7):2052-2058. DOI 10.1021/jf0348830
- 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(10): 5065-5070. DOI 10.1073/pnas.080076297
- Ram H., Soni P., Salvi P., Gandass N., Sharma A., Kaur A., Sharma T.R. Insertional mutagenesis approaches and their use in rice for functional genomics. *Plants.* 2019;8(9):310. DOI 10.3390/plants8090310
- Senthil-Kumar M., Mysore K.S. Caveat of RNAi in plants: the off-target effect. *Methods Mol. Biol.* 2011;744:13-25. DOI 10.1007/978-1-61779-123-9_2
- Smith N.A., Singh S.P., Wang M.-B., Stoutjesdijk P., Green A., Waterhouse P.M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature.* 2000;407(6802):319-320. DOI 10.1038/35030305
- Tesso T., Ejeta G., Chandrashekar A., Huang C.P., Tandjung A., Lewamy M., Axtell J., Hamaker B.R. A novel modified endosperm texture in a mutant high-protein digestibility/high-lysine grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Cereal Chem.* 2006;83(2):194-201. DOI 10.1094/CC-83-0194
- Wang L., Gao L., Liu G., Meng R., Liu Y., Li J. An efficient sorghum transformation system using embryogenic calli derived from mature seeds. *PeerJ.* 2021;9:e11849. DOI 10.7717/peerj.11849
- Wilson A.K., Latham J.R., Steinbrecher R.A. Transformation-induced mutations in transgenic plants: Analysis and biosafety implications. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2006;23:209-238. DOI 10.1080/02648725.2006.10648085
- Wong J.H., Lau T., Cai N., Singh J., Pedersen J.F., Vensel W.H., Hurkman W.J., Wilson J.D., Lemaux P.G., Buchanan B.B. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J. Cereal Sci.* 2009;49(1):73-82. DOI 10.1016/j.jcs.2008.07.013

ORCID

L.A. Elkonin orcid.org/0000-0003-3806-5697
N.V. Borisenko orcid.org/0000-0003-3543-9083
T.E. Pylaev orcid.org/0000-0002-2701-3333

O.A. Kenzhegulov orcid.org/0000-0002-1272-3105
S.Kh. Sarsenova orcid.org/0009-0007-2471-1631
N.Yu. Selivanov orcid.org/0000-0002-7438-0013
V.M. Panin orcid.org/0009-0007-2851-415X

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетной темы Федерального аграрного научного центра Юго-Востока FNWF-2023-0006 и государственного задания Минобрнауки России для Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр РАН», тема № 121031700141-7. ВЭЖХ-анализ аминокислотного состава белков муки проводили с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН, г. Саратов. qPCR-анализ копияности генетической конструкции выполнен на базе научно-производственного и образовательного центра молекулярно-генетических и клеточных технологий Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.08.2023. После доработки 25.09.2023. Принята к публикации 13.10.2023.