

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-26

Оригинальное исследование

Оптимизация параметров биобаллистики для трансформации мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. линии Велют

М.А. Нестеров ^{1,2} ✉, А.А. Киселёва ^{1,2}, Е.М. Тимонова ^{1,2}, Е.М. Сергеева ^{1,2}, Е.А. Салина ^{1,2}

Аннотация: Для улучшения хозяйственно ценных признаков мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) весьма перспективно геномное редактирование, а биобаллистический метод – один из наиболее распространенных способов доставки генетических конструкций. Большая часть опубликованных работ по редактированию мягкой пшеницы выполнена с использованием нескольких модельных сортов. Показано, что эффективность трансформации – генотип-специфичный показатель, поэтому подбор условий для успешной трансформации немодельных генотипов является актуальной задачей. В работе проведено сравнение эффективности биобаллистики для трансформации зародышевых щитков мягкой пшеницы линии Велют при варьировании следующих параметров: материал и концентрация микрокапсул (20, 40 мг/мл для золотых микрокапсул и 50 мг/мл для вольфрамовых), давление гелия (650 и 1100 psi). Эффективность биобаллистики оценивали по среднему числу клеток, экспрессирующих репортерный ген белка eGFP, на эксплант. Результаты показали, что при использовании частиц вольфрама как при 650 psi, так и 1100 psi, а также частиц золота при 1100 psi и 40 мг/мл эффективность трансформации снижается из-за усиления повреждения тканей щитков. Наибольшая эффективность бомбардировки отмечена для микрокапсул золота при следующих сочетаниях параметров: концентрация частиц 20 мг/мл и давление 1100 psi либо 40 мг/мл и давление 650 psi.

Ключевые слова: трансформация; биобаллистика; пшеница; линия Велют; зародышевые щитки.

Для цитирования: Нестеров М.А., Киселёва А.А., Тимонова Е.М., Сергеева Е.М., Салина Е.А. Оптимизация параметров биобаллистики для трансформации мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. линии Велют. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;10(4):224-230. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-26

Финансирование: Исследование выполнено за счет бюджетных средств FWNR-2024-0009.

Original article

Optimization of bioballistic parameters for transformation of common wheat *Triticum aestivum* L. line Velut

М.А. Nesterov ^{1,2} ✉, А.А. Kiseleva ^{1,2}, Е.М. Timonova ^{1,2}, Е.М. Sergeeva ^{1,2}, Е.А. Salina ^{1,2}

Abstract: Genome editing is a promising method for improving agronomic valuable traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), with the bioballistic method being one of the most common techniques for delivering genetic constructs. Most published studies on editing bread wheat have used a few model varieties. However, transformation efficiency has been shown to be genotype-dependent, making it essential to optimize conditions for successful transformation of non-model genotypes. In this study, we compared the effectiveness of biobalistics for transforming immature scutellum of the common wheat line Velut using various parameters: the type and concentration of microcarriers (20, 40 mg/ml for gold microparticles and 50 mg/ml for tungsten) and helium pressure (650 and 1100 psi). Transformation efficiency was evaluated by the average number of eGFP-expressing cells per explant. It was concluded from the results obtained that transformation efficiency decreased when using tungsten particles at both 650 psi and 1100 psi, as well as gold particles at 1100 psi and 40 mg/mL, due to increased scutellum damage. This study demonstrated that the highest transformation efficiency was achieved using gold microcarriers with the following parameter combinations: a particle concentration of 20 mg/ml at 1100 psi, or 40 mg/ml at 650 psi.

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия
Kurchatov Genomic Center of the ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia

 mikkaneator@bionet.nsc.ru

© Нестеров М.А., Киселёва А.А., Тимонова Е.М., Сергеева Е.М., Салина Е.А., 2024

Key words: transformation; biobalistic; wheat; line Velut; immature scutellum.

For citation: Nesterov M.A., Kiseleva A.A., Timonova E.M., Sergeeva E.M., Salina E.A. Optimization of biobalistic parameters for transformation of common wheat *Triticum aestivum* L. line Velut. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;10(4):224-230. DOI 10.18699/letvjgb-2024-10-26 (in Russian)

Funding: Исследование выполнено за счет бюджетных средств FWNR-2024-0009.

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$, AABBDD) – одна из наиболее значимых сельскохозяйственных культур. Изменения климата и, следовательно, условий возделывания растений, а также растущие продовольственные потребности делают актуальной задачу создания сортов пшеницы с улучшенными сельскохозяйственными и адаптивными признаками. Для ускорения этого процесса применяют маркер-опосредованную селекцию, однако более перспективной технологией, позволяющей воздействовать целенаправленно на определенные гены, считаются подходы геномного редактирования с использованием, например, системы CRISPR-Cas (Chen et al., 2019). Один из ключевых моментов методик геномного редактирования в частности и геномной инженерии в целом – доставка чужеродных нуклеиновых кислот (ДНК плазмид, экспрессирующих кассет) либо рибонуклеопротеиновых комплексов в растительную клетку.

Для двудольных растений успешно используют перенос генетического материала с помощью агробактерий, метод не требует дорогостоящего оборудования и дает стабильные результаты. Однако для растений из класса однодольных, в частности семейства злаковые (Poaceae Barnh.), применение агробактериальной трансформации ограничено по ряду причин: в целом менее эффективная регенерация *in vitro*, уровень которой сильно зависит от генотипа; отсутствие природной восприимчивости однодольных к агробактериям. Успешные результаты агробактериальной трансформации показаны для отдельных сортов пшеницы и ячменя (Wan, Lemaux, 1994; Cheng et al., 1997).

Более эффективен и менее зависим от генотипа метод трансформации пшеницы «биобаллистика», при котором осуществляется прямое попадание экзогенного генетического материала в растительную клетку. Суть метода заключается в бомбардировке эксплантов с помощью прибора, называемого генная пушка, золотыми либо вольфрамовыми микрочастицами диаметром 0.6–1.6 мкм с иммобилизованными на них плазмидными векторами. Первые трансгенные растения пшеницы были получены именно с помощью биобаллистики (Vasil et al., 1992).

Эффективность этого метода зависит от большого количества факторов, к которым относятся как биологические (тип экспланта, условия культивирования и регенерации), так и физические, влияющие непосредственно на доставку экзогенной ДНК в клетки: материал и размер микрочастиц, параметры работы генной пушки (Jones, 2005). С начала применения метода биобаллистики появилось много исследовательских работ, в которых тестируют влияние различных параметров как по отдельности, так и в сочетании, и разработаны протоколы, применяемые для широкого спектра сортов (Altpeter et al., 1996; Zhang et al., 2015).

Для трансформации пшеницы часто используют тип экспланта, называемый незрелый зародышевый щиток, – специализированная ткань, которая представляет собой видоизмененную ось зародыша, а также эмбриогенные каллусы, образованные из щитков. В первых работах были задействованы эмбриогенные каллусы (Vasil et al., 1992). Применение непосредственно щитков в качестве экспланта позволяет ускорить процесс трансформации пшеницы (Wang et al., 2022). Для ускорения идентификации трансформантов используют также конструкции, экспрессирующие репортерные гены, например *gfp* (green fluorescence protein) (Pang et al., 1996).

В первых работах, посвященных биобаллистике злаковых, описана экспрессия репортерного гена в клетках зародышей с помощью частиц вольфрама (Lonsdale et al., 1990). Микрочастицы вольфрама дешевле и более доступны, чем частицы золота, и широко применяются при трансформации каллусов пшениц (Miroshnichenko et al., 2007, 2011, 2018, 2020; Tian et al., 2018). В большом количестве последующих исследований показано, что предпочтительными носителями ДНК служат частицы золота диаметром 0.6 мкм (Ismagul et al., 2018), при этом частицы 1 мкм так же эффективны (Rasco-Gaunt et al., 1999; Yao et al., 2007; Hamada et al., 2017; Wang et al., 2022).

В целом, задача оптимизации методики состоит в нахождении баланса между эффективностью бомбардировки микрочастицами и вызванными ею разрушениями используемого типа тканей. Хотя успех трансформации при применении метода биобаллистики меньше зависит от генотипа, чем при использовании агробактерий (Altpeter et al., 2016), в ряде исследований показаны пятикратные различия в эффективности доставки ДНК в клетки и трансформации в зависимости от сорта пшеницы, при следовании одинаковому протоколу (Rasco-Gaunt et al., 2001; Fadeev et al., 2006; Souza et al., 2015; Wang et al., 2022). Таким образом, подбор параметров бомбардировки для конкретного генотипа (сорта, линии) остается актуальной задачей.

Линия яровой мягкой пшеницы Велют, ее подробная родословная представлена в (Berezhnaya et al., 2021), обладает таким хозяйственно ценным признаком, как устойчивость к полеганию, но имеет длительный вегетационный период (91–104 сут) (Агеева и др., 2021, 2023). Линия Велют обладает также хорошей регенерационной способностью, что делает ее отличным объектом для геномного редактирования (Miroshnichenko et al., 2019). Таким образом, перспективной задачей является сокращение сроков колошения этой линии, которое может быть достигнуто методами геномной инженерии. Цель работы – подбор эффективных параметров биобаллистики для трансформации зародышевых щитков мягкой пшеницы линии Велют. Для этого мы оценивали совокупное влияние трех варьирующихся параметров:

материал микрочастиц (золото, вольфрам), концентрация микрочастиц (20, 40 мг/мл для золотых и 50 мг/мл для вольфрамовых микрочастиц), а также давление гелия (650 и 1100 psi) – на уровень экспрессии репортерного гена в зародышевых щитках.

Материалы и методы

Растительный материал и приготовление эксплантов

Растения пшеницы линии Велют выращивали в сосудах в контролируемых условиях климатической камеры Fitotron SGR 121 (Weiss Technik UK Ltd., Великобритания). Первые шесть недель растения выращивали при 12-часовом световом дне и температуре 18 °С днем/15 °С ночью, влажность 70 %, после – при 16-часовом дне и температуре 21 °С днем/18 °С ночью, влажность 70 %.

Колосья с завязавшимися зернами срезали в периоде между 14–16 днями после оплодотворения. Стерилизацию зерновок и выделение незрелых зародышей проводили в асептических условиях. Для стерилизации зерновки помещали в 70 % этанол на 1 мин, а затем в раствор хлорсодержащего коммерческого отбеливателя (50 % раствор Domestos) на 10 мин при осторожном перемешивании и после этого пять раз промывали стерильной водой. Незрелые зародыши размером 1–2 мм изолировали, удаляли аксис и помещали щитком вверх на среду для индукции каллуса WCIM (Sparks, Doherty, 2020) на двое суток в темноту при температуре 24 °С в термостате TC-1/80 СПУ (Россия). Для подготовки к процедуре бомбардировки зародышевые щитки в той же ориентации в количестве 30 штук распределяли, формируя круг диаметром 2.0–2.5 см в один слой ближе к центру чашки Петри со средой MS с витаминами, содержащей дополнительно 0.4 М маннита, и культивировали в темноте при температуре 26 °С в течение 4–6 ч до процедуры баллистики и 16 ч после. После этого экспланты помещали на среду WCIM для роста каллуса по 30 штук на чашку Петри диаметром 9 см.

Иммобилизация ДНК на микрочастицах

В качестве микронесителей использовали частицы золота диаметром 1 мкм (BioRad, США) либо вольфрамовые микрочастицы M17 (медианный размер частицы 1.1 мкм)

(BioRad, США). Для оценки эффективности трансформации был использован вектор 35S-eGFP-*nosT*, который содержит ген флюоресцирующего белка eGFP под промотором CaMV35S, предназначенный для транзientной экспрессии этого белка в клетках растений (Fujii, Kodama, 2015). Вектор предоставлен проф. Yutaka Kodama (Addgene plasmid # 80127; <http://n2t.net/addgene:80127>; RRID:Addgene_80127). Иммобилизацию плазмиды на микрочастицы в количестве 1 мкг/на выстрел осуществляли согласно стандартному протоколу (Sanford et al., 1993) с использованием CaCl₂/спермидина.

Бомбардировка эксплантов

Бомбардировку эксплантов микрочастицами проводили в стерильных условиях с помощью генной пушки Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, США) по стандартному протоколу из руководства к использованию (PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System Instruction Manual).

Расстояние от останавливающего экрана (stopping screen) до чашки Петри было фиксированным и составляло 6 см. Тестировали следующие варьирующиеся параметры: материал микрочастиц (золото 1 мкм и вольфрам M17), концентрации микрочастиц (для золота 40 и 20 мг/мл, для вольфрама 50 мг/мл), разрывные диски для давления гелия 650 и 1100 psi. Обстрел каждой чашки проводился по два раза.

В качестве контроля использовались две чашки Петри с эксплантами, одна из которых была обстреляна частицами золота в концентрации 40 мг/мл без плазмиды, а вторая – с интактными (необстрелянными) щитками.

Микроскопия и обработка полученных результатов

Через 24 ч инкубирования эксплантов в темноте при температуре 24 °С в термостате TC-1/80 СПУ (Россия) оценивали первичное общее состояние щитков с помощью световой микроскопии, без оценки интенсивности флюоресценции. Еще через 24 ч проводили оценку флюоресценции. Уровень экспрессии гена *eGFP* определяли по количеству точек флюоресценции в каждом щитке индивидуально. Оценка количества точек флюоресценции (показатель, который отражает произошедшее событие трансформации) проведена индивидуально для каждого щитка на каждой чашке Петри, затем данные по каждому сочетанию параметров суммиро-

Таблица 1. Рассчитанное количество точек флюоресценции в листовых щитках пшеницы линии Велют при сочетании разных параметров биобаллистики: материал частиц золото (Au) или вольфрам (W), концентрация частиц 20, 40, 50 мг/мл; давление гелия 650 или 1100 psi

Table 1. The number of fluorescence spots in the scutellum of the common wheat line Velut was calculated for various combinations of biobalistic parameters: particle material (gold (Au) or tungsten (W)), particle concentration (20, 40, 50 mg/ml), and helium pressure (650 or 1100 psi)

Параметр эксперимента	Количество эксплантов, штук	Суммарное количество точек флюоресценции	Среднее количество точек флюоресценции/эксплант	Стандартная ошибка среднего (SEM)
Au20/650 psi	46	255	5.5	1.64
Au20/1100 psi	46	4775	103.8	8.92
Au40/650 psi	48	4285	89.3	8.79
Au40/1100 psi	50	2944	58.9	8.95
W50 /650 psi	46	996	21.65	2.88
W50/1100 psi	54	2895	53.6	4.83

Таблица 2. Достоверность различий количества точек флюоресценции/щитков между отдельными экспериментами. В ячейках указаны числовые значение *p*-value при расчете по критерию Тьюки–Крамера

Table 2. Significance of differences in the number of fluorescent spots per scutellum between individual experiments. The cells display *p*-values calculated using the Tukey–Kramer test

Параметр эксперимента	Au20/650 psi	Au20/1100 psi	Au40/650 psi	Au40/1100 psi	W50/650 psi
Au20/650 psi	–	–	–	–	–
Au20/1100 psi	1.248e-10	–	–	–	–
Au40/650 psi	1.248e-10	0.6632	–	–	–
Au40/1100 psi	8.917e-7	0.0000622	0.01849	–	–
W50/650 psi	0.5677	1.248e-10	4.212e-10	0.001753	–
W50/1100 psi	0.0000088	0.000002904	0.002137	0.9927	0.01003

вали. Для расчета флюоресценции брали те щитки, которые входили целиком в поле зрения микроскопа при фотографировании. Суммарное количество проанализированных щитков для каждого набора параметров отражено в табл. 1. Оценку проводили на флюоресцентном микроскопе ZEISS SteREO Discovery.V8 с использованием зеленого фильтра (GFP WB) в программе ZEN 3.1.

Фотографические изображения щитков обрабатывали в следующем порядке: для первичной разметки точек флюоресценции использовали программу LabelMe (Russell et al., 2008; Wada, 2021). Количество точек флюоресценции подсчитывали с помощью бота DLgram, использующего машинное обучение (Matveev et al., 2024). Данные по количеству точек флюоресценции были объединены в таблицы Microsoft Excel, статическая обработка ANOVA проведена с использованием расширенного пакета Excel для анализа данных, достоверность различий при попарных сравнениях рассчитана с помощью апостериорного критерия Тьюки–Крамера. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Для выбора оптимального типа частиц и их концентрации, а также давления гелия для выстрела, подходящих для трансформации тканей незрелых зародышей мягкой пшеницы линии Велют, был проведен эксперимент, в котором сравнивали эффективность трансформации в следующих комбинациях параметров: (1) микрочастицы золота Au 20 мг/мл при давлении гелия 650 psi, (2) микрочастицы золота Au 20 мг/мл при давлении гелия 1100 psi, (3) микрочастицы золота Au 40 мг/мл при давлении гелия 650 psi, (4) микрочастицы золота Au 40 мг/мл при давлении гелия 1100 psi, (5) микрочастицы вольфрама W 50 мг/мл при давлении гелия 650 psi, (6) микрочастицы вольфрама W 50 мг/мл при давлении гелия 1100 psi (см. табл. 1).

В качестве двух контролей использовали «холостой» выстрел без частиц и выстрел частицами золота 40 мг/мл при давлении 1100 psi без плазмиды. При оценке общего состояния щитков ожидаемо наблюдали самые слабые повреждения тканей щитка при использовании концентрации частиц золота 20 мг/мл и давлении 650 и 1100 psi, а самые сильные – при использовании частиц вольфрама и давлении гелия 1100 psi.

Для определения эффективности биобаллистики мы оценили экспрессию репортерного гена *eGFP* в тканях незрелых зародышей. Суммарное количество проанализированных щитков для каждого набора параметров составило от 46 до 54 щитков для экспериментальных выстрелов и 20 и 22 щитка в контрольных чашках (см. табл. 1).

Эффективность трансформации плазмидой для каждой комбинации параметров отличается (рис. 1 и 2). Если сравнивать значения среднего количества точек флюоресценции/щиток, то наименьшее значение будет 5.5 точек при Au20 и 650 psi, а наибольшее – 103.8 точки при Au20 и 1100 psi. При этом наблюдается большой разброс (стандартная ошибка среднего) для каждого варианта.

Достоверность различия полученных данных оценена с помощью метода ANOVA и апостериорного критерия Тьюки–Крамера для попарных различий (см. рис. 2, табл. 2). Поскольку в предыдущих исследованиях, где рассматривали отдельное влияние размера микрочастиц и давления гелия (Hamada et al., 2017), показано, что оба фактора оказывают влияние комбинированно, принято решение рассматривать их влияние не по отдельности, а совместно.

При оценке количества точек флюоресценции показано отсутствие достоверных различий между следующими экспериментами: Au20/650 и W50/650; Au20/1100 и Au40/650; Au40/1100 и W50/1100 psi. Между оставшимися группами наблюдали достоверные различия. Наименьшая интенсивность экспрессии репортерного гена получена для сочетания параметров Au20/650 и W50/650 psi, средняя – при сочетании параметров Au40/1100 и W50/1100 psi, а наивысшая – при сочетании параметров Au20/1100 и Au40/650 psi.

При сравнении влияния параметров биобаллистики на эффективность трансформации в предыдущих исследованиях отмечено, что наиболее значимо давление гелия. Этот параметр определяет эффективность доставки частиц в клетки и степень разрушения тканей эксплантов (Chernobrovkina et al., 2007). Отсутствие достоверных различий при параметрах Au20/1100 и Au40/650 psi можно объяснить тем, что в этом случае увеличение давления гелия до 1100 psi делает более эффективной проникновение микрочастиц золота в клетки щитков, а увеличение количества золота в два раза, до 40 мг/мл, компенсирует более низкую эффективность доставки частиц в клетки при сниженном давлении гелия. При этом совместное действие давления

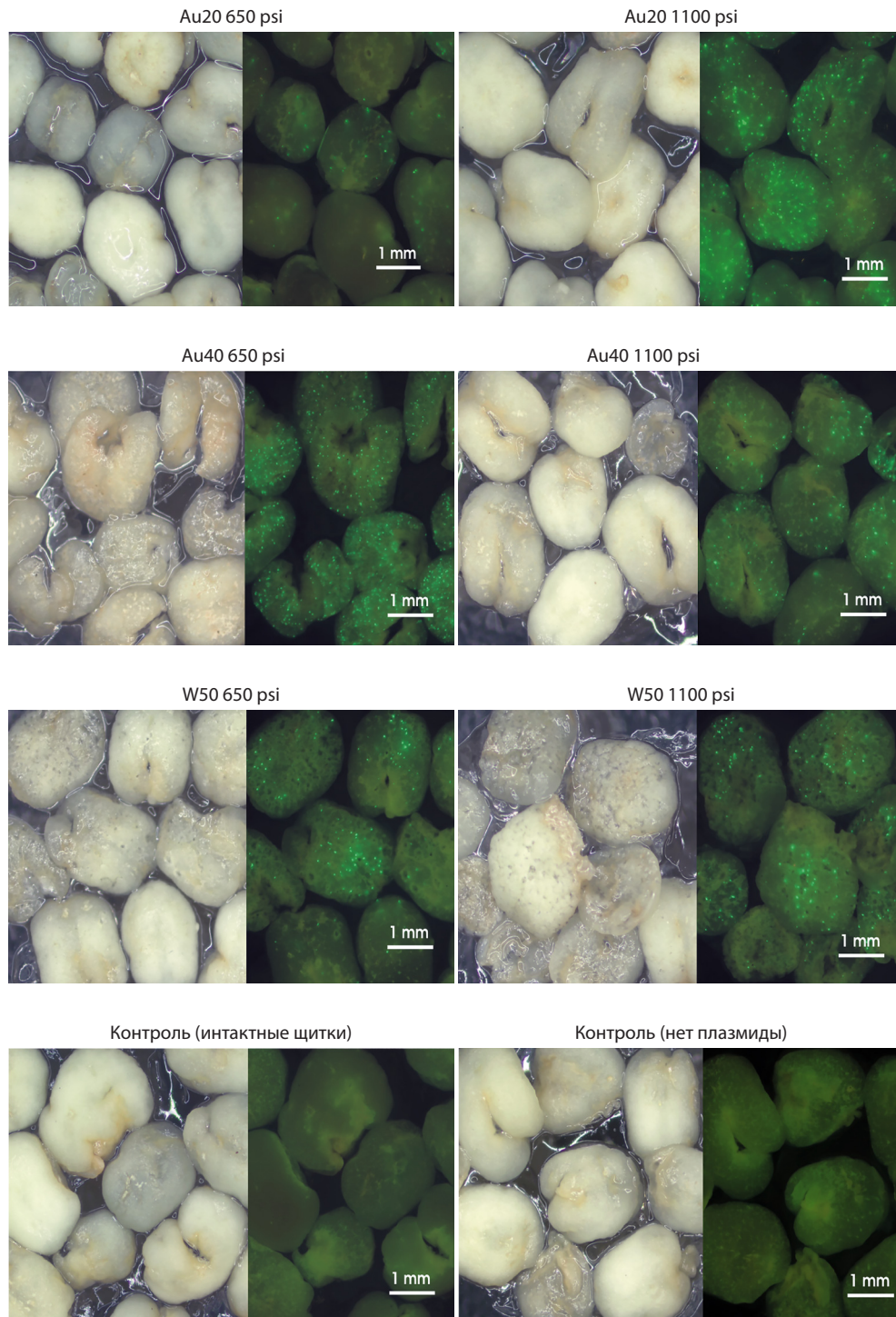


Рис. 1. Микроскопическое изображение щитков после проведенной процедуры биобаллистики. Надпись над каждой парой фотографий отображает сочетание параметров выстрела: Au20 – использованы частицы золота в концентрации 20 мг/мл, Au40 – частицы золота в концентрации 40 мг/мл, W50 – частицы вольфрама в концентрации 50 мг/мл; 650 и 1100 psi – разрывные диски для соответствующего давления гелия. Контрольный выстрел в отсутствие плазмиды проводился при параметрах Au40 и 1100 psi. Левая часть каждой пары фотографий: щитки при световой микроскопии, правая часть – флуоресцентная микроскопия с применением зеленого фильтра. Фотографии правой и левой частей сделаны одновременно

Fig. 1. Microscopic images of the scutellum following biobalistic treatment. The caption above each pair of photographs displays the combination of shot parameters: Au20 – gold particles at a concentration of 20 mg/ml, Au40 – gold particles at 40 mg/ml, W50 – tungsten particles at 50 mg/ml. The labels “650 psi” and “1100 psi” indicate the rupture disks corresponding to the helium pressure. A control shot using Au40 at 1100 psi was performed without a plasmid. In each pair, the left image shows the scutellum under light microscopy, while the right image shows fluorescence microscopy with a green filter. Both images were taken simultaneously

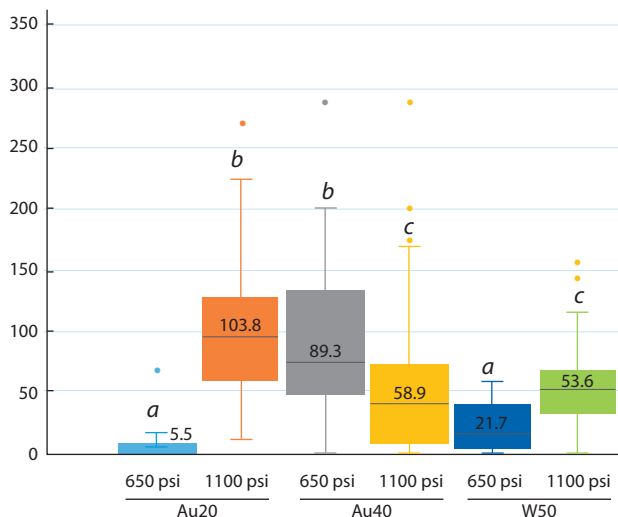


Рис. 2. Результаты статистического анализа ANOVA ($\alpha = 0.05$) для шести экспериментов с различающимися параметрами: материал микрочастиц, концентрация микрочастиц, давление гелия. В каждом ящике указано среднее значение точек флуоресценции на щиток. Величины, достоверно различающиеся при $p < 0.05$, обозначены буквами *a*, *b* и *c* над столбцами. Рассчитанные по критерию Тьюки–Крамера значения *p*-value представлены в табл. 2

Fig. 2. Results of the ANOVA statistical analysis ($\alpha = 0.05$) for six experiments with varying parameters (microcarrier material, microcarrier concentration, helium pressure). The mean number of fluorescence spots per scutellum is indicated in each box. Values that differ significantly ($p < 0.05$) are marked by the letters *a*, *b*, and *c* above the columns. The *p*-values calculated using the Tukey–Kramer test are shown in Table 2

1100 psi и концентрации частиц золота 40 мг/мл понижает эффективность трансформации, что, вероятно, связано с повышением разрушения тканей щитков.

Уровень экспрессии при трансформации частицами вольфрама можно отнести к наименьшему (при давлении 650 psi) и среднему (давление 1100 psi). Тот факт, что применение микрочастиц вольфрама менее эффективно при трансформации зародышевых щитков, объясним тем, что они вызывают большие разрушения тканей щитков (см. рис. 1), кроме того, вольфрам токсичен для тканей растений и вызывает двуцепочечные разрывы молекул ДНК, что может приводить к разрушению ДНК вектора при иммобилизации на частицы (Krysiak et al., 1999). Так, например, в работе М.А. Чернобровкиной и ее коллег (Chernobrovkina et al., 2007) при бомбардировке щитков ячменя частицами вольфрама экспрессия репортерного гена отсутствовала.

Заключение

В нашей работе подобраны оптимальные условия биобаллистики для бомбардировки щитков линии мягкой пшеницы Велут микрочастицами золота диаметром 1 мкм: концентрация 20 мг/мл при давлении гелия 1100 psi и концентрация 40 мг/мл при давлении гелия 650 psi. При этом целесообразнее использовать меньшую концентрацию частиц для удешевления эксперимента и минимизации повреждения ткани экспланта без потери эффективности трансформации.

Список литературы / References

- Агеева Е.В., Леонова И.Н., Лихенко И.Е., Советов В.В. Масса зерна колоса и масса тысячи зерен как признаки продуктивности у сортов яровой мягкой пшеницы разных групп спелости в условиях лесостепи Приобья. *Письма в Вавилонский журнал генетики и селекции*. 2021;7(1):5-11. doi 10.18699/Letters-VJ2021-7-01
- [Ageeva E.V., Leonova I.N., Likhenko I.E., Sovetov V.V. The ear grain weight and the thousand grain weight as productivity traits in varieties of spring bread wheat of different ripening groups in the conditions of the Priob'e steppe. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(1):5-11. doi 10.18699/LettersVJ2021-7-01 (in Russian)]
- Агеева Е.В., Леонова И.Н., Салина Е.А., Лихенко И.Е. Изучение анатомо-морфологических признаков стебля и устойчивости к полеганию сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология*. 2023;16(4):506-521
- [Ageeva E.V., Leonova I.N., Salina E.A., Likhenko I.E. A study of morpho-anatomical traits and lodging resistance in spring bread wheat varieties (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2023;16(4):506-521 (in Russian)]
- Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Stöger E., Vasil I.K. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant Cell Rep.* 1996;16(1-2):12-17. doi 10.1007/BF01275440
- Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Jr. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*. 2016;28(7):1510-1520. doi 10.1105/tpc.16.00196
- Berezhnaya A., Kiseleva A., Leonova I., Salina E. Allelic variation analysis at the vernalization response and photoperiod genes in Russian wheat varieties identified two novel alleles of *Vrn-B3*. *Biomolecules*. 2021;11(12):1897. doi 10.3390/biom11121897
- Chauhan H., Khurana P. Wheat genetic transformation using mature embryos as explants. *Methods Mol. Biol.* 2017;1679:153-167. doi 10.1007/978-1-4939-7337-8_10
- Chen K., Wang Y., Zhang R., Zhang H., Gao C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2019;70:667-697. doi 10.1146/annurev-arplant-050718-100049
- Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 1997;115(3):971-980. doi 10.1104/pp.115.3.971
- Chernobrovkina M.A., Sidorov E.A., Baranov I.A. The effect of the parameters of biolistic transformation of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) on the level of transient expression of *GFP* reporter gene. *Biol. Bull.* 2007;34(6):558-563. doi 10.1134/S1062359007060040
- Fadeev V.S., Blinkova O.V., Gaponenko A.K. Optimization of biological and physical parameters for biolistic genetic transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) using a particle inflow gun. *Russ. J. Genet.* 2006;42(4):402-411. doi 10.1134/S1022795406040077
- Fujii Y., Kodama Y. In planta comparative analysis of improved green fluorescent proteins with reference to fluorescence intensity and bimolecular fluorescence complementation ability. *Plant Biotech.* 2015;32(1):81-87. doi 10.5511/plantbiotechnology.15.0120a
- Hamada H., Linghu Q., Nagira Y. An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Sci. Rep.* 2017;7:11443. doi 10.1038/s41598-017-11936-0
- Ismagul A., Yang N., Maltseva E., Iskakova G., Mazonka I., Skiba Y., Bi H., Eliby S., Jatayev S., Shavrukov Y., Borisjuk N., Langridge P. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions. *BMC Plant Biol.* 2018;18:135. doi 10.1186/s12870-018-1326-1
- Jones H.D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. *J. Cereal Sci.* 2005;41(2):137-147. doi 10.1016/j.jcs.2004.08.009
- Krysiak C., Mazuś B., Buchowicz J. Generation of DNA double-strand breaks and inhibition of somatic embryogenesis by tungsten microparticles in wheat. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1999;58:163-170. doi 10.1023/A:1006303331181

- Lonsdale D., Onde S., Cuming A. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 1990;41(9):1161-1165. doi 10.1093/jxb/41.9.1161
- Matveev A.V., Nartova A.V., Sankova N.N., Okunev A.G. DLgram cloud service for deep-learning analysis of microscopy images. *Microsc. Res. Tech.* 2024;87(5):991-998. doi 10.1002/jemt.24480
- Miroshnichenko D., Filippov M., Dolgov S. Genetic transformation of Russian wheat cultivars. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2007;21(4):399-402. doi 10.1080/13102818.2007.10817482
- Miroshnichenko D.N., Poroshin G.N., Dolgov S.V. Genetic transformation of wheat using mature seed tissues. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2011;47:767-775. doi 10.1134/S0003683811080096
- Miroshnichenko D., Ashin D., Pushin A., Dolgov S. Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum* L.), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnol.* 2018;18:68. doi 10.1186/s12896-018-0477-3
- Miroshnichenko D.N., Klementyeva A.A., Salina E.A., Dolgov S.V. Evaluation of *in vitro* plant regeneration efficiency in Siberian wheat cultivars. In: Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. Proceedings of the Fifth International Scientific Conference PlantGen-2019. Novosibirsk, 2019;126-128. doi 10.18699/ICG-PlantGen2019-40
- Miroshnichenko D., Klementyeva A., Pushin A., Dolgov S. A competence of embryo-derived tissues of tetraploid cultivated wheat species *Triticum dicoccum* and *Triticum timopheevii* for efficient and stable transgenesis mediated by particle inflow gun. *BMC Plant Biol.* 2020;20(Suppl. 1):442. doi 10.1186/s12870-020-02580-4
- Pang S.Z., DeBoer D.L., Wan Y., Ye G., Layton J.G., Neher M.K., Armstrong C.L., Fry J.E., Hinchee M.A., Fromm M.E. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant Physiol.* 1996;112(3):893-900. doi 10.1104/pp.112.3.893
- PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System Instruction Manual. [https://www.biorad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsl/literature/10000070900.pdf]
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Barcelo P., Lazzeri P.A. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep.* 1999;19:118-127. doi 10.1007/s002990050721
- Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannell M., Barcelo P., Lazzeri P.A. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *J. Exp. Bot.* 2001;52(357):865-874. doi 10.1093/jxb/52.357.865
- Russell B.C., Torralba A., Murphy K.P., Freeman W.T., LabelMe: a database and web-based tool for image annotation. *Int. J. Comput. Vis.* 2008;77(1-3):157-173. doi 10.1007/s11263-007-0090-8
- Sanford J.C., Smith F.D., Russell J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 1993;217:483-509. doi 10.1016/0076-6879(93)17086-k
- Souza C., Eduardo D., Fettig S., Ziegler P., Beck E. Transformation of an Argentine spring wheat genotype: optimization of the protocols for particle bombardment of excised immature embryos and rapid isolation of transgenic plants. *BAG. J. Basic Appl. Genet.* 2015;26(1):18-37
- Sparks C.A., Doherty A. Genetic transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) using biolistics. *Methods Mol Biol.* 2020;2124:229-250. doi 10.1007/978-1-0716-0356-7_12
- Tian B., Navia-Urrutia M., Chen Y., Brungardt J., Trick H.N. Biolistic transformation of wheat. *Methods Mol. Biol.* 2018;1864:117-130. doi 10.1007/978-1-4939-8778-8_9
- Vasil V., Castillo A., Fromm M., Vasil I.K. herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Nat. Biotechnol.* 1992;10:667-674. doi 10.1038/nbt0692-667
- Wada K. Labelme: Image Polygonal Annotation with Python [Computer software]. 2021. doi 10.5281/zenodo.5711226
- Wan Y., Lemaux P.G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiol.* 1994;104(1):37-48. doi 10.1104/pp.104.1.37
- Wang Y., Zeng J., Su P., Zhao H., Li L., Xie X., Zhang Q., Wu Y., Wang R., Zhang Y., Yu B., Chen M., Wang Y., Yang G., He G., Chang J., Li Y. An established protocol for generating transgenic wheat for wheat functional genomics via particle bombardment. *Front. Plant Sci.* 2022;13:979540. doi 10.3389/fpls.2022.979540
- Yao Q., Cong L., He G.Y., Chang J.L., Li K.X., Yang G.X. Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency. *Mol. Biol. Rep.* 2007;34(1):61-67. doi 10.1007/s11033-006-9016-8
- Zhang K., Liu J., Zhang Y., Yang Z., Gao C. Biolistic genetic transformation of a wide range of Chinese elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *J. Genet. Genomics.* 2015;42(1):39-42. doi 10.1016/j.jgg.2014.11.005

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.09.2024. После доработки 05.11.2024. Принята к публикации 18.11.2024.