

УДК 57.085.23, 57.085.25

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ СЕЛЕКТИВНОГО ДАВЛЕНИЯ ГЛЮФОСИНАТОМ АММОНИЯ

*А.А. Галимова, И.Ф. Рахматуллина, З.А. Ибрагимова, Б.Р. Кулуев*

*Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа, 450054, Россия*

Генетическая трансформация злаковых культур – активно развивающееся направление биотехнологии. Процесс получения трансгенных растений условно делится на следующие этапы: перенос чужеродного генетического материала, получение растений-регенерантов и отбор трансгенных растений. Эффективный отбор трансгенных растений требует знаний концентраций и времени воздействия селективных агентов для культур тканей исследуемых видов растений. Цель нашей работы – выявление оптимальной концентрации и продолжительности воздействия глюфосината аммония (гербицид Basta) для отбора трансгенных регенерантов мягкой пшеницы в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** глюфосинат аммония, Basta, селективный отбор, мягкая пшеница

## EFFICIENCY OF OBTAINING REGENERANT PLANTS OF BREAD WHEAT UNDER CONDITIONS OF AMMONIUM GLUFOSINATE SELECTIVE PRESSURE

*A.A. Galimova, I.F. Rakhmatullina, Z.A. Ibragimova, B.R. Kuluev*

*<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia*

Genetic transformation of cereal crops is an actively developing area of biotechnology. The process of obtaining transgenic plants is conventionally divided into the following stages: transfer of foreign genetic material, obtaining regenerated plants and selection of transgenic plants. Effective selection of transgenic plants requires knowledge of the concentrations and exposure times of tissue culture selective agents for the plant species being studied. The purpose of our work is to identify the optimal concentration and duration of exposure to ammonium glufosinate (Basta herbicide) for the selection of transgenic regenerants of bread wheat *in vitro*.

**Keywords:** ammonium glufosinate, Basta, selective screening, bread wheat

**Введение.** Глюфосинат — природный контактный гербицид широкого спектра действия. Он впервые обнаружен разными исследовательскими группами, исследующими *Streptomyces hygroscopicus* и *S. viridochromogenes* [4]. В промышленных масштабах гербицид выпускается под торговыми марками Биалафос, Basta, Rely и другие. На сегодняшний день имеются убедительные доказательства того, что основным фактором быстрой фитотоксичности у растений, обработанных глюфосинатом, являются активные формы кислорода (АФК) [8]. Накопление АФК в тилакоидах хлоропластов вызывает перекисное окисление клеточных мембран [5, 9] и гибель клеток.

Устойчивые к глюфосинату культуры могут метаболизировать глюфосинат за счет экспрессии генов *pat* или *bar* [1, 3]. Экспрессия этих генов в растениях позволяет расщеплять глюфосинат до биологически инертного метаболита, что позволяет использовать их в качестве селективируемых маркеров в векторах для трансформации растений. Это, в свою очередь,

предусматривает необходимость знаний концентраций гербицида для той или иной культуры растения и его частей. Как правило, в качестве эксплантов для каллусогенеза у растений мягкой пшеницы используются незрелые и зрелые зародыши [6]. Но на сегодняшний день результатов исследований по определению оптимальных концентраций глюфосината аммония и времени его воздействия на культуры тканей мягкой пшеницы нет, что и определило цель настоящей работы. Мы исследовали влияние препарата Basta на эффективность побегообразования и ризогенез, а так же на развитие растений-регенерантов из морфогенных каллусов, полученных из зрелых зародышей и выдержанных на разных концентрациях селективного агента определенный промежуток времени.

**Материалы и методы.** В работе использовалась мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.). В качестве эксплантов для получения каллусов использовались зрелые зародышиярового сорта мягкой пшеницы Тая. Поверхностную стерилизацию зерновок проводили по [2]. Далее целые зерновки помещали на индукционные питательные среды [7], содержащие каллусоиндуцирующие регуляторы роста 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 2 мг/л и 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5 мг/л и культивировали при температуре 25°C, в темноте в течение 14 дней с целью получения морфогенных каллусов. Затем для регенерации целых растений морфогенные каллусы помещали на регенерационные среды без регуляторов роста растений [7]. Экспланты культивировали в камере роста Binder (Германия) при температуре 25°C и освещении 5000 люкс. Далее регенеранты пересаживали в пластиковые контейнеры (MAGENTA GA-7 VESSEL, Sigma-Aldrich, США) и продолжали культивировать при тех же условиях температуры и освещения. В качестве селективного агента на основе глюфосината аммония был использован химически чистый реактив Basta (Macklin, Китай).

**Результаты и их обсуждение.** Проведена оценка влияния глюфосината аммония на способность каллусов, полученных в культуре зрелых зародышей на эффективность побего- и корнеобразования. Так, после калусообразования каллусы отделяли от зерновок и помещали на регенерационную среду с разной концентрацией селективного агента (0; 5.0; 7.5; 10, 15 мг/л) и выдерживали на каждой концентрации 7, 14, 21 и 28 суток. Затем каллусы и/или регенеранты пересаживали на среду без глюфосината аммония. Спустя 4 недели культивирования определяли долю эксплантов, которые образовали зеленый каллус, побег, корневую систему и полноценные регенеранты (рис. 1).

Так, за 28 суток культивирования эксплантов на разных концентрациях глюфосината аммония зеленые каллусы были получены для всех опытных вариантов с достаточно высокой эффективностью (рис. 1 а). На стадии побегообразования начинают появляться различия в частоте образования зеленых побегов между разными концентрациями глюфосината аммония – уменьшение числа эксплантов, образовавших побег с ростом концентрации селективного агента (рис. 1 б). Продолжительность контакта с гербицидом так же сказывалась на частоте образования эксплантами корней. Культивирование эксплантов на среде с концентрацией препарата Basta 15 мг/л дольше 14 суток привело к полному отсутствию процесса корнеобразования. По рисунку 4в видно, что воздействие гербицида даже в концентрации 10 мг/л дольше 14 суток так же критично для процесса корнеобразования (рис. 1 в). Анализ доли эксплантов, давших растения-регенеранты, показал, что продолжительность контакта с гербицидом до 7 суток для эксплантов не критично. Регенеранты были получены даже при культивировании на среде с концентрацией селективного агента 15 мг/л (рис. 1 г).

**Заключение.** Таким образом, определена схема селективного давления глюфосината аммония, которая может быть использована для отбора каллуса и регенерантов мягкой пшеницы, полученных в культуре зрелых зародышей.

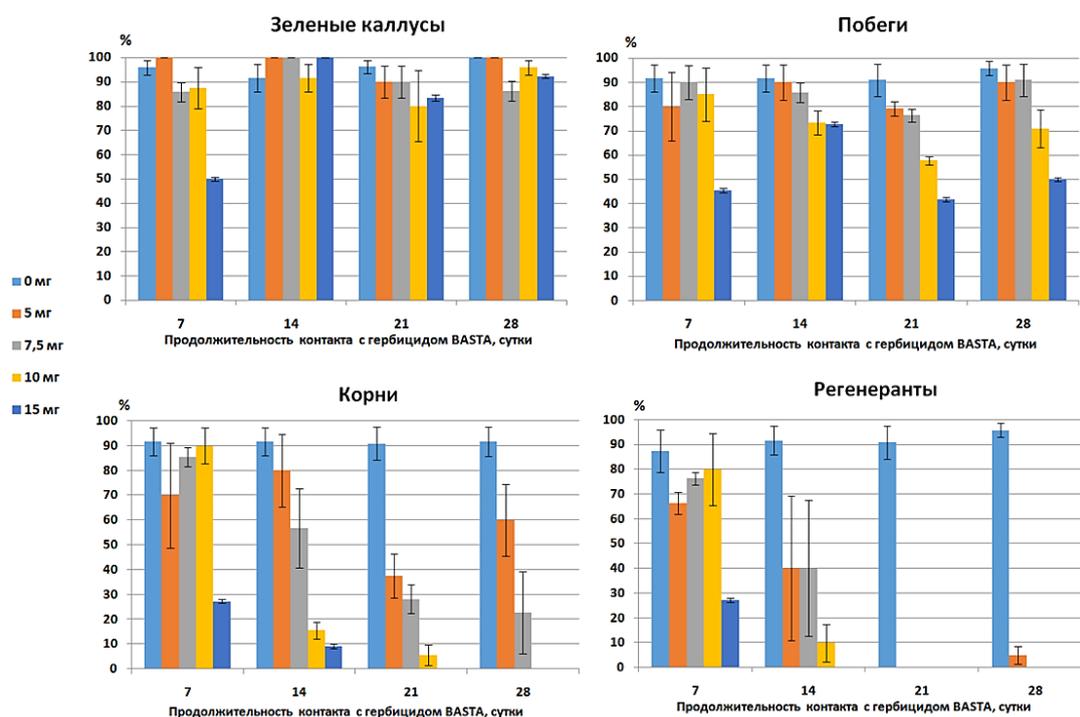


Рисунок 1. Доли (ось y) каллусов с зелеными точками регенерации (а), каллусов с побегами (б), каллусов с корнями (в), каллусов, образовавших растения-регенеранты (г) при использовании разных концентраций глюфосината аммония (0 мг/л, 5.0 мг/л, 7.5 мг/л, 10 мг/л и 15 мг/л) и разной продолжительности его воздействия (7, 14, 21 и 28 суток) (ось x).

**Благодарности.** Статья подготовлена при поддержке Минобрнауки России в рамках госзадания №122030200143-8

### Библиографический список

- Anderson JA, Ellsworth PC, Faria JC, Head GP, Owen MDK, Pilcher CD, Shelton AM, Meissle M (2019) Genetically Engineered Crops: Importance of Diversified Integrated Pest Management for Agricultural Sustainability. *Front BioengBiotechnol* 7:24
- Bartok T, Sági F (1990) A new endosperm-supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 22: 37-41
- Bawa, AS, Anilakumar KR (2013). Genetically modified foods: safety, risks and public concerns- a review. *J Food SciTechnol* 50:1035–1046
- Bayer E, Gugel K, Hagele K, Hagenmaier H, Jessipow S, Koning W and Zahner H (1972) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-alanyl-alanin. *HelvChim Acta* 55: 224-239
- Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109: 212-228
- Gumerova GR, Galimova AA, Kuluev BR (2023) Bread wheat callusogenesis and organogenesis using mature embryos as explants. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding* 184: 19-28
- Sparks CA, Jones HD (2009) Biolistics transformation of wheat. *Methods in Molecular Biology* 478: 71-92.
- Takano HK, Beffa R, Preston C, Westra P and Dayan FE (2020) A novel insight into the mechanism of action of glufosinate: How reactive oxygen species are formed. *Photosynth Res* 144:361-372
- Takano HK, Patterson EL, Nissen SJ, Dayan FE and Gaines TA (2019) Predicting herbicide movement across semi-permeable membranes using three phase partitioning. *PesticBiochemPhysiol* 159: 22-26.