

ПОДБОР УСЛОВИЙ ДЛЯ ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В ТКАНИ ПШЕНИЦ РАЗЛИЧНОЙ ПЛОИДНОСТИ МЕТОДОМ БАЛЛИСТИКИ

Мирошниченко Д.Н.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, e-mail: miroshnichenko@bibch.ru

Задача наших исследований заключалась в определении оптимальных условий для переноса гетерологичных последовательностей в клетки диплоидной пшеницы однозернянки и тетраплоидной пшеницы Тимофеева с помощью устройства «генная пушка» PIG. Для этого использовали вольфрамовые частицы различного размера с нанесенной на них плазмидной ДНК вектора psGFP-BAR. Эффективность переноса генетического материала анализировали через 24 часа после обстрела частицами по транзientной экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка (*gfp*). Полученные результаты показали, что для достижения оптимального баланса между повреждающим эффектом и эффективностью экспрессии предпочтительнее использовать частицы-носители размером 0,7 мкм. Исследования также показали, что величина давления гелия в устройстве PIG, определяющая силу, с которой частицы-носители ДНК проникают в ткани-мишени, оказывает существенное влияние на уровень транзientной экспрессии гена *gfp*. При этом для достижения максимального эффекта следует использовать величину давления гелия, равную 5,5-6,0 кгс/см².

Ключевые слова: генетическая трансформация, генетическая пушка, экспрессия гена, *gfp*.

OPTIMIZATION OF BALLISTIC PARAMETERS FOR EFFICIENT GENE TRANSFER INTO TISSUES OF WHEAT OF DIFFERENT PLOIDY

Miroshnichenko D.N.

All Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: miroshnichenko@bibch.ru

The aim of our investigation was to determine the optimal parameters for the transfer of heterologous sequences into the cells of diploid einkorn wheat and tetraploid timofeevii wheat by means of particle inflow gun (PIG). The tungsten particles of various sizes have been used as carriers to deliver the plasmid DNA of psGFP-BAR. The transient expression of the green fluorescent gene (*gfp*) has been analyzed to detect the efficacy of genetic material transfer after 24 hours of bombardment. The results showed that particles of 0.7 μm are the preferable carries to achieve the proper balance between the damaging effect of particles and the efficiency of transient expression. Our studies also showed that the helium pressure that conducted in the chamber of inflow particle gun significantly affect the level of transient *gfp* expression owing to the penetration intensity of the DNA-coated particles into the target cells. In order to achieve the maximum effect, the helium pressure of 5.5-6.0 kgf/cm² should be adjusted.

Keywords: genetic transformation, particle inflow gun, gene expression, *gfp*.

Развитие биотехнологий открывает возможность идентификации и клонирования генов из геномов дикорастущих и окультуренных видов пшеницы, имеющих хозяйственно-ценные признаки. Методы генетической трансформации позволяют в относительно короткие сроки прояснить роль того или иного гена через повышение уровня его экспрессии или его инактивацию в трансгенных растениях. Это позволяет более направленно подходить к использованию в долговременных межвидовых скрещиваниях того или иного генетического материала для получения высокопродуктивных сортов. Однако на сегодняшний день успешный перенос и анализ генов у пшеницы ограничен сортами полиплоидных видов твердой и мягкой пшеницы. Исследования, описывающие возможность генетической

трансформации ряда других ди- и тетраплоидных видов пшеницы, в настоящий момент отсутствуют.

Задачей нашей работы было определение оптимальных условий переноса гетерологичных генов в клетки диплоидной пшеницы однозернянки (*T. monococcum* L., 2n, A геном) и тетраплоидной пшеницы Тимофеева (*T. timopheevii* Zhuk., 4n, GA геном) с помощью устройства «генная пушка» PIG [2]. Для подбора оптимальных параметров биобаллистической трансформации использовали репортерный ген зеленого флуоресцентного белка *gfp*, который позволяет определить эффективность переноса генов уже через несколько часов после обстрела плазмидной ДНК тканей пшеницы [4]. Проведенные ранее экспериментальные работы показали, что величина давления гелия, определяющая силу, с которой частицы проникают в ткани экспланта, оказывает значительное влияние на уровень транзientной экспрессии гена *gfp* в клетках мягкой гексаплоидной пшеницы [1]. Для решения поставленной задачи изучали влияние на эффективность переноса генов таких факторов, как величина давления гелия, а также размер частиц-носителей ДНК.

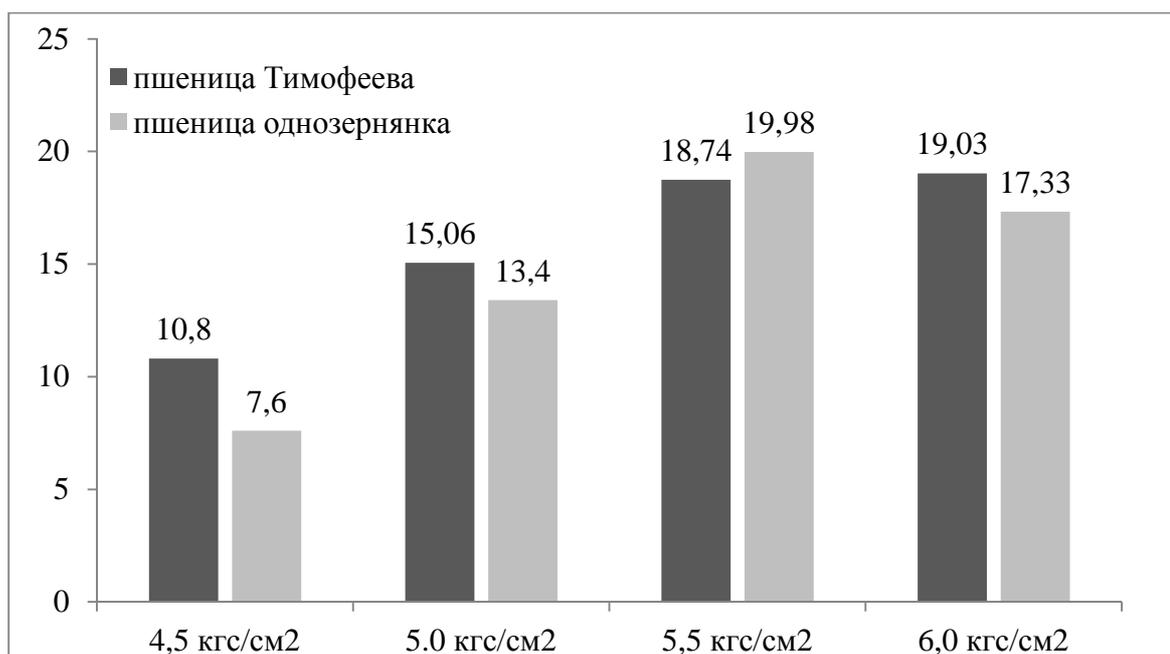
Материалы и методы исследования

Перенос генетического материала в клетки незрелых зародышей пшеницы однозернянки и пшеницы Тимофеева производили с использованием устройства Particle Inflow Gun [2] по модифицированной методике [1] вольфрамовыми частицами с нанесенной на них плазмидной ДНК вектора psGFP-BAR [4]. Использовали частицы трех размеров: N5 (0,7 мкм), N10 (0,7 мкм) и N17 (1,1 мкм) (Biorad, USA). При осуществлении переноса ДНК создавали давление гелия в камере генной пушки, равное 4,5, 5,0, 5,5 и 6,0 кгс/см². Эффективность переноса генетического материала проводили путем анализа флуоресценции клеток через 24 часа после обстрела частицами по транзientной (временной) экспрессии гена *gfp*. Подсчитывали количество клеток, проявляющих характерную для гена *gfp* флуоресценцию, с помощью микроскопа ZEISS (Германия) со светофильтрами 450–490 нм (возбуждение флуоресценции GFP) и 515–530 нм (эмиссия флуоресценции GFP).

Результаты и их обсуждение

Анализ транзientной экспрессии в клетках пшеницы однозернянки показал, что увеличение давления гелия с 4,5 до 5,5 кгс/см² приводило к постепенному увеличению числа флуоресцирующих клеток с 7,60 до 19,98 шт./эксплант (рис. 1). При увеличении давления гелия до 6,0 кгс/см² наблюдали несущественное снижение числа флуоресцирующих клеток до 17,33 шт./эксплант. Характер транзientной экспрессии гена *gfp* у пшеницы Тимофеева в целом соответствовал тому, который наблюдался у пшеницы однозернянки. Так, увеличение

давления гелия приводило к постепенному увеличению числа флуоресцирующих клеток, достигнув максимума 19,03 шт./эксплант при 6 кгс/см² (рис. 1).



*Рис. 1. Влияние давления гелия на среднее число флуоресцирующих клеток с экспрессией гена *gfp* в тканях незрелых зародышей пшеницы однозернянка и пшеницы Тимофеева (экспланты обстреливали частицами N17)*

Перенос гетерологичной ДНК в растительные клетки осуществляется на металлических частицах [6]. Для этих целей используются ковкие металлы: вольфрам или золото. Подавляющее большинство работ по трансформации пшеницы выполнено с использованием золотых частиц на коммерческой установке высокого давления газа PDS 1000/He gun [3]. Поскольку в нашей работе мы использовали пушку низкого давления газа PIG, проблема повреждения клеток при бомбардировке была не столь острой. Следует также отметить, что вольфрамовые частицы имеют более низкую стоимость в сравнении с золотыми, что позволяет снизить затраты на проведение исследований.

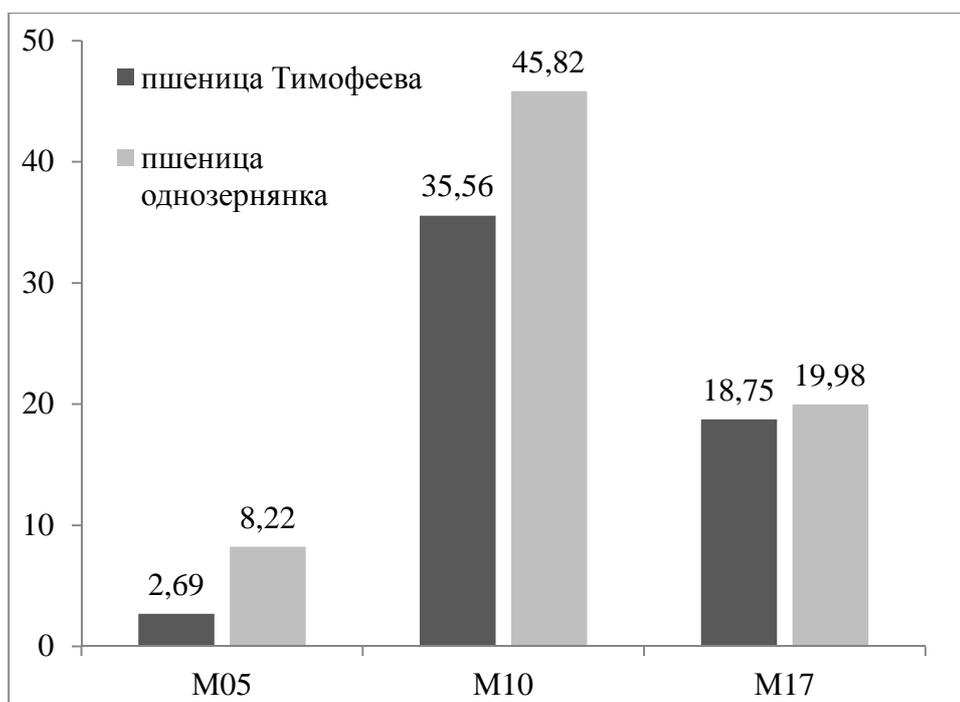


Рис. 2. Влияние размера вольфрамовых частиц на среднее число флуоресцирующих клеток с экспрессией гена *gfp* в тканях незрелых зародышей пшеницы однозернянки и пшеницы Тимофеева

Теоретически частицы меньшего размера должны обеспечивать более равномерное распределение ДНК по поверхности ткани-мишени и меньше повреждать растительные клетки, что, в свою очередь, должно положительно влиять на уровень транзientной экспрессии. Как показали результаты проведенных исследований – это не совсем так. При обстреле тканей пшеницы однозернянки и пшеницы Тимофеева частицами среднего размера (N10) количество флуоресцирующих клеток с экспрессией гена *gfp* было выше (рис. 2). Более мелкие частицы N5 не обеспечивали хорошего проникновения в клетки, поэтому уровень экспрессии при их использовании был низким. Более крупные частицы N17 лучше доставляли гетерологичную ДНК, чем частицы N5, поэтому приводили к более высокой транзientной экспрессии. Однако из-за более крупного размера они оказывали сильный повреждающий эффект, что привело к снижению числа живых клеток, способных к флуоресценции по сравнению с частицами N10. Полученные данные отличаются от тех, которые были получены в предыдущих исследованиях по баллистической трансформации мягкой пшеницы, когда частицы N17 оказались более предпочтительны для переноса ДНК, чем частицы N10 [1]. Это подтверждает необходимость поиска оптимальных условий для каждого вида пшеницы, поскольку восприимчивость клеток-мишеней значительно зависит от генотипических особенностей. Так, в данной работе ткани пшеницы однозернянки были более восприимчивы к переносу ДНК, чем ткани пшеницы Тимофеева, поскольку

демонстрировали большее число клеток с экспрессией гена *gfp* (45,82 против 35,56 шт./эксплант).

Заключение

В ходе экспериментов по оптимизации параметров по переносу гетерологичных последовательностей (на примере гена *gfp*) в ткани диплоидного и тетраплоидного видов пшеницы *T. monosocum* и *T. timopheevii* нами установлено, что для достижения эффективной экспрессии следует соблюдать следующие условия при использовании генной пушки PIG:

1) обстрел частицами, несущими плазмидную ДНК, следует проводить, используя величину давления гелия, равную 5,5-6,0 кгс/см²;

2) для достижения оптимального баланса между повреждающим эффектом и проникновением через клеточную стенку предпочтительнее использовать вольфрамовые частицы размером 0,7 мкм.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации (грант № 14.М04.12.0015).

Список литературы

1. Филиппов М.В. Подбор оптимальных параметров баллистической трансформации генома мягкой пшеницы / М.В. Филиппов, Д.Н. Мирошниченко, Д.И. Верниковская, С.В. Долгов // Сельскохозяйственная биология. — 2006. — №. 1. — С. 67-73.
2. Finer J.J. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells / J.J. Finer, P. Vain, M.W. Jones, M.D. McMullen // Plant Cell Rep. — 1992. — Vol. 11. — P. 232-238.
3. Lazzeri P.A., Jones H.D. Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization / Methods in Molecular Biology [под ред. H.D. Jones, P.R. Shewry]. — NJ : Humana Press Totowa, 2009. — Vol. 478. — P. 3-20.
4. Miroshnichenko D. Genetic transformation of Russian wheat cultivars / D. Miroshnichenko, M. Filippov, S. Dolgov // Biotechnology and Biotechnological Equipment. — 2007. — Vol. 4. — P. 399-402.
5. Richards H.A. Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation / H.A. Richards, V.A. Rudas, H.A. Richards, J.K. McDaniel, Z. Tomaszewski, B.V. Conger // Plant Cell Rep. — 2001. — Vol. 20. — P. 48-54.
6. Sanford J.C. Optimizing the biolistic process for different biological applications / J.C. Sanford, F.D. Smith, J.A. Russell // Methods Enzymol. — 1993. — Vol. 217. — P. 483-509.

Рецензенты:

Харченко П.Н., д.б.н., профессор, заведующий отделом клеточной и генной инженерии растений ФГБНУ ВНИИСБ, г. Москва;

Долгов С.В., д.б.н., заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений, Филиал ФГБНУ ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Пущино.