

Обзорная статья

УДК 633.511:602.6:577.2

DOI: 10.30901/2658-6266-2022-2-05



Генная инженерия хлопчатника: современное состояние и перспективы

К. В. Смирнов^{1,2}, Т. В. Матвеева¹, Л. А. Лутова¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

Автор, ответственный за переписку: Кирилл Вадимович Смирнов, kirill.vad.smirnov@gmail.com

На настоящий момент сразу несколько представителей рода *Gossypium* L. культивируют в сельском хозяйстве для производства волокна. Несмотря на то, что хлопчатник возделывается достаточно давно, тем не менее, многие аспекты его культивирования и переработки все еще находятся на стадии исследования. Говоря об агрономии данной культуры, нельзя не упомянуть о ряде фундаментальных проблем. Например, количество пестицидов, расходуемое при культивировании хлопчатника, больше, чем для любой другой культуры. Распыляемые на хлопковых полях химикаты смываются с полей и, попадая в источники пресной воды, загрязняют их, нанося значительный ущерб окружающей среде. Такого рода трудности могут быть преодолены переходом на культивирование трансгенных линий хлопчатника. Внедрение трансгенного хлопчатника в сельское хозяйство имеет важное значение во многих отношениях: экологическом, социальном и экономическом, а именно приводит к сокращению количества используемых для защиты растений пестицидов, косвенному увеличению урожайности, значительному снижению уровня загрязнения окружающей среды, а также к сокращению общих экономических затрат и количества необходимой для возделывания культуры рабочей силы. По сей день, основными способами получения трансгенных линий при работе с хлопчатником все еще являются агробактериальная трансформация и биолистика. Однако в последние годы получают развитие и инновационные методы трансформации. Например, в Китае для получения коммерческого трансгенного хлопчатника с каждым годом все активнее используется привнесение генетического материала в клетку хозяина посредством пыльцевой трубки. И, хотя в последние десятилетия были получены трансгенные линии, устойчивые к болезням и абиотическим стрессам, а также с улучшенным качеством волокна, доминирующее положение на рынке трансгенного хлопчатника все еще занимают линии растений, устойчивых к насекомым и к гербицидам. Все вышперечисленное говорит о недостаточной степени интеграции между научно-исследовательскими лабораториями, источником новых передовых разработок, и агрономами. В данном обзоре собраны и обобщены результаты исследований, посвященных возделыванию и генетической модификации хлопчатника. Рассмотрены основные методы генетической трансформации культивируемых представителей рода *Gossypium*, как активно используемые в текущий момент, так и находящиеся в разработке. Также описаны наиболее известные трансгенные линии, среди которых как уже вошедшие в сельское хозяйство, так и лишь недавно полученные. Таким образом, читатель сможет получить общее представление о текущих достижениях в области генетической модификации хлопчатника.

Ключевые слова: хлопчатник, трансгенные растения, агробактериальная трансформация, биолистика, РТТ, магнитофекция пыльцы, ГМ хлопчатник, TAM66274

Благодарности: Обзор подготовлен в рамках курса «Генная инженерия сельскохозяйственных растений с практикумом по генной инженерии» программы подготовки магистров «Молекулярная биология и агrobiотехнология растений».

Для цитирования: Смирнов К.В., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Генная инженерия хлопчатника: современное состояние и перспективы. *Биотехнология и селекция растений*. 2022;5(2):25-37. DOI: 10.30901/2658-6266-2022-2-05

Прозрачность финансовой деятельности. Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Смирнов К.В., Матвеева Т.В., Лутова Л.А., 2022

Review article

DOI: 10.30901/2658-6266-2022-2-o5

Genetic engineering of cotton: current status and perspectives

Kirill V. Smirnov^{1,2}, Tatiana V. Matveeva¹, Ludmila A. Lutova¹¹St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia²All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia**Corresponding author:** Kirill Vadimovich Smirnov, kirill.vad.smirnov@gmail.com

Currently, several species of the genus *Gossypium* are cultivated to produce fiber. Cotton has been grown for a long time, however, many aspects of its cultivation and processing are still researched. When talking about the agronomy of cotton, some fundamental problems should be mentioned. For example, the amounts of pesticides used in the cultivation of cotton are greater than for any other crop. Chemicals sprayed on cotton are washed away from the fields and pollute fresh water sources, causing significant damage to the environment. Fortunately, such challenges can be overcome by switching to the cultivation of transgenic cotton. The introduction of transgenic cotton has already brought many important environmental, social and economic benefits, including a reduction in the use of pesticides, indirect influence on the increase in yields, minimization of environmental pollution, reduction of economic costs and labor for cultivating the crop. Until today, the main methods of obtaining transgenic cotton lines are still agrobacterial transformation and biolistics. In recent years, however, innovative methods of transformation have also been developed. For example, the pollen tube-mediated introduction of genetic material for obtaining commercial transgenic cotton is actively used in China. Although transgenic lines with resistance to diseases and abiotic stresses, and with improved fiber quality have been obtained in recent decades, the market of transgenic cotton is still dominated by insect- and herbicide-resistant lines. All the above indicates an insufficient integration between institutes as sources of advanced developments and agricultural industry. The present review collected and summarized the results of research on the cultivation and genetic modification of cotton. The main methods of genetic transformation of cultivated representatives of the genus *Gossypium*, both actively used at present and still under development, were considered. Also, the most remarkable transgenic lines were also described, among which are those that have already been adopted by the agricultural industry and those that have been obtained only recently. Thus, the reader will be able to get a general idea of the current achievements in the field of cotton genetic modification.

Keywords: cotton, transgenic plants, agrobacterial transformation, biolistics, PTT, pollen magnetofection, GM cotton, TAM66274**Acknowledgments:** The review was prepared in the framework of the course of “Genetic Engineering of Agricultural Plants with a Workshop on Genetic Engineering” as part of the master’s program “Molecular Biology and Plant Agrobiotechnology”.**For citation:** Smirnov K.V., Matveeva T.V., Lutova L.A. Genetic engineering of cotton: current status and perspectives. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2022;5(2):25-37. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2022-2-o5

Financial transparency. The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal’s opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer.

© Smirnov K.V., Matveeva T.V., Lutova L.A., 2022

Введение

Сельское хозяйство вносит значительный вклад в национальную экономику многих стран, особенно развивающихся, при этом хлопчатник является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Хлопчатник возделывают более чем в 70 странах мира, в некоторых из них его даже называют “белым золотом” (Ahmad, Hasanuzzaman, 2020). Хлопковое волокно, ежегодный оборот которого в мире составляет примерно 600 миллиардов долларов, признано уникальным сырьевым ресурсом (Wendel et al., 1992; Lee, Fang, 2015). В первую десятку стран-производителей хлопкового волокна входят Индия, Китай, Соединенные Штаты Америки, Пакистан, Бразилия, Австралия, Узбекистан, Турция, Туркменистан и Буркина-Фасо (Sawan, 2018). Ежегодно в этих странах производится около 25 миллионов тонн хлопка (Tariq et al., 2018).

Хлопчатник представляет собой культуру крайне интересную для агробιοтехнологии. Переработка данного растения обеспечивает сырьем постоянно растущую текстильную промышленность, позволяет получать хлопковое масло, широко применяемое в кулинарии, а богатые белком остатки жмыха в ограниченных количествах (из-за присутствия в них токсичного госсипола) используются в качестве кормовых добавок для сельскохозяйственных животных (Khan et al., 2020). Однако возделывание хлопчатника сопряжено с множеством проблем (Tausif et al., 2018). Одним из способов преодолеть их является получение новых генетически модифицированных (ГМ) линий (Tokel et al., 2021).

На настоящий момент, методы трансформации, благодаря современным передовым технологиям редактирования генома, стали мощным инструментом улучшения качества любой сельскохозяйственной культуры, в том числе и хлопчатника. Трансгенный (ГМ) хлопчатник является одной из первых генетически модифицированных культур. Он получил широкое распространение в середине 1990-х годов после того, как результаты генетической модификации были признаны хлопководами всего мира (Shaheen et al., 2021). ГМ хлопчатник дает огромные преимущества агрономам за счет косвенного увеличения урожайности этой культуры и снижения затрат на её возделывание. Возделывание ГМ хлопчатника приводит к снижению нагрузки на окружающую среду. Например, благодаря сокращению количества используемых пестицидов снижается уровень её загрязнения. Трансгенный хлопчатник также применяют в качестве модельного объекта для исследования фундаментальных генетических, биохимических и морфофизиологических процессов, таких как экспрессия и регуляция генов, биосинтез целлюлозы, а также дифференцировка и формирование волокна (Zamir, 2001).

Методы генетической трансформации хлопчатника

Хлопчатник был среди первых культур, наряду со многими модельными объектами, для которых были получены растения с искусственно измененным генотипом. Первые эксперименты такого рода были осуществлены в 1987 году двумя независимыми группами (Firoozabady et al., 1987, Umbeck et al., 1987). Однако в первые несколько лет достигнутый прогресс был незначительным, в основном из-за того, что регенерация растений посредством соматического эмбриогенеза для хлопчатника оставалась чрезвычайно сложной задачей.

Общеизвестно, что наиболее распространенным методом трансформации растений, включая хлопчатник, является агробактериальная трансформация. Для данного метода принципиально необходимо наличие двух этапов: перенос и интеграция генов интереса в геном, и получение целого растения из трансформированной клетки (Tohidfar et al., 2005; Li et al., 2009a; Nandeshwar et al., 2009; Hashmi et al., 2011).

Несмотря на то, что любая клетка содержит полный набор генетической информации, что позволяет ей потенциально стать целым растением, технология культивирования тканей недостаточно развита, чтобы индуцировать дифференцировку любой клетки с последующим образованием соматического эмбриона (Divya et al., 2008). Таким образом, регенерация растения по-прежнему остается так называемым “бутылочным горлышком” для трансформации многих видов растений, включая хлопчатник (Khan et al., 2006, Rao et al., 2006; Hussain et al., 2009). Во многих лабораториях мира было исследовано влияние различных факторов на соматический эмбриогенез и регенерацию у хлопчатника (Sun et al., 2006). Благодаря совершенствованию методов работы с культурами клеток хлопчатника и прогрессу в изучении процесса регенерации у растений, а также разработке новых технологий трансформации, за последние два десятилетия удалось добиться значительного прогресса в области получения трансгенных генотипов.

Агробактериальная трансформация. *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend) Conn, бактерия семейства Rhizobiaceae Conn, является своеобразным природным инструментом для генетической трансформации. Основопологающим для данного метода является то, что *A. tumefaciens* содержит плазмиду, которая индуцирует формирование опухолей, и поэтому получила название Ti-плазида (Tumor inducing). Ti-плазмиды содержат T-ДНК, которая может встраиваться в геном растения (Gelvin, 2003). С точки зрения генной инженерии наиболее примечательным является то, что в T-ДНК может быть интегрирован любой чужеродный ген с помощью метода получения рекомбинантной ДНК (Firoozabady et al., 1987; Umbeck et al., 1987). В составе T-ДНК этот чужеродный ген может быть перенесен и встроен в геном растения-донора.

Генетическая трансформация хлопчатника, опосредованная агробактериями, представляет собой процесс, который можно условно подразделить на несколько этапов. Получение трансгенного растения начинается с совместного инкубирования агробактерий с ранеными эксплантами, такими как семядоли и гипокотили, после чего за счет селективных маркеров осуществляется отбор успешно трансформированных клеток. Далее проводится регенерация хлопчатника из трансформированных клеток, в основном посредством соматического эмбриогенеза, обнаружение и анализ экспрессии гена интереса в полученных растениях (Yuceer, Kos, 2006).

Говоря о методе агробактериальной трансформации с точки зрения получения трансгенного хлопчатника, необходимо отметить некоторые специфические особенности, влияющие на эффективность и скорость, а иногда и на результативность данного процесса. Например, в настоящее время сразу несколько штаммов агробактерий были успешно использованы для получения трансгенных растений. Среди них наиболее часто используемыми штаммами являются LBA 4404, EHA105 и C58C3. Хотя все эти штаммы и позволяют получать трансгенные растения, исследования показывают, что штамм LBA 4404 значительно эффективнее штамма EHA105 (Sunilkumar, Rathore, 2001) или C58C3 (Jin et al., 2005). Например, при использовании хлопчатника 'Coker-312', принятого в качестве эталона для получения трансгенных форм, эффективность трансформации штаммом LBA 4404 была более чем в два раза выше, чем при использовании агробактерий штамма EHA105 (Sunilkumar, Rathore, 2001), что может быть объяснено с точки зрения специфичности взаимодействия агробактерия-хозяин.

Также на эффективность протекания агробактериальной трансформации может оказывать влияние температурный фактор. Инкубирование агробактерий с эксплантами может проводиться при любой температуре в диапазоне от 21 до 28°C, однако, было установлено, что более низкая температура внутри этого диапазона предпочтительнее, чем более высокая (Sunilkumar, Rathore, 2001).

Природа экспланта также может оказывать значительное влияние на скорость трансформации. В настоящее время используются экспланты преимущественно из семядолей или гипокотилей. Однако несколько лабораторий уже разработали новые стратегии получения трансгенных растений хлопчатника посредством трансформации эмбрионного каллуса (Leelavathi et al., 2004) и апекса (Zapata et al., 1999), которые обладают сравнительно высоким потенциалом для регенерации целого растения.

Введение ацетосирингона (англ. Acetosyringone, AS) в среду для совместного инкубирования, или его предварительное добавление в культуру агробактерий, значительно ускоряет и повышает эффективность трансформации (Sunilkumar, Rathore, 2001; Jin et al., 2005). AS

является фенольным компонентом, который функционирует как сигнальная молекула, индуцируя экспрессию генов *vir* агробактерий, что повышает скорость течения процесса трансформации (Nair et al., 2011).

Наконец, генотипические особенности хлопчатника являются основным барьером для его агробактериальной трансформации. Обусловлено это тем, что у растений не всех линий может быть индуцирован соматический эмбриогенез и не все способны регенерировать из каллуса. Тем не менее, ученые пытаются получать новые линии хлопчатника для преодоления данного барьера (Zhang et al., 2001).

Биолистика. Физический метод, использующий ускоренные микрочастицы для доставки ДНК и других молекул в интактные ткани и клетки, представляет собой альтернативный способ трансформации, используемый для получения трансгенного хлопчатника. Существует несколько различных типов систем для доставки биолистических частиц, посредством которых чужеродная генетическая информация вводится в клетку.

Впервые данный метод трансформации на хлопчатнике был применен в 1993 году, когда МакКейб и Мартинелл при помощи генной пушки с использованием высокоскоростных золотых сферических наночастиц, покрытых ДНК, внедрили чужеродные гены в меристематическую ткань (McCabe, Martinell, 1993). При дальнейших исследованиях было установлено, что чужеродные гены стабильно интегрировались и наследовались в потомстве по менделевским законам (McCabe, Martinell, 1993). Позже, путем трансформации различных эксплантов, в геном хлопчатника были аналогично внедрены репортерные гены и гены-мишени, стабильная экспрессия которых окончательно подтвердила эффективность данного метода (Rajasekaran et al., 2000; Rech et al., 2008; Liu et al., 2011).

Основным преимуществом биолистической системы доставки частиц является то, что ее можно использовать для преобразования достаточно широкого спектра тканей различных сортов хлопчатника (Finer, McMullen, 1990).

Хорошо известно, что регенерация *in vitro* является сложным, трудоемким процессом и, как правило, применима не для всех культивируемых представителей рода *Gossypium* (Yan et al., 2018). Один из подходов к преодолению этих трудностей включает бомбардировку наночастицами апикальных меристем, из которых могут быть получены трансформированные побеги и растения (Wu et al., 2005; Duncan, 2011). Этот метод позволяет обойти этап получения растения-регенеранта и связанные с этим проблемы, тем самым сокращая время, необходимое для получения трансформантов (Terakawa et al., 2005). К сожалению, из нескольких биолистических устройств, о которых сообщалось в литературе (Terakawa et al., 2005), только одно коммерчески доступно на настоящий момент. Bio-Rad (PDS 1000/He) широко используется во многих лабораториях мира. Модифицированная версия этого устройства была использована для транс-

формации ряда сортов бразильского хлопчатника (Aragão et al., 2005). Некоторые другие запатентованные библистические установки также были успешно применены для трансформации зародышевых меристем хлопчатника (Wu et al., 2005).

Однако библистическая система доставки частиц не лишена и минусов, например, она может привести к более высокой частоте возникновения мутаций у хлопчатника и попаданию в клетку множественных копий гена интереса. Также необходимо отметить, что хотя трансформированные клетки и могут быть получены из различных типов тканей, шанс успешной трансформации может сильно варьировать. Например, стабильная трансформация эпидермального слоя наблюдается примерно у 5% проростков, в то время как доля трансформированных клеток при бомбардировке апикальной меристемы составляет лишь 0,71% (Wilkins et al., 2000).

Трансформация посредством пыльцевой трубки (РТТ). Во время двойного оплодотворения у растений, попавшее на рыльце пестика пыльцевое зерно прорастает в столбик, формируя пыльцевую трубку, по которой спермии доставляются в зародышевый мешок, где они и сливаются с яйцеклетками. В достаточно протяженную пыльцевую трубку, непосредственно, может быть введен чужеродный ген, который по этому пути также может быть доставлен в зародышевый мешок и в оплодотворенную яйцеклетку (рис. 1).

Данный метод трансформации был успешно использован для получения трансгенного хлопчатника, арбуза, сои, пшеницы, папайи и кукурузы (Martin et al., 1992; Huang et al., 1999; Shou et al., 2002; Hao et al., 2011; Ali et al., 2015). Некоторые из полученных таким образом форм широко используются в сельском хозяйстве.

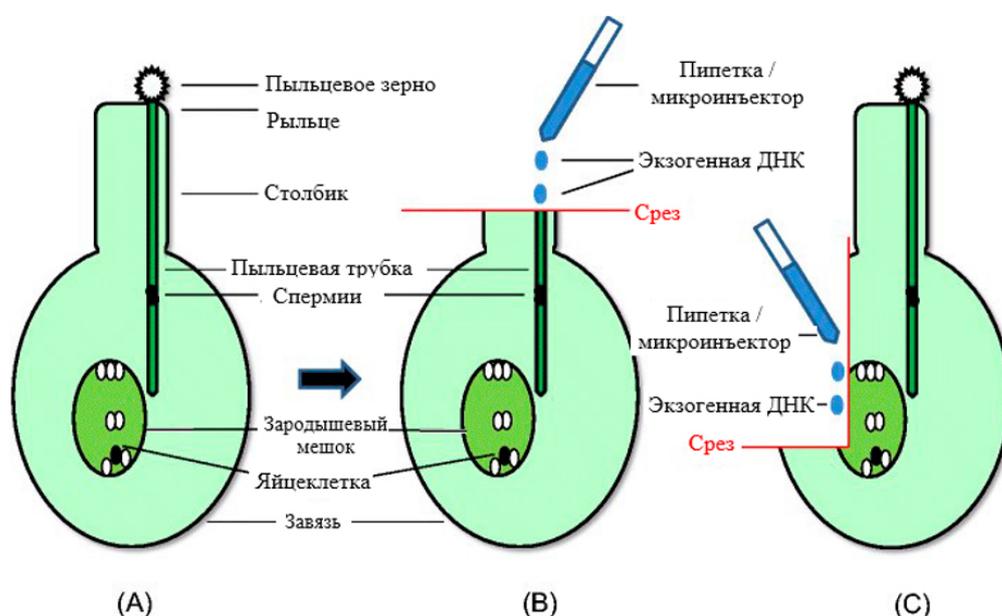


Рис. 1. Схематическое представление переноса генов, опосредованного пыльцевой трубкой (РТТ) (из Ali et al, 2015)

Обычное оплодотворение (А); нанесение экзогенной ДНК на механически удаленный столбик для облегчения РТТ (В); и непосредственно в семяпочку (С)

Fig. 1. Schematic representation of pollen tube-mediated gene transfer (PTT) (from Ali et al, 2015)

Normal fertilization (A); application of exogenous DNA to a mechanically removed column to induce PTT (B); and directly into the ovule (C)

Существует три основных этапа генетической трансформации, осуществляемой с помощью пыльцевой трубки, которые включают инъекцию экзогенной ДНК в пыльцевую трубку, интеграцию чужеродных генов в геном растения и отбор трансгенных растений.

Эта технология была впервые применена для генетической трансформации хлопчатника в 1978 году. Чжоу и его коллеги (Zhou et al., 1983) вводили экзоген-

ную геномную ДНК в зародышевые мешки хлопчатника через пыльцевую трубку, после чего получали относительно большое количество трансформантов, из которых впоследствии смогли отобрать растения для создания ГМ линий хлопчатника (Wang et al., 2013). Позже, для исследования пути проникновения генов интереса через пыльцевую трубку, посредством данного метода был внедрен репортерный ген *gfp*. В результате было установлено,

что ген интереса экспрессируется как в зародыше хлопчатника, так и в уже сформировавшемся растении, что дает прямые и убедительные цитологические и молекулярно-биохимические доказательства эффективности РТТ (Huang et al., 1999).

Значительным преимуществом данного метода по сравнению с агробактериальной трансформацией является отсутствие необходимости регенерировать растение из каллуса. Также немаловажными являются отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании и относительная простота осуществления, что в совокупности делает данный метод достаточно доступным для любой лаборатории.

Трансформация посредством магнитофекции пыльцы. Для успешной модификации зародышевой плазмы используются различные методы генной инженерии растений, среди которых биолистика, электропорация, опосредованный агробактериями перенос генов и слияние протопластов (Faranda et al., 1994; Bates, 1995; Clough, Bent, 1998). Однако эти методы трансформации требуют высокого уровня технических знаний и дорогостоящего оборудования для подготовки растительных клеток, осуществления процесса трансформации, а также для последующей успешной регенерации трансгенных растений (Yang et al., 2009). По сравнению с перечисленными подходами, методы трансформации, осуществляемые

посредством пыльцы, считаются более перспективными альтернативами традиционным методам трансформации растений, поскольку они не требуют культивирования тканей, регенерации и, соответственно, лишены связанных с этим проблем, которые зачастую могут значительно усложнить процесс получения трансгенных растений (Zhang et al., 2005). Трансгенные семена получают непосредственно через опыление трансформированной пыльцой, несущей чужеродный генетический материал.

За последние годы спектр молекулярно-биологических исследований, в которых может быть применена технология трансформации растений, был значительно расширен. В настоящее время исследования в данной области концентрируются на проблемах, связанных со стабильным внедрением и надежной экспрессией чужеродной ДНК после ее интеграции (Ahmad et al., 2012). Развитие нанотехнологий позволило использовать принципиально новые подходы к созданию трансгенных растений с применением наночастиц в качестве носителей генетического материала (Torney et al., 2007). При работах с клетками животных, магнитофекция, основанная на магнитных силах, уже признана высокоэффективным методом переноса генов, а именно внедрения ДНК, связанной с магнитными наночастицами (MNPs), в клетки-мишени (рис. 2; Dobson, 2006; Ruf, Bock, 2017).



Рис. 2. Получение трансгенных растений посредством магнитофекции пыльцы
(из Ruf, Bock, 2017)

Fig. 2. Generation of transgenic plants by pollen magnetofection
(from Ruf, Bock, 2017)

В последние годы хлопчатник широко используют в качестве репрезентативного и модельного растения для магнитофекции пыльцы. Обусловлено это в первую очередь тем, что оболочку пыльцы хлопчатника пронизывают поры или так называемые пыльцевые апертуры. Эти структуры облегчают доставку чужеродной ДНК через

мембрану внутрь пыльцы. Таким образом, манипулируя направленным потенциалом магнитного поля и используя MNPs в качестве носителя для экзогенной ДНК, которые могут проходить через эти отверстия, становится возможным ее внедрение в пыльцевые зерна. Как правило, для магнитофекции пыльцы хлопчатника используются

MNPs, представляющие собой полиэтиленмин, покрытый Fe_3O_4 . Такие магнитные наночастицы несут положительный заряд и способны электростатически связывать отрицательно заряженную ДНК, в результате чего образуются комплексы MNP/ДНК. Затем при помощи направленного магнитного поля комплексы MNP/ДНК переносятся в собранную пыльцу через поверхностные отверстия. Далее, полученную пыльцу, несущую экзогенную ДНК, используют для опыления растений. На завершающем этапе работы осуществляют отбор успешно трансформированных растений, после чего становится возможным получение новой линии (Ruf, Vock, 2017; Zhang et al., 2019).

Полученные трансгенные линии

Следующим этапом после успешного отбора трансгенных растений хлопчатника является получение коммерческой линии. Необходимо отметить, что данный путь включает множество ступеней, которые необходимо преодолеть для полноценного введения линии в производство. Обычно трансгенные растения необходимо контролировать на предмет агрономических признаков, стабильности чужеродных генов, уровня их экспрессии и биоактивности. При этом для переноса чужеродного гена в коммерческий сорт с хорошими агрономическими характеристиками, как правило, используют возвратные скрещивания. Таким образом, может пройти не менее

двух лет, в лучшем случае, прежде чем трансгенное растение хлопчатника можно будет использовать в полевых условиях.

Трансгенный хлопчатник был впервые использован фермерами-хлопководами в 1994 году в Китае. В 1996 году Bt-хлопчатник (см. ниже раздел: Насекомоустойчивые линии) начали выращивать в США на площади около 730 000 гектаров, а также в Мексике и Австралии на общей площади около 0,8 миллиона гектаров. Два года спустя площадь, засеваемая Bt-хлопчатником удвоилась и составила 1,5 миллиона гектаров, а затем вновь увеличилась до 5,4 миллионов гектаров в 2003 году (Zhang et al., 2005). В настоящее время почти все основные страны, занимающиеся производством хлопка, в той или иной степени внедрили трансгенный хлопчатник (He et al., 2006).

Анализируя перечень запатентованных на настоящий момент коммерческих линий генетически модифицированного хлопчатника, согласно базам данных ISAAA (ISAA GM approval database, 2022) и GenBit (GenBit GM crops database, 2022), наиболее распространенным способом получения ГМ растений хлопчатника все еще со значительным отрывом является агробактериальная трансформация и гибридизация с трансгенными линиями, а доля линий, полученных посредством иных методов трансформации, пока невелика, однако сам факт их наличия уже можно считать значительным агробιοтехнологическим достижением (рис. 3).



Рис. 3. Соотношение способов трансформации, используемых для получения ГМ линий хлопчатника (по базам данных ISAAA и GenBit)

Fig. 3. The ratio of transformation methods used to obtain GM cotton lines (according to ISAAA and GenBit databases)

Рассматривая же совокупность запатентованных линий ГМ хлопчатника и вновь отталкиваясь от данных, представленных в базах данных ISAAA и GenBit, можно отметить достаточно высокую консервативность с точки зрения наиболее часто внедряемых признаков. Наибольшее распространение получили линии с интродуцированными признаками гербицидоустойчивости

и насекомоустойчивости. При этом необходимо отметить, что на настоящий момент в научно-исследовательских лабораториях мира уже были получены трансформированные растения хлопчатника с достаточно широким спектром измененных признаков, однако внедрены данные линии в сельское хозяйство еще не были (рис. 4).



Рис. 4. Соотношение линий ГМ хлопчатника с основными внедряемыми признаками (по базам данных ISAAA и GenBit)

Fig. 4. The ratio of GM cotton lines with the main improved traits (according to ISAAA and GenBit databases)

В последнее время ученые также пытаются разработать гибридный трансгенный хлопчатник посредством скрещивания трансгенных растений с растениями коммерческих нетрансгенных линий, обладающих желаемыми агрономическими характеристиками. Эта технология позволит быстро использовать трансгенные технологии в полевых условиях и значительно интенсифицировать процесс внедрения полученных форм в сельскохозяйственное производство. В настоящее время, полученный таким образом трансгенный гибридный хлопчатник используется только на территории Китая и Индии (Zhang et al., 2019).

Насекомоустойчивые линии. Вредители являются одной из самых серьезных проблем при культивировании хлопчатника в любом регионе. Подсчитано, что вредители могут снижать урожайность на 15-50%, а также влиять на качество волокна. Установлено, что хлопчатник является источником питания для более чем 1320 видов насе-

комых. Большинство вредителей, наносящих вред растениям хлопчатника, относятся к отряду Чешуекрылые (Lepidoptera L.), например, коробочный червь и почковый червь.

Таким образом, с самого начала работы по получению хлопчатника, устойчивого к насекомым, приоритетом является использование трансгенных технологий. Хорошо известно, что пестициды, содержащие *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), являются эффективными биологическими средствами защиты растений, которые используются в полевых условиях в течение многих лет. Что еще более важно, многие вредители, на которые нацелены Bt, например, хлопковый коробочный червь, наносят значительный ущерб сельскому хозяйству (Baur, Voethel, 2003). В настоящее время многие гены Bt были идентифицированы, секвенированы и охарактеризованы, и некоторые из них были успешно перенесены в растения, включая хлопчатник, сою, кукурузу и томаты.

Полевые и лабораторные биологические исследования показывают, что три основных вредителя хлопчатника, среди которых, мучнистый червь (*Helicoverpa zea* Boddie), табачный почковый червь (*Heliothis virescens* Fabricius) и розовый коробчатый червь (*Pectinophora gossypiella* Saunders) восприимчивы к Bt, и гораздо меньше вредителей может выжить на Bt-хлопчатнике (Li et al., 2007; Gore et al., 2000). Полевые испытания показывают, что Bt-хлопчатник может уменьшить ущерб от гусениц на 93-100%, а также значительно уменьшить повреждение сельскохозяйственных культур чешуекрыльями, питающимися листьями. Как результат, культивирование Bt-хлопчатника может снизить необходимое расходование пестицидов на 70% (Carrière et al., 2007; Ramasundaram et al., 2007).

Гербицидоустойчивые линии. Получение хлопчатника с устойчивостью к гербицидам – это еще одна история успешного внедрения трансгенных растений. Сорняки являются значительной проблемой при возделывании любых культур, включая хлопчатник. Они могут приводить к значительным потерям хлопка, в связи с чем необходимо тщательно контролировать рост сорняков на полях. Было установлено, что на хлопковых полях могут произрастать представители более 30 различных родов сорных растений (Economidou et al., 2016). Самый удобный способ уничтожения сорняков – опрыскивание гербицидами, однако губительные для сорняков гербициды также приводят к гибели или же частичному поражению растений хлопчатника. Таким образом, возникла острая необходимость введения в геном хлопчатника генов устойчивости к гербицидам, которые бы позволили растениям хлопчатника обладать преимуществом при обработке их этими средствами борьбы с сорняками.

Одним из наиболее широко используемых гербицидов является глифосат, активный ингредиент гербицида Раундап. Глифосат – это неселективный гербицид широкого спектра действия, который имеет тенденцию уничтожать любые растения в поле, включая хлопчатник. Поглощаемый растением глифосат воздействует на 5-енолпирувиллицикат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), в результате чего блокируется синтез ароматических аминокислот (Steinrücken, Amrhein, 1980). Трансгенный хлопчатник с геном *cp4 EPSPS*, обеспечивающим устойчивость к глифосату, делает растение резистентным сразу ко всем глифосат-содержащим гербицидам (Nida et al., 1996). Данная устойчивость основана на том, что продуктом экспрессии данного гена является фермент, выполняющий аналогичные EPSPS функции (Riar et al., 2011).

В настоящее время в ряде стран, включая США и Австралию, разработано и широко используется несколько коммерческих трансгенных сортов хлопчатника с устойчивостью к различным гербицидам. Внедрение трансгенного хлопчатника, устойчивого к гербицидам, позволило бороться с сорняками гораздо эффективнее и, в результате, эти формы получили целый ряд значительных экономических, социальных и экологических

преимуществ.

Линии с улучшенным качеством. Среди запатентованных линий трансформированного хлопчатника к данной группе относится лишь линия TAM66274 (Rathore et al., 2020). Уникальность данной линии заключается в том, что её семена содержат значительно меньше госсипола.

Госсипол – это терпеноид, синтезируемый и запасываемый в пигментных вместилищах тканей хлопчатника (Withers, Carruth, 1915). Лизигенные вместилища являются одной из основных особенностей трибы Gossypieae, принадлежащей к семейству мальвовых, в которое входят *Gossypium* L. и семь других родов (Fryxell, 1968). Зеленые части хлопчатника, например: листья, прицветники, стенка завязи, содержат в основном госсипол, гемигоссиполон и гелиоциды, в то время как корни содержат госсипол, госсипол-6-метилэфир, госсипол-6,6-диметилэфир и гемигоссипол, дезоксигемигоссипол, гемигоссипол-6-метилэфир и дезоксигемигоссипол-6,6-диметилэфир. Преобладающим же терпеноидом, присутствующим в лепестках цветков и в семенах, является госсипол (Stipanovic et al., 1999; Sunilkumar et al., 2006). Конститутивное присутствие госсипола и родственных терпеноидов играет важную роль в защите хлопчатника от членистоногих вредителей. Также повышение содержания госсипола и связанных с ним терпеноидов наблюдается при микробных инфекциях (Pinki et al., 2018).

У большинства животных, включая человека, госсипол вызывает поражение сердца и печени (Risco et al., 1992; Gadelha et al., 2014). Также у животных, при попадании госсипола в организм, значительно снижается гематокрит и содержание гемоглобина, развивается анемия (Risco et al., 1992). Токсический эффект госсипола обусловлен его способностью хелатировать железо в кишечнике и печени, тем самым снижая его доступность (Core, 2018). Однако госсипол разрушается под действием высоких температур, поэтому масло хлопчатника можно употреблять в пищу после сильного прогрева.

В течение нескольких десятилетий велись поиски способа нивелировать токсическое воздействие госсипола и тем самым повысить полезность и общую экономическую ценность хлопчатника. В результате длительных исследований, в которых были задействованы ученые нескольких десятков лабораторий мира, в 2014 году была наконец получена линия TAM66274 (Rathore et al., 2020). У растений хлопчатника данной линии, полученной посредством агробактериальной трансформации, присутствует RNAi-конструкция под контролем промотора, специфичного для семян. Принцип работы данной конструкции основан на явлении РНК-интерференции, позволяющей осуществлять посттранскрипционный сайленсинг генов (от англ. gene silencing = подавление активности гена). Мишенью конструкции, присутствующей у растений линии TAM66274, является продукт экспрессии гена δ-кадиненсинтазы. Избирательное подавление

его образования привело к снижению уровня содержания госсипола в семенах на 97%. При этом не было отмечено влияния на уровень содержания госсипола и связанных с ним терпеноидов в других частях растения, где они необходимы для защиты от насекомых и патогенов. В ходе полевых испытаний, проведенных в течение нескольких лет в США, была подтверждена стабильность и наследуемость этого признака у хлопчатника без снижения его урожайности, а также качества и иных агрономических показателей волокна и семян (Rathore et al., 2020).

Полученное хлопковое семя с ультранизким содержанием госсипола (ULGCS) считается безопасным для использования в качестве продукта питания человека или корма для животных.

Прочие ГМ линии. Помимо линий хлопчатника, устойчивых к вредителям и гербицидам, к настоящему времени получено уже немало растений ГМ хлопчатника, отличающихся повышенной устойчивостью к абиотическому стрессу, характеризующихся изменениями в процессе биосинтеза целлюлозы, разных по окраске и качеству волокна (Light et al., 2005; Li et al., 2009b; Pasapula et al., 2011; Zhang et al., 2011; Zhu et al., 2011). Были установлены роли целого ряда генов, а также некоторых микроРНК, в процессе инициации формирования и развития хлопкового волокна, а также в процессе ответа на биотический и абиотический стресс. Среди изученных генов также немало таких, которые кодируют транскрипционные факторы, что открывает новый простор для дальнейшей модификации хлопчатника (Mittal et al., 2015; Guo et al., 2016; Wang et al., 2017a; b). Однако эти трансгенные линии хлопчатника все еще находятся на стадии разработки, и им еще предстоит пройти долгий путь, прежде чем их можно будет использовать в сельском хозяйстве в коммерческих масштабах.

Заключение

Хлопчатник безусловно является уникальной сельскохозяйственной культурой. Однако, как и при возделывании любой другой культуры, его культивирование сопряжено с множеством проблем, решение которых позволит сельскому хозяйству выйти на новый уровень.

С каждым годом становится все больше различных способов введения генов интереса в растения, однако для любой культуры необходимо найти свой уникальный подход, то есть крайне важен индивидуальный подбор методов трансформации для каждого отдельно взятого сельскохозяйственного растения (Wilkins et al., 2000).

К сожалению, внедрение получаемых посредством трансформации ГМ линий осуществляется достаточно медленно. В связи с этим разнообразие признаков среди трансгенного хлопчатника относительно небольшое. Однако следует отметить, что в лабораториях мира уже было получено достаточно много крайне примечательных линий, выход на широкий рынок которых способен

изменить сельское хозяйство в целом. Например, благодаря внедрению рассмотренной в данной статье линии TAM66274, хлопчатник может стать дуальной культурой, которую будут выращивать не только ради получения волокна, но и в качестве стабильного источника пищевого масла и белка как для животных, так и для людей, что позволило бы частично снивелировать мировую продовольственную проблему (Rathore et al., 2020).

References/Литература

- Ahmad P., Ashraf M., Younis M., Hu X., Kumar A., Akram N.A., Al-Qurainy F. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. *Biotechnology Advances*. 2012;30(3):524-540. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.006
- Ahmad S., Hasanuzzaman M. (eds). Cotton production and uses. Agronomy, crop protection, and postharvest technologies. Singapore: Springer Singapore; 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-1472-2
- Ali A., Bang S.W., Chung S.-M., Staub J.E. Plant transformation via pollen tube-mediated gene transfer. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2015;33(3):742-747. DOI: 10.1007/s11105-014-0839-5
- Aragão F.J.L., Vianna G.R., Carvalheira S.B.R.C., Rech E.L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Science*. 2005;168(5):1227-1233. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.12.024
- Bates G.W. Chapter 26. Electroporation of plant protoplasts and tissues. In: *Methods in Cell Biology*. 1995;50:363-373. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)61043-2
- Baur M.E., Boethel D.J. Effect of Bt-cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biological Control*. 2003;26(3):325-332. DOI: 10.1016/S1049-9644(02)00160-3
- Carrière Y., Ellers-Kirk C., Biggs R.W., Sims M.A., Dennehy T.J., Tabashnik B.E. Effects of resistance to Bt cotton on diapause in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. *Journal of Insect Science*. 2007;7:1-12. DOI: 10.11673/031.007.4901
- Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 1998;16(6):735-743. DOI: 10.1046/j.1365-3113.1998.00343.x
- Cope R.B. Cottonseed toxicity. In: *Veterinary Toxicology*. Elsevier; 2018. p.967-980. DOI: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00068-4
- Divya K., Anuradha T., Jami S.K., Kirti P.B. Efficient regeneration from hypocotyl explants in three cotton cultivars. *Biologia Plantarum*. 2008;52(2):201-208. DOI: 10.1007/s10535-008-0046-z
- Dobson J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. *Gene Therapy*. 2006;13(4):283-287. DOI: 10.1038/sj.gt.3302720
- Duncan D.R. Organogenesis and embryogenesis in plant genetic transformation. In: Dan Y., Ow D.W. (eds). Plant Transformation. Vol. 1. Historical in: *Plant Transformation*. Hilversum, The Netherlands: Bentham Science Publishers, 2011; p.46-54. DOI: 10.2174/978160805248611101010046
- Economou G., Uludag A., Krähmer H. Summary of global cotton weed distribution. In: Krähmer H. (ed.). Atlas of weed mapping. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2016. p.102-102. DOI: 10.1002/9781118720691.ch10
- Faranda S., Genga A., Viotti A., Manzocchi L.A. Stably transformed cell lines from protoplasts of maize endosperm suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 1994;37(1):39-46. DOI: 10.1007/BF00048115
- Finer J.J., McMullen M.D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Reports*. 1990;8(10):586-589. DOI: 10.1007/BF00270059
- Firoozabady E., DeBoer D.L., Merlo D.J., Halk E.L., Amerson L.N., Rashka K.E., Murray E.E. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant molecular biology*. 1987;10(2):105-116. DOI: 10.1007/BF00016148

- Fryxell P.A. A redefinition of the tribe Gossypieae. *Botanical Gazette*. 1968;129(4):296-308. DOI: 10.1086/336448
- Gadelha I.C.N., Fonseca N.B.S., Oloris S.C.S., Melo M.M., Soto-Blanco B. Gossypol toxicity from cottonseed products. *The Scientific World Journal*. 2014(2014):231635. DOI: 10.1155/2014/231635
- Gelvin S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003;67(1):16-37. DOI: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003
- Gore J., Leonard B.R., Church G.E., Russell J.S., Hall T.S. Cotton boll abscission and yield losses associated with first-instar bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) injury to nontransgenic and transgenic Bt cotton. *Journal of Economic Entomology*. 2000;93(3):690-696. DOI: 10.1603/0022-0493-93.3.690
- GenBit GM crops database. URL: <https://genbitgroup.com/en/gmo/gmodatabase/index.php> [дата обращения: 09.02.2022]
- Guo K., Du X., Tu L., Tang W., Wang P., Wang M., Liu Z., Zhang X. Fibre elongation requires normal redox homeostasis modulated by cytosolic ascorbate peroxidase in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Experimental Botany*. 2016;67(11):3289-3301. DOI: 10.1093/jxb/erw146
- Hao J., Niu Y., Yang B., Gao F., Zhang L., Wang J., Hasi A. Transformation of a marker-free and vector-free antisense ACC oxidase gene cassette into melon via the pollen-tube pathway. *Biotechnology letters*. 2011;33(1):55-61. DOI: 10.1007/s10529-010-0398-2
- Hashmi J.A., Zafar Y., Arshad M., Mansoor S., Asad S. Engineering cotton (*Gossypium hirsutum* L.) for resistance to cotton leaf curl disease using viral truncated AC1 DNA sequences. *Virus Genes*. 2011;42(2):286-296. DOI: 10.1007/s11262-011-0569-9
- He K., Wang Z., Bai S., Zheng L., Wang Y., Cui H. Efficacy of transgenic Bt cotton for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Crop Protection*. 2006;25(2):167-173. DOI: 10.1016/j.cropro.2005.04.003
- Huang G., Dong Y., Sun J. Introduction of exogenous DNA into cotton via the pollen-tube pathway with GFP as a reporter. *Chinese Science Bulletin*. 1999;44:698-701. DOI: 10.1007/BF02909705
- Hussain S.S., Rao A.Q., Husnain T., Riazuddin S. Cotton somatic embryo morphology affects its conversion to plant. *Biologia Plantarum*. 2009;53(2):307-311. DOI: 10.1007/s10535-009-0055-6
- ISAA GM approval database. URL: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp> [дата обращения: 09.02.2022]
- 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 and Organ Culture*. 2005;81(2):229-237. DOI: 10.1007/s11240-004-5209-9
- Khan T., Singh A.K., Pant R.C. Regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in different cultivars of cotton (*Gossypium* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2006;42(6):498-501. DOI: 10.1079/IVP2006802
- Khan M.A., Wahid A., Ahmad M., Tahir M.T., Ahmed M., Ahmad S., Hasanuzzaman M. World cotton production and consumption: an overview. In: Ahmad S., Hasanuzzaman M. (eds). *Cotton Production and Uses*. Singapore: Springer Singapore; 2020. p.1-7. DOI: 10.1007/978-981-15-1472-2_1
- Lee J.A., Fang D.D. Cotton as a world crop: origin, history, and current status. In: Fang D.D., Percy R.G. (eds). *Cotton*. 2nd ed. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc.; 2015. p. 1-23. (Agronomy Monographs; vol. 57). DOI: 10.2134/agronmonogr57.2013.0019
- Leelavathi S., Sunnichan V.G., Kumria R., Vijaykath G.P., Bhatnagar R.K., Reddy V.S. A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 2004;22(7):465-470. DOI: 10.1007/s00299-003-0710-x
- Li F.-F., Wu S.-J., Chen T.-Z., Zhang J., Wang H.-H., Guo W.-Z., Zhang T.-Z. *Agrobacterium*-mediated co-transformation of multiple genes in upland cotton. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2009a;97(3):225-235. DOI: 10.1007/s11240-009-9521-2
- Li F., Wu S., Lü F., Chen T., Ju M., Wang H., Jiang Y., Zhang J., Guo W., Zhang T. Modified fiber qualities of the transgenic cotton expressing a silkworm *fibroin* gene. *Chinese Science Bulletin*. 2009b;54:1210-1216. DOI: 10.1007/s11434-009-0142-2
- Li Y.-X., Greenberg S.M., Liu T.-X. Effect of Bt cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab, non-Bt cotton and starvation on survival and development of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest management science*. 2007;63(5):476-482. DOI: 10.1002/ps.1371
- Light G.G., Mahan J.R., Roxas V.P., Allen R.D. Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings expressing a tobacco glutathione S-transferase fail to provide improved stress tolerance. *Planta*. 2005;222(2):346-354. DOI: 10.1007/s00425-005-1531-7
- Liu J.F., Wang X.F., Li Q.L., Li X., Zhang G.Y., Li M.G., Ma Z.Y. Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the *phyA* gene from *Aspergillus ficuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2011;106:207-214. DOI: 10.1007/s11240-010-9908-0
- Martin N., Forgeois P., Picard E. Investigations on transforming *Triticum aestivum* via the pollen tube pathway. *Agronomie*. 1992;12(7):537-544. DOI: 10.1051/agro:19920705
- McCabe D.E., Martinell B.J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. *Nature Biotechnology*. 1993;11:596-598. DOI: 10.1038/nbt0593-596
- Mittal A., Jiang Y., Ritchie G.L., Burke J.J., Rock C.D. At *RAV1* and At *RAV2* overexpression in cotton increases fiber length differentially under drought stress and delays flowering. *Plant Science*. 2015;241:78-95. DOI: 10.1016/j.plantsci.2015.09.013
- Nair G.R., Lai X., Wise A.A., Rhee B.W., Jacobs M., Binns A.N. The integrity of the periplasmic domain of the VirA sensor kinase is critical for optimal coordination of the virulence signal response in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 2011;193(6):1436-1448. DOI: 10.1128/JB.01227-10
- Nandeshwar S.B., Moghe S., Chakrabarty P.K., Deshattiwar M.K., Kranthi K., Anandkumar P., Mayee C.D., Khadi B.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *cry1Ac* gene into shoot-tip meristem of diploid cotton *Gossypium arboreum* cv. RG8 and regeneration of transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2009;27(4):549-557. DOI: 10.1007/s11105-009-0102-7
- Nida D.L., Kolacz K.H., Buehler R.E., Deaton W.R., Schuler W.R., Armstrong T.A., Taylor M.L., Ebert C.C., Rogan G.J., Padgett S.R., Fuchs R.L. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996;44(7):1960-1966. DOI: 10.1021/jf9505640
- Pasapula V., Shen G., Kuppu S., Paez-Valencia J., Mendoza M., Hou P., Chen J., Qiu X., Zhu L., Zhang X., Auld D., Blumwald E., Zhang H., Gaxiola R., Payton P. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. *Plant Biotechnology Journal*. 2011;9(1):88-99. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2010.00535.x
- Pinkii, Siwach S.S., Sangwan R.S., Singh S., Mor V.S., Mandhanian S., Rohila S., Rohila N. Estimation of biochemical parameters in different environments in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018;7(04):1624-1629. DOI: 10.20546/ijcmas.2018.704.183
- Rajasekaran K., Hudspeth R.L., Cary J.W., Anderson D.M., Cleveland T.E. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*. 2000;19:539-545. DOI: 10.1007/s002990050770
- Ramasundaram P., Vennila S., Ingle R.K. Bt cotton performance and constraints in Central India. *Outlook on Agriculture*. 2007;36(3):175-180. DOI: 10.5367/000000007781891487
- Rao A.Q., Hussain S.S., Shahzad M.S., Bokhari S.Y.A., Raza M.H., Rakha A., Majeed A., Shahid A.A., Saleem Z., Husnain T., Riazuddin S. Somatic embryogenesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* spp.). *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*. 2006;7(4):291-298. DOI: 10.1631/jzus.2006.B0291
- Rathore K.S., Pandeya D., Campbell L.M., Wedegaertner T.C.,

- Puckhaber L., Stipanovic R.D., Thenell J.S., Hague S., Hake K. Ultra-low gossypol cottonseed: selective gene silencing opens up a vast resource of plant-based protein to improve human nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2020;39(1):1-29. DOI: 10.1080/07352689.2020.1724433
- Rech E.L., Vianna G.R., Aragão F.J.L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature protocols*. 2008;3(3):410-418. DOI: 10.1038/nprot.2008.9
- Riar D.S., Norsworthy J.K., Griffith G.M. Herbicide programs for enhanced glyphosate-resistant and glufosinate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum*). *Weed Technology*. 2011;25(4):526-534. DOI: 10.1614/WT-D-11-00027.1
- Risco C.A., Holmberg C.A., Kutches A. Effect of graded concentrations of gossypol on calf performance: toxicological and pathological considerations. *Journal of Dairy Science*. 1992;75(10):2787-2798. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(92)78042-4
- Ruf S., Bock R. Loopholes for smuggling DNA into pollen. *Nature Plants*. 2017;3(12):918-919. DOI: 10.1038/s41477-017-0072-y
- Sawan Z.M. Climatic variables: evaporation, sunshine, relative humidity, soil and air temperature and its adverse effects on cotton production. *Information Processing in Agriculture*. 2018;5(1):134-148. DOI: 10.1016/j.inpa.2017.09.006
- Shaheen M., Ali M.Y., Muhammad T., Qayyum M.A., Atta S., Bashir S., Bashir M.A., Hashim S., Hashem M., Alamri S. New promising high yielding cotton Bt-Variety RH-647 adapted for specific agro-climatic zone. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(8):4329-4333. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.04.019
- Shou H., Palmer R.G., Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2002;20:325-334. DOI: 10.1007/BF02772120
- Steinrücken H.C., Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1980;94(4):1207-1212. DOI: 10.1016/0006-291X(80)90547-1
- Stipanovic R., Benedict C., Bell A. Cotton Pest Resistance: The Role of Pigment Gland Constituents. In: Cutler H., Cutler S. (eds). *Biologically active natural products*. CRC Press LLC; 1999. DOI: 10.1201/9781420048629.ch18
- Sun Y., Zhang X., Huang C., Guo X., Nie Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species. *Plant Cell Reports*. 2006;25(4):289-296. DOI: 10.1007/s00299-005-0085-2
- Sunilkumar G., Campbell L.M., Puckhaber L., Stipanovic R.D., Rathore K.S. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(48):18054-18059. DOI: 10.1073/pnas.0605389103
- Sunilkumar G., Rathore K.S. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molecular Breeding*. 2001;8:37-52. DOI: 10.1023/A:1011906701925
- Tariq M., Afzal M.N., Muhammad D., Ahmad S., Shahzad A.N., Kiran A., Wakeel A. Relationship of tissue potassium content with yield and fiber quality components of Bt cotton as influenced by potassium application methods. *Field Crops Research*. 2018;229:37-43. DOI: 10.1016/j.fcr.2018.09.012
- Tausif M., Jabbar A., Naem M.S., Basit A., Ahmad F., Cassidy T. Cotton in the new millennium: advances, economics, perceptions and problems. *Textile Progress*. 2018;50(1):1-66. DOI: 10.1080/00405167.2018.1528095
- Terakawa T., Hasegawa H., Yamaguchi M. Efficient whisker-mediated gene transformation in a combination with supersonic treatment. *Breeding Science*. 2005;55(4):465-468. DOI: 10.1270/jsbbs.55.465
- Tohidfar M., Mohammadi M., Ghareyazie B. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2005;83:83-96. DOI: 10.1007/s11240-004-6155-2
- Tokel D., Genc B.N., Ozyigit I.I. Economic impacts of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton. *Journal of Natural Fibers*. 2021;1-18. DOI: 10.1080/15440478.2020.1870613
- Torney F., Trewn B.G., Lin V.S.-Y., Wang K. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology*. 2007;2(5):295-300. DOI: 10.1038/nnano.2007.108
- Umbeck P., Johnson G., Barton K., Swain W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Nature Biotechnology*. 1987;5:263-266. DOI: 10.1038/nbt0387-263
- Wang C., He X., Wang X., Zhang S., Guo X. ghr-miR5272a-mediated regulation of *GhMCK6* gene transcription contributes to the immune response in cotton. *Journal of Experimental Botany*. 2017a;68(21-22):5895-5906. DOI: 10.1093/jxb/erx373
- Wang M., Sun R., Li C., Wang Q., Zhang B. MicroRNA expression profiles during cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber early development. *Scientific reports*. 2017b;7:44454. DOI: 10.1038/srep44454
- Wang M., Zhang B., Wang Q. Cotton transformation via pollen tube pathway. In: Zhang B. (ed.). *Transgenic Cotton: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p.71-77. (Methods in Molecular Biology; vol. 958). DOI: 10.1007/978-1-62703-212-4_6
- Wendel J.F., Brubaker C.L., Percival A.E. Genetic diversity in *Gossypium hirsutum* and the origins of Upland cotton. *American Journal of Botany*. 1992;79(11):1291-1310. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1992.tb13734.x
- Wilkins T.A., Rajasekaran K., Anderson D.M. Cotton biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000;19(6):511-550. DOI: 10.1080/07352680091139286
- Withers W.A., Carruth F.E. Gossypol—a toxic substance in cottonseed. A preliminary note. *Science*. 1915;41(1052):324. DOI: 10.1126/science.41.1052.324.b
- Wu J., Zhang X., Nie Y., Luo X. High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants. *Plant Breeding*. 2005;124(2):142-146. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2004.01056.x
- Yan S., Zhu W., Zhang B., Zhang X., Zhu J., Shi J., Wu P., Wu F., Li X., Zhang Q., Liu X. Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton is constrained by physical isolation measures. *Scientific Reports*. 2018;8(1):2862. DOI: 10.1038/s41598-018-21312-1
- Yang A., Su Q., An L., Liu J., Wu W., Qiu Z. Detection of vector- and selectable marker-free transgenic maize with a linear *GFP* cassette transformation via the pollen-tube pathway. *Journal of Biotechnology*. 2009;139(1):1-5. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.08.012
- Yuceer S.U., Koc N.K. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2006;53(3):413-417. DOI: 10.1134/S1021443706030198
- Zamir D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(12):983-989. DOI: 10.1038/35103590
- Zapata C., Park S.H., El-Zik K.M., Smith R.H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;98:252-256. DOI: 10.1007/s001220051065
- Zhang B.-H., Feng R., Liu F., Zhou D.-Y., Wang Q.-L. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) explants. *Israel Journal of Plant Sciences*. 2001;49(3):193-196. DOI: 10.1560/406W-UWRP-B01G-0Q0E
- Zhang M., Zheng X., Song S., Zeng Q., Hou L., Li D., Zhao J., Wei Y., Li X., Luo M., Xiao Y., Luo X., Zhang J., Xiang C., Pei Y. Spatiotemporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. *Nature Biotechnology*. 2011;29:453-458. DOI: 10.1038/nbt.1843
- Zhang R., Meng Z., Abid M.A., Zhao X. Novel pollen magnetofection system for transformation of cotton plant with magnetic nanoparticles as gene carriers. In: Zhang B. (ed.). *Transgenic cotton: methods and protocols*. New York, New York, NY: Springer; 2019. p.47-54. (Methods in Molecular Biology; vol. 1902). DOI: 10.1007/978-1-4939-8952-2_4
- Zhang Y., Yin X., Yang A., Li G., Zhang J. Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. *Euphytica*. 2005;144:11-22. DOI: 10.1007/s10681-005-4560-1
- Zhou G., Weng J., Zeng Y., Huang J., Qian S., Liu G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier; 1983. Vol. 101. p.433-481.

Информация об авторах

Кирилл Вадимович Смирнов, магистрант, кафедра генетики и биотехнологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; инженер-исследователь, лаборатория протеомики надорганизменных систем, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин 8, ш. Подбельского, д. 3, kirill.vad.smirnov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2875-3798>

Татьяна Валерьевна Матвеева, доктор биологических наук, профессор, кафедра генетики и биотехнологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, t.v.matveeva@spbu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8569-6665>

Людмила Алексеевна Лутова, доктор биологических наук, профессор, кафедра генетики и биотехнологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Россия, l.lutova@spbu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6125-0757>

Information about the authors

Kirill V. Smirnov, Master's degree student, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya Embankment, St. Petersburg 199034, Russia; Research engineer, Laboratory for Proteomics of Supra-Organismal Systems, All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, 3, Podbelsky Highway, Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, kirill.vad.smirnov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2875-3798>

Tatiana V. Matveeva, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya Embankment, St. Petersburg 199034, Russia, t.v.matveeva@spbu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8569-6665>

Ludmila A. Lutova, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, 7/9, Universitetskaya Embankment, St. Petersburg 199034, Russia, l.lutova@spbu.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6125-0757>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 15.04.2022; одобрена после рецензирования 27.05.2022; принята к публикации 28.06.2022

The article was submitted 15.04.2022; approved after reviewing 27.05.2022; accepted for publication on 28.06.2022.