

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

№ госрегистрации АААА-А15-115123010003-5



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
Повышение толерантности к засолению у продуктивных сортов мягкой пшеницы
(*Triticum aestivum* L.) путем введения транскрипционного фактора OsGATA риса,
эктопическая экспрессия которого, индуцируется избыточным засолением

по теме:
ВЫБОР НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОСТАВЛЕННЫХ ПЕРЕД НИР ЗАДАЧ
(промежуточный)

Этап 1

ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-
технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы»

Соглашение о предоставлении субсидии от 11.11.15 г. № 14.613.21.0052

Руководитель проекта,
доктор биологических наук


«...» декабря 2015

А.К. Гапоненко

Москва 2015

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель,
гл.н.с., д-р биол. наук



А.К. Гапоненко
(введение, заключение,
руководство работой)

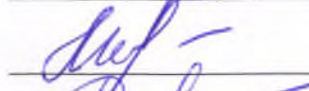
Исполнители темы:

с.н.с., к.х.н.



О.А. Шульга
(Раздел 1,3,6)

с.н.с., к.б.н



Я.В. Мишуткина
(Раздел 1,3,4,5)

гл.н.с., д.с.-х.н.



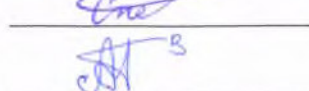
Н.В. Давыдова
(Раздел 1,3,5)

м.н.с.



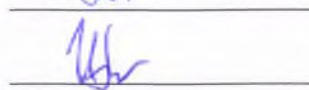
А.А. Тимошенко
(Раздел 4,5)

м.н.с.



Н.А. Спеченкова
(Раздел 4,5)

лаборант



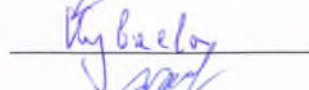
Е.В.Понизова
(Раздел 4,5)

с.н.с., к.б.н.



И.Б. Мерцалов
(Раздел 1,4,5)

лаборант



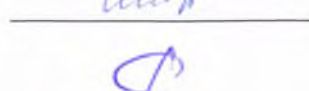
А.А.Сидоров
(Раздел 4,5)

лаборант



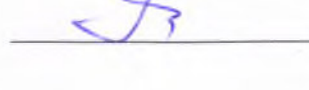
Е.Е. Куваева
(Раздел 5)

лаборант



Е.Ю. Заволока
(Раздел 5)

лаборант



А.А. Акишина
(Раздел 5)

Нормоконтролер

Рева Л.Г.

Соисполнители:

ООО «Академинновация»
(ООО «АИН»)
(Раздел 2)

Руководитель работ,
ген. директора ООО «АИН»,
к.б.н.



В.И. Шаров

РЕФЕРАТ

Отчет 82 с., 17 рис., 4 табл., 136 источников.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА - ПШЕНИЦА, АБИОТИЧЕСКИЕ СТРЕСС, СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ, ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР OSGATA, ТРАНСФОРМАЦИЯ.

Объект исследования или разработки: 4 сорта яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) отечественной селекции: Злата, Эстер, Амир, Агата.

Цель работы. Повышение толерантности к засолению у продуктивных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) путем введения транскрипционного фактора OsGATA риса, эктопическая экспрессия которого, инициируется избыточным засолением.

Метод или методологию проведения работы. Растения пшеницы выращивали в условиях искусственного климата при оптимальных условиях вегетации – качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха, фитосанитарная обработка. Амплификацию полноразмерной копии гена транскрипционного фактора (ТФ) OsGATA из кДНК риса проводили методом ПЦР. кДНК риса была получена постановкой ОТ ПЦР на матрице пула РНК (с использованием специфических праймеров), выделенной из 7-ми дневных проростков риса. Полноразмерная копия ТФ OsGATA была перенесена в вектор pCAMBIA1304 для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы.

Результаты работы. За время выполнения работ, в соответствии с календарным планом, были получены следующие результаты:

1. Проведен тщательный анализ научно-технической литературы (статьи, патенты, монографии) и на основе проведенного анализа, разработаны экспериментальные и методические подходы, а также составлен план исследований для решения поставленных задач НИР.
2. Проведено патентное исследование в соответствии ГОСТ Р 15.011-96, показавшее перспективность разрабатываемых технологий. Подготовлен отчет о патентном исследовании.
3. Выращена коллекция исходных сортов яровой мягкой пшеницы, состоящая из 960 растений. Выращенные растения пригодны для проведения следующего этапа НИР по получению трансгенных линий.
4. Иностраным партнером подготовлен аннотационный отчет, содержащий протоколы амплификации полноразмерной копии гена транскрипционного фактора OsGATA из риса и создания вектора для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, несущий ген транскрипционного фактора OsGATA.
5. От иностранного партнера получен экспериментальный образец полноразмерной копии гена транскрипционного фактора OsGATA из риса, повышающего толерантность к засолению.

6. От иностранного партнера получен экспериментальный образец вектора для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, несущий ген транскрипционного фактора OsGATA.

Основные конструктивные, технологические и технико-эксплуатационные характеристики. Исходная коллекция пшеницы представлена здоровыми растениями, выращенными в условиях закрытого грунта в количестве 960 шт. (240 растений каждого сорта). Растения представляют собой образцы на разных стадиях развития от стадии кущения до стадии колошения. Экспериментальный образец полноразмерной копии гена ТФ OsGATA из риса (*Oryza sativa*), представляет собой клон гена OsGATA в виде образца ДНК длиной 691 п.н. Сходство нуклеотидного состава составляет 99%. При конструировании вектора pCAMBIA1304-OsGATA использовали последовательность нуклеотидов клонированной полномеразной копии гена OsGATA.

Степень внедрения. Коллекция исходных сортов яровой мягкой пшеницы и векторные конструкции будут использованы на втором этапе работы для получения трансгенных линий пшеницы, толерантных к засолению.

Рекомендации по внедрению или итоги внедрения результатов НИР. Вектор pCAMBIA1304-OsGATA, несущий ген транскрипционного фактора OsGATA, может быть использован для получения трансгенных линий озимых сортов пшеницы и других злаковых культур. Полноразмерная копия гена OsGATA, кодирующая транскрипционный фактор OsGATA, может быть поставлена под стресс-индуцибельный промотор при создании новых векторных конструкций для генетической трансформации пшеницы или других злаков. Такой вариант модификации может показать большую эффективность при создании толерантных к стрессам растений.

Область применения: Генетика, селекция, биотехнология и физиология растений.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННОЙ НАУЧНОЙ, ЛИТЕРАТУРЫ, ЗАТРАГИВАЮЩЕЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКУЮ ПРОБЛЕМУ, ИССЛЕДУЕМУЮ В РАМКАХ НИР	11
1.1. Засоление почв и интенсификация сельского хозяйства	11
1.2. Растения в условиях стресса и механизмы адаптации	12
1.2.1. Влияние засоления на физиологические процессы в растениях	12
1.2.2. Осмотический и ионный эффекты засоления	14
1.2.3. Токсическое действие ионов	16
1.2.4. Адаптация к засолению на уровне целого растения	17
1.2.5. Адаптация к засолению на клеточном уровне	19
1.2.6. Адаптации к засолению на молекулярном уровне	20
1.2.6.1. Восприятие сигнала повышенного засоления	21
1.2.6.2. Регуляция транспорта Na^+/K^+	23
1.2.6.3. Роль NHX и SOS в поддержании низкого уровня Na^+ в цитоплазме	23
1.2.6.4. Регуляция экспрессии генов растений в ответ на солевой стресс	24
1.3. Пути создание солеустойчивых культур	27
1.3.1. Классические методы селекции	27
1.3.2. Маркер-ассоциированная селекция (МАС)	28
1.3.3. Генетическая инженерия	29
1.3.3.1. Модификация по генам осмопротекторов	29
1.3.3.2. Инженерия транспортеров и ионных каналов	29
1.3.3.3. Использование антиоксидантных ферментов и глиоксалазной системы	31
1.3.3.4. Модификация транскрипционных факторов	32
1.3.3.5. Модификация сигнальных молекул	34
1.4. Пшеница - стратегический ресурс продовольственной безопасности РФ	36
1.4.1. Значение производства пшеницы для РФ	36
1.4.2. Проблемы урожайности и генетический потенциал сорта	37
1.4.3. Стратегии создания толерантных к абиотическим стрессам злаковых культур	38
1.4.4. Перспективы производства трансгенной пшеницы	39
2. ПРОВЕДЕНИЕ ПАТЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГОСТ 15.011-96	42
3. РАЗРАБОТКА И ОБОСНОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПОВЫШЕНИЯ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ. ОЦЕНКА ВАРИАНТОВ ВОЗМОЖНЫХ РЕШЕНИЙ	44
4. РАЗРАБОТКА ПЛАНА ИССЛЕДОВАНИЙ	54
4.1.1. Методы исследования	54
4.1.2. Дизайн исследования	54
4.1.3. Планируемый результат	55
4.1.4. Технические характеристики планируемых научно-технических результатов НИР	56
5. ВЫРАЩИВАНИЕ РАСТЕНИЙ ИСХОДНЫХ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ	58
6. АННОТАЦИОННЫЙ ОТЧЕТ ИНОСТРАННОГО ПАРТНЕРА	65
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	69
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	71

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ТФ	Транскрипционный фактор
АБК (ABA)	Абсцизовая кислота (Abscisic Acid)
АФК (ROS)	Активные формы кислорода (Reactive oxygen species)
с/х	Сельскохозяйственный
МАС	Маркер-ассоциированная селекция (marker-assisted selection)
QTL	Локус количественных признаков (Quantitative Trait Loci)
ГМ	Генетически модифицированный
ГИ	Генетически измененный

ВВЕДЕНИЕ

Интенсификация производства, внедрение комплексной механизации, химизации и т.п. предъявляют новые повышенные требования к сельскохозяйственным растениям, что создаёт потребность в непрерывном поддержании и совершенствовании имеющихся сортов.

На получение нового сорта в рамках «традиционного» селекционного процесса, без применения биотехнологических методов, может потребоваться от восьми до десяти лет. Подобная длительность оправдана биологически, однако это существенно снижает конкурентность отечественных селекционных программ. Данный проект направлен на разработку и совершенствование биотехнологических способов получения новых сортов.

Оценка современного состояния решаемой научно-технической проблемы: Для увеличения урожайности и валовых сборов растениеводства в условиях быстро меняющегося климата и сокращения природных ресурсов необходимы сорта, широко адаптивные и эффективно использующие ресурсы среды. Только при таком подходе можно накормить быстро увеличивающееся население планеты. Возможности производителей зерна, их ресурсы, требования к конечной продукции, ее себестоимости сильно различаются. Задача современной селекции и биотехнологии создавать сорта, которые удовлетворяли бы каждого из производителей зерна не только по уровню урожайности, но и качеству, устойчивости к стрессам среды, болезням и вредителям. Велика потребность в сортах, которые могли бы в полной мере использовать ресурсы среды каждой экологической зоны, каждого поля и получать дивиденды от генотип-средового взаимодействия.

Селекционные программы во всем мире значительно ускоряются использованием достижений «постгеномной эры» - компьютерных программ, моделирующих взаимодействие белков и молекул ДНК *in silico*, функциональной и экспериментальной геномики, транскриптомики, метаболомики, прямой и обратной генетики. Но создание современных сортов с новыми признаками, соответствующими экстремальным условиям окружающей среды – повышенным температурам, нарастающему дефициту воды, засорению и прочих неблагоприятных антропогенных явлений методами традиционной селекции могут потребоваться десятилетия.

Применение биотехнологии в селекции пшеницы, главной культуры, во всем мире стремительно ширится. Создано ряд международных программ, инициатив и проектов, которые изучают геномы злаков и механизмы генной экспрессии, что позволяет пониманию биологических процессов в клетках, тканях и целом организме на различных молекулярных уровнях. Понимание процессов на молекулярном уровне открывает новые подходы к производству конкурентно способных сортов, устойчивых к стрессам.

Основание и исходные данные для разработки темы: Основанием для проведения НИР, выполняемой в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», является Соглашение от «11» ноября 2015 г. № 14.613.21.0052.

Сведения о планируемом научно-техническом уровне разработки: В настоящее время модификация регуляторных генов высших организмов является передовой областью зелёной битехнологии. Для получения живых клеток с направленно модифицированным геном применяют целый ряд высокотехнологических подходов: методы молекулярного клонирования, методы биобаллистики и агробактериальной трансформации и т.д. С целью объективного контроля наследования нужного признака, используют широкий спектр таких методов как иммуноферментный анализ, полимеразно-цепная реакция и т.п. Применение перечисленных инструментов позволяет прогнозировать получение инновационных результатов в области биотехнологии растений. Полученные результаты находятся на конкурентном уровне относительно аналогичных исследований иностранных учёных. Использование регуляторных генов высших растений позволит создать сорта с новыми хозяйственно-ценными признаками. Данный подход активно разрабатывается ведущими в этой области странами как США, ЕС и Канада.

Сведения о патентных исследованиях и выводы из них: В ходе выполнения первого этапа исследований проведен патентный поиск в результате которого установлено следующее: на основе отобранных отечественных и зарубежных патентов показано, что каждое из направлений не до конца удовлетворяет требованиям современного развития техники и известные из уровня техники решения не могут обеспечить требуемые показатели. Проведенный патентный поиск показал перспективность разрабатываемых технологий и отсутствие аналогов данной разработки.

Актуальность темы: Создание новых сортов с/х растений с использованием постгеномных и биотехнологических методов является наиболее приоритетным направлением программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года. Сорта и гибриды нового поколения, устойчивые к засолению, засухе, болезням, гербицидам, насекомым-вредителям представляют чрезвычайный интерес для современного растениеводства. Например, использование солеустойчивых сортов ценных культур позволит вовлекать в сельскохозяйственный оборот засоленные земли, которые в РФ занимают площадь 16,3 млн. га, что составляет 9% от общей площади с/х земель. Пшеница является стратегическим продуктом для России и всего мира. В настоящее время, пшеница обеспечивает 21% всех пищевых калорий в мире. Потери урожая данной культуры в различных экологических и метеорологических условиях, возникают из-за засухи, засоленности, морозов, жары, грибных и вирусных болезней и насекомых. Каждый из перечисленных факторов среды может снижать урожайность, в среднем, на

15%. Получение устойчивых к засолению сортов пшеницы, позволит значительно повысить рентабельность данной культуры для РФ.

Новизна темы исследования заключается в том, нами предлагается новая технология в решении проблемы создания растений пшеницы, устойчивой к засухе и засолению. Исследование роли различных генов ТФ участвующих в ответе растений на абиотические стрессы (дефициту воды и засолению почв), относится к числу приоритетных в современной науке. В этом проекте, мы планируем перейти от модельного объекта арабидопсиса к важнейшей сельскохозяйственной культуре - пшенице и впервые охарактеризовать роль транскрипционного фактора риса OsGATA в пшенице при засолении, улучшить продуктивные сорта пшеницы, повысив их толерантность к засолению и, возможно, к засухе, чтобы минимизировать потери урожая при производстве пшеницы в засоленных областях РФ: Крыму, Северном Кавказе, Среднем и Нижнем Поволжье.

Связь данной работы с другими научно-исследовательскими работами: Создание трансгенных растений, которые могут быть использованы в практике, требует наличие нескольких компонентов, интеллектуальная собственность которых должна быть защищена патентами. Это продуктивные сорта или компоненты гибридов, системы генетической трансформации и гены, экспрессия которых улучшает свойства растений. В РФ созданы продуктивные сорта пшеницы, генетический потенциал которых не полностью раскрывается из-за стрессов среды, к которым относится и засоление почв. В ИБР РАН в группе д.б.н., А.К.Гапоненко разработаны методы генетической трансформации важнейших культур - пшеницы, подсолнечника, сахарной свеклы. Недостающий компонент создания трансгенных растений, которые могут быть использованы в практике РФ - это гены, определяющие устойчивость растений к стрессам среды. Этот компонент - гены транскрипционных факторов (ТФ), повышающие толерантность растений к стрессам, успешно выделяются и изучаются индийскими коллегами в лаборатории физиологии и молекулярной биологии стресса Университета Джавахарлала. Неру, Нью-Дели, Индия, под руководством профессора Ashwani Pareek. В лаборатории были клонированы несколько ТФ из локуса количественных признаков солеустойчивости SALTOL QTL риса. Предварительные исследования лаборатории физиологии и молекулярной биологии стресса показали роль ТФ риса OsGATA в повышении толерантности к засолению у арабидопсиса. Полноразмерная копия гена ТФ OsGATA будет выделена индийскими партнерами и будет предоставлена группе А.К.Гапоненко для генетической трансформации продуктивных российских сортов пшеницы. Планируется создание выборки трансгенных растений от независимых трансгенных событий и изучения влияния экспрессии гена ТФ OsGATA на толерантность пшеницы к засолению.

Цель проекта: Повышение толерантности к засолению у продуктивных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) путем введения транскрипционного фактора OsGATA риса, эктопическая экспрессия которого, инициируется избыточным засолением.

Цели и задачи этапа исследований, их место в выполнении НИР в целом:

1. Должен быть выполнен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках исследований, в том числе обзор научных информационных источников: статьи в ведущих зарубежных и (или) российских научных журналах, монографии и (или) патенты) - не менее 15 научно-информационных источников за период 2010 – 2015 гг.
2. Должны быть выполнены патентные исследования в соответствии с ГОСТ 15.011-96.
3. Должны быть разработаны и обоснованы экспериментальные и методические подходы повышения толерантности к засолению у пшеницы. Сравнительная оценка вариантов возможных решений исследуемой проблемы с учетом результатов исследований, проводившихся по аналогичной тематике.
4. Должен быть разработан план исследований по созданию толерантных к засолению продуктивных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), путем введения транскрипционного фактора OsGATA риса, эктопическая экспрессия которого, инициируется избыточным засолением.
5. Должна быть создана коллекция растений исходных сортов яровой мягкой пшеницы, пригодных для трансформации. Растения пшеницы должны быть выращены в условиях искусственного климата при оптимальных условиях вегетации – качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха, фитосанитарная обработка. Исследования должны проводиться на основе высокопродуктивных сортов мягкой пшеницы, занесенных в реестр селекционных достижений РФ.
6. Должна быть амплифицирована полноразмерная копия гена транскрипционного фактора OsGATA из кДНК риса методом ПЦР. кДНК риса должна быть получена постановкой ОТ ПЦР на матрице пула РНК (с использованием специфических генных праймеров), выделенной из 7-ми дневных проростков риса.
7. Должны быть создан вектор для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, несущий транскрипционный фактор OsGATA на основе вектора экспрессии растений pCAMBIA1304.

1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННОЙ НАУЧНОЙ, ЛИТЕРАТУРЫ, ЗАТРАГИВАЮЩЕЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКУЮ ПРОБЛЕМУ, ИССЛЕДУЕМУЮ В РАМКАХ НИР

1.1. Засоление почв и интенсификация сельского хозяйства

Засоление является одним из наиболее распространенных процессов деградации сельскохозяйственных земель. Оно проявляется главным образом в южных регионах страны — степной, сухостепной и полупустынной зонах. Катионы натрия являются основной причиной засоления, которое, в зависимости от типа аниона, может быть сульфатным, хлоридным, содовым (гидрокарбонатным) или смешанным. Наличие гидрокарбонатов (соды) вызывает сильнощелочную реакцию среды и приводит к дефициту кальция для растений. Присутствие легкорастворимых солей в корнеобитаемом слое вызывает деградацию почв из-за отрицательного влияния на химические, физико-химические, агрохимические параметры, а токсичное действие солей приводит к прямому разрушению клеток растений и их гибели (Гордеев и др., 2008).

Подобная деградация земель в настоящее время затрагивает около 20 % территории мира, без учета засушливых районов и пустынь, которые составляют четверть общей площади планеты (Yeо, 1999). В России засоленные почвы занимают, по разным источникам, от 24 млн. до 30 млн. га, что соответствует 11-13 % от общей площади сельскохозяйственных угодий (Гордеев и др., 2008).

Засоление может возникать либо вследствие естественных причин, например, посредством привнесения грунтовыми и поверхностными водами (засоление первичное), либо в результате антропогенного воздействия (вторичное засоление).

Вторичное засоление и осолонцевание почв возникает по следующим причинам:

1. Из-за бездренажного орошения и неконтролируемой подачи воды (грунтовые воды поднимаются до уровня выше критического на орошаемых участках, а также на землях, примыкающих к орошаемым зонам и расположенных вдоль каналов распределительной сети и вокруг искусственных водоемов);
2. Из-за орошения минерализованными водами;
3. Из-за внесения повышенных доз минеральных удобрений;
4. В результате сброса буровых растворов и минерализованных вод при нефтедобыче;
5. Из-за применения антигололедных средств в населенных пунктах (особенно в крупных городах).

Восстановление засоленных почв требует больших материальных и временных затрат, что связано с необходимостью удаления солей и возвращение утраченных физических и химических свойств, а также с последующим постоянным искусственным поддержанием такого состояния,

которое позволяет вести дальнейшее использование почв. Чаще всего, из-за дороговизны процедур восстановления, такие земли выводят из сельскохозяйственного оборота. С другой стороны, в южных регионах России засоленные и солонцовые почвы занимают столь обширные территории, что они неизбежно вовлекаются в сельскохозяйственное использование.

К настоящему времени разработаны различные способы мелиорации и технологии последующего сельскохозяйственного освоения таких земель. При восстановительных работах учитывают, в первую очередь, комплексность почвенного покрова, климатические и ландшафтные условия территории, характер последующего сельскохозяйственного использования почв. Однако, процедуры восстановления и освоение засоленных и солонцовых почв часто порождает негативные экологические последствия, вызванные перемещением легкорастворимых солей из одних мест и накоплением их в других местах (Гордеев и др., 2008).

Одним из путей использования засоленных территорий в интересах аграрного производства и биотехнологии является выращивание солеустойчивых сортов растений. Применение данного подхода позволяет решить часть обозначенных проблем, а именно: 1) Ввести в сельскохозяйственный оборот земли, которые не могут быть использованный в этом качестве из-за засоления; 2) Избежать дорогостоящих процедур искусственного восстановления почв, которое часто вызывает экологические проблемы.

Создание и выращивание биотехнологических солеустойчивых сортов ценных сельскохозяйственных растений позволит ввести в оборот обширные территории засоленных почв, которые не могут быть использованы в этом качестве в настоящее время (Flowers, Yeo, 1995, Ashraf, Harris, 2004, Yamaguchi, 2005).

1.2. Растения в условиях стресса и механизмы адаптации

1.2.1. Влияние засоления на физиологические процессы в растениях

Солеустойчивость – это способность растений проходить полный онтогенетический цикл развития на засоленных почвах и формировать жизнеспособные семена. По отношению к солевому стрессу растения делят на две основные группы: галофиты и гликофиты. Галофиты – это растения, способные завершить онтогенез в условиях высокой засоленности. Гликофиты – растения пресных местообитаний, обладающие ограниченными способностями адаптироваться к высокому содержанию соли в почве (Кошкин, 2010). Практически все с/х растения являются гликофитами. Важно учитывать, что если механизмы устойчивости галофитов конститутивны, то аналогичные механизмы гликофитов – индуцибельны (то есть реализуются лишь под воздействием фактора) (Кузнецов, Дмитриева, 2006).

Чувствительность к солевому стрессу может увеличиваться или уменьшаться в зависимости от вида/сорта растений, факторов окружающей среды и этапа онтогенеза. Например, у некоторых видов восприимчивость к засолению может быть наибольшей на этапе прорастания, в то время как для других видов увеличение чувствительность может наблюдаться во время завязывания семян (Howat, 2000). Межвидовые различия в устойчивости к засолению хорошо выявляются при анализе скорости роста растений на субстрате с различным уровнем концентрации соли (Рисунок 1). Например, рис (*Oryza sativa*) из зерновых культур является наименее устойчивым к засолению, а ячмень (*Hordeum vulgare*) – наиболее. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum*) более устойчива, чем твердая (*Triticum turgidum ssp. durum*).

Интересно, что признаки устойчивости к солевому стрессу присутствуют в геноме зерновых. Например, пырей удлиненный (*Thinopyrum ponticum*, syn. *Agropyron elongatum*) является галофитный родственником пшеницы и одним из самых устойчивых однодольных видов (Рисунок 1); его рост протекает при концентрации соли выше, чем в морской воде (Munns, Tester, 2008).

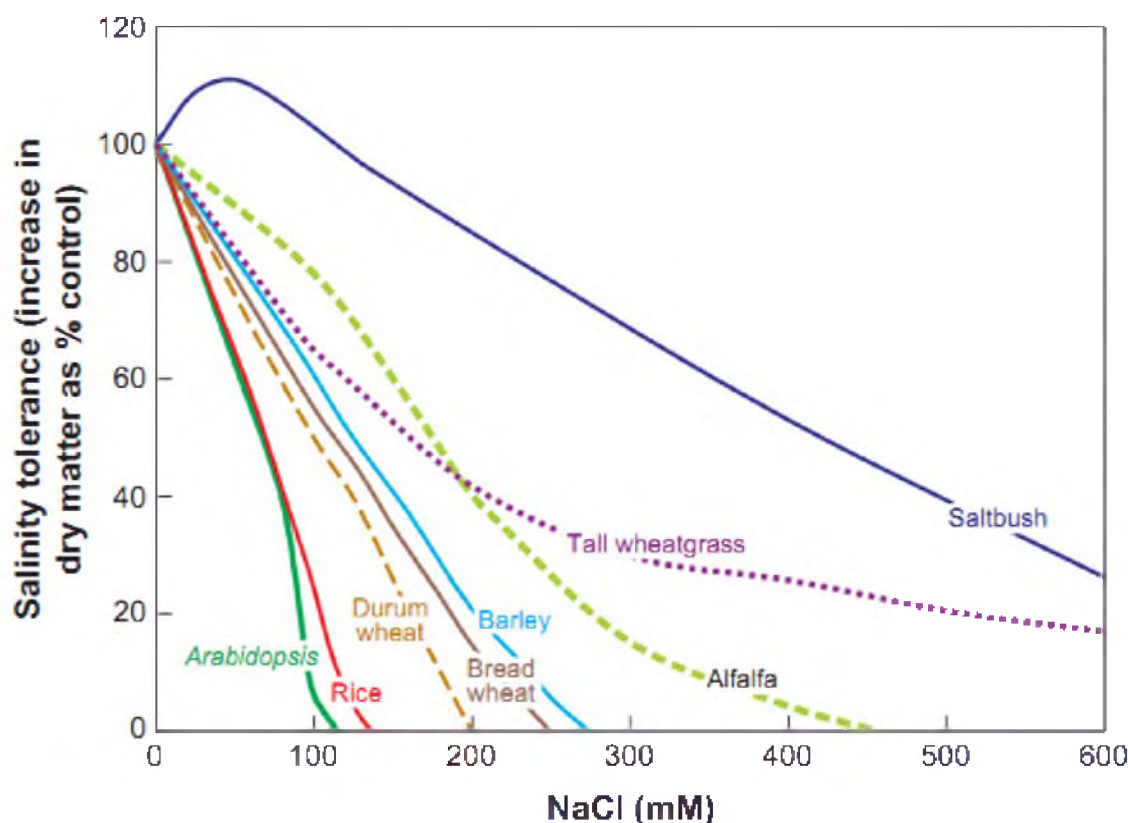


Рисунок 1 Различие в солеустойчивости у разных видов (Munns, Tester, 2008). Увеличение массы сухого вещества побегов после роста на субстрате, содержащего NaCl в различных концентрациях, не менее 3 недель, по отношению к контролю, выращенному в отсутствие NaCl (%).

У двудольных различия в чувствительности к солевому стрессу более вариабельны, чем у однодольных. Например, некоторые бобовые очень чувствительны (даже более чувствительны, чем рис) к засолению, а люцерна (Alfalfa) демонстрирует высокую устойчивость. Многие двудольные галофиты выдерживают достаточно высокие концентрации NaCl (100-200 мМ), сохраняя нормальные темпы роста (Flowers *et al.*, 1997). Например, лебеда (*Atriplex* spp.) способна хорошо расти на концентрациях солей больше, чем в морской воде (Рисунок 1). Такое модельное растение, как *Arabidopsis thaliana*, в сравнении с другими видами, при аналогичных условиях освещения и влажности (то есть, при высоких скоростях транспирации), проявляет высокую чувствительность к засолению (Рисунок 1).

1.2.2. Осмотический и ионный эффекты засоления

Токсический эффект от засоления объясняется как осмотическими эффектами, так и действием отдельных ионов (ионный эффект) (Munns, Tester, 2008). Повышенное осмотическое давление почвенного раствора, содержащего легкорастворимые соли, создает так называемую физиологическую засуху, которая воздействует на растения подобно атмосферной засухе. В дополнение к изменению водного баланса, засоление добавляет другую проблему: избыточное накопление ионов солей в клетках является токсичным и приводит к их гибели. Ионы солей ухудшают ферментативные функции, ингибирует синтез белка, влияют на структуру и проницаемость клеточных мембран, ингибируют фотосинтез, и приводят к образованию токсичных реактивных форм кислорода (Flowers, Yeo, 1995, Mäser, *et al.*, 2002).

В воздействии солевого стресса выделяют первичные и вторичные изменения. Первичные изменения - это те процессы, которые вызваны непосредственным воздействием солевого стресса. Вторичные изменения – это процессы, которые обусловлены нарушением метаболических функций вследствие солевого стресса. Для примера можно рассмотреть процесс снижения роста побегов в ответ на засоление, который происходит в два этапа: быстрое реагирование на увеличение внешнего осмотического давления (осмотический эффект) и медленный отклик, связанный с накоплением ионов Na^+ в листьях (ионный эффект) (Таблица 1).

Таблица 1 Влияние солевого стресса на растения

Влияние стресса	Осмотический эффект	Ионный эффект
Скорость наступления	Быстро (минуты-часы)	Медленно (дни-недели)
Первичное место действия	Снижение роста новых побегов	Некроз старых листьев

Осмотический эффект появляется сразу после увеличения концентрации солей вокруг корней до порогового уровня. Пороговый уровень для большинства растений составляет примерно 40 мМ NaCl, или меньше для чувствительных растений, таких как рис и *Arabidopsis* (Munns, Tester, 2008). Повышенная концентрация ионов в почве снижает поступление питательных веществ в растение из-за того, что нарушает работу транспортеров и ионных каналов корня, в частности калий-селективных ионных каналов плазматической мембраны. Недостаток питательных веществ вызывает снижение скорости роста листьев, новые листья появляются более медленно, развитие боковых почек замедляется или даже останавливается, что приводит к замедлению и остановке формирования боковых побегов (Рисунок 2).



Рисунок 2 Схема действия засоления на растение (Холодова, 2015)

У зерновых действие солевого стресса главным образом проявляется в уменьшение числа новых побегов; у двудольных - в значительном уменьшении размеров отдельных листьев или побегов (за счет потери тургора). Данный факт объясняется тем, что снижение развития листовой поверхности способствует уменьшению потребления воды растением, что в свою очередь, позволяет сохранить влажность почвы и предотвратить повышение концентрации соли в окружающей среде (Munns, Tester, 2008).

Как быстрое падение скорости роста после начала действия высокой засоленности, так и мгновенное ее восстановление после снятия действия стрессора указывают на вовлеченность в эти

процессы исключительно водного статуса клеток (осмотический эффект). Уже через несколько минут после первоначального снижения скорости роста клеток, начинается постепенное ее восстановление, длящееся от 30 мин и более, вплоть до достижения нового стационарного состояния. Время восстановления и скорость роста в новом стационарном состоянии зависят от уровня засоления и условий окружающей среды (Кошкин, 2010).

Ростовая функция корней реагирует на воздействие солевого стресса аналогичным образом, за исключением более быстрого восстановления после отмены воздействия (Hsiao, Xu, 2000).

Ионное повреждение надземных органов растений при засолении происходит вследствие того, что создается высокая концентрация (несколько сотен мМ) Na^+ в апопласте листа. Ионы Na поступают в листья в составе ксилемного тока и концентрируются в апопласте по мере расходования воды (Flowers *et al.*, 1977; Tester, Davenport, 2003). Вторая фаза реакции растения (ионно-специфическая) на засоление начинается, когда соль накапливается до токсической концентрации в старых листьях, и они отмирают. Если скорость, с которой они отмирают больше, чем скорость, с которой новые листья формируются, то фотосинтетическая способность растения падает и больше не обеспечивает потребность в углеводах молодых листьев, что дополнительно снижает их скорость роста (Carillo, *et al.*, 2011).

Ионный стресс воздействует на процесс роста гораздо позже, и с меньшим эффектом, чем осмотический, особенно на низких и средних уровнях засоления (Carillo, *et al.*, 2011). Только при высоких уровнях концентрации солей, или у чувствительных видов, которые не имеют возможность контролировать транспорт ионов Na, ионный эффект начинает доминировать над осмотическим. Вероятно, между видами растений существуют генетические различия в устойчивости к осмотическому стрессу, однако они пока не были выявлены (Munns, Tester, 2008).

Повышенная ионная устойчивость проявляется гораздо позже во времени. У многих видов, показано, что генетические различия проявляются в скорости накопления Na^+ и Cl^- в листьях, а также в чувствительности к уровню ионной концентрации. Повышенная устойчивость к обоим факторам (осмотическому и ионному) позволяет растению эффективно выживать в условиях солевого стресса (Carillo, *et al.*, 2011).

1.2.3. Токсическое действие ионов

Следует учитывать, что не все почвенные соли способны ингибировать рост. Кроме того, в почве нет солей в чистом виде, а наблюдаемые эффекты - это результат влияния на растение целого сложного комплекса солей (Tester, Davenport, 2003).

Для большинства растительных видов (особенно злаковых) ионы натрия достигают токсической концентрации раньше, чем ионы хлора, и это объясняет то, почему большинство исследований было сосредоточено на выведении и контроле транспорта Na^+ (Tester, Davenport,

2003). Но для некоторых видов, таких как соя, citrusовые и виноград, Cl^- считается более токсичным ионом (Lauchli, 1984, Storey, Walker, 1999). Доказательством этого эффекта является связь между генетическими различиями в скорости накопления Cl^- в листьях и устойчивостью к засолению. Эта разница может возникнуть из-за того, что Na^+ удерживается настолько эффективно в корнях и стеблях древесных, что его мало достигает листьев, и K^+ остается основным катионом. Таким образом, Cl^- , который продолжает проходить в листовые пластинки, становится более токсичным компонентом.

Токсическое действие ионов натрия связывают с их накоплением в тканях листа, что вызывает некроз старых листьев. Сокращение продолжительности жизни листьев в свою очередь приводит к снижению продуктивности сельскохозяйственных культур (Munns, Tester, 2008). Временные рамки, в течение которых проявляется токсичность Na^+ , зависят от уровня накопления Na^+ в листьях и от эффективности компартментации Na^+ на клеточном уровне и на уровне растения. Ионы натрия транспортируются в побег по ксилеме в быстродвигающемся транспирационном потоке, но могут быть частично выведены из ксилемного тока посредством симпортеров семейства НКТ (Carillo, *et al.*, 2011). Корни также в некоторой степени могут регулировать уровень Na^+ за счет его экспорта в почву.

Калий - ключевой макроэлемент в гомеостазе клеток и тканей, он участвует в осморегуляции, клеточном растяжении, устьичных движениях, мембранной поляризации и нейтрализации отрицательно заряженных, неспособных диффундировать ионов. Ионы калия необходимы для связывания транспортных РНК с рибосомами и, следовательно, для синтеза белка. Дефицит K^+ ведет к уменьшению содержания хлорофилла, снижению фотосинтетической активности, что приводит к ограничению роста растения (Szczzerba, *et al.*, 2009). При высокой концентрации в цитоплазме ионы натрия, они могут конкурировать с ионами калия за сайты связывания более чем 50 ферментов, активируемых K^+ , что приводит к нарушению их функционирования (Tester, Davenport, 2003, Szczzerba *et al.*, 2009).

В течение эволюции растения развили различные механизмы адаптации к засолению. Условно можно выделить три основных уровня адаптации растения к засолению: 1) Адаптация к засолению на уровне целого растения, 2) Клеточный уровень адаптации, 3) Молекулярный уровень адаптации.

1.2.4. Адаптация к засолению на уровне целого растения

Осморегуляция. Индуцированный засолением осмотический стресс снижает поступление воды в растение, что создаёт угрозу для нормального метаболизма и фотосинтеза. Транспирация играет одну из главных ролей в процессах поступления воды из корня в побег. Солевой стресс

прямо или опосредованно через гормональную регуляцию вызывает закрытие устьиц, что ведет к снижению транспирации и общего притока воды (Horie *et al.*, 2012).

Поддержание ионного гомеостаза. Солеустойчивость растения в значительной степени зависит от их способности к поддержанию ионного гомеостаза, через регулирование поступления Na^+ в корни и их последующей транспортировки по растению. Задержавшиеся в корнях ионы Na^+ могут быть изолированы в вакуоли или транспортированы в надземную часть. При этом концентрация Na^+ в корне остается достаточно постоянной с течением времени, а в побегах имеет тенденцию к медленному повышению. Органы и ткани растения демонстрируют различную чувствительность к ионам Na^+ и по-разному обеспечивают их движение. Наиболее чувствительными частями растений являются меристемы и генеративные органы (Балнокин, 2012).

Поддержание ионного гомеостаза зависит от способности растения контролировать транспорт соли в ходе нескольких процессов (Кошкин, 2010):

Избирательность поглощения клетками корня. Первоначальное поступление Na^+ из почвенного раствора осуществляется пассивно за счет градиента концентрации и разности потенциалов. Пока ещё не ясно, какие типы клеток управляют избирательностью поглощения ионов из почвенного раствора. Первоначальное поглощение Na^+ и Cl^- может происходить в эпидерме, экзодерме или, если почвенный раствор транспортируется по апопласту, даже в эндодерме.

Загрузка ксилемы. Транспорт Na^+ в корне по направлению к проводящим пучкам ксилемы проходит через симпласт и апопласт от эпидермиса к ксилеме. Имеются доказательства преимущественной загрузки K^+ (а не Na^+) клетками корневой стелы. Ограничение тока Na^+ в ксилему может осуществляться путем его задержки на границе стелы с помощью физического барьера (пояски Каспари), а также эффективным "откачиванием" Na^+ из клеток на этой границе (Steudle, 2000).

Удаление соли из ксилемы в верхней части корней, стебля, черешка или влагалища листьев. У многих видов Na^+ задерживается в верхней части корневой системы и нижней части стебля, что указывает на обмен K^+ на Na^+ в клетках стелы корня или в сосудистых пучках стебля и черешков.

Загрузка флоэмы. Транспорт Na^+ или Cl^- по флоэме незначителен (особенно у более солеустойчивых видов), что указывает на отсутствие экспорта солей к растущим частям побега.

Выведения через солевые железы. Специализированные типы клеток имеют лишь галофиты, которые обладают всеми механизмами контроля поглощения, транспорта и выделения солей. Гликофиты обладают лишь двумя первыми механизмами и реализуют их в разной степени.

Генетические вариации в рамках конкретного вида или между близкородственными видами обусловлены преимущественно различиями в контроле за поглощением солей корнями или

загрузкой ксилемы. В частности, генетические вариации в загрузке Na^+ в ксилему объясняют различия в накоплении Na^+ и соответственно в солеустойчивости у видов рода *Triticum*. Выведение солей особенно важно для многолетников, листья которых живут год или более. В этом случае возникает острая необходимость регулировать поступающий солевой поток в течение гораздо большего периода времени, чем у однолетников, листья которых живут около одного месяца. Поддержанию низкой скорости накопления соли в листьях способствуют также высокое соотношение побег/ корень, высокая скорость роста, отсутствие апопластного транспорта солей в корнях (Кошкин, 2010).

1.2.5. Адаптация к засолению на клеточном уровне

Осморегуляция. Адаптация к осмотическому стрессу происходит комплексно: отдельно на уровне цитоплазмы и отдельно на уровне вакуоли. На уровне вакуоли процесс адаптации заключается в накоплении неорганических ионов, таких как Na^+ , K^+ и Cl^- внутри вакуоли (Maathuis, 2005), а так же увеличением количества транспортеров для этих ионов в тонопласте. Для сохранения равенства осмотического потенциала в вакуоли и цитоплазме в последней должны накапливаться соответствующие осмолиты (осмопротекторы), не оказывающие токсического действия на метаболизм клетки (Кузнецов, Шевякова, 1999). Осмопротекторы - высокорастворимые низкомолекулярные вещества, такие как сахара, спирты, пролин, четвертичные соединения аммония, глицинбетаин и др. Эти вещества способствуют поглощению и удержанию воды, а также предотвращают разрушение макромолекул, присутствующих в клетках растений, под действием высоких концентраций солей. Важную роль при этом играет большой объем вакуоли, где сохраняется Na^+ .

Трансмембранное движение воды происходит за счет водных каналов - аквапоринов. Таким образом, изменение проводимости и количества этих каналов является важным этапом при адаптации к осмотическому стрессу (Hachez, Chaumont, 2010).

Поддержание ионного гомеостаза. Механизмы клеточного уровня адаптации растения к солевому стрессу заключаются в снижении концентрации Na^+ в цитоплазме. Наличие этих механизмов подтверждается накоплением значительных количеств солей в листьях (более 200 мМ), которые не теряют способность к нормальному фотосинтезу. Интересно, что в экспериментах *in vitro* аналогичные концентрации солей вызывают блокировку функций многих ферментов (Tester, Davenport, 2003), при этом, ферменты галофитов так же чувствительны к присутствию Na^+ , как и у гликофитов (Веселов и др., 2007). В поддержание гомеостаза Na^+ в цитоплазме участвуют антипортеры как плазматической мембраны, так и тонопласта (NHX, НКТ, SOS1) (Рисунок 3). Засоление индуцирует также активность H^+ -насосов тонопласта и плазматической мембраны.

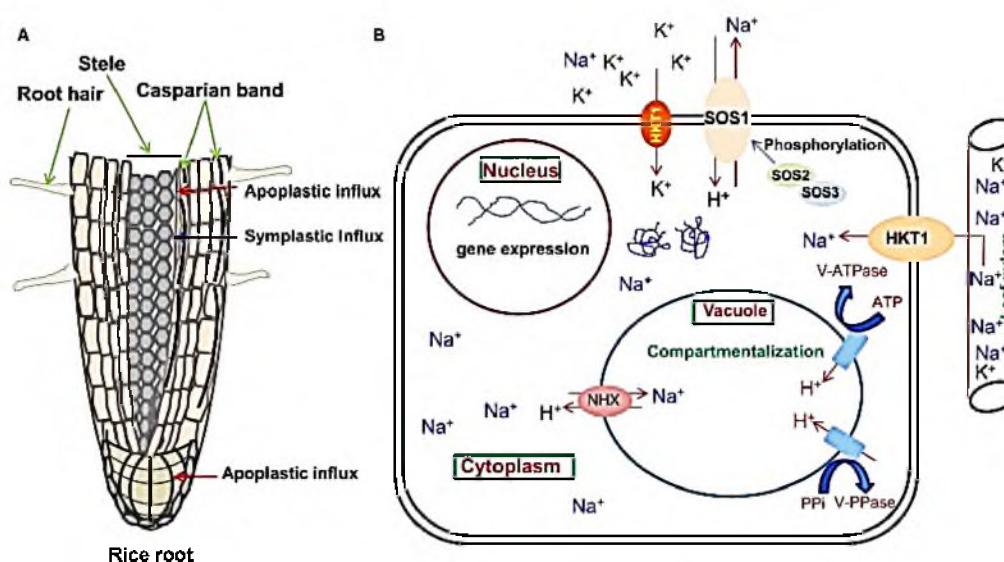


Рисунок 3 Схематическое представление притока Na^+ в корнях, пути его изоляции и первичные защитные механизмы посредством транспортеров, присутствующих на мембране и тонопласте клетки (Das *et al.*, 2015). (A) приток Na^+ через корень растения. Красные стрелки показывают возможные сайты входа Na^+ для апопластического обходного потока и синяя стрелка представляет собой путь для симпластна движения. (B) Различные транспортеры (NHX, HKT, SOS1), ответственные за движение ионов, локализованные на биологических мембранах, показано для отдельной клетки растения. Также показаны обеспечение энергии вакуоль H^+ -АТФазы или V-АТФазы, вакуоль H^+ -транслокации пирогосфатазы или V-PPase) и активации молекул (SOS3, SOS2).

Ионные каналы. Поступление ионов Na^+ в растение может идти на фоне конкуренции с поступлением ионов K^+ через калиевые каналы. Калиевые каналы растений могут быть разделены на два основных класса: потенциал-независимые неселективные катионные каналы (ПНКК) и потенциал-зависимые K^+ -каналы (ПЗКК) (Dreyer, Uozumi 2011). Функционирование ПЗКК определяется содержанием ионов K^+ в цитоплазме, тургором клетки и фазой реполяризации в ходе генерации потенциала действия. Ионные калиевые каналы активируются при деполяризации мембраны или при увеличении мембранного потенциала, участвуют в движении устьиц и обеспечивают приток и отток ионов калия из клетки в ходе генерации потенциала действия. Работа этих каналов регулируется АБК, Ca^{2+} , инозитолтрифосфатом, диацилглицеролом, G-белками.

1.2.6. Адаптации к засолению на молекулярном уровне

В ответ на солевой стресс растения отвечают множественными молекулярными и метаболическими реакциями. Такие ответы включают в себя изменение экспрессии стрессовых генов, синтез стрессовых белков, изменение ионного транспорта, активацию различных антиоксидантных систем и накопление соответствующих осмолитов (Soni *et al.*, 2015). Изучение полного транскриптома клеток корня арабидопсиса показало, что в ответ на засоление происходит

изменение транскрипции более 5,5 тыс. генов. При этом наиболее серьезные изменения экспрессии генов наблюдаются в течение первых 3-х часов солевого воздействия (Geng *et al.*, 2013). К генам солевого стресса относятся тысячи генов, которые кодируют ионные транспортеры, белки ионных и водных каналов, транспортные АТФ-азы и др. Весь этот белковый комплекс необходим для восстановления градиента водного потенциала (нарушенного при засолении) в системе почва-растение, сохранения внутриклеточного водного гомеостаза и преодоления ионного дисбаланса, а также для синтеза осморегуляторов и полифункциональных стресс-протекторных соединений, включая компоненты антиоксидантной системы (Turan *et al.*, 2014, Soni *et al.*, 2015). Гены солевого стресса не могут экспрессироваться без активации транскрипции генов, кодирующих сенсорные молекулы, транскрипционные факторы и компоненты внутриклеточной передачи стрессового сигнала.

1.2.6.1. Восприятие сигнала повышенного засоления

Для эффективного восприятия сигналов солевого стресса, растения развили способность распознавать как гиперосмотический компонент, так и ионный (Na^+) компоненты стресса. О наличии двух сенсорных систем говорит тот факт, что растения дают различные ответы на NaCl и на чисто осмотический стресс (Deinlein *et al.*, 2014). Реакции на два этих сигнала достаточно сложно отделить одну от другой, т.к. высокая концентрация соли в почвенном растворе оказывает гиперосмотическую нагрузку на корни. На сегодняшний день вопрос о наличии у растений двух сенсорных систем, воспринимающих отдельно сигнал гиперосмотического и ионного стресса, остается дискуссионным. Имеется предположение, что роль осмосенсора у растений арабидопсиса может выполнять белок-рецептор - гистидикиназа НК1, которая в реакции комплементации способна восстанавливать утраченную функцию осмосенсора у дрожжей (Urao *et al.*, 1999). Кроме того, суперэкспрессия гена НК1 восстанавливает утраченную устойчивость к засухе и осмотическому стрессу у мутантных линий *Arabidopsis thaliana* (Tran *et al.*, 2007, Wohlbach *et al.* 2008). Гиперосмотические рецепторы растений, скорее всего, тесно связаны с Ca^{2+} -каналами, поскольку уровень кальция в цитоплазме многократно возрастает, спустя несколько секунд после воздействия NaCl или маннитола на клетки корня (Knight *et al.*, 1997, Tracy *et al.*, 2008).

На роль вторичных мессенджеров солевого стресса могут претендовать ионы кальция (Ca^{2+}) и активные формы кислорода - АФК (ROS) (Рисунок 4) (Jiang *et al.*, 2013a, Deinlein *et al.*, 2014). Вторичный мессенджер передает сигнал на Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPKs) и другие протеинкиназы (CBLs, CIPKs), которые передают сигнал об осмотическом стрессе на транскрипционные факторы (ТФ), регулирующие экспрессию стресс-контролируемых генов. Причем транскрипционные факторы могут активироваться непосредственно Ca^{2+} /кальмодулином, кальмодулинсвязывающими транскрипционными активаторами (CAMTAs), GT-элемент-

связывающими белками (GTLs) и MYBs (Deinlein *et al.*, 2014). Хотя быстрое увеличение концентрации Ca^{2+} является признаком ответа на осмотический стресс, могут существовать и Ca^{2+} -независимые осмотические сенсорные механизмы.

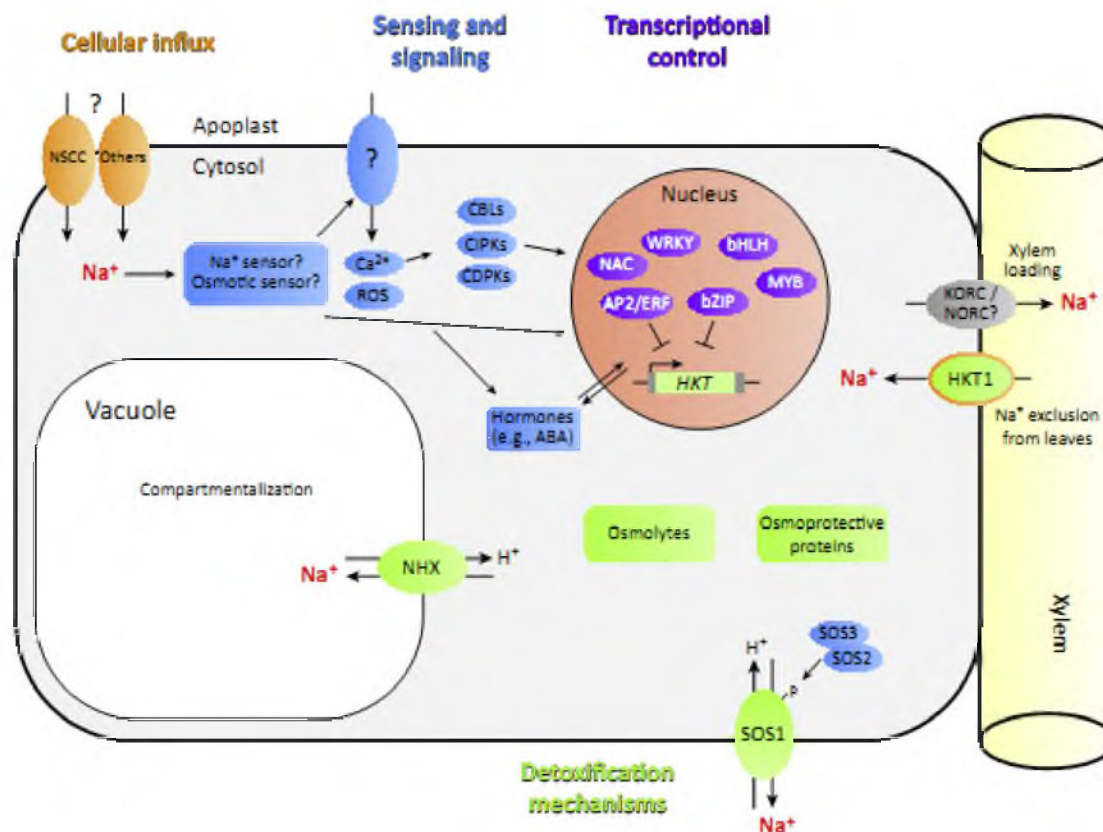


Рисунок 4 Схема важнейших ответных реакций на солевой стресс клеток корня растений и механизмов транспорта ионов натрия (Deinlein *et al.*, 2014). Na^+ (красный цвет) поступает внутрь клетки через NSCC и другие мембранные транспортеры, большинство из которых до сих пор еще не идентифицированы. После восприятия сигнала, активируются Ca^{2+} , АФК и гормональные сигнальные каскады. CBLs, CIPKs и CDPKs являются компонентами Ca^{2+} -сигнального пути (сенсорные и сигнальные участники имеют голубой цвет), который может изменять глобальный транскрипционный профиль растения (семейства ТФ помечены в ядре пурпурным цветом; в качестве примера представлены AP2/ERF и bZIP, которые являются негативными регуляторами экспрессии HKT гена). В итоге, эти начальные сигнальные пути приводят к экспрессии и активации клеточных механизмов детоксификации, включая HKT, NHX и SOS Na^+ -транспортные механизмы, а также механизмы осморегуляции (клеточные механизмы детоксификации показаны зеленым цветом). Более того, распределение Na^+ по растению регулируется ткане-специфичным путем на уровне выведения Na^+ из ксилемы. Обозначения: NSCCs – неселективный катионный канал; ROS – активные формы кислорода; CDPKs - Ca^{2+} -зависимая протеинкиназа; CBLs - calcineurin B-подобный белок; CIPKs, CBL-взаимодействующие протеинкиназы; AP2/ERF, APETALA2/Ethylene Response Factor; bZIP, basic leucine zipper; NHX, Na^+/H^+ exchanger; SOS (Salt Overly Sensitive).

1.2.6.2. Регуляция транспорта Na^+/K^+

Мембранные транспортеры играют ключевую роль в механизмах устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам у растений. Для устойчивости к засолению особенно важны Na^+ и K^+ транспортеры (Schroeder *et al.* 2013). Ионный гомеостаз во время солевого стресса требует поддержания стабильного притока и транспорта K^+ , т.к. накопление K^+ в клетках растений уравнивает токсические эффекты накопления Na^+ . Существуют различные пути поступления Na^+ в клетки корня: Na^+ может проникать через клеточную мембрану с помощью ионных/катионных каналов и транспортеров. Кальций-проницаемые неселективные катионные каналы - Calcium-Permeable Nonselective Cation Channels (NSCCs), включая управляемый циклическими нуклеотидами каналы - Cyclic Nucleotide-Gated Channel (CNGC) и глутамат-подобный рецепторы - Glutamate-Like Receptor (GLR), проницаемы для Na^+ и, таким образом, представляют собой вероятные пути поступления Na^+ в клетку (Рисунок 4) (Tester, Davenport, 2003, Deinlein *et al.*, 2014).

Кроме того, у риса (*Oryza Sativa*) был выявлен Na^+ -транспортер OsHKT2;1 который опосредуют приток Na^+ в корни при K^+ -голодании (Horie *et al.*, 2007), а у арабидопсиса катион/ H^+ -симпортер AtCHX21, экспрессирующийся в корневой эндодерме, участвует в транспорте ионов Na^+ из эндодермы в клетки осевого цилиндра (Hall *et al.*, 2006).

Контроль переноса (загрузки) Na^+ в ксилему осуществляется двумя вероятными кандидатами: выходным селективный K^+ -каналом стелярной паренхимы - KORC и неселективным выходным катионным каналом – NORC/NSCC (de Boer, Wegner, 1997). Класс I HKT транспортеров играет важную роль в выведении Na^+ из ксилемы (см.ниже) (Sunarpi *et al.* 2005). Входные и выходные K^+ -каналы участвуют в долгосрочном селективном притоке и оттоке K^+ в растительные клетки, и соответственно участвуют в снижении токсического действия Na^+ (Schroeder *et al.* 2013).

1.2.6.3. Роль NHX и SOS в поддержании низкого уровня Na^+ в цитоплазме

Двумя основными факторами, поддерживающими низкие концентрации цитоплазматического Na^+ в клетках растений, являются тонопласт-локализованный Na^+/H^+ -антипортер 1 NHX1, и мембрано-локализованный Na^+/H^+ -антипортер SOS1 (также известный как NHX7) (Yamaguchi *et al.* 2013) (Рисунок 4).

В то время как большинство NHX необходимы для детоксикации Na^+ за счет выведения ионов Na^+ в вакуоль, антипортеры SOS участвуют в экспорте Na^+ из клетки. Конститутивная сверхэкспрессия AtNHX1 и его ортологов в *Arabidopsis* и других видах растений, таких как

томаты (*Solanum Lycopersicum*) или рис (*Oryza Sativa*), приводила к увеличению солеустойчивости (Deinlein *et al.*, 2014).

Недавние исследования показали, что белки NHX-типа также играют важную роль при обособлении K^+ в вакуолях и клеточного гомеостаза pH (Barragan *et al.*, 2012). Избыточная экспрессия AtNHX1 в томатах приводит к увеличению концентрации вакуолярного K^+ , а также к ускорению транспорта K^+ из корня в побеги (Bassil *et al.*, 2011, Deinlein *et al.*, 2014). Кроме того, томатный LeNHX3 был локализован в локусах количественных признаков (QTL), связанных с накоплением Na^+ в листьях (Villalta *et al.*, 2008).

Последние работы показывают, что вакуолярные NHX-антипортеры участвуют в регуляции осмоса, росте клеток и развитии растений, в то время как эндосомные NHX-антипортеры имеют решающее значение для роста клеток и могут быть вовлечены в процесс перемещения везикул и производство белков (Bassil *et al.*, 2011, Barragan *et al.*, 2012, Deinlein *et al.*, 2014). Ранее было показано вовлечение эндосомных транспортных белков, в том числе NHX, в механизмы солеустойчивости растений, через контроль ионного и pH гомеостаза органелл (Yamaguchi *et al.* 2013, Bassil *et al.*, 2011, Deinlein *et al.*, 2014). NHX5 и NHX6 совместно локализуются с маркерами цис- и транс-сети Гольджи и нокаутированные по двум генам *nhx5* и *nhx6* растения были более чувствительны к засолению (Leidi *et al.*, 2010). Кроме того, потеря функции вакуолярной H^+ -АТФазы (V-АТФазы), не изменяла солеустойчивости арабидопсиса. Напротив, снижение V-АТФазы в транс-сети Гольджи/ранней эндосоме (TGN/EE) приводило к повышению чувствительности к засолению (Villalta *et al.*, 2008). Интересно, что избыточная экспрессия вакуолярного протонного пирофосфатазного насоса типа I (AVP1) улучшает устойчивость растений к засолению за счет обособления Na^+ в вакуоли (Undurraga *et al.*, 2012). Роль протонного пирофосфатазного насоса (H^+ -PP) в регуляции солеустойчивости была показана на злаках. Растения ячменя (*Hordeum vulgare*) с гиперэкспрессией AtAVP1 проявляли повышенную толерантность к засолению не только в условиях теплицы, но также дали повышенный прирост биомассы и урожайности при полевых испытаниях на засоленных почвах (Schilling *et al.*, 2013).

1.2.6.4. Регуляция экспрессии генов растений в ответ на солевой стресс

Факторы транскрипции являются неотъемлемой частью сигнального пути солевого стресса при различных стрессовых ответах. В ответ на повышение внешнего засоления начинают дифференциально экспрессироваться различные генные семейства факторов транскрипции: bZIP, WRKY, AP2/ERF, MYB, bHLH, NAC и др. (Golldack *et al.* 2011). Эти транскрипционные факторы, в свою очередь, регулируют уровни экспрессии различных генов, которые в конечном итоге, влияют на уровень солеустойчивости растений (Рисунок 4). Для компенсации потери воды, из-за повышенного внешнего осмотического давления (результат высокой минерализации),

активируются гены, вовлеченные в поглощение и транспорт неорганических ионов и синтез осмолитов (Geng *et al.*, 2013). В какой-то степени, регуляция транскрипции этих зависимых от стресса генов в растениях происходит при посредничестве гормональной системы растения (Рисунок 3). После индукции стресса, начальный период покоя сопровождается фазой восстановления роста, оба эти процесса коррелируют с изменением уровня гормонов - абсцизовой кислоты (ABA), жасмоната (JA), гиббереллиновой кислоты (GA) и брассиностероида (BR).

Важное значение имеет повышение концентрации АБК в корне и ее транспорт в ассимилирующие органы. При этом, повышение концентрации АБК достигается как транскрипционной активацией генов, кодирующих соответствующие ферменты, так и ингибированием ферментов катаболизма АБК (Xiong *et al.*, 2002). Существуют АБК-зависимые и АБК-независимые цепи передачи сигналов. Основное звено АБК-независимых цепей передачи сигналов состоит из MAPK-каскада или CDPK. Результатом проведения сигналов является регуляция экспрессии ряда ТФ, ответственных за активирование кодирующих гены клеточных эффекторов устойчивости к гиперосмотическому стрессу (Shinozaki, Shinozaki-Yamaguchi 1997).

Недавно было показано участие этилена в адаптации растений к почвенному засолению через изменение соотношения Na^+/K^+ в побегах. Нокаут ETHYLENE-OVERPRODUCER1 (ETO1), вызывающий повышение уровня этилена, которое стимулирует производство АФК (ROS) клетками осевого корня. Накопление АФК приводит к снижению приток Na^+ в корни, снижению Na^+ в ксилеме и задержке K^+ в корнях и, следовательно, повышение толерантности к засолению (Jiang *et al.* 2013b).

В ответ на высокое засоление, большинство стресс-индуцируемых транскрипционных изменений происходят примерно через 3 часа после действия солевого стресса. В корнях проростков *A.thaliana* в ответ на солевой стресс экспрессируется 5590 генов. Наиболее активная экспрессия этих генов осуществляется в клетках коры корня (Geng *et al.*, 2013).

ABA предотвращает удлинение боковых корней в окружающую среду с высокой концентрацией солей. Кроме того, растения стараются обойти сильно засоленные участки, изменяя направление роста корней (Galvan-Ampudia *et al.*, 2013). Это явление называется - галотропизм и вызывается оно не осмотическим стрессом, а более-индуцибельным ауксиновым ответом.

Сложность ответа растений на стрессы заключается, прежде всего, в том, что существуют сотни генов и биохимических молекулярных механизмов, индуцируемых абиотическими стрессами в растениях (Seki *et al.*, 2002; Avni Öktem *et al.*, 2008). Анализ функций стресс-индуцируемых генов является важным инструментом не только для понимания молекулярных механизмов стрессоустойчивости и ответов высших растений, но и для выявления путей улучшения стрессоустойчивости сельскохозяйственных культур с помощью генных манипуляций

– генетической трансформации и редактированием генома растений. Многие гены, индуцируемые засухой, также индуцируются солевым и холодовым стрессами, что свидетельствует о существовании сходных механизмов регуляции стрессовых реакций растений (Seki *et al.*, 2003).

Эти гены можно классифицировать на три большие группы:

1. Гены, кодирующие продукты, которые напрямую защищают клетки растений от стресса: как стрессовые белки теплового шока (HSPs) или шапероны, белки позднего эмбриогенеза (LEA), осмопротектанты антифриз белки, ферменты детоксикации и уничтожающие свободные радикалы (Bray *et al.*, 2000, 2002, 2004; Wang *et al.*, 2000a, 2003b);

2. Гены, вовлеченные в сигнальные каскады и контроль транскрипции, такие как митоген-активируемая протеин киназа (MAPK), кальций зависимая протеин киназа (CDPK) (Ludwig *et al.*, 2004), SOS киназы (Zhu *et al.*, 2001), фосфолипазы (Frank *et al.*, 2000) и транскрипционные факторы (TF) (Cho *et al.*, 2000; Shinozaki *et al.*, 2000);

3. Гены, вовлеченные в поглощение и транспорт воды и ионов, такие как аквапорины и транспортеры (Blumwald *et al.*, 2000).

Транскрипционные факторы, вовлеченные в ответ растений на стрессы. За последние несколько лет, анализ транскриптома показал, что различные стрессы окружающей среды вызывают одинаковые ответы растений. Перекрытием стрессовых реакций можно объяснить явление, известное как перекрестная толерантность, т.е. возможность ограничить сопутствующий ущерб, нанесенный другими стрессами, сопровождающими основной стресс. Ответы растений на абиотические стрессы требует производства важных метаболических белков, которые участвуют в синтезе осмопротекторов и регуляторных белков, действующих в сигнальной трансдукции. Этими белками являются киназы и факторы транскрипции (TFS), которые регулируют экспрессию сотен генов путем связывания со специфическими последовательностями ДНК в промоторах соответствующих генов-мишеней. Этот тип транскрипции регуляторной системы называется регулон. Были идентифицированы, по крайней мере, четыре различных регулона, которые активны в ответе на абиотические стрессы. За проблему обезвоживания клетки отвечает белок связывающие элементы DREB1 (DREB1)/C-repeat binding factor и (CBF)/DREB2/. Эти регулоны функционируют независимо от действия абсцизовой кислоты (ABA), в то время как ABA-зависимый (ABRE) связывающий белок (AREB)/ABRE связывающий фактор (ABF) регулон функционирует как ABA-зависимая регуляция экспрессия гена (Saibo *et al.*, 2009). В добавок к этим главным регулонам, обнаружены и другие регулоны, включая NAC (или NAM, No Apical Meristem) and Myeloblastosis-Myelocytomatosis (MYB/MYC), которые вовлечены в регуляцию экспрессии абиотических стресс зависимых генов (Рисунок 5). В частности, NAC- тип ТФ OsNAC6 индуцируется такими абиотическими стрессами, как холод, засуха и засоление.

Микроэрей (microarray) анализ показал, что много абиотически-индуцибельных генов увеличивают экспрессию в рисе при сверх-экспрессии OsNAC6 (Nakashima *et al.*, 2007).

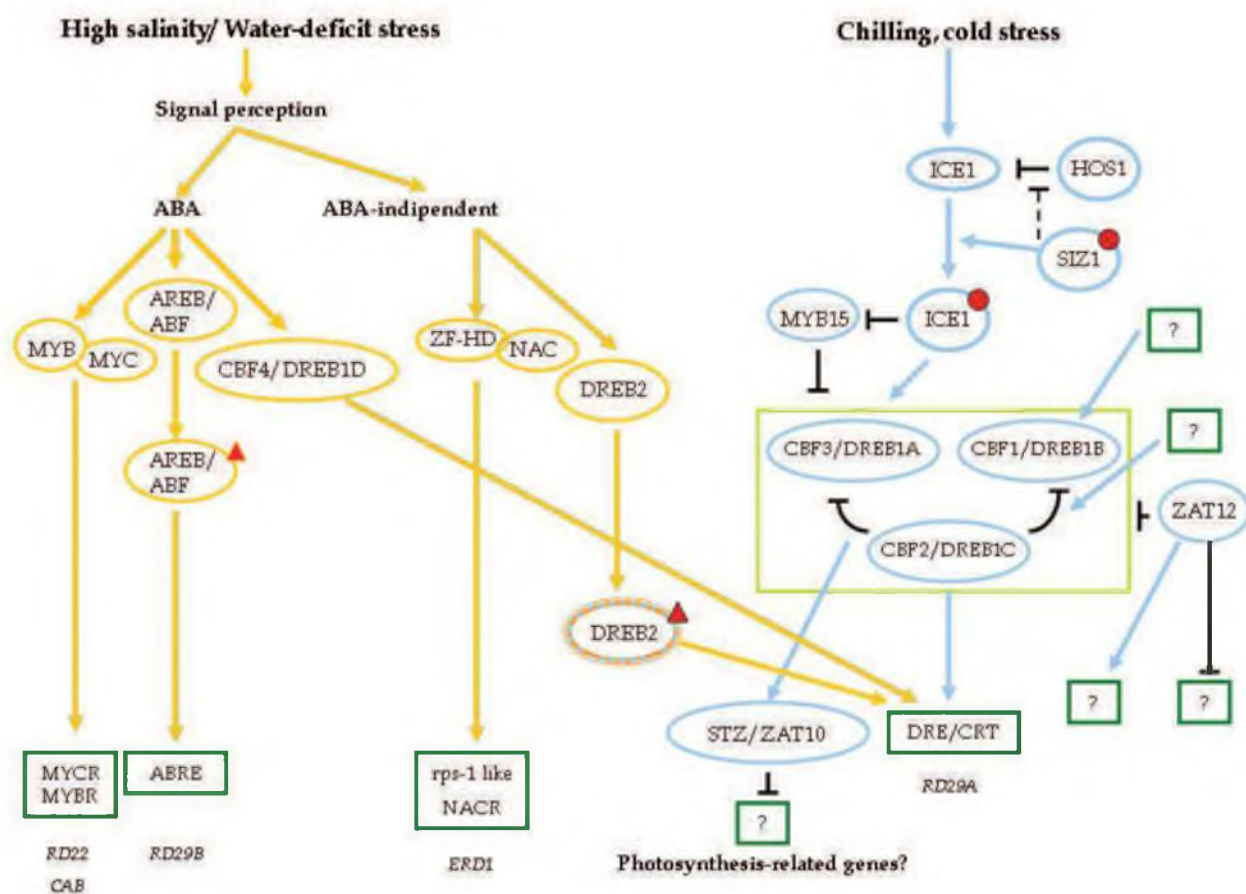


Рисунок 5 Транскрипционная сеть абиотических стрессовых реакций растений (Ciarmiello *et al.*, 2011). ТФ показаны в овалах. ТФ-модифицирующие ферменты показаны кругами. Маленькие красные треугольники соответствуют пост-трансляционным модификациям. Зеленые квадраты с вопросительными знаками представляют предполагаемые ТФ MYC, ICE1, которые могут активировать CBF1/DR EB1B и CBF2/DR EB1C. Зеленые прямоугольники представляют цис-элементы стресс-индуцируемых генов. Красные точки соответствуют модификации сумоилирования по SIZ1 ТФ ICE1. Пунктирная черная линия от SIZ1 к HOS1 показывает место конкурентного связывания на ТФ ICE1. SIZ1 блокирует доступ HOS1 к ICE1 за счет убиквитинирования сайтов связывания. CBF4/DREB1D является ABA-зависимым цис-элементом связывания ТФ DRE.

1.3. Пути создание солеустойчивых культур

1.3.1. Классические методы селекции

Традиционные методы селекция для производства высокоурожайных и устойчивых к стрессу культур используются очень давно. Селекционеры используют генетические потенциал солеустойчивых генотипов, для внутривидовых, межвидовых и межродовых скрещиваний. Таким способом было выведено несколько солеустойчивых сортов/линий, например - CSR10, CSR13,

CSR27 солеустойчивые сорта риса (Центральной научно-исследовательский институт засоления почв, Индия). Тем не менее, классическая селекция имеет ряд ограничений: 1) полигенность признака устойчивости к засолению, 2) низкий внутривидовой потенциал, 3) привнесение нежелательных признаков, 4) несовместимость скрещиваемых видов и др. (Turan, *et al.*, 2012). К тому же при выведении устойчивых к засолению линий/сортов, необходимо сохранять другие важные агрономические характеристики, такие как урожайность, продуктивность и пр. Геномные инструменты, такие, как молекулярные маркеры и методы генной инженерии, значительно повышают эффективность селекционных программ.

1.3.2. Маркер-ассоциированная селекция (MAC)

Маркер-ассоциированная селекция (MAC) – (marker-assisted selection) или маркер-вспомогательная селекция широко используется для решения следующих задач (Леонова 2013): 1) Оценка генетического разнообразия и чистоты сортового материала; 2) Хромосомная локализация и картирование генов и локусов количественных признаков (QTL) и выявление маркеров, тесно сцепленных с признаками; 3) Контроль различных типов скрещивания; 4) Интрогрессия генов/QTLs в различных схемах MAC; 5) Пирамидирование генов; 6) Селекция признаков с количественным наследованием.

В сочетании с методами классической селекции MAC существенно сокращает время необходимое для создания стрессоустойчивых сортов (Леонова 2013). В качестве примера можно привести большой пятилетний интернациональный проект «От QTL до сорта: маркер-ассоциированная селекция сортов риса, устойчивых к абиотическим стрессам с использованием QTLs для засухи, затопления и засоления» в котором приняли участие 18 научно-исследовательских центров Индии и Филиппин (Singh *et al.*, 2016). Исследователи использовали стратегию интрогрессии QTLs в трех направлениях - устойчивость к засухе, затоплению и засолению. Четырнадцать скрещиваний было проведено для интрогрессии DTY QTLs (засухоустойчивость) в 3-и сорта-реципиента, 10-ти скрещиваний - для введения Sub1 QTL (устойчивость к затоплению) в 10-ть сортов-реципиентов и 7-ми скрещиваний для интрогрессии Saltol QTL (устойчивость к засолению) в 7-мь сортов-реципиентов. Схема MAC состояла из 3-х шаговой селекционной стратегии: (а) беккроссные скрещивания и отбор по внутренним QTL/ген маркерам; (б) отбор по рекомбинантным/сцепленным с QTL SSR маркерам; и (с) на заключительном этапе, использованием SNP 50K чипов высокой плотности, чтобы выбрать среди полученных линии, наиболее рекуррентные родительским генотипам. Отбор на основе ДНК-маркеров сопровождали фенотипическим отбором введенного признака в теплице и в полевых испытаниях. В результате за 5 лет (что на 7 лет меньше, чем при получении сорта с помощью традиционных способов селекции), на основе широко используемых в данном регионе сортов

риса, были получены три типа устойчивых линий (к засухе, к затоплению и засолению) на 90% изоморфные к родительским (Singh *et al.*, 2016). Однако солеустойчивость представляет собой мультигенный признак, подверженный влиянию окружающей среды и эпистатическим взаимодействиям, что сильно осложняет процесс интрогрессии QTLs для данного признака.

1.3.3. Генетическая инженерия

В настоящее время, в мире все более широко используются биотехнологические подходы увеличения устойчивости экономически важных растений к стрессам (Nechaev, Garopenko 2013). Создание толерантных к засолению культур с помощью генной инженерии происходит за счет модификации: 1) синтеза осмопротекторов; 2) ионных каналов и транспортеров; 3) антиоксидантных ферментов; 4) транскрипционных факторов; 5) шаперонов, 6) сигнальных молекул и др.

1.3.3.1. Модификация по генам осмопротекторов

Более 20 лет назад, до развития постгеномных наук, таких как функциональная геномика, транскриптомика и ряда других, наиболее часто для повышения толерантности растений к засолению использовали:

1. Гены, которые кодируют ферменты, необходимые для биосинтеза различных осмопротектантов (Holmberg & Bulow 1998, Tarczynski & Bohnert 1993, Kishor *et al.*, 1995, Hayashi *et al.*, 1997).
2. Гены, которые кодируют ферменты для изменения мембранных липидов (Kodama 1994, Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996).
3. Гены белков позднего эмбриогенеза растений (LEA белков) (Xu D., *et al.* 1996)

Гены, кодирующие осмопротекторы были частыми субъектами генетических модификаций несмотря на то, что их сверхэкспрессия в некоторых случаях приводила к повышению солеустойчивости сельскохозяйственных растений, но в целом они также влияли на рост растений и в отсутствие стресса, снижая урожайность растений, что было весьма нежелательно для фермеров (Flowers 2004, Yamaguchi & Blumwald 2005).

1.3.3.2. Инженерия транспортеров и ионных каналов

Поглощение солей контролируется низким и высоким сродством ионных транспортеров: трансмембранных белков, которые перемещают ионы через клеточную мембрану, которые также необходимы для поглощения ионов калия (K^+). Выведение ионов из растения зависит от активности гена SOS1 (Salt Overly Sensitive1), изначально охарактеризованном в *Arabidopsis*, но

недавно идентифицированном в рисе, и показана его функциональная консервативность у двудольных и однодольных (Martínez-Atienza et al., 2007). Вакуолярные мембранные транспортеры, в том числе один, кодируемый геном арабидопсиса AtNHX1, играют роль в секвестрации ионов в вакуоли. NHX1 белки также консервативны у разных видов, и были выделены из нескольких культур. Сверх-экспрессия генов NHX1 у *Arabidopsis*, риса, рапса и томатов увеличивает устойчивость к солевому стрессу (ISAAA 2007, <http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/32/default.asp>).

Избыточная экспрессия гена вакуолярного Na^+/H^+ антипортера показала улучшение толерантности к засолению у некоторых растениях (Silva & Geros, 2009). Показано, что повышенная экспрессия AtNHX1 в растениях арабидопсиса способствовало устойчивому росту и развитию при поливе раствором, содержащим до 200 mM NaCl (Apse et al., 1999), хотя недавние свидетельства сообщают, что трансгенный арабидопсис не показывал значительно улучшенную устойчивость к соли, по сравнению с контрольными растениями (Yang et al., 2009). Трансгенные растения томата, избыточно экспрессирующие ген AtNHX1 смогли расти, цвести и плодоносить в присутствии 200 mM NaCl (Zhang, et al., 2001; Zhang & Blumwald, 2001). Также, трансгенные растения табака с гиперэкспрессией гена GhNHX1 из хлопка и трансгенный рис сверхэкспрессирующими ген Na^+/H^+ антипортера OsNHX1 показали более высокую солеустойчивость (Fukuda et al., 2004; Wu, et al., 2004). Избыточная экспрессия AtNHX1 в *Petunia hybrida* усиливает солеустойчивость и засухоустойчивость этого растения, которое аккумулировала больше Na^+ , K^+ и пролина в ткани листьев, чем растения дикого типа, сохраняя высокое содержание воды и высокое соотношение K^+/Na^+ (Xu, et al., 2009). Введением NAX генов *Triticum monococcum* в гексаплоидную мягкую пшеницу (*Triticum aestivum* L.), концентрация Na^+ в листовой пластинке была снижена на 60% и увеличена доля Na^+ в пазухах листьев. Эти результаты показывают, что NAX гены имеют потенциал для улучшения солеустойчивости мягкой пшеницы (James et al., 2011).

Повышенная экспрессия в томате, рисе и арабидопсисе гена Аргинин Вазопрессин 1 (AVP1), кодирующего вакуольную пирофосфатазу, действующей как протонный насос на вакуолярной мембране, увеличивает секвестрацию ионов и сахаров в вакуоли, уменьшая водный потенциал и приводит к увеличению толерантности к соли, по сравнению с растениями дикого типа (Pasapulaet et al., 2011). Сверхэкспрессия генов позднего эмбриогенеза (LEA) приводит к накоплению до высоких уровней белков, в процессе развития семян, у ячменя HVA1 (Xu et al., 1996) и пшеницы дегидрин DHN-5 (Brini et al., 2007), также может повысить толерантность растений к соли, хотя их функция не ясна.

1.3.3.3. Использование антиоксидантных ферментов и глиоксалазной системы

Активные (реактивные) формы кислорода (ROS) синтезируются в растениях при нормальных условиях; но в условиях стрессового воздействия их количество значительно увеличивается. В подобную антиокислительную защиту вовлечены как ферментативные, так и не ферментативные метаболиты. Сверхэкспрессия в трансгенных растениях таких антиокислительных ферментов как супероксид-дисмутаза, глутатион-редуктаза, глутатион-пероксидаза, аскорбат-пероксидаза и ферментов, участвующих в детоксификации свободных радикалов, вызывала устойчивость к различным абиотическим стрессам (McKersie, *et al.*, 1996, Turan, *et al.*, 2014). Экспрессия хеликазы МН1 люцерны в арабидопсисе приводило к увеличению соле- и засухоустойчивости за счет улучшения антиокислительной защиты (Luo, *et al.*, 2009).

К числу генов антиокислительных ферментов относится и гены *Gly I* и *Gly II* системы глиоксалазного метаболического пути, сопряженного с системой гомеостаза глутатиона, регулирующего содержание свободных радикалов и окислительно-восстановительный потенциал в цитоплазме. Поэтому генно-инженерные манипуляции с метаболическим путем глутатиона представляются многообещающими для повышения устойчивости растений к стрессам.

При условиях абиотического стресса, растения аккумулируют высокий уровень высокотоксичного соединения метилглиоксаля (МГ). МГ взаимодействуя с ДНК, РНК и белками вызывает в них различные повреждения. Существует несколько механизмов обезвреживания этого соединения. Первый путь это детоксификация клеток и второй поддержание гомеостаза окислительно-восстановительного потенциала клеток. Растения используют глиоксалазный метаболический путь, в котором участвуют два фермента: глиоксалазу 1 (*Gly I*) и глиоксалазу 2 (*Gly II*). *Gly I* детоксифицирует МГ до S-лактоглутатиона (SLG) при этом используя одну молекулу восстановленного глутатиона. Впоследствии, SLG преобразуется в лактат и молекула восстановленного глутатиона возвращается обратно в систему гомеостаза глутатиона. Наши соисполнителями (Проф.С.Сопори и др., ICGEB, New-Delhi, India) показано, что сверх экспрессия генов *GlyI* и *Gly II* у растений ведет к существенному повышению устойчивости к засолению как для двудольных растений (*Nicotiana tabacum* L), так однодольных – риса *Oryza sativa*. Большое количество трансгенных было получено на основе модификации метаболических путей метилглиоксаля. Метилглиоксаль является цитотоксическим продуктом, поэтому в клетке существует несколько механизмов его инактивации, в том числе глиоксалазная система. Метилглиоксаль реагирует в клетке с глутатионом, и затем метаболизируется глиоксалазой I и глиоксалазой II. Трансгенные растения сверхэкспрессирующие гены *GlyI* (Glyoxalase I) и *GlyII* (glyoxalase II) демонстрируют толерантность к засолению (Yadav *et al.*, 2005; Singla-Pareek *et al.*, 2003, 2008; Ghosh *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2015).

1.3.3.4. Модификация транскрипционных факторов

Как показал практика, единичные гены не способны обеспечивать комплексную устойчивость к засолению, поэтому была выдвинута идея модифицировать растения на уровне стресс-индуцируемых ТФ, регулирующих работу нескольких генов. К тому же многие стресс-отзывчивые гены, могут иметь общий ТФ. Известно несколько семейств ТФ - DREB, NAC, MYB, MYC, Cys2/His2-цинковые пальцы, bZIP, AP2/ERF и WRKY, участвующих в толерантности к солевому стрессу. Они связываются с промотором и/или регуляторными элементами генов сигнальных генов. Член(ы) различных групп могут быть вовлечены в единичный ответ, и члены той же группы могут также участвовать в различного рода стрессовых реакциях. Многие трансгенные растения (Таблица 2) устойчивые к засолению были получены с помощью генной инженерии гена(ов) ТФ (Turan, *et al.*, 2012).

Трансгенные растения *A. thaliana* со сверхэкспрессией AtDREB1A демонстрировали высокую устойчивость к обезвоживанию, засолению и низким температурам (Liu *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2006). Аналогично, избыточная экспрессия гена ТФ OsDREB1A из риса в растениях арабидопсиса вызывала увеличение устойчивости к тем же абиотическим стрессам (Dubouzet *et al.*, 2003; Zhang Y. *et al.*, 2009). Растения риса и сои экспрессирующие DREB2A были сравнительно более устойчивы к засухе и засолению по сравнению с нетрансформированными образцами (Mallikarjuna *et al.*, 2011; Zhang X. *et al.* 2013). Семейство специфических ТФ NAC (NAM, ATAF1/2 и CUC2) участвует как в развитие растения, так и в реакциях на стресс. Трансгенные растения риса сверхэкспрессирующие SNAC1 и SNAC2 (стрессовые NAC риса) показали повышенную солее- и засухоустойчивость (Hu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008). Сверхэкспрессия OsNAC5 в рисе и арабидопсисе увеличивала солее- и засухоустойчивость, а нокдаун этого гена в рисе приводил к повышенной чувствительности к засолению (Song *et al.*, 2011). Точно так же избыточная экспрессия ONAC045 (рисовый NAC) в рисе вызывала повышение толерантности к засухе и засолению (Zheng *et al.*, 2009). Такой же эффект вызывает сверхэкспрессия OsbZIP23 (член семейства ТФ bZIP из риса) (Xiang *et al.*, 2008). Недавно было показано, что сверхэкспрессия гена GmbZIP1 (член семейства ТФ bZIP из сои) в трансгенных растениях арабидопсиса и пшеницы придавала устойчивость к нескольким абиотическим стрессам (засолению, засухе и низкой температуре) (Gao *et al.*, 2011). Стабильная экспрессия кукурузного ABP9 (член семейства ТФ bZIP) в *Arabidopsis* приводила к многократному повышению стрессоустойчивости, в том числе к засолению, засухе, заморозкам и окислительному стрессу (Zhang *et al.*, 2011a). Эктопической экспрессии другого гена кукурузы ZmbZIP72 (фактор транскрипции bZIP) в *Arabidopsis*, также приводило к повышению солеустойчивости (Ying *et al.*, 2012). Растения томатов сверхэкспрессирующие SlAREB1 (член семейства ТФ bZIP из *Solanum*

lycopersicum) демонстрировали устойчивость к ряду биотических и абиотических стрессов (Orellana *et al.*, 2010). Аналогично, избыточная экспрессия ZFP179 (член семейства ТФ Cys2/His2-цинковых пальцев риса) придает повышенную толерантность к засолению в рисе (Sun *et al.*, 2010).

Таблица 2 Трансгенные растения устойчивые к абиотическим стрессам, полученные с помощью экспрессии генов ТФ

ТФ	Семейств о ТФ	Источник ТФ	Объект модификации	Признак устойчивости	Ссылка
AtDREB1A	DREB	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i> , хризантема	засуха, засоление, низкие температуры	Liu <i>et al.</i> , 1998 Hong <i>et al.</i> , 2006
OsDREB1A	DREB	рис	<i>A. thaliana</i>	засуха, засоление, низкие температуры	Dubouzet <i>et al.</i> , 2003; Zhang Y. <i>et al.</i> , 2009
OsDREB2A	DREB	рис	рис, соя	засуха, засоление	Mallikarjuna <i>et al.</i> , 2011; Zhang X. <i>et al.</i> 2013
SNAC1 SNAC2	NAC	рис	рис	засуха, засоление	Hu <i>et al.</i> , 2006; Hu <i>et al.</i> , 2008
OsNAC5	NAC	рис	<i>A. thaliana</i> , рис	засуха, засоление	Song <i>et al.</i> , 2011
ONAC045	NAC	рис	рис	засуха, засоление	Zheng <i>et al.</i> , 2009
OsZIP23	bZIP	рис	рис	засуха, засоление	Xiang <i>et al.</i> , 2008
GmbZIP1	bZIP	соя	<i>A. thaliana</i> , пшеница	засуха, засоление	Gao <i>et al.</i> , 2011
ABP9	bZIP	кукуруза	<i>A. thaliana</i>	засуха, засоление, низкие температуры	Zhang <i>et al.</i> , 2011a
ZmbZIP72	bZIP	кукуруза	<i>A. thaliana</i>	засуха, засоление	Ying <i>et al.</i> , 2012
SIAREB1	bZIP	томат	томат	абиотические и биотические стрессы	Orellana <i>et al.</i> , 2010
ZFP179	Cys2/His2	рис	рис	засоление	Sun <i>et al.</i> , 2010
TaMYB2A	MYB	пшеница	<i>A. thaliana</i>	засуха, засоление, низкие температуры	Mao <i>et al.</i> , 2011
GbMYB5	MYB	хлопок	табак	засуха	Chen T. <i>et al.</i> , 2015
GmERF3	AP2/ERF	соя	табак	абиотические и биотические стрессы	Zhang G. <i>et al.</i> , 2009
HARDY	AP2/ERF	<i>A. thaliana</i>	клевер	засуха, засоление	Abogadallah <i>et al.</i> , 2011
MtCBF4	AP2/EREB P	люцерна	<i>A. thaliana</i> , люцерна	засуха, засоление	Li <i>et al.</i> , 2011c
BrERF4	AP2/ERF	репа	<i>A. thaliana</i>	засуха, засоление	Seo <i>et al.</i> , 2010
TaWRKY71	WRKY	пшеница	<i>A. thaliana</i>	засуха, засоление, низкие/высокие температуры	Xu Q. <i>et al.</i> , 2013

Точно так же введение пшеничного TaMYB2A (член семейства ТФ MYB пшеницы) в *Arabidopsis* обеспечивало мульти-устойчивость к абиотическим стрессам (засуха, засоление, холод, жара) (Mao *et al.*, 2011). Zhang с соавторами (2009) показали, что эктопическая экспрессия соевого гена GmERF3, кодирующего ТФ AP2/ERF в табаке повышала толерантность последнего не только абиотическим, но и биотическим стрессам (Zhang G. *et al.*, 2009). Трансгенные растения клевера (*Trifolium alexandrinum* L.) экспрессирующие ген HARDY (член семейства ТФ AP2/ERF из *Arabidopsis*) были более устойчивы к засолению и засухе (Abogadallah *et al.*, 2011). Экспрессия гена MtCBF4 (член семейства ТФ AP2/EREBP люцерны) в *Arabidopsis* и люцерне приводило к повышению солее- и засухоустойчивости (Li *et al.*, 2011c). Точно так же, трансгенные растения *Arabidopsis* сверхэкспрессирующие BrERF4 из *Brassica rapa* показали повышенную устойчивость к засухе и засолению (Seo *et al.*, 2010). Экспрессия гена TaWRKY71 (член семейства ТФ WRKY пшеницы) усиливал устойчивость к абиотическим стрессам у трансгенных растений *A.thaliana* (Xu *et al.*, 2013). Последние исследования показали участие генов семейства ТФ GATA в регуляции метаболизма ионов Na⁺ при засолении у сои, арабидопсиса и риса (Zhang C. *et al.*, 2015).

1.3.3.5. Модификация сигнальных молекул

Воздействие любого стресса для растений, вызывающих изменение нормального развития растений воспринимается сигнальными молекулами, что приводит к запуску сигнального каскада и выработке стрессового ответа у растения. Эти сигнальные пути могут быть специфическими или неспецифическими в зависимости от типа стресса. Сигнальные пути различных стрессов могут пересекаться. Сигнальные пути включают в себя многочисленные сигнальные молекулы, и могут быть АБК-зависимыми или АБК-независимыми. Наиболее хорошо изучен ген RD29 (responsive to dehydration), который активируется при осмотическом шоке, охлаждении, водном дефиците и обработке АБК (Jia H. *et al.*, 2012). В промоторной области этого гена выявлены нуклеотидные последовательности, которые позволяют реагировать на АБК (АБК-отвечающий элемент, ABRE) и осмотический шок (элемент, отвечающий на дегидратацию, DRE).

Многие трансгенные растения с высокой устойчивостью к засолению были получены за счет модификации MAPK сигнального пути (Turan 2012). Эктопическая экспрессия *Nicotiana* протеинкиназы MAPKKK/NPK1 в кукурузе, приводит к активации окислительного сигнала и в конечном итоге увеличивает толерантность к засолению, повышенной и пониженной температуре (Shou *et al.*, 2004). Сверхэкспрессия ZmMKK4 (MAPKK кукурузы) придавала солее- и засухоустойчивость трансгенным растениям *Arabidopsis* (Kong *et al.*, 2011). Zhang с соавторами (2011b) показали, что избыточная экспрессия GhMPK2 хлопка вызывает повышение устойчивости у трансгенных растений табака (Zhang *et al.* 2011b). В другом исследовании было установлено, что растения риса, избыточно экспрессирующие OsMAPK33 более чувствительны к засолению, чем

растения дикого типа (Lee *et al.*, 2011). Есть также кальций-зависимые протеинкиназы (CDPKs), которые участвуют в реакции растения на солевой стресса. Asano с соавторами (2011) охарактеризовали ген OsCDPK21 риса, который при сверхэкспрессии в трансгенных растениях повышает толерантность к засолению (Asano *et al.*, 2011). Эктопическая экспрессия гена GsCBRLK (кальций-зависимой кальмодулинсвязывающей рецептор-подобной киназы) из *Glycine soja* в *Arabidopsis* приводит к солеустойчивости и АБК-зависимым стрессам (Bai X. *et al.*, 2013). Другим типом сигнальных молекул являются кальциневрин-В-подобные (CBL) белки, представляющие собой группу Ca^{2+} -рецепторов в растениях. Они играют важную роль в передаче сигнала при различных стрессовых ответах за счет взаимодействия с CBL-протеинкиназами (CIPKs). Охарактеризован ряд OsCIPKs генов риса, регулирующих солеустойчивость и ответную реакцию на солевой стресс в трансгенных растениях (Xiang *et al.* (2007). Другое семейство киназ, играющих важную роль в передаче стрессовых сигналов принадлежит SnRK2 (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2) семейству (Coello *et al.*, 2011). Сверхэкспрессия гена кукурузы ZmSAPK8 (SnRK2 семейство) в *Arabidopsis* повышала устойчивость к засолению, а также повышала регуляцию транскрипции других стрессовых генов - RD29A, RD29B, RAB18, P5CS1, ABI1 и DREB2A (Ying *et al.*, 2011). В другом исследовании было показано, что эктопическая экспрессия гена пшеницы TaSnRK2.8 (SnRK2 семейство) в *Arabidopsis* повышает солеустойчивость, наряду с усилением транскрипционной активности генов биосинтеза АБК (Zhang *et al.*, 2010). LecRLKs (lectin receptor like kinases) также осуществляют передачу сигналов во время стрессовой реакции (Vaid *et al.*, 2015). G-белок сопряжённый рецептор (GPCR), как известно, воспринимает внеклеточные сигналы и преобразовывает их в гетеромерные G-белки, которые в дальнейшем передаются к эффектору (Yadav and Tuteja, 2011). Когда ген *Pisum sativum* (Galpha1), кодирующий для G-альфа-субъединицу, был экспрессирован в *Arabidopsis*, это увеличивало устойчивость к засолению и высоким температурам (Misra *et al.*, 2007). Эктопическая экспрессия гена *Rab7 Pennisetum glaucum*, кодирующего Rab-GTPase (GTP-связывающий белок), повышала устойчивость к засолению у трансгенных растений табака (Agarwal *et al.*, 2008). Conti с коллегами. (2008) выявили два SUMO протеазы - OTS1 (Overley Tolerant to Salt 1) и OTS2 у *Arabidopsis*. Двойной мутант по *ots1* и *ots2* проявлял повышенную чувствительность к засолению, в то время как избыточная экспрессия OTS1 придавала повышенную солеустойчивость трансгенным растениям.

1.4. Пшеница - стратегический ресурс продовольственной безопасности РФ

1.4.1. Значение производства пшеницы для РФ

Пшеница является стратегическим продуктом для России и всего мира. В настоящее время, пшеница обеспечивает 21% всех пищевых калорий в мире. Для 4,5 миллиарда человек в 94 развивающихся странах пшеница дает 20% от потребления необходимого белка. Для увеличения урожайности и валовых сборов растениеводства в условиях быстро меняющегося климата, экстремальности и низкой предсказуемости погодных условий даже на краткосрочный период и сокращения природных ресурсов теперь, пожалуй, больше, чем когда-либо, необходимы новые сорта, широко адаптивные и эффективно использующие ресурсы среды. Задача современной селекции и биотехнологии создавать сорта, которые удовлетворяли бы каждого из производителей зерна не только по уровню урожайности, но и качеству, устойчивости к болезням и вредителям. Средняя урожайность пшеницы в РФ на 20013 год, по данным ФАО составляет 22,3 ц/га (<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>) (Рисунок 6). В то же время, высокопродуктивные сорта озимой пшеницы, высеваемые в Краснодарском крае в 2013 году селекции КНИИСХ им П.П.Лукияненко имеют генетический потенциал урожайности в 76 ц/га и более.

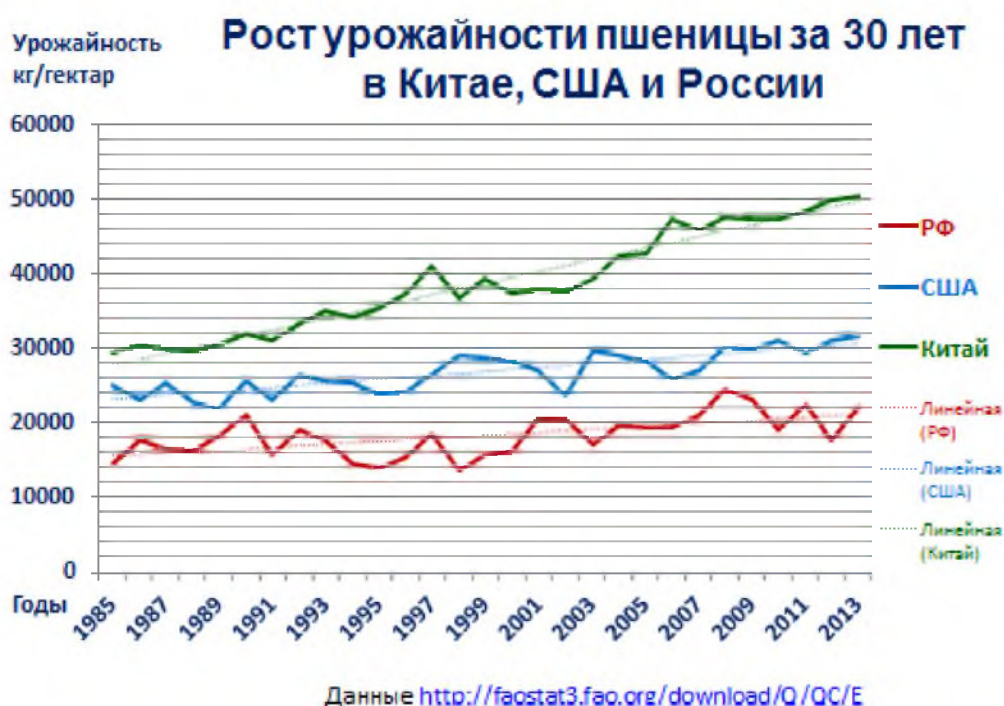


Рисунок 6 Урожайность пшеницы (кг/га) за период 1985-2015 в Китае, США и России (А.К.Гапоненко, VIII Международный конгресс "Biotechnology: State and Prospects for Development", Москва 2015)

1.4.2. Проблемы урожайности и генетический потенциал сорта

Потери урожая в различных экологических и метеорологических условиях, возникают из-за засухи, засоленности, морозов, жары, грибных и вирусных болезней и насекомых (Рисунок 7). Каждый из перечисленных факторов среды может снижать урожайность, в среднем, на 15%. Селекционные программы во всем мире значительно ускоряются использованием достижений «постгеномной эры» - компьютерных программ, моделирующих взаимодействие белков и молекул ДНК *in silico*, функциональной и экспериментальной геномики, транскриптомики, метаболомики, прямой и обратной генетики. Но создание современных сортов с новыми признаками, соответствующими новым и часто экстремальным условиям окружающей среды - повышенным температурам, нарастающему дефициту воды, растущим засолением почв и прочих неблагоприятных антропогенных явлений методами традиционной селекции могут потребоваться десятилетия.



Рисунок 7 Причины снижения урожайности пшеницы (А.К.Гапоненко, VIII Международный конгресс "Biotechnology: State and Prospects for Development", Москва 2015)

Международный консорциум по секвенированию генома пшеницы (IWGSC) проводит последовательный анализ генома пшеницы (на сегодняшний день отсеквенирован геном мягкой пшеницы) (Pennisi, 2014). На сегодняшний день, исследователи в IWGSC предполагают, что полная последовательность всего генома мягкой пшеницы будет доступна в течение трех лет (<http://www.wheatgenome.org>). Обладая информацией о полной последовательности генома мягкой пшеницы, селекционеры приобретают в своё пользование высококачественные инструменты для

ускорения селекционной программы, определения генов, контролирующих комплексные признаки, такие как урожайность, качество зерна, устойчивость к болезням и вредителям или абиотическому стрессу.

1.4.3. Стратегии создания толерантных к абиотическим стрессам злаковых культур

В качестве примера стратегии мы приводим схему из обзорной статьи Sahoo и коллег (2013), рассматривающей пути ускорения создания засухоустойчивых сортов риса: «Повышение засухоустойчивости риса с помощью генной инженерии ТФ и протеинкиназ» (Рисунок 8).

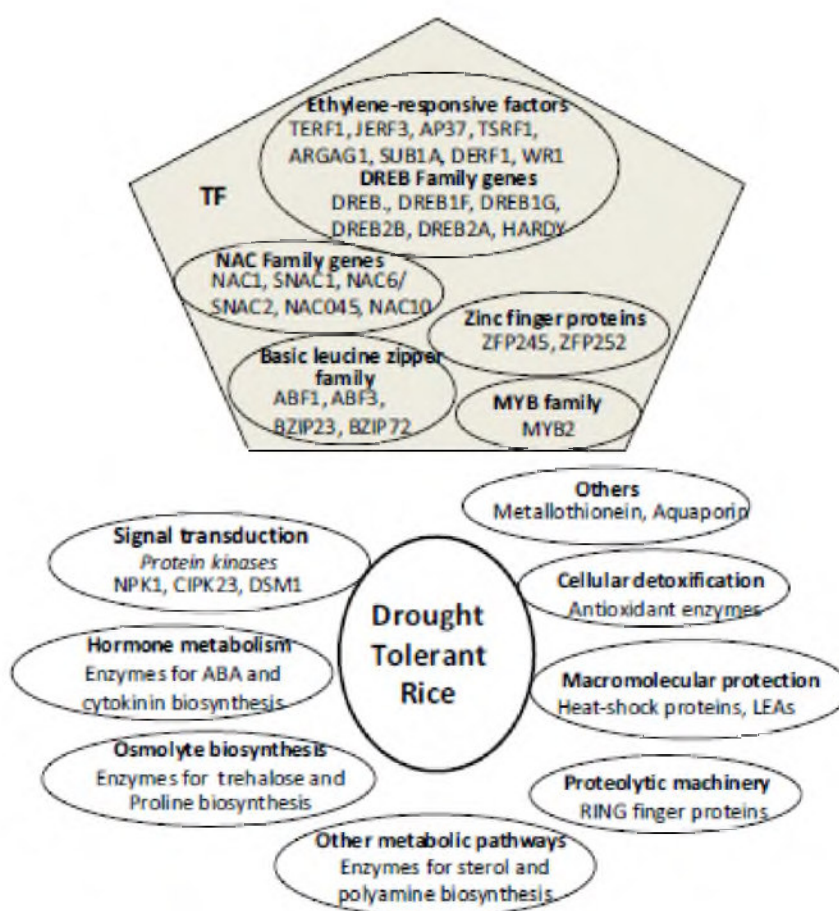


Рисунок 8 План разработки засухоустойчивых сортов риса методами генной инженерии (Sahoo *et al.*, 2013). Показаны гены, функционально проверенные по их роли в защите от засухи, толерантности к дефициту воды. Перечисленные гены относятся к нескольким классам на основе их клеточной функции: транскрипционные факторы различных семейств (TF), гены биосинтеза осмолитов, гены трансдукции сигнала, гены метаболизма гормонов, клеточной детоксикации, протеолиза, макромолекулярной защиты, и других метаболических процессов. Генно-инженерное использование этих генов была показано, для улучшения засухоустойчивости у различных сортов риса.

Исследователи CSIRO Plant Industry выделили два гена солеустойчивости (Nax1 и Nax2) из древнего дикорастущего родственника пшеницы - *Triticum monosocum*. Оба гена ингибируют накопление натрия, который может быть токсичным для растений, ограничивая его перенос от корней к побегам (James, 2006). На основании полевых испытаний, линии с геном Nax2 дают на 25% больше урожая, чем контрольные растения (без гена) в условиях засоления. CIMMYT (Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы) использовали ген (DREB1A) из *Arabidopsis*, чтобы повысить устойчивость пшеницы к засухе, низкой температуре и засолению (CIMMYT 2004). На сегодняшний день во всем мире существует около 900 трансгенных линий пшеницы, улучшенной с помощью генной инженерии (см. ниже, <http://www.nbiap.vt.edu/search-release-data.aspx>).

1.4.4. Перспективы производства трансгенной пшеницы

Первая, устойчивая к гербициду пшеница, произведена с помощью генной инженерии Monsanto уже в 2004 году (событие MON 71800), коммерчески известная как Roundup Ready™ пшеница. Ген из почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* почвы штамм CP4 был введен на пшеницу для производства глифосат толерантной линии пшеницы. Хотя исследования доказали, что это глифосат толерантная пшеница безопасна и питательна, как и других традиционные сорта пшеницы, Монсанто решила не вводить Roundup Ready™ пшеницу на рынке в 2004 году из-за недовольства общественности (Fitzgerald, 2010).

В ближайшие годы к наиболее распространенным ГМ-культурам, выращиваемым в мире, добавится ГМ-пшеница и ГМ-рис. Все более актуальным является внедрение в сельское хозяйство ГМ-пшеницы, поскольку выращивание традиционных сортов пшеницы перестало быть прибыльным по сравнению с выращиванием ГМ-сортов сои, кукурузы и рапса. Площади под пшеницей в мире за последние 30 лет уменьшились на 5,5%, поскольку производство пшеницы намного менее рентабельно, чем ГМ-кукурузы и ГМ-соя, созданных с помощью методов генной инженерии. Так в США за период с 2001 по 2009 год увеличение урожайности пшеницы составило 3,8%, в то время как за тот же период времени увеличение урожайности ГМ-кукурузы составило 14,7%, а сои 9,7% (James, 2010).

На декабрь 2015 поиск по базам данных ISB (информационные системы биотехнологии (<http://www.nbiap.vt.edu/search-release-data.aspx>)) нашел 576 события испытаний трансгенной пшеницы в США и еще более 300 случая в других странах (Рисунок 9, Таблица 3). Среди трансгенных форм пшеницы наиболее часто изменяются такие признаки как: толерантность к абиотическим стрессам, изменение развитие колоса, изменение метаболизма азота, толерантность к засухе и жаре, урожайность, устойчивость к фузариозу, развитие колоса, развитие растения, время цветения, метаболизм азота, эффективное использование воды.

BP_NUMBER	INSTITUTION	ACRE	ARTICLE	ISSUED DATE	EFFECTIVE DATE	EXPIRE DATE	STATUS	IN_EFFECT	SORT_DATE	
14-308-105n	Bayer CropScience	180	Wheat				Pending	no	11/04/2014	
14-275-105n	Arcadia Biosciences	15	Wheat	10/14/2014	10/24/2014	10/24/2015	Acknowledged	yes	10/24/2014	
14-268-103n	Biogenma USA	14	Wheat	09/30/2014	10/15/2014	10/15/2015	Acknowledged	yes	10/15/2014	
14-224-101n	United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service	1	Wheat	Улучшение хлебопекарных качеств			ged	yes	09/17/2014	
14-223-102n	United States Department of Agriculture/Agricultural Research Service	1	Wheat	Улучшение хлебопекарных качеств			ged	yes	09/16/2014	
14-175-103n	Bayer CropScience	110	Wheat	07/16/2014	08/01/2014	08/01/2015	Acknowledged	yes	08/01/2014	
14-178-101n	Monsanto	105	Wheat	07/15/2014	07/26/2014	07/26/2015	Acknowledged	yes	07/26/2014	
14-149-105n	Rutgers University	.5	Wheat	Устойчивость к фузариозу колоса					05/30/2014	
14-093-106n	Southern Illinois University/Carbondale			Увеличена толерантность к засухе, Устойчивость к гербициду Баста					05/15/2014	
14-106-105n	Rutgers University	.5	Wheat	Устойчивость к фузариозу колоса					05/12/2014	
14-077-104n	University of Nebraska	1	Wheat	Увеличена толерантность к засухе					04/15/2014	
14-079-109n	Arcadia Biosciences			Увеличена эффективность усвоения азота и толерантность к стрессам					04/14/2014	
14-079-110n	Arcadia Biosciences			Увеличена эффективность усвоения азота и толерантность к стрессам					04/14/2014	
14-072-102n	Biogenma USA	28.5	Wheat	03/25/2014	04/05/2014	04/05/2015	Acknowledged	yes	04/05/2014	
14-050-104n	University of Minnesota	.5	Wheat	Устойчивость к фузариозу колоса					04/01/2014	
14-073-106n	Pioneer Hi-Bred International Inc.	10	Wheat	Увеличена толерантность к засухе					04/01/2014	
14-059-127n	Betaseed Inc		Wheat	03/18/2014	03/18/2014	03/18/2015	Acknowledged	yes	03/18/2014	
14-035-101n	Monsanto	100	Wheat	Увеличена урожайность			015	Acknowledged	yes	03/05/2014
14-028-109n	University of Nebraska/Lincoln	1	Wheat	02/07/2014	03/03/2014	03/03/2015	Acknowledged	yes	03/03/2014	
13-343-106n	Bayer CropScience			Замедленно созревание, увеличена эффективность усвоения азота					03/01/2014	
14-034-104n	Monsanto	202	Wheat	Повышение урожайности			1/2015	Acknowledged	yes	03/01/2014
13-274-101n	Arcadia Biosciences			Увеличена эффективность усвоения азота и толерантность к стрессам					1/08/2013	
13-254-111n	Biogenma USA	.5	Wheat	10/17/2013	10/17/2013	10/17/2014	Acknowledged	no	10/17/2013	

1

Рисунок 9 Выписка из базы данных ISB по полевым испытаниям трансгенной пшеницы в США (А.К.Гапоненко, VIII Международный конгресс "Biotechnology: State and Prospects for Development", Москва 2015)

Отношение к биотехнологической пшенице изменилось за последние годы. В 2009 год опрос производителей пшеницы, проведенный Национальной ассоциации производителей пшеницы (NAWG), показал, что 76% респондентов выступают за поддержку коммерциализации биотехнологий пшеницы (NAWG. 2009). Международный Информационный Совет по Продуктам Питания (IFIC) также сообщил, что 73% опрошенных ими потребителей сказали, что они, скорее всего, приобрели бы хлеб, сухари, печенье, каши, или макаронных изделий с ГМ пшеницей, разработанной, чтобы использовать меньше воды, земли и/или пестицидов (IFIC. 2010). Девять связанных с выращиванием пшеницы ассоциаций из Австралии, Канады и США выступили с трехсторонним заявлением о необходимости увеличения инвестиций в научно-исследовательские и опытно-конструкторские разработки ГМ пшеницы.

Таблица 3 Данные о полевых испытаниях независимых трансгенных событиях генно-инженерной (ГИ) пшеницы, толерантной к засухе (26 случаев) и абиотическим стрессам (4 случая) (Выписка из базы данных ISB на декабрь 2015 г).

Ссылка	Организация	Площадь (акры)	Дата проведения испытаний	Место проведения	Признак
15-279-101n	Arcadia Biosciences	10	10/16/2015	CA	AP-Drought Tolerance Increased, AP-Nitrogen Utilization Efficiency Increase, AP-Stress Tolerance Increased, MG-CBI
15-279-102n	Arcadia Biosciences	10	10/27/2015	CA	AP-CBI, AP-Nitrogen Use Efficiency, AP-Stress Tolerance Increased, MG-CBI
15-079-105n	Arcadia Biosciences	2	03/30/2015	ID	AP-Drought Tolerance Increased, MG-CBI
15-076-103n	Arcadia Biosciences	30	03/27/2015	ND	AP-Nitrogen Utilization Efficiency Increase, AP-Stress Tolerance Increased, MG-CBI
15-037-103n	University of Nebraska	2	02/27/2015	NE	AP-Drought Tolerance, AP-Drought Tolerance Increased
15-076-102n	Arcadia Biosciences	20	03/27/2015	ID	AP-Nitrogen Use Efficiency, AP-Nitrogen Utilization Efficiency Increase, AP-Stress Tolerance Increased, MG-CBI
-093-106n	Southern Illinois University/Carbondale	1	04/09/2014	IL	AP-Drought Tolerance Increased, HT-Phosphinothricin Tolerant
14-077-104n	University of Nebraska	1	04/01/2014	NE	AP-Drought Tolerance, AP-Drought Tolerance Increased
13-214-101n	Monsanto	100	08/23/2013	HI	AP-Abiotic Stress Tolerance, AP-Altered Nitrogen Metabolism, AP-Drought Tolerant, AP-Yield Increased, FR-Fusarium Resistant, FR-Resistance To Fungus, HT-C
073-101n	Monsanto	80	04/02/2013	HI	AP-Altered Nitrogen Metabolism, AP-Drought Tolerant, AP-Yield Increased, OO-Method Development
073-101n	Monsanto	80	04/02/2013	HI	AP-Altered Nitrogen Metabolism, AP-Drought Tolerant, AP-Yield Increased, OO-Method Development

Проведен аналитический обзор современной научной, литературы, касающейся научно-технической проблемы, исследуемой в рамках НИР. Общее количество проанализированных работ 136, в том числе обзор научных информационных источников: статьи в ведущих зарубежных и российских научных журналах, монографии, патенты – из которых 60 научно-информационных источников за период 2010 – 2015 гг.

2. ПРОВЕДЕНИЕ ПАТЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ГОСТ 15.011-96

На первом этапе выполнения НИР были проведены патентные исследования в соответствии ГОСТ Р 15.011-96.

Целью патентного исследования является определение технического уровня, используемых подходов и тенденций развития в области ГМ-продукции, сельскохозяйственной продукции и методах ее воспроизводства, злаковых и других культурах. В процессе поиска исследовались тенденции в области решения проблем по засаливанию почв и создание культур, произрастающих на таких почвах. Дополнительно выявлены примеры эффективного решения данной задачи и тенденции патентной защиты технических решений в данной области на примере продуктивных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L).

Обоснование регламента поиска

В соответствии с задачами патентных исследований, особенно с целью определения возможности последующего патентования, поиск проводился в ранге проверки соответствия исследуемого объекта техники условию патентоспособности, а именно: новизне, изобретательскому уровню и промышленной применимости.

Условие новизны и изобретательского уровня требуют чистоты на общемировом уровне, следовательно, необходимо проведение общемирового патентного поиска.

Поиск проводился по патентным базам:

- электронной патентной базы ФИПСa (полнотекстовая база за период с 1994г по настоящее время);
- электронной патентной базы США (полнотекстовая база за период с 1976г по настоящее время);
- электронной патентной базы Европейского патентного ведомства (полнотекстовая база за период с 1987 г по настоящее время);
- электронной патентной базы Евразийских патентов.

Патентный поиск проводился, по ключевым словам: ГМ – КУЛЬТУРЫ, ПАТЕНТЫ, НОРМАТИВНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ

Поиск научно-технической литературы проводился с использованием поисковых систем в Интернете.

Сведения о выполнении регламента поиска:

- степень выполнения регламента поиска полная;
- отступления от требований регламента отсутствуют.

Предложения по дальнейшему проведению поиска и патентных исследований: на последующих стадиях выполнения работ целесообразно выполнить патентный поиск с целью дальнейшего патентования изобретения материалы по которому следует сформировать по окончательным результатам исследований.

новые патентные исследования проводить не целесообразно вследствие явного отсутствия аналогов по достигаемому техническому результату.

Проведено патентное исследование в соответствии ГОСТ Р 15.011-96, показавшее перспективность разрабатываемых технологий. Полный отчет о проведение патентных исследований представлен в документе «Отчет о патентных исследованиях».

3. РАЗРАБОТКА И ОБОСНОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ И МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПОВЫШЕНИЯ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ. ОЦЕНКА ВАРИАНТОВ ВОЗМОЖНЫХ РЕШЕНИЙ

Рост растений и продуктивность находятся под постоянной угрозой со стороны экологических изменений в виде различных стрессовых факторов. Наиболее распространенными являются абиотические стрессы такие как засухи (дефицит воды), затопление, засоление, экстремальные температуры (тепловые и замораживание) и интенсивное освещение. Толерантность или восприимчивость к этим абиотическим стрессам очень сложное явление, еще потому, что стресс может возникнуть на разных этапах развития растений и более чем один стресс одновременно влияет на растения. Восприятие абиотических стрессов и передачи их сигналов в растениях, которое должно перейти к адаптивным реакциям являются критическими шагами для выживания и размножения растений, подвергшихся неблагоприятным условиям (Chinnusamy, *et al.*, 2004).

Получение солеустойчивых растений возможно двумя основными способами: классическая селекция и генетическая модификация. Классическая селекция имеет ряд ограничений при создании солеустойчивых сортов пшеницы: 1) полигенность признака устойчивости к засолению, 2) низкий внутривидовой потенциал, 3) привнесение нежелательных признаков и др. (Turan, *et al.*, 2012). К тому же при выведении устойчивых к засолению линий/сортов, необходимо сохранять другие важные агрономические характеристики, такие как урожайность, продуктивность и пр. Геномные инструменты, такие как молекулярные маркеры могут повышать эффективность селекционных программ. В сочетании с методами классической селекции маркер-ассоциированная селекция существенно сокращает время необходимое для создания стрессоустойчивых сортов (Леонова, 2013). Однако подобные методики эффективны только при наличии генов устойчивости в геноме селектируемой культуры.

В настоящее время, в мире все более широко используются биотехнологические подходы увеличения устойчивости экономически важных растений к стрессам (Nechaev, Gaponenko, 2013). Методы генной инженерии позволяют вводить один транскрипционный фактор, который включает десятки или сотни генов, ответственных за адаптацию растения к стрессу. **Таким образом, наиболее перспективным направлением является использование методов генетической инженерии.**

По прогнозам, изменение климата, засоление и деградация почв ведет к снижению производительности сельского хозяйства, снижению его стабильности и прибыльности во многих регионах мира. В этой связи ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН)

ставит цели увеличить объемы производства сельского хозяйства на 70% в течение последующих 40 лет, чтобы удовлетворить потребности в продовольствии растущего населения мира. В 1960 г. при населении 3 млрд. человек на одного жителя Земли приходилось 0,43 га пашни, к 2012 г. население Земли более чем удвоилось (7 млрд.), а пашни – уменьшилось в 2 раза (0,22 га/человека). При сохранении темпов роста к 2050 г. население Земли увеличится до 9 млрд., и на каждого жителя останется уже 0,18 га. Из прогнозов ФАО следует, что к 2050 году производство сельскохозяйственной продукции в мировом масштабе должно быть увеличено на 70 процентов, при этом в развивающихся странах – почти на 100 процентов чтобы удовлетворить только дополнительные потребности в продовольствии. Современная интенсификация зернового хозяйства в 28 странах мира обеспечивается применением инноваций в АПК и коммерциализацией достижений биотехнологии, понимаемой как создание нового поколения генно-инженерных (ГИ) гибридов и сортов растений, устойчивых к гербицидам, насекомым и толерантным к дефициту воды.

Преимущества биотех-культур для интенсификации сельскохозяйственного производства. Анализ 2014 года подтвердил значительные и множественные преимущества биотех-культур для интенсификации сельскохозяйственного производства. 147 исследований, выполненных в течение прошедших 20 лет, подтверждают, что: **«В среднем применение ГМ технологии позволило сократить объем носимых пестицидов на 37%, увеличить урожайность на 22% и увеличить доход фермеров на 68%»** (Клайв Джеймс, 2014). Эти результаты подтверждают выводы более ранних глобальных исследований. Последние данные 1996 – 2014 г. показали, что биотех-культуры внесли свой вклад в обеспечение продовольственной безопасности, устойчивости и защите от глобального изменения климата за счет увеличения урожайности. Это оценивается в 133 миллиарда долларов США; обеспечения более благоприятной окружающей среды за счет сокращения ~500 миллионов кг д.в. пестицидов за период с 1996 по 2012 годы; сокращения эмиссии CO₂ только в 2013 г. на 28 миллиардов кг. Предприятия государственно-частного Партнерства были успешны в разработке и регистрации новых продуктов, затрагивающие широкий диапазон различных культур и признаков и проведенные на всех трех континентах Южного полушария. 2014 год был 19-ым годом успешной коммерциализации биотехнологических культур (ГИ или ГМ). В 2014 г. биотех-культуры выращивали в 28 странах. Общее увеличение площадей под биотех-культурами за 20 лет составило более чем в 100 раз, с 1,7 миллионов гектаров в 1996 г. до 181,5 миллионов гектаров в 2014 г. при ежегодном темпе роста - 3 - 4%.

100-кратное увеличение площадей ГИ-культур делает биотехнологию самой быстрорастущей технологией в современной истории, и причина этому – предоставление множественных преимуществ производителям зерновых и технических культур.

В 2014 г. 18 миллионов фермеров в мире, из которых 90% - это мелкие и небогатые производители, выращивали биотех-культуры на площади в 181,5 миллионов гектаров. Фермеры увеличивают производительность за счет стабильной интенсификации (ограничивая посевные площади до 1.5 миллиардов гектаров и таким образом сохраняя леса и биоразнообразие).

В России планируется ускорения селекции методами биотехнологии. Председатель Правительства РФ В.В.Путин 24 апреля 2012 года утвердил «Комплексную программу развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года». В разделе «Сельскохозяйственная биотехнология», которой записано: «Наиболее приоритетным является создание новых сортов сельскохозяйственных растений с использованием постгеномных и биотехнологических методов. В настоящее время в Российской Федерации практически не создаются сорта и гибриды нового поколения, устойчивые к засухе, болезням, гербицидам, насекомым-вредителям и неблагоприятным условиям среды, с использованием генетической инженерии. Без использования биотехнологических инноваций сельскохозяйственное производство России будет по-прежнему высоко затратным, и проигрывать в конкурентоспособности зарубежным странам». Поскольку российским селекционерам необходимо начать использовать достижений постгеномной эры – усовершенствованные методы работы с ДНК, генами и геномами на уровне ДНК–белковых взаимодействий, генетическую трансформацию пшеницы смысловыми генами. Цель биотехнологии в селекции главной продовольственной культуры мира пшеницы в России - это повышение устойчивости продуктивных сортов к стрессам среды.

Селекция зерновых на устойчивость к засолению является одним из важных направлений селекции, учитывая прогнозируемое увеличение мирового населения и сопутствующего спроса на землю, пищу и воду. Плодородные почвы будут все чаще занимать городскими районами, и сельское хозяйство будет маргинальным в менее благоприятных условиях. Этот критический процесс все более усугубляется непригодными методами ведения сельского хозяйства, эрозией почв и повышению засоления пахотных земель.

Селекционные программы повышения устойчивости злаков к различным стрессам среды выполняются в международных институтах: пшеницы в Международном центре улучшения кукурузы и пшеницы (CIMMYT), Мексика; ячменя в Международном центре сельскохозяйственных исследований в засушливых регионах, (ICARDA), Сирия и риса в Международном Институте Изучения Риса, IRRI, Филиппины, что убедительно показывает, насколько важна эта проблема не только для развивающихся стран, таких как Индия, Пакистан и

Китай, но и стран, основных производителей и экспортеров пшеницы, таких как Австралия, США, Аргентина и Канада. Осуществляется существенная финансовая и организационная международная поддержка исследований, направленных на понимание и повышение засухоустойчивости основных зерновых культур в мире, таких как пшеница, рис, кукуруза и ячмень, что подчеркивает значение этого признака для нашего современного мира. Россия, за последние 20 лет, значительно отстала в этом важнейшем направлении современных методов селекции пшеницы.

Хотя селекция с помощью маркеров в настоящее время широко используется и в селекции пшеницы, она не внесла значительный вклад в улучшение адаптации сорта к недостаточным условиям биоагропотенциала поля, и селекционеры, в основном, полагаются на прямой фенотипический отбор в экстремальных условиях среды.

Толерантность к засолению – это количественный полигенный признак, со сложным фенотипическим проявлением и запутанной фенологией. Селекция на устойчивость к засолению усложняется наличием одновременно нескольких типов абиотических стрессов, таких как высокие температура, освещенность, низкая влажность почвы и воздуха при высокой скорости ветра, а недостатки биоагропотенциала поля создают особые трудности в повышении урожайности культурных растений. Ограниченный успех физиологических и молекулярных подходов в селекции теперь предполагает, что необходимо тщательное переосмысление стратегии селекции для того, чтобы лучше понять и природу устойчивости к засолению. Исследовательские программы для повышения устойчивости пшеницы должны решить эту проблему междисциплинарным подходом. С неперенным учетом взаимодействия между несколькими стрессами и фенотипом растений и интеграции физиологических исследований толерантности растений к засолению с методами функциональной геномики.

Подробно описаны морфофизиологические и молекулярные механизмы толерантности к засолению с помощью транскриптомной, метаболомной и протеомной платформ. Ученые в геномных центрах Австралии, Великобритании, США, Франции и в международных консорциумах исследуют состав генома, экспрессии генов и метаболических процессов злаков, чтобы понять сложные процессы при стрессовых условиях. Фундаментальные исследования могут ускорить производство новых сортов, которые могут справиться с неблагоприятными условиями окружающей среды, при сохранении и увеличении урожайности и питательной ценности, таких культур как пшеница, ячмень, кукуруза и рис. Важными компонентами в процессе определения генов-кандидатов для повышения устойчивости пшеницы к засолению является исследование геномов зерновых и анализ признаков количественных локусов (QTL), клонирование генов QTL, контролирующих урожайность в условиях засоления. Исследование функций генов методами обратной генетики: создание трансгенных растений с

генами неизвестных функций и оценка их действия на устойчивость к стрессам, таким как засуха, засоление и экстремальные температуры.

Создание устойчивых культур к засолению методами обратной генетики. Одним из направлений анализов геномов является исследование классов генов известной молекулярной функции, чтобы определить индивидуально их влияние на фенотип растения при различных условиях засоления почв. Такой подход «методами обратной генетики» включает в себя достижения в области генетической модификации и редактирования геномов растений.

Центральными средствами в этой стратегии являются молекулярные методы выделения генов и их регуляторных элементов *in vitro* и *in planta* и методы генетической трансформации пшеницы для переноса таких генов и регуляторов их активности в желаемые генотипы. Например, в австралийском центре функциональной геномики растений (ACPFPG) сконструированные кДНК библиотеки пшеницы и ячменя, были использованы для идентификации более 50 различных транскрипционных факторов (ТФ), которые переключают действие десятков генов, вовлеченных в ответ растений на стрессы среды. В ACPFG в последние годы получены трансгенные формы ячменя и пшеницы, устойчивые к засухе, засолению и холоду.

Создание устойчивых к стрессам сортов – задача трудная, потому что она требует кооперации фундаментальных исследований с прикладными и селекционными программами с их огромным селекционным материалом. Без такого подхода, без перестройки исследовательского комплекса Россия не сможет в будущем достойно конкурировать на мировом рынке зерна.

Выбор объекта исследования. Пшеница одна из трех главных пищевых культур мира и является стратегическим ресурсом продовольственной безопасности РФ. Выбор исходных сортов, в который будет вводиться необходимый признак или признаки является стратегическим моментом данного проекта. Исходный сорт-реципиент должен быть востребован среди производителей и обладать необходимыми для эффективного возделывания признаками. Например, для пшеницы важны такие признаки, как высокая урожайность, высокое содержание белка в зерне, хлебопекарные качества, устойчивость к абиотическим (устойчивость к полеганию, кислотостойкость) и биотическим факторам (мучнистой росе; карликовой ржавчине; в к пыльной и твердой, черной головне), экологическая пластичность (районированность).

Для нашего исследования были выбраны 4 сорта яровой пшеницы отечественной селекции, которые отвечают всем перечисленным требованиям и занесенные в реестр селекционных достижений РФ - Злата, Эстер, Агата, Амир. Нами выбраны яровые сорта пшеницы, поскольку за 14 месяцев НИР невозможно получить два поколения озимой пшеницы. Кроме того выбранные нами сорта яровой пшеницы селекции МосНИИСХ «Немчиновка» созданные под руководством д.с-х.н. Натальи Владимировны Давыдовой являются очень востребованными в РФ.

Описание сортов мягкой яровой пшеницы объектов данного исследования.

ЗЛАТА Сорт создан в ГНУ МосНИИСХ «Немчиновка» совместно с Рязанским НИИСХ. Лауреат выставки «Золотая осень» (Москва, 2010). Родословная сорта: получен методом индивидуального отбора из гибридной популяции F4 (Иволга × Прохоровка).

Включен в Госреестр селекционных достижений в 2009 году. Разновидность лютеценс. Куст полупрямостоячий. Лист зеленый, по ширине от промежуточного до узколистного. Колос цилиндрический, белый, плотный, по длине от среднего до длинного, с короткими остевидными отростками. Колосковая чешуя с сильно выраженной нервацией, зубец средней длины, прямой, плечо средней ширины, скошенное. Зерно красное, полуудлиненной формы, бороздка средней глубины. Масса 1000 зерен от 35 до 45 г. Хозяйственные и биологические особенности. Сорт раннеспелый, с потенциалом продуктивности до 6,5-7,0 т/га. Устойчив к полеганию. Значительно слабее стандартного сорта поражается бурой ржавчиной и мучнистой росой, на уровне стандартного сорта – септориозом. Имеет хорошие и стабильные по годам хлебопекарные качества. Сила муки 250-350 е.а., содержание клейковины в муке до 35-38%. Рекомендован для возделывания в Центральном, Волго-Вятском и Средневолжском регионах.

АМИР Сорт создан в ГНУ «НИИСХ центральных районов Нечерноземной зоны» (ГНУ «НИИСХ ЦРНЗ») совместно с НПО «Нива Татарстана». Высокоурожайный засухоустойчивый сорт со стабильно высокими технологическими показателями качества семян и товарного зерна. Родословная сорта. Выведен методом индивидуального отбора из гибридной популяции F3 от скрещивания (Rodna × Приокская) F1 × Приокская. Разновидность лютеценс. Сорт среднеспелый, созревает за 70-90 дней. Отличается быстрым ростом после всходов. Куст полупрямостоячий, соломина полая. Опушение листа в период кущения отсутствует, лист зеленый средней ширины (1,5-2,0 см). Колос белый, средней плотности, цилиндрический, на верхней четверти колоса короткие остевидные отростки, имеет средний восковой налет. Для флагового листа характерен слабый восковой налет на нижней стороне листовой пластинки. Пыльники имеют антоциановую окраску. Колосковая чешуя средняя (9-10 мм), зубец прямой, короткий, плечо широкое, прямой формы, нервация мелкая. Киль имеет зазубренность на 2/3 длины. Зерно крупное, стекловидное, округлое, красное. Бороздка неглубокая. Масса 1000 зерен 35-45г. Потенциал урожайности 6,0-6,5 т/га. В хозяйствах при Государственном сортоиспытании урожайность часто превышала 7 т/га; устойчив к полеганию и прорастанию на корню; меньше стандартного сорта поражается бурой ржавчиной, мучнистой росой, пыльной и твердой головней; высокие показатели качества зерна: содержание клейковины 35-45% при ИДК 72-78 е.п., сила муки 300-500 е.а., объемный выход хлеба 1000-1200 см³, стабильно высокое «число падения», высокий выход кондиционных семян. Сорт Амир с 2001 г. внесен в Госреестр по Средневолжскому региону. Большие перспективы у него также в Волго-Вятском, Северо-Западном и Центральном экономических районах.

АГАТА Патентообладатель: ФГБНУ «Московский НИИСХ Немчиновка», ФГБНУ «Рязанский НИИСХ». Разновидность лютесценс. Куст полупрямостоячий. Лист зеленый, опушен в период кущения, по ширине промежуточного типа. Колос цилиндрический, белый средней плотности, по длине от среднего до длинного, с короткими остевидными отростками в верхней части колоса. Колосковая чешуя с сильно выраженной нервацией, плечо узкое, закругленное, зубец короткий, умеренно изогнут. Зерно красное полуудлиненной формы, бороздка средней глубины. Масса 1000 зерен 38-43г. Сорт среднеспелый, вегетационный период 75-84 дней. Устойчив к полеганию. Умеренно устойчив к бурой ржавчине, мучнистой росе и септориозу, засухоустойчивый. Хлебопекарные качества отличные. Ценная пшеница. Содержание белка – 12,6-16,3%, сырой клейковины в муке 29,0-44,0 %, ИДК 57-92 ед, сила муки 316-530 е.а., объемный выход хлеба 940-1000 см³. Натура зерна 769-807 г/л. Средняя урожайность в КСИ за 2008-2013 годы 4,46 т/га. В благоприятные по метеоусловиям годы потенциал урожайности выше 6,0 т/га. В засушливые 2007, 2010, 2011 годы сорт превысил по урожайности стандарт Лада на 0,5 т/га. За годы испытания хорошо зарекомендовал на сортоучастках Рязанской, Калужской, Тульской, Брянской и других областей.

ЭСТЕР Оригинатор – ГНУ «НИИСХ центральных районов Нечерноземной зоны». Высокая и стабильная продуктивность сорта сочетается с прекрасными хлебопекарными качествами зерна. Это лучшее товарное зерно пшеницы в Нечерноземье. Родословная сорта. Создан методом индивидуального отбора из гибридной популяции F4 от скрещивания сорта Эта с линией 52/4. В родословную линии 52/4 входят сорта Нададорес 63, Минская, Зорба (озимая) и образец Но 15080. Ботанические и биологические особенности. Разновидность лютесценс. Сорт среднеспелый. Созревает за 80-100 дней. Высота растений – от 80 до 125 см. Куст полупрямостоячий, ближе к прямостоячему. Соломина полая. Лист зеленый. По ширине листовой пластины ближе к широколистному. Колос веретеновидный, желтого цвета, длинный (12-15см), средней плотности. Плечо колосковой чешуи прямое, широкое. Зубец короткий, слегка изогнут. Нервация выражена средне. На верхней четверти колоса размещены короткие остевидные отростки. Зерно полуудлиненной формы с длинным хохолком, красного цвета, бороздка неглубокая. Консистенция стекловидная. Зерно средней крупности (масса 1000 зёрен 35-40 г). Рекомендуемая норма высева 220-250 кг/га

Конкурентоспособность (основные достоинства): сорт с потенциалом урожайности выше 6,5 т/га. Максимальная урожайность в сортоиспытании составила 8,35 т/га; устойчив к полеганию; засухоустойчив, легко переносит жесткий климатический стресс; значительно слабее стандартного сорта поражается пыльной и твердой головней, устойчив к мучнистой росе и бурой ржавчине; превосходные хлебопекарные качества зерна: повышенное содержание клейковины (30-50% при ИДК 70-75 е.ш.), объемный выход хлеба 1000-1100 см³, сила муки 300-450 е.а., высокое "число

падения" (360-450 сек.). Сорт Эстер адаптирован в широком диапазоне условий возделывания. Перспективен для Центрального, Средневолжского и Волго-Вятского регионов.

Выбор способа трансформации. Узким местом генной инженерии важнейших сельскохозяйственных культур, которым относится пшеница, является низкая частота генетической трансформации. Будут проведены работы по модификации генетической трансформации пшеницы агробактериальным способом. Это необходимо для повышения эффективности генетической трансформации, поскольку достигнутая ранее нами (Гапоненко и др, 2006) частота трансформации пшеницы биобаллистическим способом недостаточна для получения необходимых для практики сотен независимых трансгенных событий. Эффективность генетической трансформации определяется несколькими процессами, из которых частота регенерации побегов из культивируемых *in vitro* соматических клеток, компетентных к генетической трансформации является одним из главных. Планируется получить достаточную по объему выборку независимых трансгенных событий, используя для достижения поставленных целей и задач комплекс методов современной физико-химической биологии и молекулярной генетики. В том числе, методы ведения культуры соматических клеток и различных эксплантатов пшеницы, генетической трансформации, а также методы клонирования, амплификации, ПЦР-диагностики, методы гисто- и иммунохимии. Для оценки уровня экспрессии введенных генов будут использованы маркерные гены, ИФА и гисто-иммунологические методы.

Выбор генов-кандидатов для улучшения толерантности растений к стрессам. К настоящему времени подробно описаны морфофизиологические и молекулярные механизмы толерантности к абиотическим стрессам, в том числе и к засолению, с помощью транскриптомной, метаболомной и протеомной платформ. Ученые исследуют состав генома, экспрессии генов и метаболических процессов злаков, чтобы понять сложные процессы при стрессовых условиях. Фундаментальные идеи могут ускорить производство новых сортов, которые могут справиться с неблагоприятными условиями окружающей среды, при сохранении и увеличении урожайности и питательной ценности, таких культур как пшеница. Важными компонентами в процессе определения генов-кандидатов для повышения солеустойчивости пшеницы является исследования геномов зерновых и анализ признаков количественных локусов (*QTL*), клонирование генов (*QTL*), контролирующих урожайность в условиях засоления. Одним из направлений анализов геномов является исследование классов генов неизвестной молекулярной функции, чтобы определить индивидуально их действия на устойчивость к стрессам, таким как засуха, засоление и экстремальные температуры. Такой подход "методами обратной генетики" включает в себя последние достижения в области технологии рекомбинантных ДНК и генетическую модификацию растений (трансгенез).

Существуют разнообразные и зачастую избыточные сигнальные молекулы и метаболические пути, которые усиливают первичный сигнал стресса через вторичные сигнальные молекулы в ядре клетки, где регулируется экспрессия стресс-обусловленных генов. ТФ играют важную роль в регулировании экспрессии стресс-обусловленных генов.

Другой уровень регулирования экспрессии генов происходит на эпигенетическом уровне и влечет за собой изменения либо на уровне хроматина или на уровне мРНК. Сельскохозяйственные растения показывают различные стратегии адаптации к засухе, в диапазоне от морфологических или физиологических свойств, которые служат важными маркерами стрессоустойчивости, до существенных изменений в экспрессии генов и индукции большого количества ТФ. Выбор генов-кандидатов для повышения устойчивости к засолению растений.

Большое количество генов, связанных со стрессом, дифференциально экспрессируются в условиях стресса (Seki, *et al.*, 2002; Zhu, 2002; Kumari, *et al.*, 2009). Для достижения этой дифференциальной экспрессии генов, ТФ осуществляют контроль тонкой настройки регуляции экспрессии генов, участвующих в ответе растений на солевой стресс (Soda, *et al.*, 2013). Наши партнеры по проекту, в лаборатории физиологии и молекулярной биологии стресса Университета Джавахарлала Неру, Индия (руководитель профессор Ashwani Pareek) показали при солевом стрессе дифференциальную экспрессию гена, кодирующего транскрипционный фактор OsGATA, который локализован в локусе количественных признаков солености Saltol. Роль транскрипционного фактора GATA в росте и развитии растений хорошо известна (Zhao, *et al.* 2004; Ritcher, *et al.*, 2013a; Ritcher, *et al.*, 2013b). Предварительные исследования лаборатории физиологии и молекулярной биологии стресса показали роль транскрипционного фактора риса OsGATA в повышении толерантности к засолению у арабидопсиса. В этой же лаборатории в QTL Saltol, в проростках контрастных генотипов риса, определён набор новых генов, определяющих устойчивость к стрессу засоления.

Таким образом для улучшения пшеницы методами генетической инженерии у нас есть все необходимые компоненты (Рисунок 10): 1) Системы генетической трансформации; 2) продуктивные сорта; 3) гены интереса и 4) генетические конструкции.



Рисунок 10 Компоненты, необходимые для улучшения с/х культур методами генной инженерии (А.К.Гапоненко, VIII Международный конгресс "Biotechnology: State and Prospects for Development", Москва 2015)

Подводя итоги необходимо напомнить и о правах на интеллектуальную собственность поскольку генетическая инженерия требует больших финансовых затрат, но результат практической деятельности приносит существенные дивиденды. В 2010 году глобальная рыночная стоимость семян биотехнологических культур оценивалась в 11,2 млрд. долларов США.

Таким образом, разработаны и обоснованы экспериментальные и методические подходы повышения солеустойчивости пшеницы и проведена сравнительная оценка вариантов возможных решений исследуемой проблемы с учетом результатов исследований, проводившихся по аналогичной тематике. Выявлены перспективные гены для увеличения солеустойчивости пшеницы без понижения ее продуктивности. Это транскрипционные факторы. Наши соисполнители выделяют перспективный фактор из риса OSGATA, который будет введен в геномы продуктивных яровых сортов пшеницы ЗЛАТА, АМИР, АГАТА и ЭСТЕР.

4. РАЗРАБОТКА ПЛАНА ИССЛЕДОВАНИЙ

После анализа современной научной, литературы, постановки задачи и разработки подхода к ее решению, мы перешли к разработке плана проведения исследования.

4.1.1. Методы исследования

Растения пшеницы будут выращиваться в условиях искусственного климата при оптимальных условиях вегетации – качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха, фитосанитарная обработка. Амплификация полноразмерной копии гена транскрипционного фактор (ТФ) OsGATA из кДНК риса будет проведена методом ПЦР. кДНК риса была получена постановкой ОТ ПЦР на матрице пула РНК (с использованием специфических праймеров), выделенной из 7-ми дневных проростков риса. Полноразмерная копия ТФ OsGATA будет перенесена в вектор pCAMBIA1304 для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы. Для введения гена OsGATA в геном используемых генотипов пшеницы будут использованы методы генетической трансформации. Отбор трансгенных линий будет проводиться на селективных средах в условиях *in vitro*. Анализ трансгенных растений будет осуществляться стандартными молекулярно-биологическими методами (ПЦР, ИФА, гистохимического окрашивания).

4.1.2. Дизайн исследования

ПЕРВЫЙ ЭТАП

1. Создание коллекции исходных сортов яровой мягкой пшеницы, пригодных для трансформации.
2. Обзор и анализ современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках НИР.
3. Проведение патентных исследований.
4. Отчет о НИР за I этап.

ВТОРОЙ ЭТАП

1. Создание коллекции трансгенных линий пшеницы (Т1).
2. Анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий Т1.
3. Получение трансгенных линий потомства Т2.
4. Анализ экспрессии целевых генов в коллекции трансгенных линий Т2.
5. Обобщение и оценка полученных результатов, разработка рекомендаций по использованию результатов проведенных НИР в реальном секторе экономики, а также в дальнейших исследованиях и разработках.

6. Заключительный отчет о НИР.
7. Подготовка 2-х публикаций по результатам проекта в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus или в базе данных "Сеть науки" (WEB of Science).
8. Заявка на патент, полученная по результатам проекта.

4.1.3. Планируемый результат

В ходе выполнения НИР должны быть получены следующие научно-технические результаты:

1. Промежуточный и заключительный отчеты о НИР, содержащие:
 - 1.1 Обзор и анализ современной научно-технической, нормативной, методической литературы, затрагивающей научно-техническую проблему, исследуемую в рамках НИР;
 - 1.2 План исследований по созданию продуктивных сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), толерантных к засолению;
 - 1.3 Результаты экспериментальных исследований по повышению толерантности к засолению у продуктивных сортов мягкой пшеницы, путем введения транскрипционного фактора OsGATA;
 - 1.4 Рекомендации и предложения по использованию результатов НИР в реальном секторе экономики, а также в дальнейших исследованиях и разработках;
 - 1.5 Обобщение и выводы по результатам НИР.
2. Отчет о патентных исследованиях.
3. Коллекция растений исходных сортов яровой мягкой пшеницы, пригодных для трансформации.
4. Коллекция трансгенных линий пшеницы (T1) и (T2), экспрессирующих ген OsGATA.
5. Две публикации по результатам проекта в научных журналах, индексируемых в базе данных Scopus или в базе данных "Сеть науки" (WEB of Science).
6. Заявка на патент, полученная по результатам проекта.
7. Результаты, которые будут получены иностранным партнером:
 - 7.1 Аннотационный отчет, содержащий протоколы амплификации полноразмерной копии гена транскрипционного фактора OsGATA из риса и создания вектора для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, несущий ген транскрипционного фактора OsGATA.
 - 7.2 Экспериментальный образец полноразмерной копии гена транскрипционного фактора OsGATA из риса, повышающего толерантность к засолению.

7.3 Экспериментальный образец вектора для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, несущий ген транскрипционного фактора OsGATA

7.4 Аннотационный отчет, содержащий:

7.4.1 Результаты оценки продуктивности и степени стабильности признаков запасных белков глиадинов, ответственных за хлебопекарные качества пшеницы у отобранных трансгенных линий пшеницы, толерантных к засолению;

7.4.2 Результаты оценки толерантности трансгенных линий (T2) к засолению и функциональной роли транскрипционного фактора OsGATA в регулировании устойчивости пшеницы к стрессу, вызываемому засолением.

4.1.4. Технические характеристики планируемых научно-технических результатов НИР

1. Коллекция растений исходных сортов яровой мягкой пшеницы должна содержать не менее 200 растений, выращенных в условиях закрытого грунта. Растения должны быть выращены в условиях теплицы при фотопериоде 16/8 часов, температурном режиме 25°/15°С (день/ночь) и умеренном поливе. Срезанные незрелые колосья выщелушивают и помещают зерновки в камеру (+4°С) на 48 ч.

2. Полноразмерная копия гена *osgata* должна содержать не менее 219 п.н, кодирующих транскрипционный фактор OsGATA.

3. Вектор для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, должен содержать Т-ДНК область, несущую ген *gus* под 35S промотером, ген *hygR* под усиленным 35S промотером и ген *osgata* под злакоспецифическим промотором.

4. Для трансформации используют морфогенные каллусы пшеницы, полученные из незрелых зародышей.

5. Для агробактериальной трансформации вектор pCAMBIA1304-OSGATA должен быть трансформирован в супервирулентную линию *Agrobacterium tumefaciens*.

6. Биобаллистическая трансформация должна проводиться с использованием “генной пушки” PIG (Particle inflow gun), при следующих условиях: давление гелия при выстреле - 6 атм.; расстояние от ткани мишени (каллус) до источника частиц (фильтродержателя) - 12 см, объем газа при выстреле - 6 см³; сечение ячейки рассекающего фильтра - 500 мкм; отрицательное давление вакуума в камере при выстреле - 30 мм рт. ст.

7. Трансформированные клетки должны отбираться на питательной среде с селективным агентом гигромицином (*hyg*) в концентрации не менее 15 мг/л.

8. Наличие трансгенной вставки должно быть подтверждено с использованием методов ПЦР на фрагменты Т-ДНК, а также с использованием GUS-окрашивающего раствора X–Gluc.

9. Экспрессия гена транскрипционного фактора OsGATA в трансгенных растениях должна быть подтверждена ИФА анализом.

10. Трансгенные линии поколения T2 должны быть получены от трансгенных линий T1, экспрессирующих транскрипционный фактор OsGATA.

11. Толерантность трансгенных линий T2 к засолению должна быть подтверждена физиологическими и биохимическими анализами по стандартным протоколам.

Таким образом, нами был разработан План исследований, направленный на получение устойчивых к засолению продуктивных сортов мягкой пшеницы путем введения транскрипционного фактора OsGATA (детальный «План исследований» представлен в документации к этапу 1).

5. ВЫРАЩИВАНИЕ РАСТЕНИЙ ИСХОДНЫХ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ТРАНСФОРМАЦИИ

Выращивание растений-доноров для получения трансгенных растений пшеницы является определяющим звеном, от которого зависит успешность всех остальных этапов исследования. Изменение температуры и/или влажности, фитосанитарного состояния, качества грунта, водного режима и минерального питания на этапе культивирования и особенно цветения может привести к снижению фертильности или даже полной стерильности растений-доноров и сделать невозможным получение незрелых зародышей, а, следовательно, и трансгенных растений. 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 – качественное освещение, водоснабжение, почвенные субстраты, удобрения, влажность и качество воздуха.

Процесс получения коллекции исходного материала мягкой яровой пшеницы включает в себя 3 основных этапа:

1. Высадка семян пшеницы
2. Прорывка и браковка нетипичных растений
3. Культивирование растений с целью получения незрелых зародышей

Высадка семян мягкой яровой пшеницы

Для создания коллекции исходного материала были использованы 4 сорта мягкой яровой пшеницы отечественной селекции: Злата, Амир, Эстер, Агата (Рисунок 11). Семена высевали каждую неделю для создания «конвейера» исходного материала.

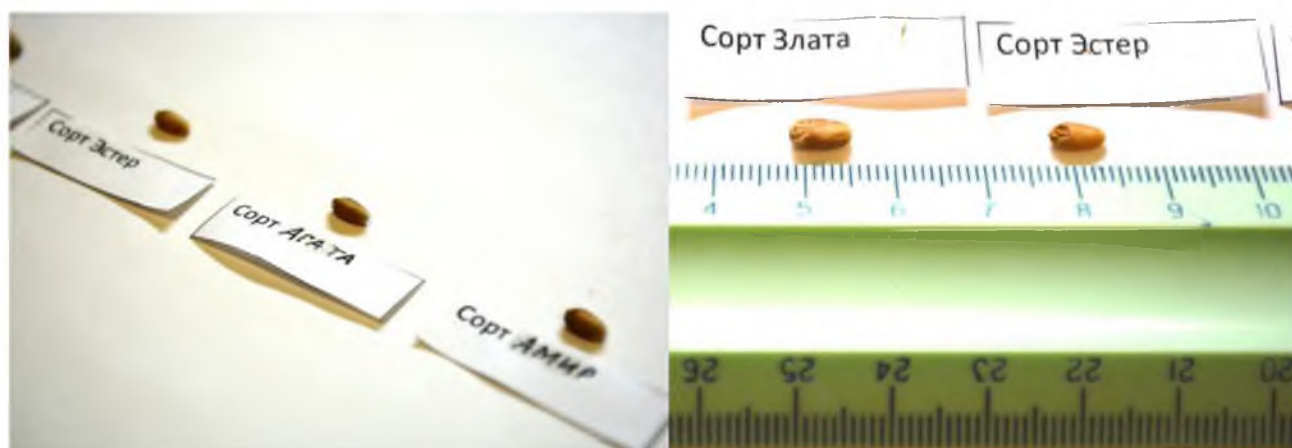


Рисунок 11 Семена яровой пшеницы до замачивания в воде

Чтобы повысить всхожесть семян, перед этапом проращивания выдерживали при температуре 4⁰С не менее 2-х недель, а затем шелушили с использованием бытовой крупорушки

для удаления плотной семенной кожуры. Далее семена обрабатывали 2% раствором KMnO_4 в течение 20 мин. Обработку семян проводили при комнатной температуре с последующей отмывкой водопроводной водой. Для приготовления 2% раствора — 2 г KMnO_4 в 100 мл воды.

Далее семена замачивали в воде на 12-24 часа (Рисунок 12), а затем переносили на влажную фильтровальную бумагу и культивировали 2-3 дня до появления проростков, при температуре 15-20°C (Рисунок 13).

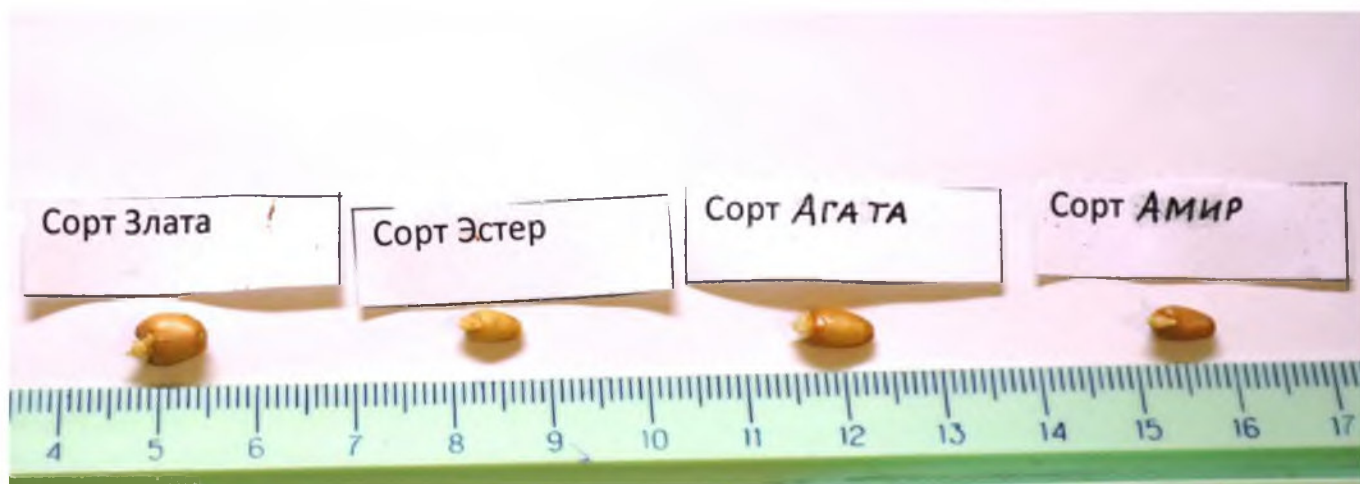


Рисунок 12 Семена яровой пшеницы через сутки после перенесения на влажный фильтр



Рисунок 13 Семена яровой пшеницы через 2 суток после перенесения на влажный фильтр

Растения проращивали по 30-35 шт. каждого сорта в неделю, чтобы колошение растений происходило в течение нескольких недель для отработки параметров и получения трансгенных растений. При набухании в семенах происходят биохимические и физиологические процессы, способствующие прорастанию. По мере набухания семена начинают прорастать.

Ко времени образования 3-4 листьев зародышевые корни разветвляются и проникают в почву на глубину 15-25 см, рост стебля и листьев временно приостанавливается, происходит

дифференциация зачаточного стебля на узлы и междоузлия. В этот период существует опасность повреждения растений корневыми гнилями, особенно, если всходы попадают в ситуацию переувлажнения, низкой температуры почвы, глубокой заделки семян.

Перед высадкой семян проводили подготовку почвенного грунта:

1. Автоклавирование почвенного грунта;
2. Выравнивание pH до значения 6,5-7 (солевая вытяжка, доломитовая мука);
3. Внесение микро- и макроэлементов (удобрений).

Для подготовки почвенного грунта использовали оборудование ЦКП (ИБР РАН).

Проросшие семена пшеницы (Рисунок 14) по 10-12 штук высевались в горшочки со стерильным почвенным субстратом. Выращивание растений проводили в Экспериментальная установка искусственного климата (ФИЦ Биотехнологии РАН).



Рисунок 14 Семена яровой пшеницы через 3 суток перед посадкой в вегетационные сосуды

Глубина посева 3-4 см. Семена проращивали в условиях искусственного климата при температуре 15/12⁰С (день/ночь), со световым режимом: 16 часов день/8 – ночь, влажностью воздуха 60-70% и интенсивность освещения 10 000 – 15 000 люкс. После появления всходов температура культивирования повышалась до 15-20⁰С.

Прорывка и браковка нетипичных растений

После образования 2-3 листьев, перед началом стадии кущения, была проведена пшеницы после браковки в фазе стеблевания прорывка и браковка нетипичных растений. В горшках оставляли 8-10 растений и проводили присыпку почвенным грунтом (Рисунок 15). Всего было оставлено 960 растений (по 240 растений каждого сорта). Все растения были промаркированы (Таблица 4). Полив смесью из водорастворимых удобрений проводили раз в 8-12 дней.



Рисунок 15 Растения пшеницы на стадии 2-3 листьев (после браковки) в вегетационных сосудах

Таблица 4. Список растений пшеницы (коллекция исходного материала)

	Злата	Эстер	Амир	Агата
Количество растений	240	240	240	240
Номера растений	ZL1-ZL240	AS1-AS240	AM1-AM240	AG1-AG240

Культивирование растений с целью получения незрелых зародышей

Растения культивировались при поливе водопроводной водой по мере подсыхания почвенного субстрата при 60-70% влажности воздуха (Рисунок 16). Для улучшения аэрации корневой системы, проводилось рыхление верхнего почвенного слоя не менее 1 раза в 10 дней. Температура в помещении поддерживалась в пределах 15-20⁰С, освещенность 10 тыс. люкс при 16 часовом фотопериоде (16 ч день/8 ч ночь). Каждые 2 недели проводилась прикорневая подкормка растений органическими удобрениями и микроэлементами.

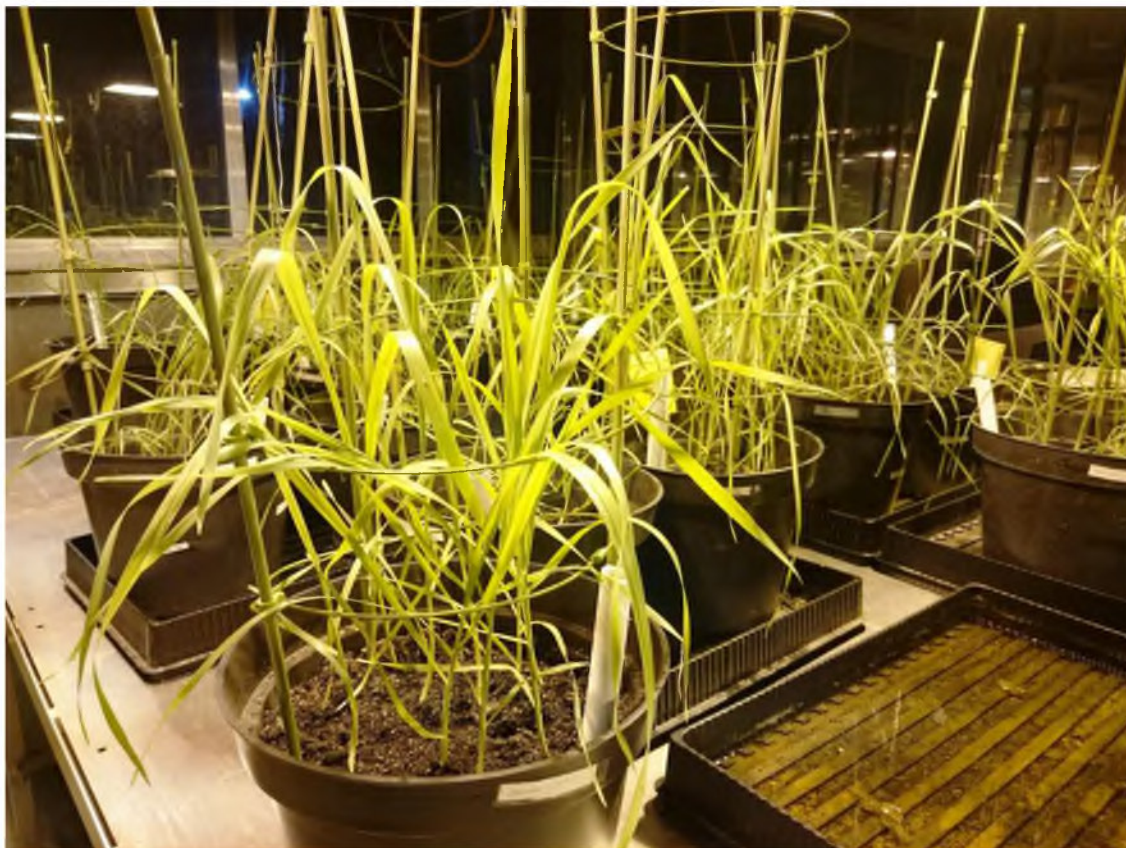


Рисунок 16 Растения яровой пшеницы в установке искусственного климата

В период кущения растения в достаточной степени были обеспечены элементами питания, особенно азотом, который резко увеличивает ростовые процессы формирующихся продуктивных органов. В фазе выхода в трубку, началом образования и дифференциации цветков, идет закладка тычинок, пестиков и покровных органов цветка. Фенологическим его признаком является появление второго стеблевого узла. На этом этапе органогенеза окончательно определяется потенциально возможное для сорта количество цветков в колосках, а значит и зерновок (Рисунок 17). Растения дорастивали до стадии колошения, в фазу молочной спелости колоса, на 10-14 сутки после выхода пыльников. Большая часть зародышей на этой стадии имеет размеры 0,8-1,5 мм. При необходимости стадия развития определялась с помощью микроскопа по стандартной методике выделения зародышей при помощи скальпеля.



Рисунок 17 Растение пшеницы на стадии выхода в трубку

Контроль фитосанитарного состояния

Очень важным при выращивании растений-доноров является предотвращение заболеваний растений и появление вредителей, т.к. эти факторы сильно снижают фертильность растений и формирование полноценного колоса.

В период создания коллекции проводилась комбинированная схема дезинфекции установки искусственного климата по следующей схеме:

1. Обработка помещения 1% раствором Командора.
2. Мытье стекол и конструкций раствором Доместоса.
3. Подготовка вегетационных сосудов объемом 10 л.
4. Обработка помещения 5% раствором «Актары» каждые 2 недели.
5. Пропарка рабочих поверхностей и грунта.

Создание коллекции растений-доноров в установке искусственного климата проводилось по следующей схеме:

1. Предпосевное внесение минеральных удобрений в сосуды с грунтом.
2. Замачивание посевного материала в 1% KMnO_4 .
3. Посев проростков пшеницы.

4. Полив в сосуды очищенной водопроводной водой каждые 2 дня по 200 мл/сосуд.
5. Полив в поддон каждые 7 дней очищенной водопроводной водой.
6. Прикорневая подкормка всходов пшеницы - N18P6K18 .
7. Рыхление верхнего почвенного слоя для улучшения аэрации.
8. Увлажнение воздуха в установке искусственного климата.
9. Профилактическая обработка растений смесью фунгицидов и бактерицидов.
10. Изоляция пораженных растений.
11. Подкормка растительного материала в фазе кущения - N18P6K18 .
12. Присыпка оголившихся узлов кущения в сосудах нейтрализованным торфом.
13. Внекорневая подкормка в фазу выхода в трубку – N34.
14. Осмотр сосудов на предмет наличия сорных растений и последующая их ликвидация.
15. В фазу выхода пыльников из колосков прекратить увлажнение воздуха в установке искусственного климата.
16. Срезка колосьев через 10-14 дней после начала цветения.
17. Удаление растений, растительных остатков.

Профилактическую обработку растений смесью фунгицидов и бактерицидов прекращали за 10-12 дней до цветения, т.к. данные препараты снижали жизнеспособность зародышей пшеницы. Календарный план по уходу за растениями-донорами приведен в приложении 2.

В результате была получена коллекция из 960 растений (240 растений каждого сорта), подходящих для проведения последующих этапов НИР. Растения были выращены с использованием ЦКП (ИБР РАН) и ЭУИК (ФИЦ Биотехнологии РАН). Созданная коллекция исходных растений будет использована при генетической трансформации пшеницы. В отчетной документации представлен «Акт о создании коллекции исходного материала».

6. АННОТАЦИОННЫЙ ОТЧЕТ ИНОСТРАННОГО ПАРТНЕРА

1. The Short Annotation report containing the way of amplification of full-size copy of the TF gene OsGATA from rice. For amplifying the OsGATA gene from rice. Total RNA were isolated from one week old rice (IR64) seedlings by TRIzol Reagent (Life Technologies, Rockville, MD, USA), and cDNA were prepared from isolated RNA using first strand cDNA synthesis kit (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada). OsGATA full length gene (CDS) was amplified by PCR using appropriate primers designed from CDS sequence available in Rice Genome Annotation Project (rice.plantbiology.msu.edu/). 2. The short annotation report of the way of creation the vector pCAMBIA 1304, carrying the gene TF OsGATA, for the Agrobacterium-mediated wheat genetic transformation. a. OsGATA cloned into shuttle vector pRT101. Full length OsGATA (LOC_Os01g24070) was amplified using OsGATAXhoIFLF and OsGATABamHIFLR primers and rice (IR64) cDNA as template. Amplified product was digested with XhoI and BamHI restriction	1. Отчёт, содержащий краткую аннотацию способа выделения полноразмерной копии гена ТФ OsGATA из риса. Для амплификации гена OsGATA из риса общую РНК выделяли из проростков риса (IR64) недельного возраста с помощью реагента TRIzol (Life Technologies, Rockville, MD, США), кДНК были получены из изолированной РНК с использованием стандартного комплекта синтеза кДНК (Fermentas Life Sciences, Берлингтон, Онтарио, Канада). OsGATA полноразмерный ген (CDS) был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием соответствующих праймеров, сконструированных из CDS последовательностей доступных в Аннотации Проекта генома риса (rice.plantbiology.msu.edu/). 2. Краткий аннотационный отчет о способе создания вектора pCAMBIA 1304, несущего ген транскрипционного фактора OsGATA, для агробактериальной генетической трансформации пшеницы. a. OsGATA клонировали в челнок вектор pRT101. Полноразмерный ген OsGATA (LOC_Os01g24070) был выделен с помощью OsGATAXhoIFLF и OsGATABamHIFLR праймеров и кДНК риса (IR64) в качестве матрицы. Амплифицированный продукт расщепляли XhoI и BamHI рестриктазами
--	---

enzymes and ligated at the corresponding site in the shuttle vector pRT101 to obtain pRT101-OsGATA construct (Figure 1). Colony PCR was done to confirm the presence of 396 bp insert. Cloning was further confirmed by restriction digestion of the isolated plasmid from PCR positive colony by the enzymes XhoI and BamHI to release the cloned fragment.	и лигировали в соответствующий сайт челночного вектора pRT101, чтобы получить pRT101-OsGATA конструкцию (рисунок 1). ПЦР колоний был сделан, чтобы подтвердить наличие 396 п.н. вставки. Клонирование было дополнительно подтверждено рестрикционным расщеплением изолированной плазмиды из ПЦР положительной колонии ферментами XhoI и BamHI, чтобы освободить клонированного фрагмента.
--	---

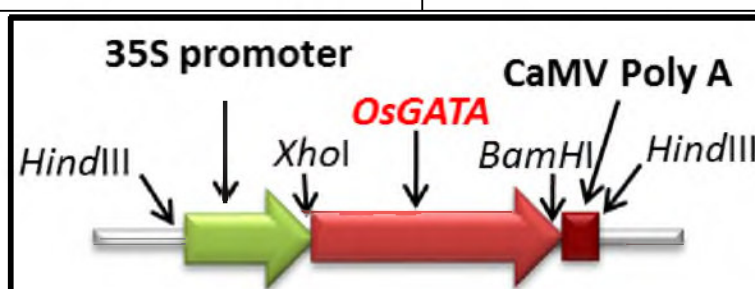


Figure 1. Cloning of OsGATA in pRT101 shuttle vector. Schematic diagram of pRT101-OsGATA cassette to be mobilized into plant expression vector where 35S promoter, constitutive CaMV 35S promoter; CaMV Poly A, Polyadenylation signal from CaMV; HindIII, restriction sites used for extraction of the whole cassette; XhoI & BamHI, Restriction enzyme for cloning the gene.	Рис. 1. Клонирование OsGATA в челночный вектор pRT101. Принципиальная схема вставки pRT101-OsGATA кассеты, в растительный вектор экспрессии, где промотор 35S - конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV); CaMV Поли А - сигнал полиаденилирования от CaMV; HindIII, сайты рестрикции, используемые для извлечения всей кассеты; XhoI и BamHI, рестрикционные ферменты для клонирования гена.
a. pRT101-OsGATA cassette was mobilized into plant transformation vector pCAMBIA1304. pRT101-OsGATA cassette included OsGATA cDNA along with the promoter and terminator, which was mobilized to the pCAMBIA1304 vector Multiple cloning site (MCS) for making it full construct for plant transformation	a. pRT101-OsGATA кассету встраивали в вектор для трансформации растений pCAMBIA1304. pRT101-OsGATA кассета включена в OsGATA кДНК вместе с промотором и терминатором, который был встроен в сайт множественного клонирования pCAMBIA1304 (MCS) для создания конструкции для трансформации

(Figure 2). To mobilize pRT101-OsGATA cassette to the MCS of pCAMBIA1304 vector, pRT101-OsGATA construct was digested using HindIII to get 1.08 kb fragment and ligated to the HindIII digested pCAMBIA1304 vector. Colony PCR was done to confirm the presence of 396 bp insert. pCAMBIA1304-OsGATA construct was further mobilized into the Agrobacterium strain LBA4404 for raising transgenic wheat plants overexpressing OsGATA TF.	растений (рисунок 2). Для введения pRT101-OsGATA кассеты с МКС в вектор pCAMBIA1304, pRT101-OsGATA конструкцию расщепляли с помощью HindIII, чтобы получить 1,08 кб фрагмент и легиrowали в Hind III, вектора pCAMBIA1304. ПЦР колоний было сделано, чтобы подтвердить наличие 396 п.н. вставки. pCAMBIA1304-OsGATA конструкция вводилась в штамм Agrobacterium LBA4404 для повышения частоты получения трансгенных растений пшеницы с гиперэкспрессией OsGATA транскрипционного фактора.
---	--

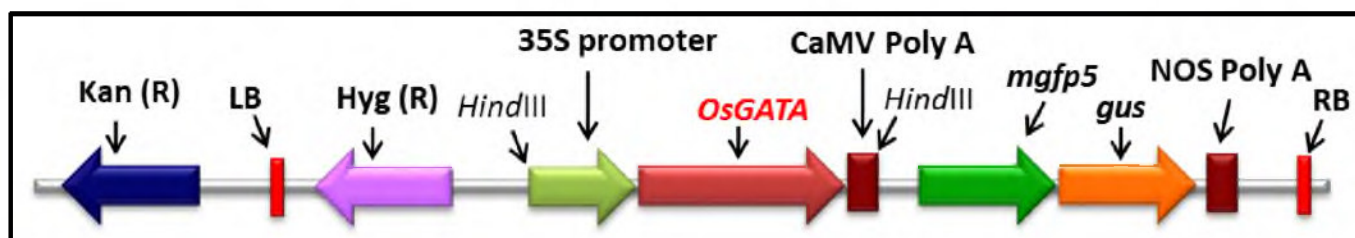


Fig. 2. Cloning of OsGATA in pCAMBIA1304 plant expression vector. Schematic diagram of pCAMBIA1304-OsGATA cassette where Kan (R), Kanamycin resistant gene; LB & RB, Left and right boarder of T-DNA; Hyg (R), Hygromycine resistant gene; CaMV 35S promoter, constitutive CaMV 35S promoter; CaMV Poly A, Polyadenylation signal from CaMV; NOS Poly A, Polyadenylation signal from nopaline synthase gene; HindIII, restriction sites used for mobilization of the whole cassette from pRT101 clone; mgfp5, Modified green florescent protein; gus, glucurodinase reporter gene.	Рис 2. Клонирование OsGATA в вектор экспрессии растений pCAMBIA1304. Принципиальная схема pCAMBIA1304-OsGATA кассеты, где Кан (R), канамицину ген устойчивости; LB и RB, левый и правый граница Т-ДНК; Hyg (R), ген устойчивости к гигромицину; CaMV 35S промотор, конститутивный CaMV 35S промотор; CaMV Поли А сигнал полиаденилирования CaMV; NOS. Поли А сигнал, полиаденилирования гена нопалин синтазы; HindIII сайты рестрикции, используемые для мобилизации всей кассеты с pRT101 клона; mgfp5, модифицированный зеленый флуоресцентный белок; GUS (uidA) ген-репортер глюкуро니다зы.
---	---

2. Funds spent in the Indian Laboratory to carry out this work: Direct cost (consumables): INR 10,00,000/- Indirect cost (infrastructure): INR 50,00,000/-	2. Расходы Индийского партнера на проведенные исследования: Прямые расходы (расходные материалы): 1 000 000 индийских рупий Непрямые расходы (инфраструктура): 5 000 000 индийских рупий
---	---

В результате была амплифицирована полноразмерная копия гена транскрипционного фактора OsGATA из кДНК риса и создан вектор для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации, несущий транскрипционный фактор OsGATA на основе вектора экспрессии растений pCAMBIA1304.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время выполнения работ, в соответствии с календарным планом и поставленными задачами:

1. Проведен аналитический обзор современной научной, литературы, касающейся научно-технической проблемы, исследуемой в рамках НИР. Общее количество проанализированных работ 136, в том числе обзор научных информационных источников: статьи в ведущих зарубежных и российских научных журналах, монографии, патенты – из которых 60 научно-информационных источников за период 2010 – 2015 гг.
2. Проведено патентное исследование в соответствии ГОСТ Р 15.011-96, показавшее перспективность разрабатываемых технологий. Полный отчет о проведении патентных исследований представлен в документе «Отчет о патентных исследованиях».
3. Разработаны и обоснованы экспериментальные и методические подходы повышения солеустойчивости пшеницы и проведена сравнительная оценка вариантов возможных решений исследуемой проблемы с учетом результатов исследований, проводившихся по аналогичной тематике. Выявлены перспективные гены для увеличения солеустойчивости пшеницы без понижения ее продуктивности. Это транскрипционные факторы. Наши соисполнители выделяют перспективный фактор из риса OSGATA, который будет введен в геномы продуктивных яровых сортов пшеницы ЗЛАТА, АМИР, АГАТА и ЭСТЕР.
4. Разработан План исследований, направленный на получение устойчивых к засолению продуктивных сортов мягкой пшеницы путем введения транскрипционного фактора OsGATA (детальный «План исследований» представлен в документации к этапу 1).
5. Выращена коллекция исходных сортов яровой мягкой пшеницы. Коллекция состоит из 960 растений (240 растений каждого сорта), подходящих для проведения последующих этапов НИР. Растения были выращены с использованием ЦКП (ИБР РАН) и ЭУИК (ФИЦ Биотехнологии РАН). Созданная коллекция исходных растений будет использована при генетической трансформации пшеницы. В отчетной документации представлен «Акт о создании коллекции исходного материала».
6. Иностранном партнером подготовлен аннотационный отчет, содержащий протоколы амплификации полноразмерной копии гена транскрипционного фактора OsGATA из риса и создания вектора для агробактериальной и биобаллистической генетической трансформации пшеницы, несущий ген транскрипционного фактора OsGATA.

Исходя из полученных результатов НИР можно сделать вывод о полном решении поставленных на I этапе задач и находятся на конкурентном уровне относительно аналогичных исследований иностранных учёных.

Полученные на данном этапе научно-технические результаты НИР будут использованы на II этапе экспериментальных исследований поставленных перед НИР задач и для обобщения и оценки результатов исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Agarwal, P. K., Agarwal, P., Jain, P., Jha, B., Reddy, M. K., Sopory, S. K. Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco //Plant cell reports. – 2008. – Т. 27. – №. 1. – С. 105-115.
2. Alvarez-Gerding, X., Cortés-Bullemore, R., Medina, C., Romero-Romero, J.L., Inostroza-Blancheteau, C., Aquea, F. Improved Salinity Tolerance in Carrizo Citrange Rootstock through Overexpression of Glyoxalase System Genes //BioMed research international. – 2015. – Т. 2015.
3. Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis* //Science. – 1999. – Т. 285. – №. 5431. – С. 1256-1258.
4. Asano, T., Hakata, M., Nakamura, H., Aoki, N., Komatsu, S., Ichikawa, H., Ohsugi, R. Functional characterisation of OsCPK21, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice //Plant molecular biology. – 2011. – Т. 75. – №. 1-2. – С. 179-191.
5. Ashraf M., Harris P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants //Plant Science. – 2004. – Т. 166. – №. 1. – С. 3-16.
6. Bai, X., Liu, J., Tang, L., Cai, H., Chen, M., Ji, W., Zhu, Y. Overexpression of GsCBRLK from Glycine soja enhances tolerance to salt stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) //Functional Plant Biology. – 2013. – Т. 40. – №. 10. – С. 1048-1056.
7. Barragán, V., Leidi, E.O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J.A., J.M. Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis* //The Plant Cell. – 2012. – Т. 24. – №. 3. – С. 1127-1142.
8. Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.C., Ohto, M.A., Ushijima, K., Nakano, R. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ antiporters NHX1 and NHX2 control vacuolar pH and K⁺ homeostasis to regulate growth, flower development, and reproduction //The Plant Cell. – 2011. – Т. 23. – №. 9. – С. 3482-3497.
9. Bray E.A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: An analysis using microarray and differential expression data //Annals of botany. – 2002. – Т. 89. – №. 7. – С. 803-811.
10. Bray E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana* //Journal of experimental botany. – 2004. – Т. 55. – №. 407. – С. 2331-2341.
11. Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses //Biochemistry and molecular biology of plants. – 2000. – Т. 1158. – С. e1203.

12. Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A., Masmoudi, K. Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt-and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants //Journal of Experimental Botany. – 2007. – T. 58. – №. 2. – C. 301-308.
13. Carillo, P., Annunziata, M.G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., P. Salinity stress and salt tolerance //Abiotic Stress Plants-Mech. Adapt. – 2011.
14. Chen, L., Ren, F., Zhong, H., Jiang, W., Li, X. Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in *Brassica napus* //Acta biochimica et biophysica Sinica. – 2010. – T. 42. – №. 2. – C. 154-164.
15. Chen, T., Li, W., Hu, X., Guo, J., Liu, A., Zhang, B. A cotton MYB transcription factor, GbMYB5, is positively involved in plant adaptive response to drought stress //Plant and Cell Physiology. – 2015. – T. 56. – №. 5. – C. 917-929.
16. Chen, W., Provart, N.J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.S., Eulgem, T., P.R. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses //The Plant Cell. – 2002. – T. 14. – №. 3. – C. 559-574.
17. Ciarmiello L.F., Woodrow P., Fuggi A., Pontecorvo G., Carillo P. Plant genes for abiotic stress //Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations. – 2011. – C. 283-308.
18. CIMMYT 2004. Results of Transgenic Wheat Trial Look Promising. (<http://www.cimmyt.org/en/news-and-updates/item/results-of-transgenic-wheat-trial-look-promising>)
19. Coello P., Hey S.J., Halford N.G. The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield //Journal of experimental botany. – 2011. – T. 62. – №. 3. – C. 883-893.
20. Conti, L., Price, G., O'Donnell, E., Schwessinger, B., Dominy, P., Sadanandom, A. Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and-2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis* //The Plant Cell. – 2008. – T. 20. – №. 10. – C. 2894-2908.
21. Da Silva J.A.T., Yücel M. Revealing response of plants to biotic and abiotic stresses with microarray technology //Genes, Genomes and Genomics. – 2008. – T. 2. – №. 1. – C. 14-48.
22. Das, P., Nutan, K.K., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A. Understanding salinity responses and adopting 'omics-based' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice //Frontiers in plant science. – 2015. – T. 6.
23. De Boer A.H., Wegner L.H. Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells //Journal of Experimental Botany. – 1997. – T. 48. – №. Special Issue. – C. 441-449.
24. Deinlein, U., Stephan, A.B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., Schroeder, J.I. Plant salt-tolerance mechanisms //Trends in plant science. – 2014. – T. 19. – №. 6. – C. 371-379.

25. Dreyer I., Uozumi N. Potassium channels in plant cells //FEBS Journal. – 2011. – T. 278. – №. 22. – C. 4293-4303.
26. Dubouzet, J.G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E.G., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt-and cold-responsive gene expression //The Plant Journal. – 2003. – T. 33. – №. 4. – C. 751-763.
27. Flowers T.J., Troke P.F., Yeo A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes //Annual review of plant physiology. – 1977. – T. 28. – №. 1. – C. 89-121.
28. Flowers T.J., Yeo A.R. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? //Functional Plant Biology. – 1995. – T. 22. – №. 6. – C. 875-884.
29. Foolad M.R. Recent advances in genetics of salt tolerance in tomato //Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – T. 76. – №. 2. – C. 101-119.
30. Fukuda, A., Nakamura, A., Tagiri, A., Tanaka, H., Miyao, A., Hirochika, H., Tanaka, Y. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice //Plant and Cell Physiology. – 2004. – T. 45. – №. 2. – C. 146-159.
31. Galvan-Ampudia, C.S., Julkowska, M.M., Darwish, E., Gandullo, J., Korver, R.A., Brunoud, G., Testerink, C. Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment //Current Biology. – 2013. – T. 23. – №. 20. – C. 2044-2050.
32. Gao, S.Q., Chen, M., Xu, Z.S., Zhao, C.P., Li, L., Xu, H.J., Ma, Y.Z. The soybean GmbZIP1 transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants //Plant molecular biology. – 2011. – T. 75. – №. 6. – C. 537-553.
33. Geng, Y., Wu, R., Wee, C.W., Xie, F., Wei, X., Chan, P.M.Y., Dinneny, J.R. A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis* //The Plant Cell. – 2013. – T. 25. – №. 6. – C. 2132-2154.
34. Ghosh, A., Pareek, A., Sopory, S.K., Singla-Pareek, S.L. A glutathione responsive rice glyoxalase II, OsGLYII-2, functions in salinity adaptation by maintaining better photosynthesis efficiency and anti-oxidant pool //The Plant Journal. – 2014. – T. 80. – №. 1. – C. 93-105.
35. Golldack D., Lüking I., Yang O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network //Plant cell reports. – 2011. – T. 30. – №. 8. – C. 1383-1391.

36. Hall, D., Evans, A.R., Newbury, H.J., Pritchard, J. Functional analysis of CHX21: a putative sodium transporter in Arabidopsis //Journal of experimental botany. – 2006. – T. 57. – №. 5. – C. 1201-1210.
37. Hayashi, H., Alia, H., Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M., Murata, N. Transformation of Arabidopsis thaliana with the codA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress //Plant Journal. – 1997. – T. 12. – №. 1. – C. 133-142.
38. Holmberg N., Bülow L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer //Trends in plant science. – 1998. – T. 3. – №. 2. – C. 61-66.
39. Hong, B., Tong, Z., Ma, N., Li, J., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Gao, J. Heterologous expression of the AtDREB1A gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance //Science in China Series C: Life Sciences. – 2006. – T. 49. – №. 5. – C. 436-445.
40. Horie, T., Costa, A., Kim, T.H., Han, M.J., Horie, R., Leung, H.Y., Schroeder, J.I. Rice OsHKT2; 1 transporter mediates large Na⁺ influx component into K⁺-starved roots for growth //The EMBO Journal. – 2007. – T. 26. – №. 12. – C. 3003-3014.
41. Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Osumi, M. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter- induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells //The Plant Journal. – 2005. – T. 44. – №. 6. – C. 928-938.
42. Howat D. Acceptable salinity, sodicity and pH values for boreal forest reclamation. – Environmental Sciences Division, 2000.
43. Hsiao T.C., Xu L.K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport //Journal of experimental botany. – 2000. – T. 51. – №. 350. – C. 1595-1616.
44. Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q., Xiong, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – T. 103. – №. 35. – C. 12987-12992.
45. Hu, H., You, J., Fang, Y., Zhu, X., Qi, Z., Xiong, L. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice //Plant molecular biology. – 2008. – T. 67. – №. 1-2. – C. 169-181.
46. IFIC 2010. Consumer Perceptions of Food Technology Survey. (http://www.foodinsight.org/Content/3843/Final_Executive%20Summary%20Food%20Tech%20Report_Website%20version_7-7-10.pdf.)
47. ISAAA 2007. Pocket K No. 30: Biotechnology for the Development of Drought Tolerant Crops (<http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/30/>).

48. ISAAA 2015. Biotech Wheat Pocket K No. 38:
(<https://isaaa.org/resources/publications/pocketk/38/default.asp>)
49. ISB data base (<http://www.nbiap.vt.edu/search-release-data.aspx>)
50. James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010. – Ithaca, NY, USA : International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), 2010.
51. James R.A., Davenport R.J., Munns R. Physiological characterization of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat, Nax1 and Nax2 //Plant Physiology. – 2006. – T. 142. – №. 4. – C. 1537-1547.
52. Jiang, C., Belfield, E.J., Cao, Y., Smith, J.A.C., Harberd, N.P. An Arabidopsis soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis //The Plant Cell. – 2013. – T. 25. – №. 9. – C. 3535-3552.
53. Jiang, Z., Zhu, S., Ye, R., Xue, Y., Chen, A., An, L., Pei, Z. M. Relationship between NaCl-and H₂O₂-Induced Cytosolic Ca²⁺ Increases in Response to Stress in Arabidopsis //PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 10.
54. Kaur, C., Ghosh, A., Pareek, A., Sopory, S.K., Singla-Pareek, S.L. Glyoxalases and stress tolerance in plants //Biochem. Soc. Trans. – 2014. – T. 42. – C. 485-490.
55. Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., Harter, K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses //The Plant Journal. – 2007. – T. 50. – №. 2. – C. 347-363.
56. Kishor, P.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., Verma, D.P.S. Overexpression of [delta]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants //Plant Physiology. – 1995. – T. 108. – №. 4. – C. 1387-1394.
57. Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R. Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity //The Plant Journal. – 1997. – T. 12. – №. 5. – C. 1067-1078.
58. Kong, X., Pan, J., Zhang, M., Xing, X., Zhou, Y., Liu, Y., Li, D. ZmMKK4, a novel group C mitogen-activated protein kinase kinase in maize (Zea mays), confers salt and cold tolerance in transgenic Arabidopsis //Plant, cell & environment. – 2011. – T. 34. – №. 8. – C. 1291-1303.
59. Lauchli A. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. – 1984.
60. Lee, S.K., Kim, B.G., Kwon, T.R., Jeong, M.J., Park, S.R., Lee, J.W., Park, S.C. Overexpression of the mitogen-activated protein kinase gene OsMAPK33 enhances sensitivity to salt stress in rice (Oryza sativa L.) //Journal of biosciences. – 2011. – T. 36. – №. 1. – C. 139-151.

61. Leidi, E.O., Barragán, V., Rubio, L., El-Hamdaoui, A., Ruiz, M. T., Cubero, B., Pardo, J.M. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato //The Plant Journal. – 2010. – T. 61. – №. 3. – C. 495-506.
62. Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis //The Plant Cell. – 1998. – T. 10. – №. 8. – C. 1391-1406.
63. Luo, Y., Liu, Y.B., Dong, Y.X., Gao, X.Q., Zhang, X.S. Expression of a putative alfalfa helicase increases tolerance to abiotic stress in Arabidopsis by enhancing the capacities for ROS scavenging and osmotic adjustment //Journal of plant physiology. – 2009. – T. 166. – №. 4. – C. 385-394.
64. Mallikarjuna, G., Mallikarjuna, K., Reddy, M. K., Kaul, T. Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) //Biotechnology letters. – 2011. – T. 33. – №. 8. – C. 1689-1697.
65. Mao, X., Jia, D., Li, A., Zhang, H., Tian, S., Zhang, X., Jing, R. Transgenic expression of TaMYB2A confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in Arabidopsis //Functional & integrative genomics. – 2011. – T. 11. – №. 3. – C. 445-465..
66. Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garcíadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J.K., Pardo, J.M., Quintero, F.J. Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice //Plant Physiology. – 2007. – T. 143. – №. 2. – C. 1001-1012.
67. Mäser, P., Eckelman, B., Vaidyanathan, R., Horie, T., Fairbairn, D.J., Kubo, M., Robertson, W. Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1 //FEBS letters. – 2002. – T. 531. – №. 2. – C. 157-161.
68. Mckersie, B.D., Bowley, S.R., Harjanto, E., Leprince, O. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase //Plant Physiology. – 1996. – T. 111. – №. 4. – C. 1177-1181.
69. Misra, S., Wu, Y., Venkataraman, G., Sopory, S.K., Tuteja, N. Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C //The Plant Journal. – 2007. – T. 51. – №. 4. – C. 656-669.
70. Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. – 2008. – T. 59. – C. 651-681.

71. Nakashima, K., Tran, L.S.P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Yamaguchi-Shinozaki, K. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice //The Plant Journal. – 2007. – T. 51. – №. 4. – C. 617-630.
72. NAWG 2009. 76% of Wheat Growers Approve Biotech Petition (<http://www.wheatworld.org/wp-content/uploads/biotech-petition-press-release-20090226.pdf>)
73. Nechaev V., Gaponenko A. The introduction of the newest biotechnologies is necessary for sustainable agricultural development and needs the sufficient investments //Visegrad Journal on Bioeconomy and Sustainable Development. – 2013. – T. 2. – №. 2. – C. 72-77.
74. Orellana, S., Yanez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., Gonzalez, E., RUIZ-LARA, S.I.M.Ó.N., Casaretto, J.A. The transcription factor SlAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato //Plant, cell & environment. – 2010. – T. 33. – №. 12. – C. 2191-2208.
75. Pennisi E. Harvest of genome data for wheat growers //Science. – 2014. – T. 345. – №. 6194. – C. 251-251.
76. Richter R., Bastakis E., Schwechheimer C. Cross-repressive interactions between SOC1 and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in Arabidopsis //Plant physiology. – 2013. – T. 162. – №. 4. – C. 1992-2004.
77. Richter, R., Behringer, C., Zourelidou, M., Schwechheimer, C. Convergence of auxin and gibberellin signaling on the regulation of the GATA transcription factors GNC and GNL in Arabidopsis thaliana //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – T. 110. – №. 32. – C. 13192-13197.
78. Sahoo, K.K., Tripathi, A.K., Pareek, A., Singla-Pareek, S.L. Taming drought stress in rice through genetic engineering of transcription factors and protein kinases //Plant Stress. – 2013. – T. 7. – №. 1. – C. 60-72.
79. Saibo N.J.M., Lourenço T., Oliveira M.M. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses //Annals of botany. – 2009. – T. 103. – №. 4. – C. 609-623.
80. Schilling, R.K., Marschner, P., Shavrukov, Y., Berger, B., Tester, M., Roy, S.J., Plett, D.C. Expression of the Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) improves the shoot biomass of

transgenic barley and increases grain yield in a saline field //Plant biotechnology journal. – 2014. – T. 12. – №. 3. – C. 378-386.

81. Schroeder, J.I., Delhaize, E., Frommer, W.B., Guerinot, M.L., Harrison, M.J., Herrera-Estrella, L., Tsay, Y.F. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production //Nature. – 2013. – T. 497. – №. 7447. – C. 60-66.

82. Seki, M., Kamei, A., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection //Current Opinion in Biotechnology. – 2003. – T. 14. – №. 2. – C. 194-199.

83. Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Satou, M. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray //The Plant Journal. – 2002. – T. 31. – №. 3. – C. 279-292.

84. Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response //Plant physiology. – 1997. – T. 115. – №. 2. – C. 327.

85. Silva P., Gerós H. Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange //Plant signaling & behavior. – 2009. – T. 4. – №. 8. – C. 718-726.

86. Singh, R., Singh, Y., Xalaxo, S., Verulkar, S., Yadav, N., Singh, S., Rani, M.G. From QTL to variety-harnessing the benefits of QTLs for drought, flood and salt tolerance in mega rice varieties of India through a multi-institutional network //Plant Science. – 2016. – T. 242. – C. 278-287.

87. Song, S.Y., Chen, Y., Chen, J., Dai, X.Y., Zhang, W.H. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress //Planta. – 2011. – T. 234. – №. 2. – C. 331-345.

88. Soni, P., Nutan, K.K., Soda, N., Nongpiur, R.C., Roy, S., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A. Towards Understanding Abiotic Stress Signaling in Plants: Convergence of Genomic, Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Approaches //Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants. – Springer New York, 2015. – C. 3-40.

89. Sun, S.J., Guo, S.Q., Yang, X., Bao, Y.M., Tang, H.J., Sun, H., Zhang, H.S. Functional analysis of a novel Cys2/His2-type zinc finger protein involved in salt tolerance in rice //Journal of experimental botany. – 2010. – C. erq120.

90. Szczerba M.W., Britto D.T., Kronzucker H.J. K⁺ transport in plants: physiology and molecular biology //Journal of plant physiology. – 2009. – T. 166. – №. 5. – C. 447-466.

91. Tarczynski, M.C., Jensen, R.G., Bohnert, H.J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol //SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-. – 1993. – T. 259. – C. 508-508.

92. Tester M., Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants //Annals of botany. – 2003. – T. 91. – №. 5. – C. 503-527.
93. Tracy, F.E., Gilliam, M., Dodd, A.N., Webb, A.A., Tester, M. NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in Arabidopsis thaliana are heterogeneous and modified by external ionic composition //Plant, cell & environment. – 2008. – T. 31. – №. 8. – C. 1063-1073.
94. Tran, L.S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104. – №. 51. – C. 20623-20628.
95. Undurraga, S.F., Santos, M.P., Paez-Valencia, J., Yang, H., Hepler, P.K., Facanha, A.R., Gaxiola, R.A. Arabidopsis sodium dependent and independent phenotypes triggered by H⁺-PPase up-regulation are SOS1 dependent //Plant science. – 2012. – T. 183. – C. 96-105.
96. Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor //The Plant Cell. – 1999. – T. 11. – №. 9. – C. 1743-1754.
97. Vaid, N., Pandey, P., Srivastava, V.K., Tuteja, N. Pea lectin receptor-like kinase functions in salinity adaptation without yield penalty, by alleviating osmotic and ionic stresses and upregulating stress-responsive genes //Plant molecular biology. – 2015. – T. 88. – №. 1-2. – C. 193-206.
98. Villalta, I., Reina-Sánchez, A., Bolarín, M.C., Cuartero, J., Belver, A., Venema, K., Asins, M.J. Genetic analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in leaf and stem as physiological components of salt tolerance in tomato //Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – T. 116. – №. 6. – C. 869-880.
99. Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance//Planta. – 2003. – T.218. – №. 1. – C. 1-14.
100. Wang, W.X., Barak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilizing protein from Populus //Plant Biotechnology 2002 and Beyond. – Springer Netherlands, 2003. – C. 439-443.
101. Wohlbach D.J., Quirino B.F., Sussman M.R. Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation //The Plant Cell. – 2008. – T. 20. – №. 4. – C. 1101-1117.
102. Woodrow, P., Pontecorvo, G., Ciarmiello, L.F., Annunziata, M.G., Fuggi, A., Carillo, P. Transcription factors and genes in abiotic stress //Crop stress and its management: Perspectives and Strategies. – Springer Netherlands, 2012. – C. 317-357.

103. Wu, C.A., Yang, G.D., Meng, Q.W., Zheng, C.C. The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na⁺/H⁺ antiporter plays an important role in salt stress //Plant and Cell Physiology. – 2004. – T. 45. – №. 5. – C. 600-607.
104. Xiang Y., Huang Y., Xiong L. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement //Plant physiology. – 2007. – T. 144. – №. 3. – C. 1416-1428.
105. Xiang, Y., Tang, N., Du, H., Ye, H., & Xiong, L. Characterization of OsbZIP23 as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice //Plant physiology. – 2008. – T. 148. – №. 4. – C. 1938-1952.
106. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress //The plant cell. – 2002. – T. 14. – №. suppl 1. – C. S165-S183.
107. Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.H.D., Wu, R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice //Plant physiology. – 1996. – T. 110. – №. 1. – C. 249-257.
108. Xu, K., Hong, P., Luo, L., Xia, T. Overexpression of AtNHX1, a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from Arabidopsis thaliana, in Petunia hybrida enhances salt and drought tolerance //Journal of Plant Biology. – 2009. – T. 52. – №. 5. – C. 453-461.
109. Xu, Q., Feng, W.J., Peng, H.R., Ni, Z.F., Sun, Q.X. TaWRKY71, a WRKY transcription factor from wheat, enhances tolerance to abiotic stress in transgenic Arabidopsis thaliana //Cereal Research Communications. – 2013. – T. 42. – №. 1. – C. 47-57.
110. Yadav D. K., Tuteja N. Rice G-protein coupled receptor (GPCR) In silico analysis and transcription regulation under abiotic stress //Plant signaling & behavior. – 2011. – T. 6. – №. 8. – C. 1079-1086.
111. Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Ray, M., Reddy, M.K., Sopory, S.K. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione //Biochemical and biophysical research communications. – 2005. – T. 337. – №. 1. – C. 61-67.
112. Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Reddy, M.K., Sopory, S.K. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress //FEBS letters. – 2005. – T. 579. – №. 27. – C. 6265-6271.
113. Yamaguchi T., Blumwald E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities //Trends in plant science. – 2005. – T. 10. – №. 12. – C. 615-620.
114. Yamaguchi T., Hamamoto S., Uozumi N. Sodium transport system in plant cells //Frontiers in plant science. – 2013. – T. 4.
115. Yeo A. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants //Scientia Horticulturae. – 1998. – T. 78. – №. 1. – C. 159-174.

116. Ying, S., Zhang, D.F., Fu, J., Shi, Y.S., Song, Y.C., Wang, T.Y., Li, Y. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis //Planta. – 2012. – T. 235. – №. 2. – C. 253-266.
117. Ying, S., Zhang, D.F., Li, H.Y., Liu, Y.H., Shi, Y.S., Song, Y.C., Li, Y. Cloning and characterization of a maize SnRK2 protein kinase gene confers enhanced salt tolerance in transgenic Arabidopsis //Plant cell reports. – 2011. – T. 30. – №. 9. – C. 1683-1699.
118. Zhang H.X., Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit //Nature biotechnology. – 2001. – T. 19. – №. 8. – C. 765-768.
119. Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., & Ma, Y. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco //Journal of experimental botany. – 2009. – C. erp214..
120. Zhang, H., Mao, X., Wang, C.,Jing, R. Overexpression of a common wheat gene TaSnRK2. 8 enhances tolerance to drought, salt and low temperature in Arabidopsis. – 2010.
121. Zhang, H.X., Hodson, J.N., Williams, J.P., Blumwald, E. Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – T. 98. – №. 22. – C. 12832-12836.
122. Zhang, L., Xi, D., Luo, L., Meng, F., Li, Y., Wu, C. A., Guo, X. Cotton GhMPK2 is involved in multiple signaling pathways and mediates defense responses to pathogen infection and oxidative stress //FEBS Journal. – 2011. – T. 278. – №. 8. – C. 1367-1378.
123. Zhang, X., Wang, L., Meng, H., Wen, H., Fan, Y., Zhao, J. Maize ABP9 enhances tolerance to multiple stresses in transgenic Arabidopsis by modulating ABA signaling and cellular levels of reactive oxygen species //Plant molecular biology. – 2011. – T. 75. – №. 4-5. – C. 365-378.
124. Zhang, X., Wang, L., Meng, H., Wen, H., Fan, Y., Zhao, J. Maize ABP9 enhances tolerance to multiple stresses in transgenic Arabidopsis by modulating ABA signaling and cellular levels of reactive oxygen species //Plant molecular biology. – 2011. – T. 75. – №. 4-5. – C. 365-378.
125. Zhang, X.X., Tang, Y.J., Ma, Q.B., Yang, C.Y., Mu, Y.H., Suo, H.C., Nian, H. OsDREB2A, a rice transcription factor, significantly affects salt tolerance in transgenic soybean //PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 12. – C. e83011.
126. Zhang, Y., Chen, C., Jin, X.F., Xiong, A.S., Peng, R.H., Hong, Y.H., Chen, J. M. Expression of a rice DREB1 gene, OsDREB1D, enhances cold and high-salt tolerance in transgenic Arabidopsis //BMB reports. – 2009. – T. 42. – №. 8. – C. 486-492.
127. Zhao, Y., Medrano, L., Ohashi, K., Fletcher, J.C., Yu, H., Sakai, H., Meyerowitz, E.M. HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis //The Plant Cell. – 2004. – T. 16. – №. 10. – C. 2586-2600.

128. Zheng, X., Chen, B., Lu, G., Han, B. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance //Biochemical and biophysical research communications. – 2009. – Т. 379. – №. 4. – С. 985-989.
129. Балнокин Ю.В. Ионный гомеостаз и солеустойчивость растений /Балнокин Ю.В. - М.: Наука, 2012. -99 с.
130. Выписка из базы данных ISB (информационные системы биотехнологии) (<http://www.nbiap.vt.edu/search-release-data.aspx>)
131. Джеймс Клайв. Мировой статус коммерциализованных биотех/ГМ культур -2014 - (<http://www.isaaa.org>).
132. Кошкин Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур: учеб. для вузов / Кошкин Е.И. -М.: Дрофа, 2010. -638 с.
133. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: учеб. для вузов / Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. -М.: Высшая школа, 2006. -742 с.
134. Леонова И.Н. 2013 Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов / Леонова И.Н. // Вавиловский журнал генетики и селекции. -2013 том 17. -№ 2. -С. 314-325.
135. Проблемы деградации и восстановления продуктивности земель сельскохозяйственного назначения в России. Под редакцией А.В. Гордеева, Г.А. Романенко. – М.: Росинформагротех, (2008). – 67 с.
136. Холодова А.Б. Получение и анализ солеустойчивости трансгенных растений арабидопсиса и картофеля, экспрессирующих гетерологичные гены вакуолярных антипортеров HvNHX2 или HvNHX3: дис.канд.биол.наук: 03.01.05: / Холодова Валентина Павловна. – М., 2015. -113 с.