

## УЛУЧШЕНИЕ ВНУТРЕННЕЙ УСТОЙЧИВОСТИ СОИ К СТРЕССАМ ПУТЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЕНИЛПРОПАНОИДНОГО ЦИКЛА

О.И. Кершанская<sup>1</sup>, О.В. Зернова<sup>2</sup>, Д.С. Нелидова<sup>2</sup>, С.Н. Нелидов<sup>1</sup>, В.В. Лозовая<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Институт биологии и биотехнологии растений» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, [gen\\_o.kersh@mail.ru](mailto:gen_o.kersh@mail.ru)

**Аннотация.** Метаболизм фенилпропаноидов генерирует огромное количество вторичных метаболитов. Основная идея исследований – улучшение внутренней устойчивости сои к стрессам путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла, - а именно – введение в сою ключевых генов биосинтеза лигнина – компаунда, вовлеченного в широкий спектр физиологических процессов, участвующих в росте растений, обеспечивающих устойчивость клеточных стенок, - натурального механического барьера для проникновения микропатогенов.

**Ключевые слова:** *устойчивость к стрессу, фенилпропаноидный цикл, генетическая инженерия, улучшение, соя*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-921-925

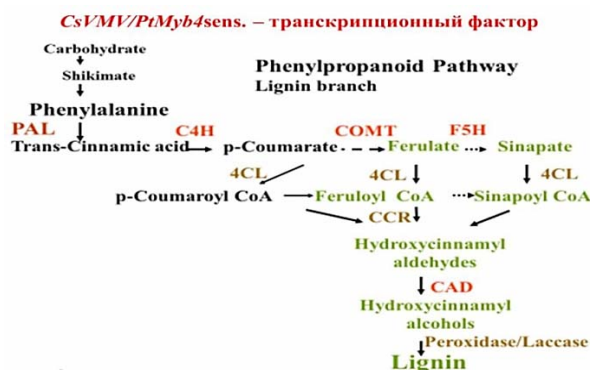
**Введение.** В мировом масштабе потери от болезней сои достигают 11-50% от валовой продукции. Улучшение генетических механизмов резистентности растений является экономичным и устойчивым средством управления болезнями. Попытки усилить природные защитные системы, такие как биосинтез лигнина, методами генетической инженерии могут помочь лимитировать колонизацию микропатогенов [Lozovaya, 2004, 2005]. Создание биотехнологических продуктов нового поколения связано с регулированием ключевых метаболических путей растения, результирующих в улучшении важнейших полигенных признаков, таких как урожай, фотосинтез, устойчивость к стрессам [Martino-Catt, 2008]. На сегодняшний день успехи в генетическом улучшении растений к действию стрессов связаны с манипуляцией одного или нескольких генов, вовлеченных в сигнальные/регуляторные пути, или кодирующие ферменты, вовлеченные в эти пути [Perez-Clemente, 2013]. Важнейшим метаболическим путем создания вторичных метаболитов в растении является фенилпропаноидный цикл. В общем, метаболизм фенилпропаноидов генерирует огромное множество вторичных метаболитов на основе нескольких промежуточных шикиматных циклов. В последние годы различные превосходные обзоры обобщают современные знания о структуре генов, вовлеченных в фенилпропаноидный цикл, в особенности, формирование лигнина и флавоноидов, регуляторные транскрипционные факторы, гормональный контроль путей жасмонатов или ауксинов и эволюции циклов генов первичного метаболизма [Vogt, 2010]. Актуальным многообещающим подходом к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам является повышение биосинтеза лигнина как естественного анти-микробного компаунда путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла.

Цель исследований: разработать подходы к улучшению природной устойчивости сои к биотическим стрессам и создать устойчивую сою путем генетической инженерии фенилпропаноидного цикла – повышения биосинтеза лигнина – натурального анти-микробного компаунда улучшения борьбы микро-патогенами, вызывающими болезни.

**Объекты и методы исследований.** 10 Казахстанских и сортов сои США, транскрипционный фактор лигнификации Cs/PtMYB4; ключевой ген биосинтеза лигнина – 35S/PAL5 (фенилаланин аммония лиазы); ген C<sub>4</sub>H/F<sub>5</sub>H, кодирующий важнейший продукт лигнификации – ферулат-5-гидроксилазу; ген 35S/CAD1,

кодирующий циннамил алкоголь дегидрогеназу; ген анти-окислительного стресса 35S/FeSOD (Fe-зависимой супероксиддисмутазы). Методы молекулярного клонирования генов; оптимизированная биотехнология *A. tumefaciens*-mediated germ-line генетической трансформации сои; методы молекулярного подтверждения интродукции генов в геном трансгенной сои в первом T<sub>1</sub> и втором T<sub>2</sub> поколениях – ПЦР, РТ-ПЦР, Саузерн и Нозерн блот анализы; скрининг на антибиотики, морфологический анализ, анализ структуры урожая, методы определения содержания и состава лигнина; метаболический профайлинг.

**Основные результаты и их новизна.** Созданы и применены в генетической трансформации сои генетические конструкции транскрипционного фактора *Cs/MYB4 sens* и основных генов лигнификации: *35S/PAL5*, *C<sub>4</sub>H/F<sub>5</sub>H*, *35S/CAD1*, а также гена антиокислительного стресса – *FeSOD* (рис. 1).



**Рис. 1. Семейство транскрипционного фактора лигнификации MYB.**

Оптимизирована биотехнология *A. tumefaciens* mediated germ-line генетической трансформации растений сои (рис. 2) [Кершанская, 2012, 2015]. Биотехнология включает в себя: а – процесс пипетирования рыльца пестика цветка суспензией агробактерий *A. tumefaciens* с целевыми генами; б – маркирование обработанных цветков цветными нитями; в – изучение схемы стадий развития цветка сои и его элементов; д-ф – исследование анатомо-морфологической характеристики опыления цветка сои: д – рыльце пестика выпускает вещества, которые привлекают и стимулируют созревание пыльцы, 9:00 утра; е – пыльца соединяется с рыльцем пестика и начинается ее прорастание, 9:15 утра; ф – прорастание пыльцевых трубок внутрь пестика цветка к зиготе, 9:30 утра.



**Рис. 2. Отработка техники *A. tumefaciens*-mediated germ-line генетической трансформации сои.**

Разработанная биотехнология использована для интродукции ключевых генов биосинтеза лигнина и получения растений сои  $T_0$  с эффективностью формирования бобов 90% от числа трансформированных семян. Проведен скрининг предположительно трансгенных растений на антибиотики с эффективностью около 20%. Получены и подтверждены методами ПЦР и РТ-ПЦР трансгенные растения сои первого поколения  $T_1$  с встроенными в геном генами лигнификации с эффективностью трансформации 5,6% [Kerhanskaya, 2015].

Получены из трансгенов первого поколения и подтверждены методами мультиплексного ПЦР (рис. 3), Саузерн (рис. 4) и Нозерн блот гибридизации трансгенные растения сои второго поколения  $T_2$  с встроенными в геном генами лигнификации с эффективностью трансформации 50-75%. В трансгенных линиях показана активизация ферментов, кодируемых встроенными генами.

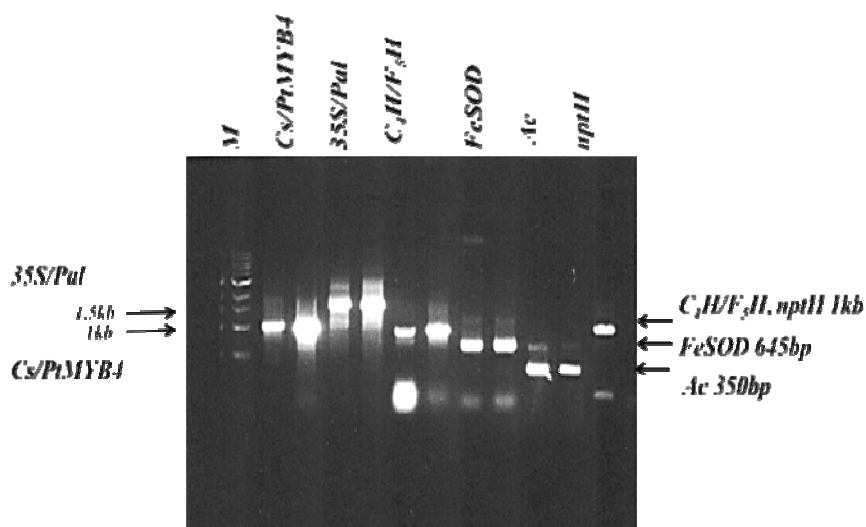


Рис. 3. ПЦР - анализ плазмидной ДНК генетических конструкций генов *Cs/PtMYB4sens.*, *35S/Pal5*, *C<sub>4</sub>H/F<sub>5</sub>H*, *FeSOD*, *Ac*, *nptII*.

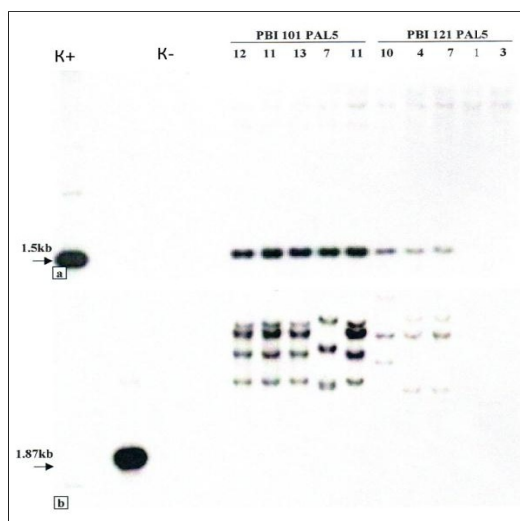
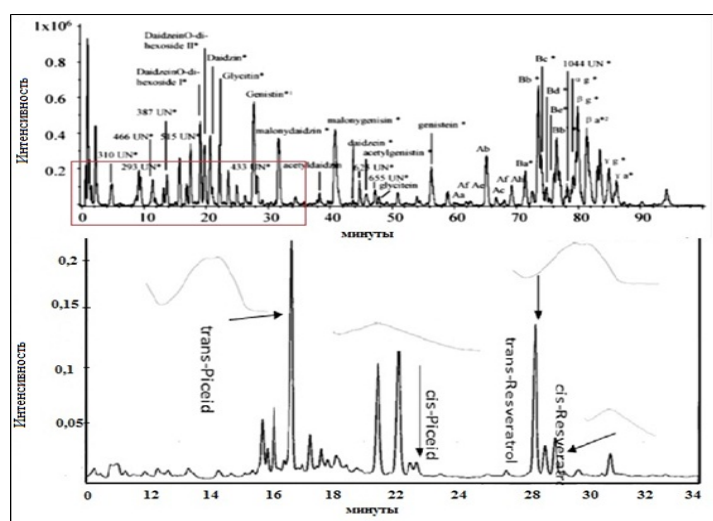


Рис. 4. Саузерн-блот анализ трансгенных растений сои с геном 35S/PAL5.

Подтверждены биохимические изменения содержания лигнина – основного природного барьера для борьбы растений с инфицированием микропатогенами. Подтверждено изменение состава мономеров лигнина – увеличение % содержания

сирингила (S) и/или глицила (G), в связи с активизацией экспрессии встроенных генов. Методом высокоточной жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим анализом (HPLC-ESI-MS), получены типичная суммарная ионная хроматограмма листьев растения сои (а) и HPLC хроматограмма экстрактов листьев трансгенных растений сорта сои Spencer (b), трансформированных отсутствующими у сои генами *Cs/PtMYB4 sens.* и *Cs/PtAhRS3 sens.* под промотором CsVMV (рис. 5). У трансгенов выявлены дополнительные пики trans-Piceid, cis-Piceid, trans-Resveratrol и cis-Resveratrol. Метаболический профайлинг трансгенных растений сои показал изменение состава и увеличение содержания важнейших метаболитов фенилпропаноидного цикла: флавонолов, фенольных кислот, генистина и сапонинов – антиоксидантов, участвующих в защите растений от биотических стрессов.



**Рис. 5. Ионная хроматограмма метаболитов трансгенных и исходных растений сои.**

Можно заключить, что осуществлен переход от Геномики к Метаболомике путем улучшения важнейшего метаболического процесса – фенилпропаноидного цикла в растениях сои методами генетической инженерии для повышения устойчивости к биотическим стрессам – болезням, вызываемым микрорганизмами.

#### Литература

- Кершанская О.И., Дидоренко С.В., Есенбаева Г.Л. Патент 25950 РК. Способ germ-line генетической трансформации сои. Оpubл. 15.08.2012, Бюл. № 8. – 8 с.
- Kershanskaya O.I., Abdulzhanova M.A., Esenbaeva G.L., Nelidova D.S., Zernova O.V., Lozovaya V.V., Widholm J.M. Improvement of inner soybean diseases resistance by genetic engineering of phenylpropanoid cycle: molecular detection of transgenic plants // *Biotechnology. Theory and practice.* – 2015. – No. 1. – P. 35-47.
- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Hartman G.L., Widholm J.M. Biochemical response of soybean roots to *F. solani* f. sp. *Glycines* infection // *Crop Sci. J.*–2004. – V. 44.–P. 819–826.
- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Widholm J.M. Genetic engineering of plant; disease resistance by modification of the phenylpropanoid pathway // *Plant Biosystems J.*– 2005. – V. 139. – P. 20–23.
- Martino-Catt S.J., Sachs E.S. The Next Generation of Biotech Crops // *Plant Physiology.* – 2008. – V. 147, No. 1. – P. 3–5.
- Perez-Clemente R.M., Vives V., Zandalinas S.I., Climent M.F. Biotechnological approaches to study plant responses to stress // *BioMed Res. International.* – 2013. – P. 10–25.
- Vogt T. Phenylpropanoid Biosynthesis // *Mol. Plant.* – 2010. – No. 3. – P. 2–20.

## IMPROVEMENT OF SOYBEAN INNATE RESISTANCE TO STRESS THROUGH GENETIC ENGINEERING OF PHENYLPROPANOID CYCLE

O.I. Kershanskaya<sup>1</sup>, O.V. Zernova<sup>2</sup>, D.S. Nelidova<sup>2</sup>, S.N. Nelidov<sup>1</sup>, V.V. Lozovaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup>University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, [gen\\_o.kersh@mail.ru](mailto:gen_o.kersh@mail.ru)

**Abstract.** Phenylpropanoid metabolism generates an enormous array of secondary metabolites based on the few intermediates of the shikimate pathway as the core unit. The main idea of our research is to improve soybean innate resistance to stresses via genetic engineering of the phenylpropanoid pathway, namely – introduction into soybean key genes involved in lignin biosynthesis, – the compound that is assigned to a broad range of physiological processes participating in plant growth, providing the rigidity to the cell walls, the natural mechanical barrier and defense against pathogen penetration.

**Keywords:** *stress resistance, phenylpropanoid cycle, genetic engineering, improvement, soybean*