

ПОЛУЧЕНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L) С ПОМОЩЬЮ БОМБАРДИРОВКИ ЧАСТИЦАМИ¹

PRODUCTION OF SALT-TOLERANT TRANSGENIC WHEAT PLANTS (*TRITICUM AESTIVUM* L) BY PARTICLE BOMBARDMENT

**A. Verbitskaia
A. Gaponenko**

Summary. An efficient method for the regeneration of transgenic wheat plants has been developed to obtain salt-tolerant transgenic wheat plants using particle bombardment. The study of the role of various TF genes involved in the response of plants to abiotic stresses (water deficiency and soil salinity) is one of the priorities in modern science. During this work, a transition was made from the model object of *Arabidopsis* to the most important agricultural crop — wheat. Plants obtained by this method are phenotypically normal and fully fertile. The transgenic insert is passed on to offspring following Mendel's laws. The technique was applied to soft wheat varieties — Zlata, Esther, Agata, Amir. The efficiency of bioballistic transformation of calli of these varieties, the efficiency of which was 1.4%–7.8%, depending on the genotype used. The highest transformation frequency was observed in explants of the Zlata variety. This method provides efficient regeneration of transgenic shoots if immature embryos with morphogenic callus obtained from donor plants after cold shock are used as a target for transformation. The vector carrying the *OsGATA* transcription factor gene can be used to obtain transgenic lines of winter wheat varieties and other cereal crops. The morphogenic callus is obtained on a medium containing picloram. The frequency of callus formation was 51.2–97.2%, and the frequency of shoot formation was 62.76–83.98%. For the introduction of foreign DNA, a bioballistic method is used — the direct introduction of genes using a PIG gun (particle inflow gun).

Keywords: wheat, bioballistic transformation, salt tolerance, genetic engineering, transcription factor, *gata*.

Вербицкая Анастасия Алексеевна
Аспирант, Институт биологии развития
им. А.К. Кольцова РАН, г. Москва
timoshenko.alekseevna@gmail.com
Гапоненко Александр Константинович
Д.б.н., г.н.с., Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Аннотация. Разработан эффективный метод регенерации трансгенных растений пшеницы для получения солеустойчивых трансгенных растений пшеницы с помощью бомбардировки частицами. Исследование роли различных генов ТФ участвующих в ответе растений на абиотические стрессы (дефициту воды и засолению почв), относится к числу приоритетных в современной науке. Во время этой работы был совершен переход от модельного объекта к важнейшей сельскохозяйственной культуре — пшенице. Растения, полученные этим методом, фенотипически нормальны и полностью фертильны. Методика применена на сортах яровой мягкой пшеницы — Злата, Эстер, Агата, Амир. Эффективность биобаллистической трансформации каллусов данных сортов, эффективность которой составила — 1.4%–7.8% в зависимости от используемого генотипа. Самая высокая частота трансформации наблюдалась у эксплантов сорта Злата. Этот метод обеспечивает эффективную регенерацию трансгенных побегов, если в качестве мишени для трансформации используются незрелые зародыши с морфогенным каллусом, полученным от растений-доноров после холодового шока. Вектор несущий ген транскрипционного фактора *OsGATA*, может быть использован для получения трансгенных линий озимых сортов пшеницы и других злаковых культур. Морфогенный каллус получают на среде, содержащей пиклорам. Частота каллусообразования составила 51,2–97,2%, частота побегообразования 62,76–83,98%. Для введения чужеродной ДНК используется биобаллистический метод — прямое введение генов с помощью пушки PIG (particle inflow gun).

Ключевые слова: пшеница, биобаллистическая трансформация, солеустойчивость, генная инженерия, фактор транскрипции, *gata*.

¹ Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19–316–90063.

Ведение

Абиотические стрессы являются основной причиной снижения урожайности для растительных культур, иногда более чем на 50%. Рост и продуктивность растений находятся под постоянной угрозой со стороны экологических изменений в виде различных стрессовых факторов.

Пшеница (*Triticum aestivum* L) является важнейшей культурой из всех зерновых для большей части населения мира. Она является основным продуктом питания для двух миллиардов человек (36% населения земного шара). Для увеличения урожайности культуры, в условиях быстро меняющегося климата, и сокращения природных ресурсов необходимы сорта нового поколения, широко адаптивные и эффективно использующие ресурсы среды. За последние тридцать лет были разработаны различные трансгенные методики, позволяющие передавать гены от широко спектра организмов злаковым культурам. 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 (из-за сложного полиплоидного генома, большого количества повторяющихся последовательностей ДНК, низкой способности растений к регенерации и трудностей с генетической трансформацией).

Первая биобаллистическая трансформация пшеницы осуществлена в 1992 году [1]. В настоящее время процесс создания трансгенных растений пшеницы переносом ДНК посредством бомбардировки частицами считается достаточно рутинным. Однако это справедливо лишь для некоторых сортов, отзывчивых к трансформации, таких как Bobwhite, Florida, Fielder, Cadenza и др., но и в этих случаях эффективность трансформации не превышает 1–6% [2,3,4,5,6,7,8,9]. Перенос генов улучшенных признаков на «модельную» пшеницу требует последующего переноса встроенных трансгенов в продовольственные сорта посредством обычного скрещивания, и может затруднить отбор трансгенных признаков от сцепленных с нежелательными признаками. Таким образом, было бы более предпочтительно, если бы технология трансформации могла применяться непосредственно к высокопродуктивным производственным сортам. Но чтобы использовать трансформацию пшеницы в селекционном процессе, необходимо получить ряд трансгенных линий для каждого гена или признака, который необходимо изменить. Это необходимо, чтобы линия была приемлемой в качестве коммерческого сорта, и трансгенная линия должна удовлетворять ряду критериев, таких как простота интеграции трансгена, уровень и стабильность экспрессии встроенного гена, стабильность наследова-

ния трансгена и приемлемость нового фенотипа, а также сохранение характеристик исходной линии. Это обусловило необходимость перехода от работы с модельными генотипами к использованию продуктивных коммерческих сортов, большинство из которых, как выяснилось, трансформируются значительно хуже, чем лабораторные. Не являются исключением в этом смысле и сорта пшеницы российской селекции.

В этой работе мы разрабатывали эффективный метод регенерации трансгенных растений пшеницы для получения солеустойчивых трансгенных растений пшеницы экспрессирующих ген *gata*. Полученные данные позволят расширить представления об участии в регуляции водного и солевого обмена транскрипционного фактора OsGATA.

Созданные в ходе исследования трансгенные растения, несущие ген *gata* и *bar*, могут быть использованы для дальнейшего изучения функциональной роли транскрипционного фактора OsGATA в регулировании устойчивости растений к стрессу, вызываемому другими абиотическими факторами. Также трансгенные линии пшеницы являются ценным исходным материалом для селекционной работы и могут быть использованы при создании солеустойчивых сортов для выращивания в регионах, где значительная часть земель засолена. С учетом всего вышеописанного при разработке настоящего метода ставилась задача создания эффективного способа получения трансгенных растений пшеницы, пригодного для широкого круга перспективных в коммерческом отношении отечественных сортов. Ожидаемым результатом было повышение эффективности и унификация процедуры регенерации трансгенных растений пшеницы для бомбардировки частицами.

Материалы и методы

Растительный материал

Работу проводили в Институте биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. В работе в качестве первичного экспланта использовали зародыши, изолированные из растений мягкой яровой пшеницы.

В исследовании использовали следующий растительный материал: мягкая яровая пшеница (*Triticum aestivum* L.) сортов отечественной селекции — Амир, Агата, Злата и Эстер, которые были предоставлены Н.В. Давыдовой ФГБНУ «Московский НИИСХ «Немчиновка». Растения выращивали в условиях теплицы Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, в теплице Отдела отдаленной гибридизации Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН и в оранжерее Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН.

Таблица 1. Состав дополнительных компонентов сред для трансформации пшеницы

Состав	Среда А	Среда Б	Среда В	Среда Г	Среда Д
2,4-D	0.5 мг	0.5 мг	0.1 мг	-	-
Пиклорам	2 мг	2 мг	-	-	-
НУК	-	-	-	-	0.5 мг
Мальтоза	40 г	120 г	30 г	30 г	15 г
Глютамин	0.5 г	0.5 г	0.5 г	-	-
Гидролизат казеина	0.1 г	0.1 г	0.1 г	-	-
MES	1г	1 г	1 г	0,5 г	0,5 г
Агар-агар	8 г	8 г	8 г	8 г	8 г
Селективный агент	-	-	-	+	+

Выделение зародышей и подготовка материала

Незрелые зародыши зерновок пшеницы собирают через 10 дней после цветения. Незрелые зародыши длиной 0.7–1.5 мм оптимальны для трансформации. Время, необходимое для достижения зародышем наилучшей стадии, зависит от генотипа и сезона.

Состав сред и условия культивирования

Растительный материал культивируют при температурах в диапазоне от 4 до 25 °С, либо в темноте, либо на свету, с 16 часовым фотопериодом (16/8 — день/ночь). Для освещения использовали лампы Osram L36/77 FLUORA и F36W/33 Cool White. В состав всех питательных сред входили макро- и микросоли MS [11], витамины B5 [12], фитогормоны и углеводы (табл. 1). pH среды довели до 5,8 перед автоклавированием. Стерилизацию среды осуществляли в автоклаве при давлении 1.2 атмосферы в течение 15 минут.

Холодовой шок

Низкотемпературная обработка растений-доноров перед стерилизацией зерновок. Собирают незрелые колосья пшеницы на 10–14 день после опыления. Срезанные колосья помещают срезанными концами в воду в холодильную камеру при 4±2 °С на 48 ч.

Стерилизация и культивирование эксплантов на среде для индукции каллусообразования.

Незрелые зерновки вышелушивают из колосков и стерилизуют 70% этиловым спиртом 6 мин. Промывают стерильной дистиллированной водой 3 раза по 5 мин. Зародыши размером 0.7–1.5 мм изолируют и помещают на среду А для индукции каллусообразования щитком

вверх, по 50 шт. на чашку Петри (9 см), и культивируют 14–18 дней в темноте 23±2 °С до образования каллуса.

Осмотическая обработка эксплантов перед трансформацией.

Перед трансформацией зародыши с каллусом выкладывают на осмотическую среду (Б), содержащую в качестве осмотического агента мальтозу (120 г/л). Экспланты располагают в центре чашки Петри, в виде кольца диаметром 40 мм по 30–40 шт./чашку и выдерживают 4–6 часов до баллистики и 20–24 часа после.

Плазмидная ДНК и биобаллистическая трансформация эксплантов.

Для селекции трансформантов использовали плазмиду psActGATA-BAR содержащую ген *gata* (для придания солеустойчивости) и селективный ген *bar* (толерантность к гербициду Basta). Вектора pBI-Act1: OsGATA: pA35 и psGFP-BAR использовали совместно для сравнения эффективности доставки гена OsGATA при введении одновременно нескольких генетических конструкций по сравнению с плазмидным вектором psActOsGATA-BAR при отборе трансформантов устойчивых к гербициду BASTA.

Стерилизация микрочастиц: Навеску микрочастиц весом 50 мг стерилизуют спиртом (500 мкл 96% спирта) в течение 15 мин. Осаждение частиц проводят на центрифуге при 14000 об./мин. в течение 6–8 мин. Промывание частиц проводят три раза стерильной водой. Конечный объем смеси частиц в воде составляет 500 мкл.

Пролиферация трансформированных клеток

После трансформации (через 20–24 часа) каллусы переносят на среду (В) для пролиферации каллуса на 3

недели, в темноте при 23 ± 2 °С. Если в течение этих трёх недель наблюдается начало побегообразования, то зародыши с каллусом переносят на среду для регенерации с селективным агентом раньше истечения срока пролиферации.

Регенерация и селективный отбор трансгенных побегов

Зародыши с каллусом (не разделяя) помещают на селективную среду Г для регенерации и селекции побегов на 3 недели, при освещении 5000 люкс и температуре 23 ± 2 °С.

Укоренение побегов на среде с селективным агентом

Образующиеся в процессе селекции зеленые побеги, помещают в пробирки со средой Д для укоренения при освещении 5000–10000 люкс температуре 20 ± 2 °С. Укоренившиеся побеги пересаживают в перлит во влажную среду для адаптации на 1–2 недели при 15 – 17 °С. Адаптированные растения переносят в почву до полного созревания в условиях теплицы.

Побеги озимых сортов должны проходить этап яровизации, после переноса их в перлит. Для этого растения выдерживают при температуре 3 ± 2 °С в течение 6 недель при освещении 5000 люкс.

Отбор трансгенных растений

Выделение ДНК. Выделение суммарной растительной ДНК проводили по модифицированной методике Деллапорта. [14].

ПЦР-анализ образцов ДНК. Для проведения ПЦР используют ДНК-амплификатор (Bio-Rad T100 Thermocycler). Условия проведения ПЦР: денатурация 95 °С –4 мин, 35 циклов (94 °С — 30 сек, 55 °С — 30 сек, 72 °С — 45 сек) и окончательная достройка — 7 мин. В качестве матрицы используют выделенные образцы геномной ДНК.

Для центрифугирования используют настольную микроцентрифугу (Eppendorf 5415C) с максимальной скоростью вращения ротора 14000 об/мин. Термостатирование образцов осуществляют в сухом термостате (Eppendorf Thermomixer).

Анализ продуктов ПЦР осуществляют методом электрофореза в агарозном геле с последующим окрашиванием гелей бромистым этидием (концентрация красящего раствора 1 мкг/мл в воде, время окрашивания — 20 мин при комнатной температуре) и фотографированием полученной картины в ультрафиолетовом свете (длина

волны — 260–280 нм) цифровым фотоаппаратом. Обработку оцифрованной информации проводят при помощи пакета Adobe Photoshop 7.0.

Проверка толерантности трансгенных линий к засолению

Проверку толерантности растений, полученных от поколения T0, проводили в условиях теплицы ИБР РАН косвенными методами оценки устойчивости трансгенных линий к хлоридному засолению.

Определение уровня хлорофилла a, b спектрофотометрически [15]. Листья (50 мг) растирали в ступке с добавлением 4 мл (2 мл+1 мл+1 мл) 96% этанола и CaCO₃, полученный гомогенат переносили в пробирки и центрифугировали 15 мин при 5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки и доводили конечный объем до 4 мл 96% спиртом.

Транспирацию определяли весовым методом. Измерение осмотического потенциала клеточного сока, полученного после замораживания-оттаивания растительного материала, его гомогенизации и последующего центрифугирования проводили в течении 10 ми (11 тыс. об/мин), с помощью криоосмометра. Измерения свежей массы побегов растений стандартным весовым методом проводили на каждой трансгенной линии.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных статистических методов в программе Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Использование качественных растений-доноров является необходимым условием для получения эффективной регенерации побегов *in vitro*. Помимо обязательного предохранения растений от таких заболеваний как мучнистая роса, карликовая ржавчина, корневые гнили и насекомых (паутинный клещ, тля, трипсы и т.д.), должны быть созданы оптимальные условия вегетации (в условиях искусственного климата) — качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха. После цветения и опыления на 11 день пшеничные побеги длиной 40 см срезали и колосья в количестве 50 шт. (каждого сорта), в течение 2 суток выдерживали в холодильной камере при температуре 4 °С. 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. В результате кратковременной обработки (48) ч. низкой температурой +4 °С была получена

высокая частота индукции МК для исследуемых сортов мягкой пшеницы — до 97.2%, а частота побегообразования и их последующего укоренения на селективной среде была равной 62.76–83.98%. В процессе каллусообразования происходило образование двух типов каллусов — морфогенного каллуса (МК) и неморфогенного каллуса (НМК). НМК представляет собой рыхлые, белые, сильно обводненные массы клеток, характеризующиеся высокой скоростью обводнения и увеличения массы и отсутствием морфогенеза, МК — плотный, желтоватый, медленно увеличивающийся в массе каллус, представленный плотно сцепленными между собой меристемными глобулами. На 7 и 14 день после культивирования проводят визуальную оценку образующегося каллуса, МК оставляют вместе с зародышем и использовали для трансформации, а НМК отсекали и изымали из культуры *in vitro*. Было важно не отделять зародыш от морфогенного каллуса, а оставлять их вместе. На 13 день экспланты, используемые в эксперименте, переносили на осмотическую среду по 40 шт на чашку Петри и производили обстрел каллусов при помощи баллистической пушки. Степень отрицательного влияния баллистической трансформации уменьшается с увеличением возраста эксплантата с момента инициации культуры тканей *in vitro* [13]. Сорт Злата наиболее устойчив к баллистическому воздействию на ткань, максимальное уменьшение образования морфогенного каллуса показано для сорта Амир. Л-1, Агата и Дея занимают промежуточное положение по степени восприимчивости к баллистическому воздействию. Оптимальный период для баллистической трансформации мягкой пшеницы: это 6 день с момента инициации культуры тканей пшеницы всех исследуемых сортов. Осмотическая обработка эксплантов при биобаллистической трансформации повысила выживаемость эксплантов и, следовательно, эффективность трансформации. Поскольку размер меристемных клеток зародыша пшеницы составляет порядка 10 микрон, а размеры частиц вольфрама, используемые как носители молекул ДНК составляют 0.4–2 мкм, то поражения протопласта велики. При воздействии высокого осмотического давления происходит процесс, называемый плазмолиз — отделение протопласта от клеточной стенки в гипертоническом растворе. Это уменьшает поражение протопласта. Экспланты выкладывали на среду по кругу диаметром 40 мм, через 6 часов наблюдался плазмолиз и каллусы обстреливали дважды с двух сторон. В результате проведенной работы была получена коллекция трансгенных растений T_0 с использованием баллистической трансформации на 6 день. После трансформации через 20 часов каллусы переносили на среду для пролиферации каллуса в темноте. Дальнейшее культивирование эксплантов на селективных средах, содержащие пиклорам, показало активное формирование эмбрио-подобных структур. Растения-регенеранты отбирали на селективной среде содержащей

фосфинотрицин в концентрации 5 мг/л на этапе регенерации побегов. Укоренение побегов проводили при пониженных температурах на средах с селективным агентом (3 мг/л). Укоренившиеся побеги пересаживали в перлит во влажную среду для адаптации на 1–2 недели при 15–17 °С. Все первичные трансгенные растения культивировали в теплице для наблюдения за морфологическими изменениями и получения семян. В теплице была получена коллекция трансгенных линий пшеницы поколения T_0 из 42 растений, и были использованы для анализа наличия гена *bar* и *gata*. При использовании методики регенерационной системы селекции получена наибольшая частота трансгенных растений, которая составила 1.4%–7.8%. Получены трансгенные растения, подтвердившие наличие и экспрессию гена *gata*, сравнивали на солевых растворах NaCl в концентрациях 0,1 мМ и 300 мМ, в течение 12 дней. На данном этапе мы изучили действие длительного засоления на растения. Засоление приводило к снижению скорости роста всех изученных исходных сортов: через 10 дней масса побега была ниже, чем в контроле в 1,7 раза при 100 мМ и в 3,5 раза при 150 мМ. У трансгенных линий угнетение роста варьировало меньше, чем в контроле в 1,3 раза при 100 мМ и в 1,8 раза при 150 мМ. Причем в большинстве трансгенных линий не было достоверных различий по генотипам. Трансгенные растения пшеницы линий Zl.O1 Ag.02 сохранили высокие темпы роста, в отличие от нетрансформированных контрольных растений в стрессовых условиях. Изучение интенсивности транспирации (объем испаренной воды за один час на единицу сырой массы листа- г/(ч.т)) производилось методом быстрого взвешивания (метод Л.А. Иванова). Общий уровень транспирации варьировал в зависимости от исходного сорта (от 0,034 до 0,043 г/(ч.т)) и достоверно не различался в листьях контрольных растений и изучаемых трансгенных линий. При определении осмотического давления клеточного сока плазмолитическим методом при отсутствии стресса и при засолении на 3-и сутки не было достоверных отличий между исходными растениями и трансгенами. Измерение осмотического потенциала клеточного сока также не выявил отличий между исходными растениями и изучаемыми трансгенными линиями в соке из тканей дифференцированной части листа (развернутая листовая пластина) растений без засоленного субстрата. Однако, трансгенные линии сорта Злата Zl.O1 и сорта Агата Ag.02 показали меньшее понижение осмотического потенциала после произрастания на засоленном субстрате при 150 мМ к 3 дню (–1,33 МПа и –1,38 МПа в сравнении с исходными сортами –1,12 МПа и –1,09 МПа). Параметры флуоресценции хлорофилла листьев растений не выявили различий между исходными растениями и трансгенами без засоленного субстрата. При воздействии солевого стресса к третьему дню генотипы отличались по содержанию зеленых пигментов: у исходного образца

сорта Злата содержание хлорофиллов а и b снижалось в этих условиях на 18 и 19% по сравнению с трансгенной линией (1,4/0,45 мг/г-без стресса; 1,148/0,364 мг/г — в стрессе), у Zl.O1 — на 10 и 8% (1,41/0,44 мг/г-без стресса; 1,26/0,40 мг/г — в стрессе); у исходного образца сорта Агата содержание хлорофиллов снижалось на 15 и 14% по сравнению с трансгенной линией (1,42/0,43 мг/г-без стресса; 1,207/0,369 мг/г — в стрессе), у Ag.02 — на 10 и 8% (1,41/0,44 мг/г-без стресса; 1,26/0,40 мг/г — в стрессе). Нами показано, что экспрессия транскрипционного фактора риса OsGATA, в трансгенных линиях продуктивных сортов пшеницы, может повысить их толерантность к засолению, что подтверждено физиологическими и биохимическими методами по стандартным протоколам.

Заключение

В ходе исследования были оптимизированы важные параметры биобаллистической трансформации и способ регенерации трансгенных растений показал большую эффективность для мягкой яровой пшеницы российской селекции, в сравнении с исходным методом. Представленная система получения трансгенных растений пшеницы занимает от 2-х до 3-х месяцев. Один из наиболее важных факторов для достижения высокоэффективной трансформации пшениц — качество незрелых зародышей. Использование незрелых эмбрионов на нужной стадии развития и размер эмбрионов является критическим фактором. Подбор времени осмотической обработки эксплантов перед и после трансформации, а также минимизация поранения за счет использования 6-дневных пшеничных эксплантов оказывает положительное влияние на частоту каллусообразования морфогенного типа. Было подтверждено положительное влияние пиклорама (ауксин подобного вещества) на индукцию каллусообразования пшеницы. Трансформированные клетки размножали на среде для пролиферации без селективного отбора, что позволило увеличить выход трансгенных побегов. Селективный отбор начинали на этапе регенерации трансгенных побегов и продолжали во время укоренения, что позволило сократить сроки селекции. Методика была использована на яровых сортах мягкой пшеницы отечественной селекции. Эффективность трансформации

оказалась высокой для всех исследуемых сортов, независимо от генотипа. Данный показатель свидетельствует о высокой эффективности предлагаемого способа и является генотип-независимым, применим к большому количеству разнообразных генотипов мягкой пшеницы. Кроме того, изучение фундаментальных основ экспрессии факторов GATA не на модельном объекте в ответ на различные абиотические стрессы может иметь потенциальное сельскохозяйственное применение на засоленных почвах в качестве молекулярных инструментов для улучшения пшеницы в направлении стрессоустойчивости. Используя данный подход, мы предполагаем, что белки GATA играют важную роль в защите не только растений риса, но и растений пшеницы в условиях солевого стресса. Экспрессия гена *gata*, регулируемого злакоспецифическим промотором, может привести к высокому уровню конститутивного накопления белка GATA как в листьях, так и в корнях трансгенных растений пшеницы. Трансгенные растения пшеницы второго поколения могут показать повышенную толерантность к дефициту воды и засолению. Ожидается, что последующие трансгенные поколения пшеницы сохранят высокие темпы роста, в отличии от нетрансформированных контрольных растений в стрессовых условиях.

Выводы

1. Разработан оригинальный и эффективный способ регенерации трансгенных растений пшеницы для биобаллистической генетической трансформации и получена коллекция трансгенных линий пшеницы поколения T0 из 42 растений.
2. Установлено, что пиклорам оказывает положительное влияние на частоту каллусообразования морфогенного типа и составляет от 78% до 91,67%, а частота побегообразования и их последующего укоренения на селективной среде достигала 74,3%, в зависимости от генотипа.
3. Оптимизированы параметры биобаллистической системы трансформации для повышения эффективности и унификация процедуры.
4. Получены трансгенные растения мягкой яровой пшеницы, показавшие устойчивость к действию гербицида БАСТА в условиях *in vitro* и подтвердившие наличие гена *gata*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vasil V., Castillo A.M., Fromm M.E., Vasil I.K. (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/technology*. 10(6) 667–674.
2. Weeks J.T., Anderson O.D., Blechl A.E. (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology*. 102(4) 1077–1084.
3. Chen W.P., Gu X., Liang G.H., Muthukrishnan S., Chen P.D., Liu D.J., Gill B.S. (1998). Introduction and constitutive expression of a rice chitinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theoretical and Applied Genetics* 97(8) 1296–1306.

4. Uzé M., Potrykus I., Sautter C. (1999). Single-stranded DNA in the genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.): transformation frequency and integration pattern. *Theoretical and applied genetics*. 99(3–4) 487–495.
5. Jordan M.C. (2000). Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. *Plant Cell Reports*. 19(11) 1069–1075.
6. Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Reed J., Kramer C., Artim-Moore L. (2001). Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker. *Plant cell reports*. 20(5) 429–436.
7. Pellegrineschi A., Brito R., Velazquez L., Noguera L., Pfeiffer W., McLean S., Hoisington D. (2002). The effect of pretreatment with mild heat and drought stresses on the explant and biolistic transformation frequency of three durum wheat cultivars. *Plant cell reports*. 20(10) 955–960.
8. Greer M.S., Kovalchuk I., Eudes F. (2009). Ammonium nitrate improves direct somatic embryogenesis and biolistic transformation of *Triticum aestivum*. *New Biotechnology*. 26(1–2) 44–52.
9. Tassy C., Partier A., Beckert M., Feuillet C., Barret P (2014). Biolistic transformation of wheat: increased production of plants with simple insertions and heritable transgene expression. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 119(1) 171–181.
10. Tamás-Nyitrai C., Jones H.D., Tamás L. (2012). Biolistic-and Agrobacterium-mediated transformation protocols for wheat. In *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 357–384
11. Murashige T., Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 15(3) 473–497.
12. Gamborg O.L., Miller R., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*. 50(1)151–158.
13. Gorbatyuk I.R., Baval A.V., Holubenko A.V., Morgun B.V. (2015). Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat *vs.* *Zymoyarka*. *Biotechnologia Acta*. 8(1)
14. Гапоненко А.К., Мишуткина Я.В., Шульга О.А., Тимошенко А.А., Спеченкова Н.А (2018). Способ получения трансгенных растений пшеницы с использованием биобаллистики. Патент РФ № 2646108 РФ на изобретение.
15. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу/Под ред //Ермакова ИПМ: Издательский центр «Академия». — 2003.

© Вербицкая Анастасия Алексеевна (timoshenko.alekseevna@gmail.com), Гапоненко Александр Константинович.

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Российская Академия Наук