

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК СОЗДАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.), УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

А.А. Вербицкая, М. Муvinги, А.К. Гапоненко

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) является наиболее важной культурой из всех зерновых культур для большинства населения мира. Она является наиболее важным продуктом питания около двух миллиарда человек (36 % населения земного шара). Пшеница обеспечивает 55 % углеводов и 20 % пищевых калорий, потребляемых во всем мире (Breiman and Graur, 1995). Потери урожая пшеницы в различных экологических условиях, возникают из-за дефицита воды (засухи), засоленности, морозов, жары, грибных и вирусных болезней и насекомых. Каждый из перечисленных факторов среды может снижать урожайность, в среднем, на 15 %. Для увеличения урожайности культуры, в условиях быстро меняющегося климата, и сокращения природных ресурсов необходимы сорта нового поколения, широко адаптивные и эффективно использующие ресурсы среды. По данным ФАО засоленные почвы занимают огромные площади – около 20 % всей поверхности суши. Наличие солей снижает осмотический потенциал и растению сложно получить воду из почвы. GATA – это транскрипционный фактор (ТФ), который играет значимую роль в клеточных процессах. ТФ GATA являются ДНК – связывающие белки, которые имеют последовательность IV цинка WGATAR. Эти ТФ экспрессируются в ответ на абиотические стрессы, такие как засоление, засуха и АБК.

За последние тридцать лет были разработаны различные трансгенные методики, позволяющие передавать гены от широко спектра организмов злаковым культурам. Трансгенные технологии позволяют повысить устойчивость растений к болезням и абиотическим стрессам, улучшить качество зерна, увеличить уровень микроэлементов и витаминов в растениях, модифицировать фотосинтез и повысить продуктивность и многое другое. Тем не менее, наличие эффективного способа трансформации для введения чужеродной ДНК в геном является существенным барьером для большинства видов однодольных, в том числе кукурузы, риса, овса, ячменя, и, в частности пшеницы.

Цель эксперимента – сравнение эффективных методик доставки генов и получение пшеницы, устойчивой к засолению, путем введения гена ТФ OsGATA.

Эффективную регенерацию трансгенных побегов данный способ обеспечивает, если в качестве мишени для трансформации используются незрелые зародыши с морфогенным каллусом, полученные от растений-доноров после холодового шока. Морфогенный каллус получают на среде содержащей пиклорам. Для введения чужеродной ДНК применяют биобаллистический способ – прямое введение генов с помощью пушки PIG (particle inflow gun). Также может быть использована любая генная пушка, например фирмы Biorad или DuPont. Перед баллистикой, экспланты выдерживают на осмотической среде с мальтозой. Трансформированные клетки размножают на среде для пролиферации. Селективный отбор трансформированных побегов начинают на этапе регенерации побегов. Укоренение побегов проводят при пониженных температурах на средах с селективным агентом. Данная система трансформации может быть использована с различными маркерными системами отбора, в том числе селекция с помощью гербицидов, таких как глифосат и биалафос (фосфинотрицин), а также антибиотиками, такими как канамицин, гигромицин. Амплификацию гена ТФ OsGATA из кДНК риса проводили методом ПЦР в ТТР Labtech (Университет Джавахарлала Неру, Индия). кДНК риса была получена постановкой ОТ ПЦР на матрице пула РНК, выделенной из 7-ми дневных проростков риса. В эксперименте мы сравнивали две системы баллистической трансформации на 4-х сортах *T. aestivum*. В варианте 1 использовали протокол Huw D. Jones с соавторами (2009), а в варианте 2 – Гапоненко А.К. с соавторами (2016). Оба варианта используют среду Мурасиге и Скуга, витамины Гамбурга. В варианте 1 используют AgNO₃ и CuSO₄ и регуляторы роста 2,4 – D и зеатин, а в варианте 2 – 2,4–D и пиклорам.

Методика была использована на яровых и озимых сортах мягкой пшеницы отечественной селекции – Злата, Амир, Агата, Эстер. На каждом этапе эксперимента наблюдались различия по всем 4 сортам. Эффективность трансформации варианта 1 составила от 0 % до 3 %, а в варианте 2 от 0 % до 7,1 %.

Созданные трансгенные растения, несущие ген OsGATA, могут быть использованы для дальнейшего изучения функциональной роли ТФ OsGATA в регулировании устойчивости растений к стрессу, вызываемому и другими абиотическими факторами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–31–27001

ЛИТЕРАТУРА

- Breiman A., Graur D. Wheat evolution //Israel Journal of Plant Sciences. – 1995. – Т. 43. – №. 2. – С. 85–98.
Sparks C.A., Jones H.D. Biolistics transformation of wheat //Transgenic Wheat, Barley and Oats. Humana Press, 2009. С. 71–92.
Гапоненко А.К., и др. Патент РФ № 2646108 РФ на изобретение «Способ получения трансгенных растений пшеницы с использованием биобаллистики» 07 декабря 2016 г.»