



МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ХЛОПЧАТНИКА

В.Ю. Головина¹, С.В. Лаштабова¹, Е.В. Михайлова², Б.Р. Кулueв²

¹Башкирский государственный педагогический университет, Уфа, belova.vika0107@gmail.com

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, kuluev@bk.ru

Резюме

Хлопчатник является одним из важнейших сельскохозяйственных растений в мире, и необходимость его возделывания в России не вызывает сомнения. Однако до сих пор одним лишь методами селекции не удастся создать новые сорта этой культуры, способные давать урожаи на обширных территориях нашей страны. Поэтому является актуальным применение современных методов генной инженерии и геномного редактирования хлопчатника. Для успешного использования этих современных методов молекулярной биологии требуется разработка эффективных способов внедрения чужеродной ДНК в клетки хлопчатника и манипуляций в культуре клеток и тканей *in vitro* этого растения. Данная статья посвящена рассмотрению наиболее доступных и относительно легковоспроизводимых методов генетической трансформации хлопчатника. Для трансформации хлопчатника применяются различные технологии осуществляемые как *in planta*, так и *in vitro*. Наиболее простым в исполнении методом является агробактериальная трансформация хлопчатника “Pistil Drip”, которая не требует специального оборудования и наличия на этой стадии высококвалифицированных специалистов.

Ключевые слова: хлопчатник, *Gossypium*, агробактериальная трансформация, баллистическая трансформация, *in planta*, *in vitro*, Pistil Drip, экспланты, эмбриогенный каллус

Введение

Хлопчатник (от лат. *Gossypium*) является одним из важнейших для современной промышленности ресурсных культурных растений: его используют для получения важнейшего текстильного волокна - хлопка, фенольного соединения госсипола (1, 6, 7-триокси-3-метил-5-изопропил-8-нафтаальдегид), применяемого в фармакологии, также хлопчатник является источником растительного масла. Кроме применения в текстильной промышленности хлопковое волокно служит сырьем для получения пороха, что делает хлопчатник стратегически важной для любой страны сельскохозяйственной культурой. Также это растение обладает отличными медоносными свойствами.

Из-за теплолюбивости и довольно длительного вегетационного периода, хлопчатник может возделываться только в странах с относительно теплым климатом. На территории бывшего СССР хлопчатник возделывался на обширных территориях в среднеазиатских республиках. На территории Российской Федерации хлопчатник может выращиваться только в некоторых самых южных регионах, таких как Краснодарский край,

Астраханская область, Республика Крым и некоторых других. Для продвижения хлопчатника на север одним лишь методом селекции может оказаться недостаточным. Поэтому является актуальным применение современных методов генной инженерии и геномного редактирования для получения новых сортов хлопчатника, способных давать урожаи в нашей стране. Генетическая трансформация хлопчатника необходима для улучшения его свойств. На данный момент уже проводятся генно-инженерные работы по получению гербицидоустойчивых [Aragao et al., 2005.], инсектоустойчивых [Yazdanpanah et al., 2009] и холодоустойчивых [Kargiotidou et al., 2010] ГМ-сортов этой культуры [Баймухаметова, 2016]. Для успешного использования современных методов генной инженерии требуется разработка эффективных способов внедрения чужеродной ДНК в клетки хлопчатника и приемов манипуляций в культуре клеток и тканей *in vitro* этого растения. Данная статья посвящена рассмотрению наиболее доступных и перспективных методов генетической трансформации хлопчатника, таких как “Pistil Drip”, “Gene Gun”, “Pollen Tube” и других.

Бокс 1

IAA - Индолилуксусная кислота

NAA - α -нафтилуксусная кислота

2,4-D - 2,4-дихлорфеноксипуксусная кислота

MC - Среда Мурасиге и Скуга

MSNAA - Среда MC (Мурасиге и Скуга),
дополненная 100 мг⁻¹ миоинозитолом и 2 мг/л NAA

BTCH - Среда BT (Beasley and Ting) с содержанием
агара, обогащенная 500 мг/л казеин гидролазой

GUS - Маркерный ген кодирующий β -глюкуронидазу

BA - 6-бензиламинопурин

2iP - 6-(γ , γ - диметилаламин) пурин

MSB - Питательная среда, содержащая
неорганические соли по прописи Мурасиге и Скуга,
и витамины среды B5

**Метод генетической трансформации цветков
хлопчатника “Pistil Drip”**

Одними из наиболее легковоспроизводимых и доступных методов трансформации хлопчатника являются так называемые методы “Pistil Drip” и “Pollen Tube” осуществляемые *in planta*. Суть метода “Pistil Drip” заключается в нанесении инокулянта агробактерий, несущих целевую векторную плазмиду на рыльце пестика цветка хлопчатника [Rech et al., 2008]. Инокулянт включает в себя кроме агробактерий, такое ПАВ, как Silwet, а так же сахарозу. Для проведения данной работы в первую очередь нужно культивировать штамм *Agrobacterium tumefaciens* [Keshamma et al., 2008], несущий целевую генно-инженерную конструкцию и маркерные гены. Изначальное культивирование можно проводить на твердой среде LB, дополненной 50 мг/л канамицина (или другого селективного антибиотика) и 20 мг/л рифампицина (для штамма AGLO *A. tumefaciens*). Бактерии инкубируют в темноте при 28°C в течение 2 дней. За день до начала цветения хлопчатника, нужно перенести *A. tumefaciens* в 20 мл жидкой среды LB и дополнить ее 50 мг/л канамицина. Культивирование клеток должно производиться в течение 2 суток на орбитальном шейкере при 28°C и 150 об/мин. В день цветения необходимо произвести самоопыление цветка для лучшего проникновения агробактерий в семязачаток, что, видимо, связано с прорастанием пыльцевой трубки [Zhang et al., 2012]. Через 5-7 часов, после самоопыления хлопчатника, подготавливают инокулянт, в состав которого входят клетки агробактерий, ресуспендированные в растворе ПАВ Silwet и сахарозы. На конечной стадии часто добавляют ацетосирингон в концентрации 40 мг/л, который индуцирует экспрессию *vir*-генов *A. tumefaciens*. Наиболее оптимальным является утреннее самоопыление до 10 часов и нанесение инокулянта в 17-18 часов вечера. Цветок, после агробактериальной обработки, необходимо завернуть полиэтиленом, чтобы инокулюм не испарялся. Утром следующего дня пленку обычно снимают. Имеется так же и другой способ нанесения инокулянта – нужно

вырезать рыльце вручную и внести агробактериальную смесь на отрезанное рыльце пестика. Повреждение тканей растения и проросшая пыльцевая трубка способствуют заражению цветка агробактериями и переносу генов. Далее, полученные таким образом семена хлопчатника [Aragao et al., 2005; Banerjee et al., 2002] проверяют на наличие целевых и маркерных генов с помощью ПЦР или саузерн-блот анализа. Также, для отбора трансгенных растений, могут быть применены методы, основанные на выявлении маркерного признака. Например, если это гербицидоустойчивость, то можно высаживать семена на среду с содержанием определенного гербицида. Следовательно, выжившие растения с высокой долей вероятности будут нести нужный признак.

**Метод трансформации цветков
хлопчатника “Pollen Tube”**

“Pollen Tube” является еще одним из относительно доступных и легко воспроизводимых методов для получения трансформированных растений хлопчатника. В начале выращивают нетрансформированный хлопчатник. В целях оптимизации урожайности используют стандартные сельскохозяйственные методики. Хлопчатник нужно постоянно проверять на наличие бутонов. Если таковые имеются, нужно приготовить раствор плазмидной ДНК в концентрации 0,1 мкг/мл. Сам цветок для повышения вероятности самоопыления следует изолировать от других цветков. На следующее утро внутрь пестика вносят микроинъектор на 5 мм вглубь и вводят 10 мкл плазмидной ДНК. Трансформированный цветок обозначают, листья на ветке удаляют. После созревания коробочек собирают семена [Min Wang et al., 2013] для дальнейшего анализа с использованием вышеперечисленных методов.

**Методы агробактериальной
трансформации эксплантов хлопчатника**

Кроме методов трансформации хлопчатника *in planta*, также существует множество методик, проводимых *in vitro*. При использовании этих методов трансформируют эмбриональные клетки, суспензии каллусных культур, семядоли ростка и его гипокотили. Ниже рассмотрим один из общих методов агробактериальной трансформации эксплантов хлопчатника *in vitro*. В качестве эксплантов могут быть использованы кусочки семядольных листьев, настоящих листьев, а также гипокотили. Эти методы включают несколько этапов:

1. Сокультивация эксплантов хлопчатника и агробактерий.
 - выращивание семян до размера саженцев,
 - культивирование штамма агробактерий,
 - сокультивация эксплантов с агробактериями.
2. Индукция и селекция трансгенных клеточных линий хлопчатника.
3. Регенерация растений из трансгенных клеток.

Работа начинается с введения хлопчатника в культуру *in vitro*. Для этого проводят стандартные процедуры стерилизации семян: убирают подпушек и внешнюю плотную оболочку семени, замачивают в

70% этаноле и промывают стерилизованной дистиллированной водой. Поверхность семян обрабатывают путем замачивания в 10% отбеливателе (белизна) на 15 минут и так же промывают в стерильной дистиллированной воде. После обработки, семена просушивают на стерильной фильтровальной бумаге и сажают по 2-3 семени в чашки Петри на среду BMSB (она содержит половину минеральных солей по прописи Мурасиге и Скуга и витамины среды B5, дополненной 2% сахарозой и 0,7 г агаром, pH 5,8).

Проращивание семян производится при температуре 28±2°C в течение цикла 14 часов дневных и 10 часов ночных при освещении около 3000 люкс.

Следующим шагом является культивирование агробактерий на среде LB с добавлением селективных антибиотиков, например, 100 мг/л канамицина и 10 мг/л рифампицина. Далее агробактериальный штамм добавляют в чашки Петри по 300 мкл на 20 мл преиндукционной среды PIM (1% глюкозы, 7,5 mM MES и 2 mM натрий-фосфатного буфера с pH 5,6). Непосредственно перед внесением агробактерий добавляют ацетосирингон (до конечной концентрации 100 mM), который является фенольным продуктом, действует как сигнальная молекула и индуцирует экспрессию *vir*-генов агробактерий и инициирует процесс трансформации [Stachel et al., 1985; Joubert et al., 2002; Lai et al., 2006; Nair et al., 2011]. Добавление ацетосирингона в культуру значительно усиливает трансформацию растений, опосредованную агробактериями [Aggarwal et al., 2011; Bhuiyan et al., 2011; Mehrotra et al., 2011; Rashid et al., 2011], что касается и хлопчатника [Sunilkumar et al., 2001; Jin et al., 2005; Wu et al., 2008].

Хлопчатник, проросший в течение 7-10 дней, извлекают из BSMB среды и производят разделение проростков на отдельные семядольные листья и гипокотили, которые разрезают на кусочки (экспланты) размером 5-7 мм и помещают на 10 минут в среду PIM, уже с агробактериями. Обработанные экспланты переносят на стерильную фильтровальную бумагу для удаления лишней PIM.

Сокультивацию производят на среде MSBC, которая отличается от BMSB наличием в составе 0,5 мг/л 2,4D, 0,1 мг/л зеатина (ZT), 3% сахарозы, 0,7 г/л агара и pH 5,8. На этом этапе нельзя добавлять селективные антибиотики, так как они могут повреждать клетки и значительно снижать эффективность трансформации. После застывания MSBC среды, ее накрывают стерильной фильтровальной бумагой и выкладывают просушенные экспланты семядольных листьев и гипокотилей. Семядольные листья кладут адаксиальной стороной вниз. Сокультивирование эксплантов рекомендуют проводить в течение 48 часов при температуре от +21°C до +28°C. Исследования показывают, что понижение температуры может способствовать повышению эффективности агробактериальной трансформации у некоторых видов растений [Dillen et al., 1997; Uranbey et al., 2005; Wang et al., 2009], в том числе и у хлопчатника [Sunilkumar et al., 2001].

Среду MSBIS используют для индукции и селекции стабильных трансгенных клеточных линий.

Состав данной среды схож с BMSB, но с добавлением селективного антибиотика, например, канамицина 50 мг/л (такой концентрации достаточно для ингибирования клеточного роста), и дополнительного антибиотика для элиминации агробактерий, например, карбенициллина в концентрации 400 мг/л.

После культивирования на MSBC экспланты переносят на MSBIS при 28°C±2°C с фотопериодом в 14-16 часов, при освещении 2000 люкс. Через неделю культивирования наблюдается появление каллуса. После 4 недель культивирования эмбриогенный каллус переносят на свежую регуляторную среду MSBIS, дополненную 0,1 мг/л ZT и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК).

Полученный эмбриогенный каллус переносят на среду MSBE (неорганические соли по MC, витамины среды B5, 0,1 мг/л 2,4-D, 0,1 мг/л ZT, 3% сахарозы, 0,7 г/л агара, pH 5,8, дополняют антибиотиком), которая индуцирует пролиферацию эмбриогенного каллуса. В связи со снижением чувствительности трансгенных эксплантов к селективному антибиотику канамицину, его концентрацию увеличивают до 150 мг/л [Zhang et al., 2001]. Обновлять среду следует каждые 3 недели до увеличения эмбриогенеза.

Следующий перенос производят на среду MSBEF (среда MSBE в состав которого входит активированный уголь) для развития эмбрионального каллуса. Далее, каллус пересаживают на среду MSBP, в которой содержится ИУК для индукции побега. Интервал обновления сред такой же, как и для среды MSBE.

На последнем этапе обновления среды, нужно отбирать соматические эмбрионы торпедообразной формы. Индукция эмбриогенного каллуса является наиболее важной стадией получения трансгенного хлопчатника. В некоторых случаях процесс затягивается, на это могут влиять многие факторы, такие как генотип, среда и комбинация растительных гормонов.

Метод культуры эмбриогенных клеток хлопчатника и трансфекция "Gene Gun"

Данный метод заключается в получении суспензии культуры эмбриогенных клеток, их преумножении и дальнейшей трансформации с помощью генной пушки.

Часто при культивировании семядолей или гипокотилей *in vitro* на них образуется каллус. Этот эмбриогенный каллус культивируют на среде BTCH (агаризированная среда BT (Beasley and Ting), обогащенная 500 мг/л казеингидролазой). За все время роста клеточной массы необходимо проследить и вовремя извлекать чистые клетки – они богаты цитоплазмой и в них не должны просматриваться вакуоли. Субкультивирование проводят каждые 3-4 недели, негомогенные клетки удаляют.

После наращивания клеточной массы, примерно 1000 мг активно делящегося каллуса отбирают и переносят в 250 мл колбу Эрлейнмейера с 40 мл жидкой среды MSNAA (содержит компоненты по прописи MC, дополненной 100 мг⁻¹ мио-инозитолом и 2 мг/л α-нафталинуксусной кислоты (NAA)). Субкультивирование проводят до образования

большого объема хорошей, однородной суспензии культуры эмбрионного каллуса. Данный раствор помещают на орбитальный шейкер (120 об/мин), температура поддерживается на уровне $26 \pm 2^\circ\text{C}$.

После одной недели культивирования удаляют не эмбрионные и мертвые клетки, ресуспендируют скопления каллуса. Каждую неделю 400-500 мг клеток нужно переносить на свежую среду. Время наращивания массы каллуса зависит от сорта и гомогенности эмбриональных клеток. Обычно через 3-4 недели суспензионная культура начинает удваиваться каждые 2-3 дня. Культуры клеток между 3 и 6 днями культивирования отлично подходят для трансформации. В это время, их переносят на влажную фильтровальную бумагу, расположенную поверх нейлонового экрана генной пушки. Нужно постараться выложить их тонким слоем, на который кладут нейлоновый фильтр.

Для получения микроносителя (порошка золота) раствор несколько раз центрифугируют и распределяют по 0,5 мл в пять микроцентрифужных пробирок. Туда добавляют ДНК, раствор дополняют CaCl_2 , спермидином и центрифугируют. Удаляют супернатант, добавляют 100% EtOH и дважды наносят на макроносители.

Суспензию эмбрионного каллуса бомбардируют несколько раз, для повышения частоты трансформации [Rajasekaran et al., 2000]. После этого, эмбрионные клетки нужно перенести на среду MSNAA, дополненную антибиотиками или гербицидами для селекции [Finer et al., 1990]. Постепенное повышение концентрации антибиотиков благоприятно влияет на частоту трансформации, повышая ее [Rajasekaran et al., 1996].

После четырех недель отбора клеток, стабильную трансформацию анализируют с помощью визуализации активности продуктов маркерных генов. Эмбрионные клетки потом переносят на агаризированную среду MSNAA без антибиотиков, для развития растительной культуры тканей. Появление соматических эмбрионов занимает около 4-6 недель. Нельзя допускать, чтобы внутри пробирки с растениями было влажно, иначе это может привести к гипергидратации листьев. Каждое растение проверяют на наличие маркерных генов. Чаще всего изучают активность гена *GUS* [Jefferson et al., 1987; Kosugi et al., 1990], экспрессия которого детектируется посредством гистохимического анализа. Для этого растительную ткань помещают в пробирку с реакционным буфером и инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Клетки, содержащие маркерный ген, окрашиваются в синий цвет. Было доказано, что добавление метанола во время гистохимического анализа ингибирует эндогенную *GUS*-подобную активность в растительных тканях [Kosugi et al., 1990]. Так же, использовали флюорогенный анализ гена *GUS*, который является более удобным по сравнению с гистохимическим анализом.

После обнаружения трансгенных растений их переносят на почву и акклиматизируют. На данном этапе растения нельзя обильно поливать, так как могут появиться различные грибковые заболевания и загнивание корня. Поддерживать жизнедеятельность

растения можно с помощью питательных растворов, например, по Хогланду-Арнону. Через 3-4 месяца после пересадки в теплицу хлопчатник должен зацвести. Когда растения окрепнут, можно проверить и подтвердить наличие целевых генов в растении посредством ПЦР или саузерн-блот анализа.

Баллистическая трансформация меристемы хлопчатника методом "Gene Gun"

Отличие данного метода от предыдущего заключается в использовании меристем проросших семян хлопчатника.

Этап подготовки семян включает в себя стерилизацию в 70% этаноле и 10% отбеливателе (белизна), в течение 20 мин. Чтобы промыть семена их оставляют на ночь в стерильной дистиллированной воде с добавлением 5 мг 6-бензиламинопурина (БА) при температуре $+21^\circ\text{C}$.

Под влиянием цитокинина в семенах стимулируется рост зародышевого корешка. Через 24 часа нужно аккуратно снять внешнюю оболочку семени. Все эмбрионы должны находиться во влажной среде: на влажной фильтровальной бумаге или в капле стерильной воды. Используя микроскоп, нужно открыть меристематический купол корешка, срезать и поместить на среду МС апикальной стороной вверх. В таком положении чашки Петри ставят под генную пушку. Изолированные зиготические эмбрионы очень скользкие, поэтому для работы с ними используются пинцеты с зазубренными наконечниками. Авторы работы отмечают, что меристемы с удаленными первыми листьями были подвергнуты трансформации в разы больше, чем концы меристемы с неповрежденными листьями [Rajasekaran, 2013]. Однако после бомбардировки побеги и меристемы хлопчатника чаще всего не поддаются быстрому размножению *in vitro* [Agrawal et al., 1997; Hemphill et al., 1998; Bazargani et al., 2011].

Общие сведения о подготовке к трансфекции ДНК-материала, микрочастиц золота, генной пушки, а так же дальнейшей биолиственной бомбардировке, акклиматизации трансгенных растений и их ПЦР-анализе описаны в предыдущем разделе о методе культивирования и трансфекции эмбрионных клеток хлопчатника методом "Gene Gun" [Kosugi et al., 1990].

Заключение

Хлопчатник является специфической растительной культурой как из-за своей значимости в жизни человека, так и по своим природным параметрам. В связи с теплолюбивостью данной культуры, его невозможно выращивать на большей части территории России. Но методы генной инженерии и геномного редактирования совместно с методами генетической трансформации в перспективе могут приблизить к решению данной проблемы. Например, одной из перспективных для России разработок является создание холодоустойчивых и скороспелых ГМ-сортов хлопчатника, что может способствовать продвижению районов возделывания данной культуры на более северные территории.

Список литературы

1. Баймухаметова Э.А. Хлопчатник: особенности культуры, перспективы создания трансгенных отечественных сортов и их выращивания в России // Биомика. 2016. Т.8. С. 275–288.
2. Aggarwal D., Kumar A., Reddy M. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of selected elite clones of *Eucalyptus tereticornis* // Acta Physiol. Plant. 2011. V. 33. P. 1603–1611.
3. Agrawal D., Banerjee A., Kolala R., Dhage A., Kulkarni A., Nalawade S., Hazra S., Krishnamurthy K. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Plant Cell Rep. 1997. V. 16. P. 647–652.
4. Aragão F., Vianna G., Carvalheira S., Rech E. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule // Plant Sci. 2005. V. 168. P. 1227–1233.
5. Banerjee A., Agrawal D., Nalawade S., Krishnamurthy K. Transient expression of β -glucuronidase in embryo axes of cotton by *Agrobacterium* and particle bombardment methods // Biol. Plant. 2002. V. 45. P. 359–365.
6. Bazargani M., Tabatabaei B., Omid M. Multiple shoot regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via shoot apex culture system // African J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 2005–2011.
7. Bhuiyan M., Min S., Jeong W., Sultana S., Choi K., Lim Y., Song W., Lee Y., Liu J. An improved genetic transformation for *Agrobacterium* - mediated genetic transformation from cotyledon explants of *Brassica juncea* // Plant Biotechnol. 2011. V. 28. P. 17–23.
8. Dillen W., De Clercq J., Kapila J., Zambre M., Van Montagu M., Angenon G. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. // Plant J. 1997. V. 12. P. 1459–1463.
9. Finer J., McMullen M. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment // Plant Cell Rep. 1990. V. 8. P. 586–589.
10. Jefferson R. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol Biol Rep. 1987. V. 5. P. 387–405.
11. Jin S., Zhang X., Liang S., Nie Y., Guo X., Huang C. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2005. V. 81. P. 229–237.
12. Joubert P., Beaupere D., Lelievre P., Wadouachi A., Sangwan R., Sangwan-Norreel B. Effects of phenolic compounds on *Agrobacterium vir*-genes and gene transfer induction – a plausible molecular mechanism of phenol binding protein activation // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 733–743.
13. Hemphill J., Maier C., Chapman K. Rapid *in vitro* plant regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Plant Cell Rep. 1998. V. 17. P. 273–278.
14. Kargiotidou A., Kappas L., Tsaftaris A., Galanopoulou D., Farmaki T. Cold acclimation and low temperature resistance in cotton: *Gossypium hirsutum* phospholipase Da isoforms are differently regulated by temperature and light // Journal of Experimental Botany. 2010. V. 61. P. 2991–3002.
15. Keshamma E., Rohini S., Rao K., Madhusudhan B., Kumar M. Tissue culture independent *in planta* transformation strategy: an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // J. Cotton Sci. 2008. V. 12. P. 264–272.
16. Kosugi S., Ohashi Y., Nakajima K., Arai Y. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity // Plant Sci. 1990. V. 70. P. 133–140.
17. Lai E-M., Shih H-W., Wen S-R., Cheng M-W., Hwang H-H., Chiu S-H. Proteomic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* response to the *vir*-gene inducer acetosyringone // Proteomics. 2006. N. 6. P. 4130–4136.
18. Mehrotra M., Sanyal I., Amla D. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and regeneration of insect-resistant transgenic plants // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 1603–1616.
19. Nair G., Lai X., Wise A., Rhee B., Jacobs M., Binns A. The integrity of the periplasmic domain of the *VirA* sensor kinase is critical for optimal coordination of the virulence signal response in *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 1436–1448.
20. Rajasekaran K., Grula J., Hudspeth R., Pofelis S., Anderson D. Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxy acid synthase // Mol. Breed. 1996. V. 2. P. 307–319.
21. Rajasekaran K., Hudspeth R., Cary J., Anderson D., Cleveland T. High frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures // Plant Cell Rep. 2000. V. 19. P. 539–545.
22. Rajasekaran K. Biolistic transformation of cotton zygotic embryo meristem // Transgenic cotton. Methods and Protocols. 2013. V.958. P. 47–58.
23. Rajasekaran K. Biolistic transformation of cotton embryogenic cell suspension cultures // Transgenic cotton. Methods and Protocols. 2013. V.958. P. 59–70.
24. Rashid H., Chaudhry Z., Khan M. Effect of explant plant source and acetosyringone concentration on transformation efficiency of wheat cultivars // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. P. 8737–8740.
25. Rech E., Vianna G., Aragao F. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants // Nature Protoc. 2008. V. 3. P. 410–418.
26. Stachel S., Messens E., Vanmontagu M., Zambryski P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* // Nature. 1985. V. 318. P. 624–629.
27. Sunilkumar G., Rathore K. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated

- transformation and regeneration // Mol. Breed. 2001. V. 8. P. 37–52.
28. Uranbey S., Sevimay C., Kaya M., Ipek A., Sancak C., Basalma D., Er C., Ozcan S. Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer // Biol Plant. 2005. V. 49. P. 53–57.
29. Wang B., Liu L., Wang X., Yang J., Sun Z., Zhang N., Gao S., Xing X., Peng D. Transgenic ramie (*Boehmeria nive* L. Gaud.): factors affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 1319–1327.
30. Wang M., Zhang B., Wang Q. Cotton Transformation via Pollen Tube pathway // Transgenic cotton. Methods and Protocols. 2013. V.958. P. 71–78.
31. Wu S-J., Wang H-H., Li F-F., Chen T-Z., Zhang J., Jiang Y-J., Ding Y., Guo W-Z., Zhang T-Z. Enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli of upland cotton via efficient selection and timely subculture of somatic embryos // Plant Mol. Biol. Rep. 2008. V. 26. P. 174–185.
32. Yazdanpanah F., Tohidfar M., Ashari M., Ghareyazi B., Jashni M., Mosavi M. Enhanced insect resistance to boll worm (*Helicoverpa armigera*) in cotton. Containing a synthetic *cryIAb* gene // Indian Journal of Biotechnology. 2009. V. 8. P. 72–77.
33. Zhang B. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton // Transgenic cotton. Methods and Protocols. 2013. V.958. P. 31–46.
34. Zhang B-H., Liu F., Liu Z-H., Wang H-M., Yao C-B. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton // Plant Growth Regul. 2001. V. 33. P. 137–149.
35. Zhang T., Chen T. Cotton Pistil Drip transformation method // Methods in Molecular Biology. 2012. V. 847. P. 237–244.

METHODS OF COTTON GENETIC TRANSFORMATION

¹Golovina V.Y., ¹Lashtabova S.V., ²Mikhaylova E.V., ²Kuluev B.R.

¹Bashkir State Pedagogical University, Ufa, belova.vika0107@gmail.com

²Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, kuluev@bk.ru

Resume

Cotton is one of the most important agricultural plants in the world, and there is no doubt that its cultivation in Russia is necessary. However, until nowadays breeding methods can't create new varieties of this crop that can produce yield in large areas of our country. So using of modern methods of genetic engineering and genome editing of cotton is relevant. For the successful application of these modern molecular biology techniques requires the development of efficient methods of introducing foreign DNA into the cotton cells and manipulation *in vitro* culture of cotton tissues and cells. This article is devoted to review of the most available and relatively reproducible methods of genetic transformation of cotton. For transformation of cotton are used methods *in planta* and *in vitro*. The elementary method is *Agrobacterium*-mediated transformation “Pistil Drip”, which does not require special equipment and highly qualified specialists.

Key words: cotton, *Gossypium*, *Agrobacterium*-mediated transformation, gene gun, *in planta*, *in vitro*, Pistil Drip, explants, embryogenic callus