

УДК 581.132: 576.3: 633.11

О.И. КЕРШАНСКАЯ, Е.В. НИСТОР, Л.А. СКВОРЦОВА, А.С. НУРМАГАМБЕТОВА

## АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИСТА ТРАНСГЕННОЙ ПШЕНИЦЫ С ИНТРОДУЦИРОВАННЫМ ГЕНОМ ФЕПК

*(Институт биологии и биотехнологии растений  
Национального центра биотехнологии РК)*

Определены изменения анатомической структуры листа  $C_3$  растения пшеницы в связи с интродукцией гена ФЕПК: хлоропласти занимают пристеночное положение; клетки обкладки – округлой формы, начинают оформляться в упорядоченные кольцеобразные структуры (Kranz), схожие с таковыми у  $C_4$  кукурузы; клетки мезофилла приобретают концентрическое расположение вокруг обкладки и проводящих пучков. Обнаружено 7 трансгенных линий пшеницы с урожаем зерна, на 25 – 50 % превосходящим урожай исходных форм. Получено около 1000 предположительно трансгенных семян пшеницы нового урожая с геном ФЕПК. Представлена схема простоявшей  $C_4$  – подобной системы метаболизма углерода  $C_4$  типа у трансгенов пшеницы.

Генетические модификации фотосинтеза, основанные на методах генетической инженерии, посредством введения генов, кодирующих ферменты  $C_4$  метаболизма из кукурузы в пшеницу, являются первым шагом к трансформации пшеницы на повышение ее урожайности до 30% и созданию новых форм, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Исследования в данном направлении чрезвычайно перспективны, так как они развиваются не только методами современных рекомбинантных ДНК технологий в Казахстане и способствуют переходу селекции и сельскохозяйственных технологий на уровень развитых в мире биотехнологий, но и являются началом развития метаболической инженерии и исследований метаболомикса.

Разрабатываемый нами подход к модификации фотосинтеза у пшеницы путем последовательного введения генов, кодирующих ферменты  $C_4$  метаболизма, является научно значимым, так как он открывает возможности генетической манипуляции физиологическими процессами для повышения продуктивности у основной стратегической продовольственной культуры – пшеницы, методами генетической инженерии.

Впервые получены предположительно трансгенные формы пшеницы с повышенной функцией  $C_4$  специфических реакций фотосинтеза и увеличением урожайности в сравнении с исходными формами – существующими сортами. Было показано, что трансгенные растения пшеницы с интродуцированным геном ФЕПК демонстриру-

ют повышение экспрессии белка – активности фермента фосфоенолпирват карбоксилазы (в 4–6 раз), увеличение интенсивности фотосинтетического газообмена листьями (до 17% у большинства растений), снижение доли фотодыхания в фотосинтетическом поглощении  $\text{CO}_2$  [1-3]. Активизация фотосинтетической функции у трансгенных растений пшеницы связана с повышением устьичной проводимости и увеличением концентрации межклеточной  $\text{CO}_2$ , обусловленной открытием устьиц. Результатом повышения концентрации внутриклеточной  $\text{CO}_2$  является увеличение фиксации  $\text{CO}_2$  из атмосферы и подавление оксигеназной активности РБФК и фотодыхания. Иными словами, впервые была доказана уникальная возможность активизации фотосинтетической функции у трансгенных растений пшеницы вследствие введения в пшеницу гена ФЕПК из  $C_4$  кукурузы.

В связи с этим актуальным и перспективным представлялось проведение исследований изменений анатомической структуры листа – появление признаков Кранц анатомии в трансгенных растениях пшеницы при модификации фотосинтеза от  $C_3$  к  $C_4$  типу в результате введения гена ФЕПК.

**Цель исследований:** определить особенности анатомической структуры фотосинтетического аппарата  $C_3$ ,  $C_4$  типа и проявление синдрома  $C_4$  Кранц анатомии листа при модификации фотосинтеза у трансгенной пшеницы с геном ФЕПК.

**Растительный и генетический материал.**

В исследованиях использованы 5 генотипов яровой пшеницы селекции Северо-Запада США и 15 генотипов яровой и озимой пшеницы Казахстанской селекции с контрастными характеристиками фотосинтеза, продуктивности и засухоустойчивости. Ген фосфоенолпируват – карбоксилазы (ФЕПК) из кукурузы использован из лаборатории профессора М. Ку, Университет Штата Вашингтон, США [4-5].

Ген ФЕПК из кукурузы представляет собой фрагмент 8,8 kb, состоящий из последовательности экзонов, инtronов, промотора (от 1212) и терминатора (около 2,5 kb) [4]. В качестве селективных маркеров генная конструкция содержит NPTII и НТРII гены устойчивости к антибиотикам канамицин и гигромицин соответственно. Регуляторными элементами, входящими в конструкцию гена ФЕПК, также являются 35S промотор, 35S терминатор и NOS – терминатор. Проба А используется для анализа Southern гибридизации и является EcoRI фрагментом размером 1.0 кб. Е и В индуцируют EcoRI и BamHI стороны соответственно [2, 4]. C<sub>4</sub> фотосинтетический ген, кодирующий ключевой фермент C<sub>4</sub> фотосинтеза – ФЕПК из кукурузы, был интродуцирован в пшеницу с высоким уровнем экспрессии фотосинтетической функции [1-3].

**Функция гена ФЕПК:** фосфоенол пируват карбоксилаза, функция ФЕПК:

(цитоплазма)



Трансгенные растения пшеницы получены д.б.н. Кершанской в результате предварительных совместных исследований с проф. М. Ку в WSU, USA, а также в результате выполнения проектов РНТП и ФИ, 2006 – 2008гг.

**Методы.** Получение семян трансгенных растений пшеницы осуществлено методом агробактериального пипетирования [1, 6]. Скрининг 1927 предположительно трансгенных семян пшеницы на устойчивость к антибиотику гигромицину, входящему в конструкцию гена ФЕПК в качестве селективного маркера, проведен по методам [1 – 3] с учетом разработанного нами способа многоэтапного скрининга семян пшеницы [2].

Полученные трансгенные растения пшеницы использованы в исследованиях для определения анатомической структуры листа пшеницы по

методам [7 – 9] и анализа признаков проявления C<sub>4</sub> Кранц анатомии листа. Анатомические срезы листьев изготовлены на микротоме. Освоены методы фиксации растительного материала для определения анатомической структуры листа. Проведены кратковременная и долгосрочная фиксация анатомических срезов в 70% этаноле и глицерине [10 – 11]. Подготовлено 58 временных препаратов, содержащих 160 срезов.

Микроскопический анализ анатомической структуры листа пшеницы и кукурузы проведен на световом микроскопе марки ZEISS AXIOSCOP 40 HBO100, совмещенном с компьютером, с использованием программы Zoom Browser EX, на камере Canon PC 1145 с фотонасадкой Canon A 610/A 620. Исследованы анатомические срезы листьев пшеницы 27 предположительно трансгенных линий, исходных форм пшеницы и кукурузы [9, 12 - 13]. Лучшие срезы сфотографированы, получено около 100 фото, увеличение – 150 раз. Сравнительные анатомические исследования листа предположительно трансгенных линий пшеницы и исходных форм проведены также на флуоресцентном микроскопе Hitachi H-600 (Hitachi Scientific Instruments, Nissei Sangyo America, USA) на срезах с серебряным окрашиванием [14]. Морфометрические измерения анатомических структур срезов пшеницы и кукурузы проведены на микроскопе МБИ – 3 с винтовым окуляром - микрометром при увеличении в 40 раз с ценой деления объектива – 51,2. Сравнительный анализ анатомической структуры листа: исходных форм, трансгенных растений пшеницы с геном ФЕПК и кукурузы – источника гена ФЕПК, проведен методами [14 – 15].

Трансгенные растения F<sub>1</sub> и исходные формы выращивали до фазы полной спелости в условиях фитotronа и на приусадебном участке ИББР НЦБ РК. Проводили уборку, анализ структуры урожая, сравнительный морфологический анализ семян исходных форм пшеницы и предположительно трансгенных семян пшеницы T<sub>0</sub>. Анализ элементов структуры урожая у предположительно трансгенных и исходных форм пшеницы проведен по методике ВИР в нашей модификации [16].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Известно, что строение листьев C<sub>3</sub> и C<sub>4</sub> – растений имеет четкие анатомические и ультраструктурные различия. В соответствии с рисун-

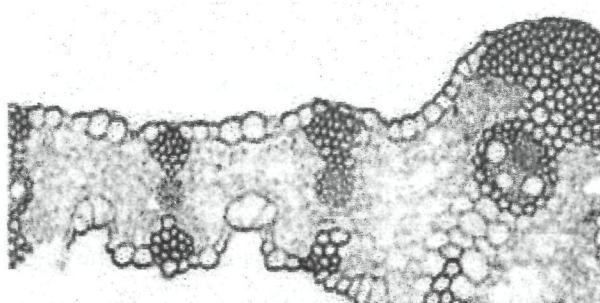


Рис. 1. Анатомический срез листа C<sub>3</sub> злаковых культур

ком 1, у злаковых культур с C<sub>3</sub>-типом фотосинтеза, включая исходные формы пшеницы, сосудистые пучки окружены двумя обкладками. Внутренняя «местомная» обкладка почти или совсем не содержит хлоропластов, имеет утолщенные клеточные стенки и заменяет собой опорные элементы, отсутствующие в сосудистом пучке. Она окружена второй обкладкой из паренхимных клеток, содержащих немного хлоропластов, которые иногда мельче, чем в мезофилле. Клетки обкладок пучка не играют существенной роли в фотосинтетической ассимиляции и метаболизме CO<sub>2</sub>. Углекислота фиксируется в клетках мезофилла, а хлоропласты хлорофилла синтезируют крахмал. Показано, что срезы листьев разных ярусов исходных форм пшеницы, используемых для трансформации, содержат традиционные анатомические структуры: наружную ткань – эпидермис с устьицами, ассимиляционную ткань – паренхиму или мезофилл, проводящую ткань – сосудистые пучки и механическую ткань.

Мезофилл – основная ткань листа с межклетниками и многочисленными хлоропластами, – наиболее приспособлен для фотосинтеза. Мезофилл состоит из тонкостенной ассимилирующей

ткани, которая содержит хлоропласты. Крахмальные зерна находятся в двух-трех рядах клеток основной ткани внутренней стороны ксилемного пучка. Мезофилл листа пронизан многочисленными проводящими пучками, или жилками, непосредственно связанными с проводящей системой стебля. У пшеницы множество жилок примерно равного размера проходили вдоль листа параллельно друг другу – параллельное жилкование. У некоторых сортов имелось незначительное ветвление основных жилок – параллельно-нервное жилкование. Проводящие пучки разделялись на мощные, тонкие и поперечные тонкие пучки. Главную роль в транспорте ассимилятов из клеток мезофилла играют мощные пучки.

Проводящие ткани жилок редко граничат с межклетниками мезофилла. Крупные жилки окружены паренхимой, содержащей мало хлоропластов, в то время как мелкие – одним или более слоями расположенных клеток, образующих обкладку проводящего пучка. Клетки обкладки обычно неодинаковы по форме, крупных размеров, выстилают и полностью изолируют проводящий пучок. Все пучки коллатеральные с ксилемой, которая направлена к верхней поверхности пластинки, и флоэмой – к нижней. В ксилеме сильных пучков имелось 1 или 2 сосуда с диаметром около 20 микрон, с кольчатыми или спиральными утолщениями. В более тонких пучках сосудов было мало или они отсутствовали. Вокруг сосудистых пучков расположена механическая ткань, состоящая из склеренхиматических волокон.

В соответствии с рисунком 2.I, у контрольных растений пшеницы клетки мезофилла и обкладки не имели строгого упорядоченного концент-

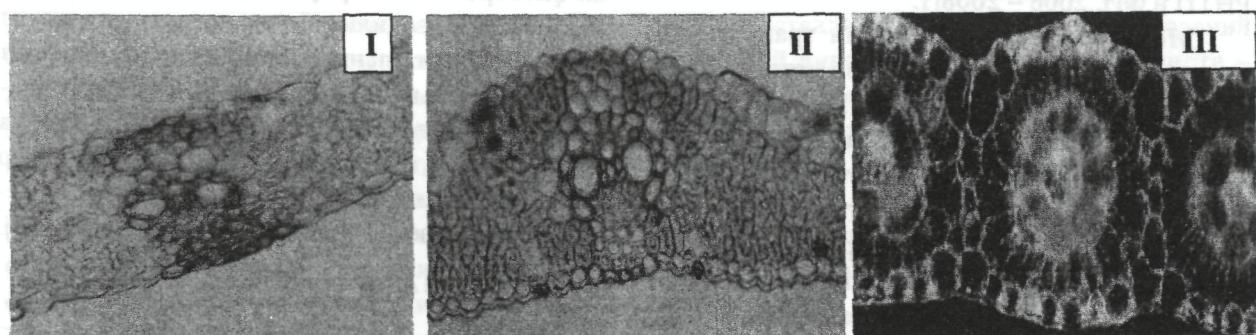


Рис. 2. Анатомические срезы листьев 7 яруса исходного сорта Houis (I), трансгенной линии Houis-19 с геномом ФЕПК из кукурузы (II) и листьев 9 яруса кукурузы (III)

рического расположения. Клетки паренхиматозной обкладки содержали некрупные хлоропласты и при небольшом увеличении казались пустыми и светлыми. Важно отметить, что клетки мезофилла и обкладки листа совершенно не были упорядочены. Мезофилл не соприкасался с клетками обкладки в конкретном радиальном положении, а хлоропласты были рассеяны по клетке мезофилла.

$C_4$  кукуруза характеризовалась высокоспециализированной анатомической структурой, соответствующей  $C_4$  пути фиксации и метаболизма  $CO_2$  (рисунок 2, III). Листовая пластинка  $C_4$ -растения кукурузы с обеих сторон была покрыта слоем слегка удлиненных клеток эпидермиса. Они, как правило, были крупнее на верхней стороне листа. Наружные стенки клеток были слабо утолщены и размещены перпендикулярно поверхности. Кутину обычно толще на адаксиальной стороне листовой пластинки. Среди основных клеток эпидермиса различали устьица, регулирующие газообмен растения. Строение клеток и устьичного аппарата кукурузы было аналогично таковому у  $C_3$ -пшеницы. Также на адаксиальной стороне листа кукурузы через равные промежутки встречались моторные клетки (двигательные, водозапасающие, водонасосные).

Основу листовой пластинки составляет мезофилл, в его толщу погружена сеть проводящих пучков. Губчатая ткань мезофилла образована близкими по форме клетками: круглыми, овальными и очень редко неправильной формы. Вся ткань пронизана крупными сообщающимися межклетниками. Обычно листья  $C_4$ -растений характеризуются особым расположением клеток мезофилла вокруг слоя больших клеток обкладки. Клетки мезофилла расположены в виде венца вокруг клеток обкладки и, соответственно, вокруг проводящих пучков. Причем, каждая клетка мезофилла в радиальном направлении соприкасалась с соответствующей клеткой обкладки, одна из клеток оставалась вне такого контакта.

Фотосинтез  $C_4$  типа начинается в клетках мезофилла и завершается в клетках обкладки проводящих пучков. В средней части мезофилла пронизан проводящими пучками. Они окружены тканями и образуют жилки. Крупные жилки содержат несколько проводящих пучков. Проводящие пучки лишены камбия и являются закрытыми, коллатеральными. Строение проводящих пуч-

ков типично для злаковых растений. У некоторых  $C_4$ -растений хлоропласты клеток мезофилла имеют хорошо развитые грани, в то время как в клетках обкладки грани развиты слабо или отсутствуют совсем. Кроме того, в хлоропластах клеток обкладки во время фотосинтеза, как правило, образуются более крупные и многочисленные зерна крахмала, чем в хлоропластах мезофилла [17 - 18].

Вокруг проводящих пучков расположены клетки паренхимной обкладки. Они обычно округлой формы, плотно прижаты друг к другу. Их клеточная оболочка толще, чем у мезофильных клеток, а сами клетки – крупнее. Клетки обкладки богаты органеллами, грани крупных темно-зеленых хлоропластов уменьшены или вообще отсутствуют. Эти хлоропласты способны синтезировать большие количества крахмала при нормальной длительности освещения. Располагаются они также в виде венка вокруг проводящих пучков. Таким образом, клетки обкладки и мезофилла образуют два концентрических слоя вокруг сосудистого пучка. Эта кольцеобразная организация клеток получила название Кранц – анатомии [14 – 15, 17-18].

Проведено микроскопическое исследование анатомических срезов листьев пшеницы и сравнительное описание их анатомического строения у 27 предположительно трансгенных линий. В соответствии с рисунком 2. II, анализ анатомии листьев разных ярусов у предположительно трансгенных растений пшеницы  $T_1$  и  $T_2$  показывает, что в результате введения гена ФЕПК начинает существенно меняться величина и организация структурных элементов и происходит образование черт  $C_4$  Кранц анатомии листа.

Определение особенностей анатомической структуры листа  $C_3$  растений пшеницы в связи с интродукцией  $C_4$  гена ФЕПК показало, что у линии Houis 20  $T_1$ , хлоропласты занимали пристеночное расположение в отличие от исходной формы, где хлоропласты занимали весь объем клетки, что обеспечивает этой линии некоторые преимущества в потреблении световой энергии. Утолщены стенки клеток эндодермы проводящей ткани, окружающей проводящие пучки, что может быть связано с началом реорганизации тканей обкладки по  $C_4$ -типу. Механическая ткань мелких проводящих пучков вообще была не развита (линии Houis 20, 21) или слабо развита у ли-

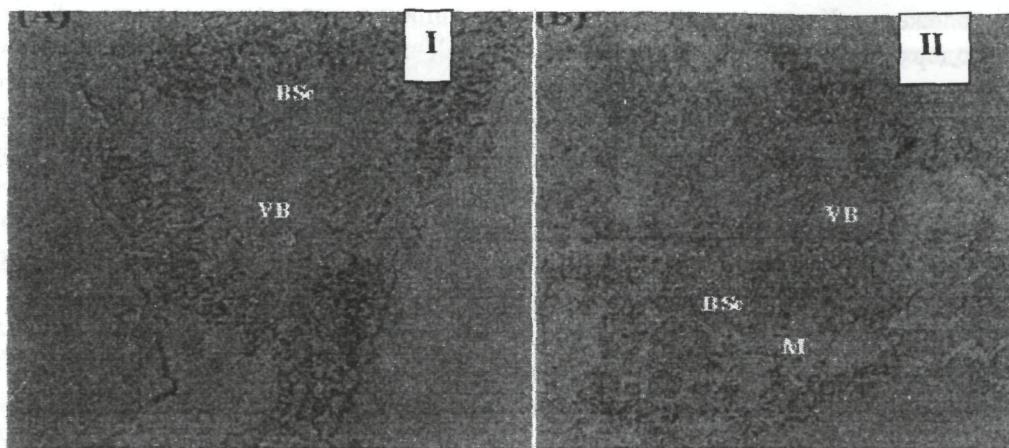


Рис. 3. Исходная форма (I) и трансгенная линия (II) пшеницы сорта Houis под флуоресцентным микроскопом Hitachi H-600, США

нии Houis 6 ( $T_2$ ). Клетки обкладки предположительно трансгенных линий были округлой формы, в отличие от овальных клеток обкладки исходной формы. Клетки обкладки в листьях верхних ярусов у трансгенных линий Houis 6, 19, 26, 49,  $T_1$ , зафиксированных в конце фазы трубкования, начинали оформляться в упорядоченные кольцеобразные структуры, значительно более схожие с таковыми у  $C_4$  растений, чем у исходных форм.

Как видно из рисунка 3, получены уникальные снимки изменения анатомической структуры листа в результате интродукции гена ФЕПК в пшеницу под флуоресцентным микроскопом Hitachi H-600, США. В контролльном растении клетки мезофилла и обкладки едва различимы, расположены хаотично. В трансгенной линии (справа) клетки обкладки увеличиваются и приобретают крупные размеры. Клетки мезофилла начинают упорядочиваться вокруг «венка» клеток обкладки и соединяются с ними наподобие двух концентрических кругов, характерных для  $C_4$  растений.

Можно предположить, что интродукция  $C_4$  гена ФЕПК приводит как к анатомическому, так и к функциональному разделению клеток у трансгенной пшеницы на клетки внутриклеточной помпы  $\text{CO}_2$  (мезофилл), а клетки обкладки начинают выполнять роль биохимических фабрик по метаболизму углерода. Возможно, интродукция внутриклеточной помпы  $\text{CO}_2$  в пшеницу поможет повысить эффективность  $C_3$  фотосинтеза за счет значительного подавления фотодыхания. Поскольку ферменты  $C_4$ -цикла присутствуют в  $C_3$  растениях, хотя и с наименьшей активностью, интродукция индивидуальных генов  $C_4$ -цикла

может совершенно изменить не только первичный метаболизм, но в конкретных случаях – также вторичный метаболизм, и анатомию листа. Возможно также, что активизируется  $C_4$  метаболизм в клетках одного типа мезофилла.

Для обоснования выдвинутых предположений приведем данные о нескольких открытиях в области  $C_3$  –  $C_4$  промежуточного типа фотосинтеза. Недавние исследования дискриминации углерода  $^{13}\text{C}$ , при активности ФЕПК, сравнимой с активностью РБФКО, что способствует переходу  $^{13}\text{CO}_2$  в  $^{12}\text{CO}_2$ , в сочетании с анатомическими исследованиями выявили, что наземный галофит с суккулентными листьями, адаптированный к полусубстратным условиям *Borszczowia aralocaspica* способен к  $C_4$  метаболизму в клетках одного типа [18]. Он содержит 2 типа хлоропластов с растворимыми ферментами, которые способны синтезировать крахмал. Иммунолокализация белков ферментов выявила, что РБФКО локализована в хлоропластах на базальной части клеток хлоренхимы, близко к сосудистым пучкам, а ФПДК локализована в хлоропластах удаленных частей клетки, близко к межклеточному воздушному пространству. Подобно РБФКО, НАД МЕ, действующий как декарбоксилирующий фермент, также более обилен в митохондриях на базальной части клеток хлоренхимы. ФЕПК равномерно распределена в цитозоле [14]. Растения с Crassulacean acid metabolism (CAM) также демонстрируют механизм концентрации  $\text{CO}_2$  в одной клетке.

Попытки интродуцировать механизм концентрации  $\text{CO}_2$  в одной клетке для наземных  $C_3$  растений, включая зерновые злаки, прогрессируют

Таблица 1. Морфометрия листа пшеницы и кукурузы

Диаметр клеток эпидермиса, мкм		Ширина листовой пластинки, мкм		Моторные клетки, мкм	Проводящие пучки, мкм	
нижний	верхний	область проводящих пучков	межреберная область		сосудистые пучки	клетки обкладки
Houis контроль, 7лист, 3 пучка, в среднем 6,7 клеток вокруг пучка						
11,80	10,56	70,17	90,29	17,08	64,39 – 61,22	18,66 – 13,77 овальные
Трансген Houis PC49 H25, T <sub>1</sub> , 7й лист, 7 пучков, в среднем 7,14 клеток обкладки вокруг пучка						
13,25	12,85	91,48	105,74	16,01	72,46 – 66,34	14,96 – 12,79 округлой формы
Houis PC 19 H25, T <sub>1</sub> , 7й лист, 2 пучка, в среднем 11,0 клеток вокруг пучка						
11,79	11,36	66,17	90,02	21,25	97,95 – 80,17	15,18 – 13,83 округлой формы
Zea maize, 9лист, 9 сосудистых пучков, в среднем 5,2 клетки обкладки вокруг пучка						
17,43	17,75	86,87	85,46	34,18	65,15 – 59,12	16,74 – 16,64 округлой формы

во всем мире через трансгенный подход [4 – 5, 18]. Показан прогресс в одинарном, двойном и многократном повышении активности ферментов C<sub>4</sub> – цикла в C<sub>3</sub> зерновых. Очень высокий уровень экспрессии был получен на трансгенном рисе [4]. Однако анатомических данных о злаках, полученных трансгенным путем, очень мало. То есть возможны разные механизмы активизации фотосинтеза за счет изменения анатомической структуры листа при создании трансгенной пшеницы с интродуцированными генами ферментов C<sub>4</sub> – типа метаболизма.

Морфометрические измерения анатомических структур срезов позволили подтвердить выявленные особенности проявления синдрома C<sub>4</sub> Кранц анатомии листа у трансгенов пшеницы (таблица 1).

Показано, что наибольшие отличия трансгенных линий от контроля отмечено по диаметру клеток верхнего и нижнего эпидермиса, области проводящих пучков, размеру моторных клеток, и наиболее значительно, – по диаметру проводящих пучков. Трансгены приближались к кукурузе по величине моторных клеток, диаметру клеток эпидермиса, окружной форме клеток обкладки, но имели меньший их размер в сравнении с кукурузой и контролем. Размер сосудистых пучков трансгенов был значительно больше, чем у кукурузы и пшеницы. В листьях от 1го до 7го яру-

сов наблюдали изменения, касающиеся кутинизации клеток эпидермиса, склерификации проводящих пучков, количества их типов, сокращения эпидермальных выростов.

Концентрическое расположение хлоренхимы вокруг пучка, или «кранц – синдром», необходим для функционирования C<sub>4</sub> фотосинтеза. ФЕП – карбоксилаза фиксирует CO<sub>2</sub> в цитоплазме клеток мезофилла с образованием оксалоацетата, который затем восстанавливается до малата или трансаминируется до аспартата. Эти соединения передвигаются в клетки обкладки пучка, подвергаются декарбоксилированию, и образовавшаяся CO<sub>2</sub> вновь фиксируется РБФКО. Первоначальная фиксация ФЕП – карбоксилазой в клетках мезофилла представляет собой механизм концентрирования CO<sub>2</sub> в клетках обкладки для ингибирования оксигеназной активности РБФКО. Поэтому РБФКО эффективно работает даже при низких концентрациях CO<sub>2</sub> в межклетниках мезофилла. То есть анатомическое разделение клеток обкладки и мезофилла обусловливает функциональные особенности C<sub>4</sub> метаболизма и обеспечивает адаптацию C<sub>4</sub> растений к засухе, высокой интенсивности света, повышенной концентрации CO<sub>2</sub>, высокой урожайности.

В соответствии с рисунком 4, простейшая C<sub>4</sub> – подобная искусственная система метabolизма углерода по C<sub>4</sub> пути у трансгенов пшеницы

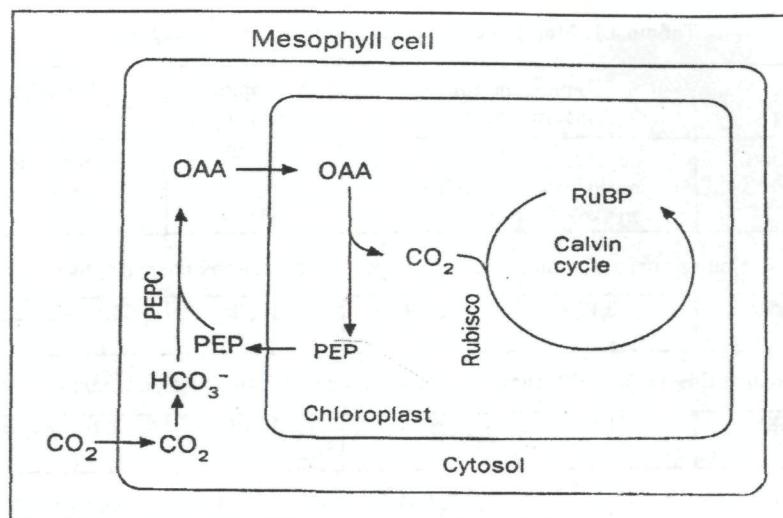


Рис. 4. Простейшая  $C_4$  – подобная искусственная система метаболизма углерода по  $C_4$  пути у трансгенов пшеницы

может быть представлена как разделение функций концентрации углекислоты и ее биохимической переработки в цитозоле и хлоропластах соответственно.

Для подтверждения эффективности генетической модификации структуры и функции фотосинтеза у трансгенной пшеницы с геном ФЕПК проведен анализ структуры урожая трансгенных линий пшеницы в сравнении с исходными формами (таблица 2). 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, массе зерна с 1 колоса, массе зерна с 1 растения. Обнаружено 6 трансгенных линий с высоким урожаем зерна, превосходящим урожай зерна с 1 растения у контроля на 25 - 50%.

Таким образом, определены особенности анатомической структуры листа  $C_3$  растений пшеницы в связи с интродукцией гена ФЕПК. Показано, что у предположительно трансгенных растений пшеницы: 1) хлоропласти занимают при-

Таблица 2. Структура урожая предположительно трансгенных растений пшеницы  $T_1$  с геном ФЕПК

Контроль и трансгенные линии сорта Houis	Высота растения, см	Длина колоса, главный/боковой, см	Число стеблей/число колосьев	Число колосков в колосе, главный/боковой	Число зерен в колосе, г	Масса зерна с 1 колоса, главный/боковой, г	Масса зерна с 1 растения, г
Контроль	78	7,5	1/1	27	17,5	0,56	$0,56 \pm 0,80$
H50 PC-26	62,6	5,6/4,7	1,3/1,3	25,8/24	18/12,5	0,59 / 0,3	$0,70 \pm 0,10$
H PC-26	61,8	6,5	1,5/1	33	20	0,71	$0,71 \pm 0,21$
H 25 PC-26	75,3	6	1/1	27,7	20	0,66	$0,67 \pm 0,19$
H PC-22	44,5	4	0,5/1	18	13	0,89	$0,89 \pm 0,25$
H PC-96	60	5	1/1	27	18	0,56	$0,56 \pm 0,20$
H 25 PC-19	76	6,5/1,5	1,5/1,5	33/5	23/0	0,77	$0,78 \pm 0,14$
H 25 PC-24	65,3	5,5	1/1	27	18,3	0,57	$0,57 \pm 0,15$
H 25 PC-18	74	6	1/1	33	19	0,78	$0,78 \pm 0,18$

стеночное расположение; 2) стенки клеток эндоцермы проводящей ткани, окружающей проводящие пучки, утолщены; 3) механическая ткань мелких проводящих пучков недоразвита; 4) клетки обкладки – округлой формы, в отличие от овальных клеток обкладки у исходных форм; 5) клетки обкладки начинают оформляться в упорядоченные кольцеобразные структуры (Kranz), значительно более схожие с таковыми у  $C_4$  кукурузы, чем у исходных форм. Клетки обкладки располагаются вокруг проводящих пучков по типу венка – Кранц, имеют слегка утолщенные стенки и богаты хлоропластами и хлорофиллом. 6) Клетки мезофилла, окружающие проводящие пучки и клетки обкладки, также имеют концентрическое расположение вокруг проводящих пучков. Наиболее ярко эти признаки проявились у линий Houis 6, 26 и 49, в листьях 1го, 6го и 7го ярусов.

Можно заключить, что интродукция гена ФЕПК в пшеницу приводит не только к активизации фотосинтетической функции, но и к изменению анатомической структуры листа по  $C_4$  типу метаболизма.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kershanskaya O.I., Ku M.S.B. Genetic modification of wheat photosynthesis for increased yield // Annual Meeting ASPB, Orlando, Florida, 2004. – P. 298 - 284.

2. Кершанская О.И. Генетические модификации фотосинтеза. Практический подход. Алматы, 2007. – 152 с.

3. Кершанская О.И., Джсангалина Э.Д. Способ многоэтапного скрининга трансгенных семян пшеницы. Заявка на предварительный патент. № Гос. Регистрации 2007/0967.1. – 2007.

4. Ku M.S.B., Agarie S., Nomura M., Fukayama H., Tsuchida H., Ono K., Hirose S., Toki S., Miyao M., Matsuoka M. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants // Nature Biotechnol. 1999. – V. 17. – P. 76-80.

5. Ku M.S.B., Cho D., Ranade U., Hsu T.-P., Li X., Jiao D., Ehleringer J., Miyao M., Matsuoka M. Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize  $C_4$  photosynthesis enzymes // Redesign Rice Photosynthesis, ed. Sheehy J, IRRI Press. 2000. – 236 p.

6. Hess D., Dressler K., Nimmricher R. Transformation experiments by Pipetting Agrobacterium into the spikelets of wheat (Tr. Aestivum L.) // Plant Science. 1990. – V. 72. – P. 233-244.

7. Kirby E.J.M. Botany of the wheat plant // FAO corporate document repository. Web site Plant Biology online. – 2007.

8. Kirby E.J.M. Appleyard M. Cereal development guide // Stoneleigh, Kenilworth, UK, NAC Cereal Unit. – 1987. – 85 p.

9. Wildon D., Ricardo W., Buchanan B. Commentary on leaf anatomy in relation to the  $C_4$  and  $C_3$  plants and refinement of textbook figure // Plant physiology online. 2004. – #4.

10. Градчанинова О.Д. Методика анатомического исследования листа пшеницы в связи с фотосинтезом // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1978. – Т. 61, № 3. – С. 28-36.

11. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джасилова Х.Х., Ильина Г.И., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике // Основы и методы. Изд. МГУ. 2004. – 312с.

12. Рейвен П., Эверт Р., Айхорн С. Современная ботаника. М., 1990. – 320 с.

13. Pyke K. A., Jellings A. J., Leech R. M. Variation in mesophyll cell number and size in wheat leaves // Annals of Botany. 1990. – V. 65. – P. 679-683.

14. Voznesenskaya E.V., Franceschi V.R., Kirats O., Freitag H., Edwards G.E. Kranz anatomy is not essential for terrestrial  $C_4$  plant photosynthesis // Nature. – 2001. – V. 414. – P. 543-546.

15. Edwards G.E., Franceschi V.R., Ku M.S.B., Voznesenskaya E.V., Pyankov V., Andreo C.S. Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of  $C_4$  plants // Journal of Experimental Botany. 2001. – V. 52, № 356. – P. 577-590.

16. Кершанская О.И. Фотосинтетические основы производственного процесса у пшеницы. Изд-е 2е, исправленное и дополненное. - Алматы, 2007. – 252 с.

17. Evans J.R., Caemmerer S.V., Setchell B.A., Hudson G.S. The relationship between  $\text{CO}_2$  transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco // Australian Journal of Plant Physiology. – 1994. – V. 21, №4. – P. 475 – 495.

18. Haasler 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 // Journal of Experimental Botany. - 2002. - V.53, N. 369. - P. 591 - 607.

## Резюме

ФЕПК генінің интродукциясына байланысты  $C_3$  бидай өсімдігінің анатомиялық құрылышының ерекшеліктері анықталды: хлоропласттардың қабырға түсінде орналасуы; аралық (обкладка) жасушалары-домалак пішінді,  $C_4$  жүгерідегідей ретпен орналасатын дөнгелек тәрізді құрылым (Kranz) қалыптаса бастайды; мезофил жасушалары еткізу түйіндерінде және аралық жасуша маңайында концентрлік түрде орналасады. Бастапқы формалы өнімнен 25 – 50 %-ке асатын, бидай өнімнің 7 трансгендері линиялары табылды. ФЕПК гені бар жана өнімнің мүмкін трансгендерінде 1000 дәні алынды. Бидай трансгендерінде көміртек метаболизмі жүйесіне үксас қаралапты  $C_4$  сызбанұсасы көрсетілді.

## Summary

Leaf anatomy in transgenic wheat plants with introduced PEPC – gene encoded phosphoenolpyruvate carboxylase from maize has been determined: chloroplasts have cell wall location; bundle shift cells have rolling shape and start to organize circle structure similar to  $C_4$  maize (Kranz); mesophyll cells organize circle around bundle shift cells and conducting bundles. We have created 7 wheat transgenic lines with increasing grain yield on 25 – 50% higher in comparison with wild type. It has been created about 1000 putative transgenic seeds with PEPC gene. Simple scheme of  $C_4$  – like system of carbon metabolism in transgenic wheat plants has been elaborated and discussed.