

На правах рукописи



Гумерова Гульнар Рафиловна

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ
КУЛЬТУР КОРНЕЙ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (ФГБНУ ИБГ УФИЦ РАН), Уфа.

Научный руководитель: **Кулуев Булат Разяпович**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник ИБГ УФИЦ РАН

Официальные оппоненты: **Дейнеко Елена Викторовна**, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник ФИЦ Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН

Халилуев Марат Рушанович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией клеточной инженерии растений ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии

Ведущая организация: «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения РАН

Защита состоится «21» февраля 2019 г. в «11» часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 678-54-20

Электронная почта: m-azarkovich@mail.ru, ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Автореферат разослан « » декабря 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Азаркович
Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Растения играют огромную роль в жизни человека, благодаря их способности производить разнообразные вещества с выраженной прикладной направленностью, причем это могут быть как первичные, так и вторичные метаболиты, которые получают из целого растения или его части с использованием различных методов экстракции (Huie, 2002). Поиски новых биотехнологических подходов для продукции полезных соединений также во многом обусловлены ограниченностью запасов растительного сырья и трудностями разработки путей химического синтеза многих природных соединений.

Метод культивирования трансгенных бородатых корней (hairy roots) раскрывает новые аспекты технологии культивирования органов для синтеза, накопления и регуляции производства вторичных метаболитов, благодаря их способности к быстрому росту в недорогой культуральной среде без фитогормонов и возможности длительного культивирования. Более того, культура hairy roots и растения, регенерировавшие из этих бородатых корней, в отличие от суспензионной клеточной или каллусной культур, отличаются своей цитогенетической, морфологической и биохимической стабильностью (Roychowdhury *et al.*, 2017). Также существует большое количество исследований, в которых показано, что содержание вторичных метаболитов в культуре hairy roots может быть таким же, либо намного превышать их концентрацию, чем в материнских растениях (Kim *et al.*, 2002; Kiselev *et al.*, 2007; Murthy *et al.*, 2008; Esam, 2011; Al-Shalabi *et al.*, 2014). Кроме того, эта система позволяет производить некоторые биологически активные соединения, которые путем химического синтеза получить практически невозможно (Giri, Narasu, 2000).

Несмотря на огромное количество исследований в этой области, многие аспекты взаимодействия *Agrobacterium rhizogenes* с растительной клеткой, молекулярные механизмы переноса и интеграции T-ДНК до конца не изучены. Наиболее полно описаны в основном только морфологические изменения, вызываемые *rol*-генами по отдельности и в сочетании друг с другом. Однако еще нет полного и однозначного представления о структуре каждого из генов, биохимических функциях, о регуляции их активности, о происхождении и эволюции этих генов (Mauro *et al.*, 2017). В настоящее время для изучения строения и функций *rol*-генов, особенностей взаимодействия *A. rhizogenes* с растениями и возможностей практического использования разрабатываются новые подходы получения культуры бородатых корней у различных видов растений. Главными недостатками существующих методик является довольно трудоемкий и долгий процесс последующего избавления от агробактерий и большая зависимость эффективности трансформации от штамма *A. rhizogenes* и вида инфицируемого растения. Более того, эти методы в основном подходят только для трансформации двудольных растений, тогда как у однодольных и голосеменных растений такими способами получить

бородатые корни весьма затруднительно и чаще всего невозможно. Вместе с тем известны несколько работ по успешной трансформации некоторых представителей голосеменных (McAfee *et al.*, 1993; Magnussen *et al.*, 1994; Mihaljevic *et al.*, 1996) и злаковых (Lee *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2006; Aguado-Santacruz *et al.*, 2009). В связи с существующими ограничениями агробактериальной трансформации возникает необходимость использования других более универсальных подходов, подразумевающих прямой перенос генов без участия *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Одним из таких перспективных методов генетической модификации может стать биобаллистическая трансформация *rol*-генами, которая позволит обойти зависимость эффективности трансформации от штамма *A. rhizogenes* и от вида инфицируемого растения. Помимо этого, имеется огромное множество видов растений, например, лекарственное растение *Withania somnifera*, тропическое дерево *Parasponia andersonii*, способное вступать в уникальный вариант симбиоза с ризобиями, а также каучуконосные одуванчики *Taraxacum kok-saghyz* и *Taraxacum hybernum*, получение культур бородатых корней которых является перспективным направлением, как с точки зрения фундаментальной науки, так и для прикладных целей.

Цель работы: оптимизация способов индукции культур бородатых корней модельных и хозяйственно-ценных растений и изучение их физиологических характеристик.

Основные задачи исследования:

1. Подобрать оптимальные условия индукции бородатых корней для *Withania somnifera*, *Parasponia andersonii*, *Taraxacum kok-saghyz* и *Taraxacum hybernum*;
2. Провести скрининг нуклеотидных последовательностей фрагмента Т-ДНК известных штаммов *A. rhizogenes* и получить модифицированный линейный ампликон, содержащий все 4 *rol*-гена;
3. Испытать метод биобаллистической трансформации линейной ДНК, содержащей все 4 *rol*-гена, на модельном объекте *Nicotiana tabacum* и на представителе однодольных *Triticum aestivum*;
4. Изучить физиологические характеристики линий адвентивных корней, полученных с использованием различных методов.

Научная новизна работы. Впервые получены бородатые корни кок-сагыза и крым-сагыза с использованием метода укалывания пастой из *A. rhizogenes* в область подсемядольного колена, а также было показано, что такие культуры hairy roots растений рода *Taraxacum* могут быть альтернативными источниками натурального каучука. Подобраны оптимальные условия для более эффективной трансформации витании с целью получения бородатых корней и выделения вторичных метаболитов. Впервые была получена культура hairy roots параспонии, несущая ген лектина гороха *PSL*, которая может быть использована в качестве модельного объекта при изучении азотфиксирующего симбиоза с бактериями *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*. Был

предложен способ безбактериальной и безплазмидной трансформации листовых дисков табака с помощью бомбардировки золотыми частицами, содержащими линейный ампликон размером 5461 п.н., состоящий только из генов *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Культуры hairy roots, полученные в ходе диссертационного исследования, имеют как теоретическое, так и практическое значение в физиологии и биотехнологии растений. Так, показано, что бородатые корни витании могут стать хорошей альтернативой целым растениям этого вида для продуцирования витанолидов. Культуры hairy roots кок-сагыза и крым-сагыза могут быть использованы для продуцирования натурального каучука, а также как промежуточный этап при получении их трансгенных форм. В ходе морфологического исследования и ОТ-ПЦР анализа адвентивных корней табака, полученных различными методами, была обнаружена положительная корреляция уровня экспрессии трансгена *rolC* и хозяйского гена *CDKB1-1* с быстрым ростом hairy roots табака. Предложенный нами способ биобаллистической трансформации линейным ампликоном, содержащим все 4 *rol*-гена и фланкированный T-границами *A. rhizogenes*, позволяет индуцировать бородатые корни у модельного объекта табака. Данный подход может быть использован как основа для дальнейших работ по разработке универсальных способов индукции культуры hairy roots, в том числе у видов растений, не поддающихся классической агробактериальной трансформации.

Методология и методы исследования. Методологическую основу данного исследования составил системный подход с применением методов генетической инженерии, физиологии и биохимии растений, статистики, а также анализ данных отечественной и зарубежной литературы.

При проведении исследования и изложения материала были применены общенаучные методы: теоретический и методологический анализ литературных источников, экспериментальные методы исследования и сравнительный анализ полученных данных. Использованные методы и статистическая обработка экспериментального материала позволили обеспечить объективность полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Культуры бородатых корней витании и каучуконосных одуванчиков, полученные методом агробактериальной трансформации, могут быть использованы для продуцирования ценных вторичных метаболитов: витанолидов и натурального каучука, соответственно.

2. Культура hairy roots табака характеризуется повышенной экспрессией гена циклин-зависимой протеинкиназы *CDKB1-1* и агробактериального гена *rolC*.

3. Бородатые корни могут быть получены путем биобаллистической трансформации с использованием линейного ампликона, содержащего 4 *rol*-гена *Agrobacterium rhizogenes*.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных в ходе исследования результатов подтверждена применением современных методов генетической инженерии, биохимии и физиологии растений, а также объемом проведенной работы. Для интерпретации и анализа полученных результатов привлечено достаточное количество данных литературы (290 источников). Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов.

Материалы диссертации были представлены на Международной конференции «Эколого-генетические основы современных агротехнологий» (г. Санкт-Петербург, 2016), на VIII Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (г. Саратов, 2016), на VI Всероссийском симпозиуме «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» (г. Москва, 2016), на 18-й научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (г. Москва, 2018) и на международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Уфа, 2018).

Личный вклад автора в проведенные исследования. Определение направления диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем д.б.н. Кулуевым Б.Р. Автором самостоятельно изучена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикациям по диссертационной теме и их написании. Основная часть экспериментальной работы выполнена автором самостоятельно.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа «Физиологические характеристики трансформированных различными способами культур корней» соответствует формуле специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» и охватывает исследования в области интенсификации растениеводства (в частности, роста корней), получения трансгенных растений с хозяйственно-ценными признаками, технологии получения важных продуктов на основе изолированных растительных клеток и тканей. Биотехнология растений способствует сохранению ресурсов природных растений и генетических ресурсов растений. В ходе диссертационного исследования получены культуры бородатых корней хозяйственно-ценных видов растений, таких как витания, кок-сагыз и крым-сагыз, которые могут быть использованы для выделения целевых вторичных метаболитов. А также показана возможность использования линейной ДНК, содержащей все 4 *rol*-гена, для получения, как бородатых корней, так и новых трансгенных растений с хозяйственно-ценными признаками.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ, и 4 статьи в журналах, индексируемых в базе данных Scopus.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах, содержит 7 таблиц и 20 рисунков. Включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты и их обсуждение (глава 3), заключение, выводы и список литературы (290 источников).

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для опытов по индукции бородатых корней методом совместного культивирования с *Agrobacterium rhizogenes* были использованы штаммы А4 и 15834, а также стерильные части растений *Withania somnifera* L. Dunal, *Parasponia andersonii* Planch, *Taraxacum kok-saghyz* Rodin и *Taraxacum hybernum* Steven. В качестве объектов исследования для биобаллистической трансформации явились листовые экспланты *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1, каллусные культуры из незрелых зародышей *Triticum aestivum* L. сорта Радуга.

Для выделения целевых генов использовали тотальную ДНК *A. rhizogenes* штамма А4. Для наработки участка ДНК с *rol*-генами в необходимом количестве применяли LR-полимеразу и вектор pAL-TA для быстрого клонирования продуктов ПЦР.

В работе были использованы различные методы генетической инженерии, физиологии и биохимии растений: выделение растительной и бактериальной тотальной ДНК, выделение плазмидной ДНК, выделение РНК и построение первой цепи кДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ОТ-ПЦР в реальном времени, аналитический электрофорез ДНК в агарозном геле, расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами, химическая трансформация компетентных клеток *E. coli*, компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей, автоматическое секвенирование ДНК ферментативным методом, различные способы стерилизации семян и листьев растений, выделение изолированных зародышей и индукция каллусов у мягкой пшеницы, получение ауксин-индуцированных адвентивных корней табака, агробактериальная и биобаллистическая трансформация растений, а также статистическая обработка полученных результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция бородатых корней *Withania somnifera*

W. somnifera (Витания снотворная, Ашваганда) является лекарственным растением, которое широко используется в традиционной медицине и в качестве биологически активной добавки благодаря своему уникальному составу. Наибольшую ценность для фармацевтической промышленности представляют вторичные метаболиты с выраженными противораковыми свойствами: витанолид А и

витаферин А (Ichikawa *et al.*, 2006). Химически синтезировать эти вещества пока не удалось, в связи с чем их выделяют из целого растения. Культуры бородатых корней витании, сверхпродуцирующие ценные метаболиты, могут стать альтернативными источниками лекарственных соединений, что позволит уменьшить себестоимость и потребление природного сырья. Агробактериальная трансформация витании разными исследователями выявила большую зависимость эффективности трансформации от типа выбранного экспланта и штамма *A. rhizogenes* (Murthy *et al.*, 2008; Saravanakumar *et al.*, 2012). В связи с вышесказанным, актуальным является определение эффективности трансформации витании и для других штаммов *A. rhizogenes*, в частности для штаммов А4 и 15834.

В качестве объекта трансформации нами были выбраны семядольные листья *W. somnifera*, полученные спустя 75 дней после посева семян, каждый из которых разрезали на две части. Культура hairy roots витании была получена в результате укалывания по центральной жилке несколько раз иглой инсулинового шприца, обмакиваемой в инокулюме, и последующей сокультивации с агробактериями на твердой среде МС, обогащенной добавлением 120 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой кислоты. Спустя 13 дней после совместного культивирования с агробактериями наблюдали появление предполагаемых бородатых корней витании. Эффективность трансформации составила 70% для штамма А4 и 60% для штамма 15834, причем во втором случае новые бородатые корни продолжали формироваться в течение как минимум пяти месяцев, тогда как при использовании штамма А4 новые корни продолжали образовываться только в течение первого месяца. Культуры бородатых корней (рис. 1А) различались по фенотипическим признакам, что может быть связано с местом встраивания в геном витании и как следствие различной экспрессией генов Т-ДНК.

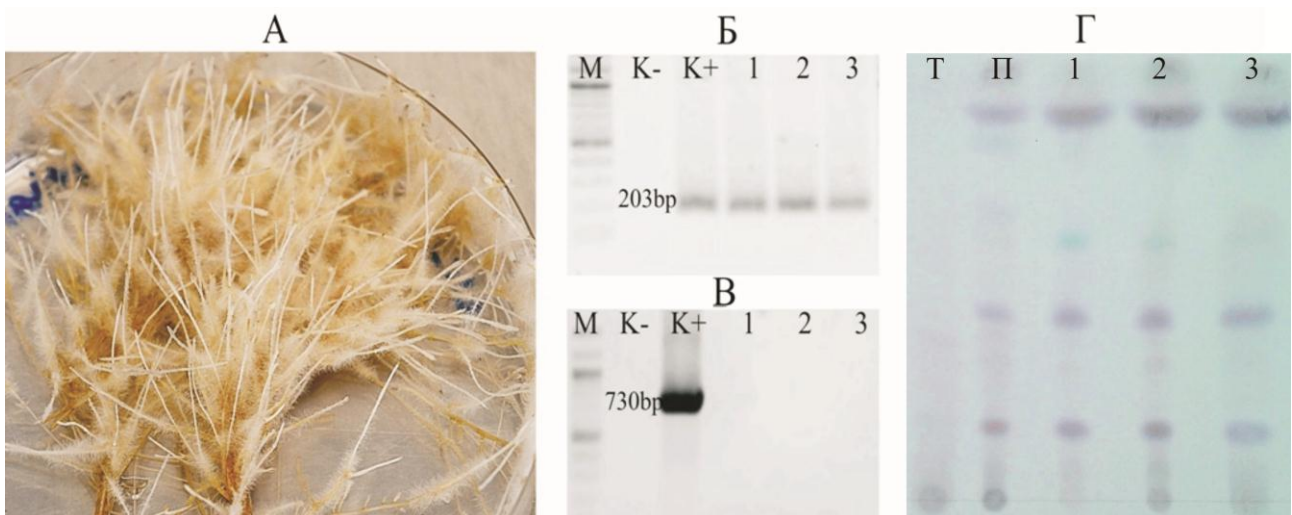


Рисунок 1. Культура hairy roots витании (А), ПЦР анализ на присутствие в геноме генов *rolA* (Б) и *virC* (В) и результаты восходящей тонкослойной хроматографии (Г) трех линий корней (Т – таблетированная и П – порошкообразная форма аптечного препарата витании).

ПЦР-анализ на присутствие *rol*-генов оказался положительным (рис. 1Б), в то время как агробактериальная контаминация не обнаруживалась (рис. 1В). Показатели эффективности трансформации оказались выше, чем в большинстве аналогичных исследований (Murthy *et al.*, 2008; Saravanakumar *et al.*, 2012), что может быть связано с использованием обогащенной среды МС, методологическими различиями в процессе трансформации и примененными в работе штаммами агробактерий, эффективность которых могла оказаться выше. Результаты восходящей тонкослойной хроматографии (рис. 1Г) подтвердили присутствие вторичных метаболитов в бородачатых корнях витании идентичных аптечному препарату в порошкообразной форме.

Получение бородачатых корней *Parasponia andersonii*

Тропические деревья *P. andersonii* являются единственными известными небобовыми древесными растениями, формирующими эффективный азотфиксирующий симбиоз с *Bradyrhizobium* и *Rhizobium* (Akkermans *et al.*, 1978; Becking, 1983; Trinick, Nadobas, 1988). Культуры hairy roots параспонии и полученные из них трансгенные растения-регенеранты могут стать уникальной модельной системой для изучения молекулярных и физиологических особенностей симбиоза *Parasponia* с *Rhizobium* (Кныазев *et al.*, 2017). Однако методы индукции hairy roots параспонии до сих пор остаются большей частью неразработанными. Лишь в работе Cao *et al.* (2012) авторам с помощью опосредованной *A. rhizogenes* трансформации удалось получить композитные растения *Parasponia*, корни которых содержали репортерный ген красного флюоресцентного белка DsRed1.

В нашей работе в качестве гена-мишени был использован ген *PSL* лектина *Pisum sativum*, позитивно регулирующий специфичность бобово-ризобиального симбиоза (Diaz *et al.*, 1995). Трансформацию проводили с использованием штамма А4 *A. rhizogenes*, несущего бинарный вектор pCambia 1301 с репортерным геном *GUS* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV), а также селективный ген *hpt*, придающий устойчивость к антибиотику гигромицину и целевой ген *PSL*.

Для агробактериальной трансформации были использованы стеблевые (без листьев) экспланты *in vitro* растений *P. andersonii*, которые пропитывали в суспензии *A. rhizogenes* в течение часа и переносили на твердую (0.8% агар) среду WPM (woody plant medium) для дальнейшей сокультивации в течение 3 суток при температуре 22°C в темноте. В отдельных экспериментах для усиления эффективности трансформации при инокуляции в суспензии агробактерий использовали кристаллы карбида кремния (silicon carbide whiskers – SCW). Принцип их использования основан на том, что игольчатые кристаллы при перемешивании с растительными эксплантами прокалывают целлюлозные оболочки, благодаря чему Т-ДНК агробактерии эффективнее проникает в клетки и может интегрироваться в растительный геном.



Рисунок 2. Агробактериальная трансформация *P. andersonii*: А – предполагаемые бородачатые корни параспонию спустя 25 дней после сокультивации; Б – культура hairy roots *P. andersonii*; В – гистохимический анализ полученных бородачатых корней.

На 25-й день после сокультивации в суспензии *A. rhizogenes* наблюдали появление адвентивных корней (рис. 2А) преимущественно на местах порезов. Эффективность трансформации определяли спустя 40 дней после агробактериальной сокультивации на основе гистохимического окрашивания и устойчивости к гигромицину. GUS анализ выделенных клонов hairy roots показал, что эффективность котрансформации и появление GUS⁺ бородачатых корней значительно увеличивается, если инокуляцию эксплантов проводить совместно с использованием SCW (таблица 1).

Таблица 1. Эффективность трансформации эксплантов *P. andersonii* штаммом А4 (pCambia 1301/PSL) *A. rhizogenes*

	Количество GUS ⁺ клонов (%)	Количество GUS ⁺ и Hyg ⁺ клонов (%)
Контроль	0±0	0±0
Инокуляция	26.7±2.8	87.5±9.5
Инокуляция + SCW	43.3±4.1*	91.7±8.3

* $p < 0.05$

Полученные данные вероятнее всего связаны с тем, что кристаллы карбида кремния в результате механического прокалывания клеточной стенки улучшают проникновение агробактериальных белков с Т-ДНК в цитоплазму растительной клетки. Таким образом, в данном случае использование игольчатых кристаллов значительно повысило эффективность трансформации в результате совместной инокуляции в суспензии агробактерий.

ПЦР анализ 5 образцов, демонстрирующих наиболее высокие показатели GUS-экспрессии и выживаемости на селективной среде, подтвердил присутствие целевого гена *PSL* лектина гороха посевного, *rol*-генов и отсутствие агробактериальной

контаминации (рис. 3). Таким образом, предложенный подход индукции бородатых корней методом сокультивации в суспензии *A. rhizogenes* с добавлением игольчатых кристаллов карбида кремния является эффективным для древесного растения *P. andersonii*. Полученная культура hairy roots параспонии может быть использована в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов симбиоза *Parasponia* и *Rhizobium*.

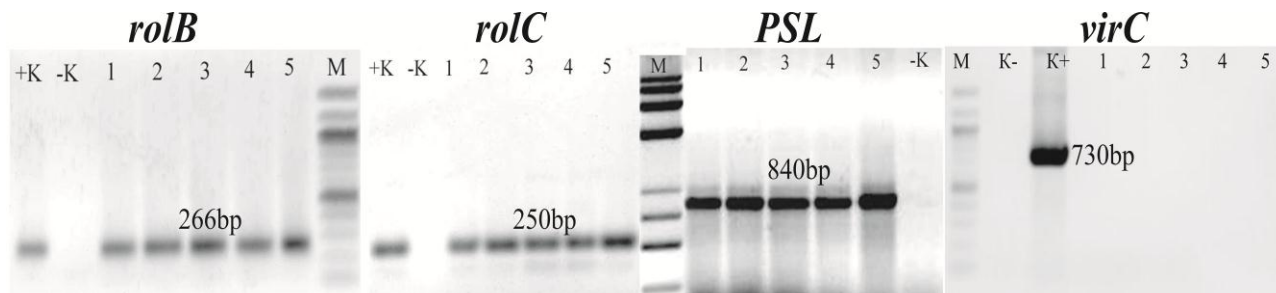


Рисунок 3. ПЦР-анализ 5 линий бородатых корней *P. andersonii* (+К – ДНК *A. rhizogenes*, -К – отрицательный контроль (вода), 1-5 – анализируемые линии корней параспонии, М – маркер молекулярной массы).

Агробактериальная трансформация *Taraxacum kok-saghyz* и *Taraxacum hybernum*

T. kok-saghyz (русский одуванчик, кок-сагыз) и *T. hybernum* (одуванчик осенний, крым-сагыз) являются наиболее перспективными источниками натурального каучука в зоне умеренного климата (Kuptsov, 1942; Kuluev *et al.*, 2015; McAssey *et al.*, 2016). Масштабное выращивание этих растений представляет огромный коммерческий интерес в качестве возобновляемого источника каучука для различных отраслей промышленности. В мире на сегодняшний день наблюдается высокий уровень интереса к возможности получения культур бородатых корней кок-сагыза и других видов одуванчиков для продуцирования натурального каучука.

Для генетической трансформации с помощью агробактерий были использованы трехнедельные *in vitro* растения, полученные в результате проращивания стерильных семян, а также штаммы А4 и 15834 *A. rhizogenes*. Было предложено 3 способа инфицирования почвенными бактериями. В первом случае, черешки стерильных растений выдерживали в суспензии агробактерий в течение 30 минут. Во втором случае, на интактных стерильных растениях кок-сагыза и крым-сагыза производили укол пастой из *A. rhizogenes* в область подсемядольного колена и переносили в чашки Петри. В третьем случае, у *in vitro* растений были удалены корни и такие экспланты, содержащие только надземные части, были погружены вертикально в твердую среду МС, на поверхности которой находилась суспензия агробактерий. Во всех случаях после трехсуточного совместного культивирования экспланты переносили на безгормональную среду МС с добавлением 400 мг/л цефотаксима. В контрольных

экспериментах проводили аналогичные манипуляции с эксплантами без использования агробактериальной суспензии.

Таблица 2. Эффективность агробактериальной трансформации *T. kok-saghyz* и *T. hybernum* на основе анализа GUS активности

Вид растения	Штамм <i>A. rhizogenes</i>	Эффективность трансформации, %		
		1й способ	2й способ	3й способ
<i>T. kok-saghyz</i>	A4	0±0	65.0±8.8*	19.6±7.1
	15834	0±0	45.6±5.2*	10.0±6.1
<i>T. hybernum</i>	A4	0±0	81.7±10.7*	36.1±7.4*
	15834	0±0	83.3±16.7*	3.1±3.0

* $p < 0.05$

Генетическая трансформация оказалась более эффективной только в случаях, когда были использованы интактные растения кок-сагыза и крым-сагыза. По результатам анализа GUS активности эффективность трансформации кок-сагыза с использованием штамма A4 составила 65.0±8.8%, а при инфекции штаммом 15834 оказалась равна 45.6±5.2%. Эффективность трансформации крым-сагыза во втором случае для обоих штаммов оказалась примерно одинаковой и наиболее высокой – около 80% (таблица 2). Гистохимический анализ (рис. 4Б, Г) также был подтвержден методом ПЦР на наличие агробактериальных онкогенов (рис. 5).



Рисунок 4. Бородатые корни кок-сагыза (А) и крым-сагыза (В) и их гистохимический анализ (Б, Г соответственно).

При трансформации третьим способом выявились различия в вирулентности штаммов для *T. hybernum*: штамм A4 оказался в 10 раз эффективнее штамма 15834 (таблица 2), что также было ранее показано на аналогичных исследованиях на одуванчике лекарственном *Taraxacum officinale* (Mahesh, Jeyachandran, 2011). На контрольных растениях наблюдали появление адвентивных корней на 7-10 дней после поранения без использования агробактериальной пасты, однако их гистохимический и ПЦР-анализ были отрицательными. Морфологические признаки и скорость роста адвентивных корней контрольных и инфицированных образцов достоверно не различались.

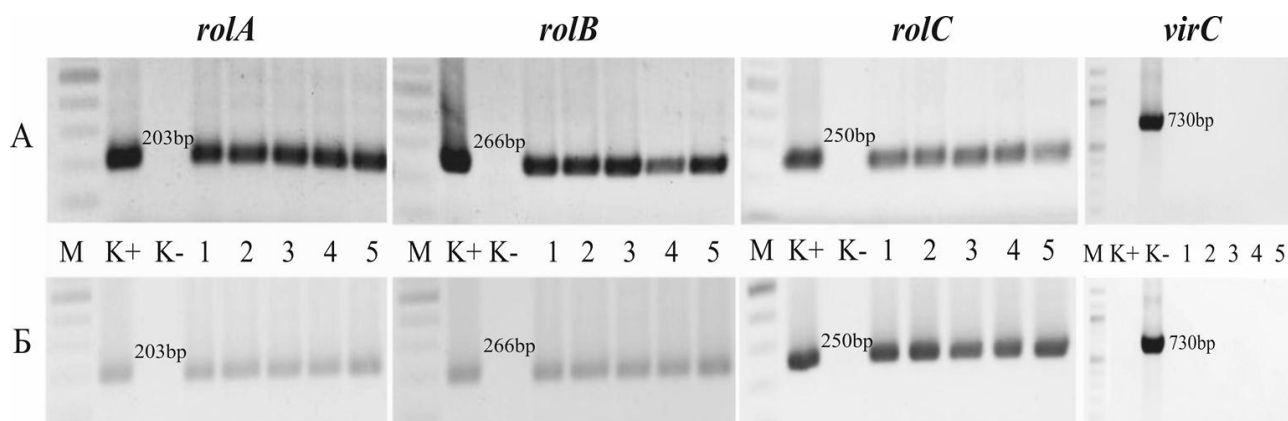


Рисунок 5. ПЦР анализ пяти линий бородатых корней кок-сагыза (А) и крым-сагыза (Б) на присутствие в геноме *rol*-генов и на агробактериальную контаминацию (*virC*).

Культуры бородатых корней кок-сагыза и крым-сагыза, растущие на безгормональной среде, характеризовались активным возникновением точек регенерации, из которых впоследствии появились целые растения. Гистохимический анализ GUS активности листьев подтвердил трансгенную природу регенерировавших растений. Этот факт указывает на принципиальную возможность регенерации трансгенных растений кок-сагыза и крым-сагыза с целевыми признаками. Подбор оптимальных условий культивирования позволит с более высокой эффективностью регенерировать целые растения *T. kok-saghyz* и *T. hybernum*.

Анализ полученных культур бородатых корней кок-сагыза и крым-сагыза показал, что они накапливают в среднем до 7.8% и 5.5% гексанового экстракта к сухой массе корней в зависимости от линии, соответственно, что в среднем сопоставимо с содержанием каучука в корнях этих видов одуванчиков дикого типа.

Изучение последовательностей нуклеотидов Т-ДНК штаммов *A. rhizogenes* и получение целевого ампликона для биобаллистической трансформации

Результаты наших исследований подтвердили основные недостатки агробактериальной трансформации: была выявлена большая зависимость эффективности трансформации от вида растения, типа экспланта и штамма *A. rhizogenes*. Для преодоления этих природных ограничений могут быть предложены прямые методы доставки генов, позволяющие обойти естественную невосприимчивость растений к заражению и часть природных ограничений *A. rhizogenes*, связанных с преодолением клеточной стенки, плазматической и ядерной мембран. Одним из таких перспективных методов является биобаллистическая трансформация растений при помощи генной пушки.

В рамках разработки нового подхода получения бородатых корней у труднотрансформируемых видов путем биобаллистической трансформации нами был проведен сравнительный анализ последовательностей Т-ДНК различных штаммов *A. rhizogenes*, имеющих в базе данных GenBank (NCBI), с помощью пакета

компьютерных программ MegAlign (DNASTAR Inc.), который показал достаточно высокую гомологию этих участков. Полученные результаты позволили нам подобрать оптимальные праймеры к области внутри T-ДНК, содержащей последовательно расположенные *rol*-гены.

Для экспериментов по биобаллистической трансформации было решено использовать линейную ДНК в виде ампликона, содержащего все 4 *rol*-гена: *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*. Следует отметить, что в литературе отсутствует информация об использовании такого варианта участка T-ДНК для получения бородачатых корней. А добавление к целевому ампликону последовательностей правой и левой границ T-ДНК *A. rhizogenes*, участвующих в процессе встраивания посредством гомологичной рекомбинации, возможно, повысит эффективность трансформации.

В связи с вышесказанным, с тотальной ДНК штамма А4 *A. rhizogenes* при помощи LR Plus полимеразы был получен ампликон размером 5401 п.н., содержащий все *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* гены. Для добавления в ампликон последовательностей правой и левой границ T-ДНК *A. rhizogenes* проводили реамплификацию при помощи других модифицированных праймеров. Схема получения ампликона, содержащего все *rol*-гены и T-границы, представлена на рисунке 6.

Электрофоретический анализ (рис. 7) показал, что размер ампликона *rol*-генов с T-границами соответствует теоретически ожидаемому (5461 п.н.). Секвенирование данного участка подтвердило его соответствие исследуемому участку T-ДНК и отсутствие нуклеотидных замен.

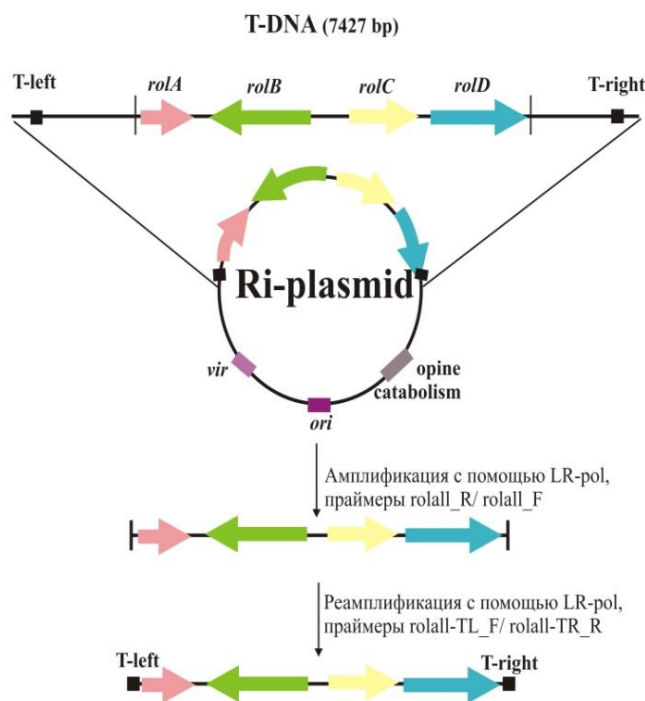


Рисунок 6. Схема получения ампликона для биобаллистической трансформации с T-границами (■) *A. rhizogenes*.

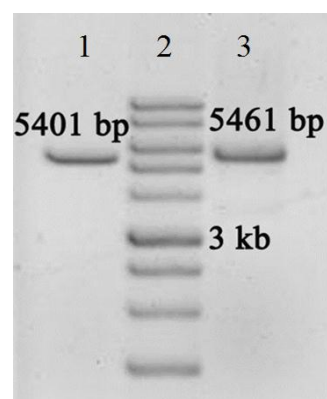


Рисунок 7. Электрофоретический анализ целевых ампликонов: 1 – ампликон, содержащий все 4 *rol*-гена; 2 – маркер молекулярной массы; 3 – ампликон с *rol*-генами, фланкированный T-границами *A. rhizogenes*.

Биобаллистическая трансформация табака с помощью модифицированного ампликона, содержащего *rol*-гены

Биобаллистическая трансформация является одним из перспективных методов прямого введения ДНК, благодаря которому появляется возможность преодоления существующих природных ограничений *A. rhizogenes* и получения культуры hairy roots у видов растений, трудно поддающихся классической агробактериальной трансформации. В первом эксперименте по бомбардировке в качестве модельного объекта были использованы листовые экспланты табака.

Через 7-15 дней культивирования на отдельных листовых эксплантах начали появляться предполагаемые бородачатые корни. В работе было использовано 150 листовых дисков, на которых было получено 29 адвентивных корней. На контрольных 40 эксплантах табака подвергнутых такой же бомбардировке, но без добавления ДНК, наблюдали один случай ризогенеза. Скорее всего, это спонтанное явление стало реакцией растительного экспланта на механические повреждения в результате бомбардировки золотыми частичками.

Фенотипические особенности и скорость роста полученных линий корней широко варьировали, можно было предполагать, что это зависело от количества копий Т-ДНК и места встраивания в геном растений. Для подтверждения наличия в геноме полученных корней *rol*-генов провели ПЦР-анализ (рис. 8) с праймерами к фрагменту *rolB* гена, так как этот ген считается ключевым в образовании бородачатых корней (Nilsson, Olsson, 1997). Для анализа было использовано только 20 линий корней, так как остальные 9 линий прекратили свой рост уже на второй неделе после их возникновения.

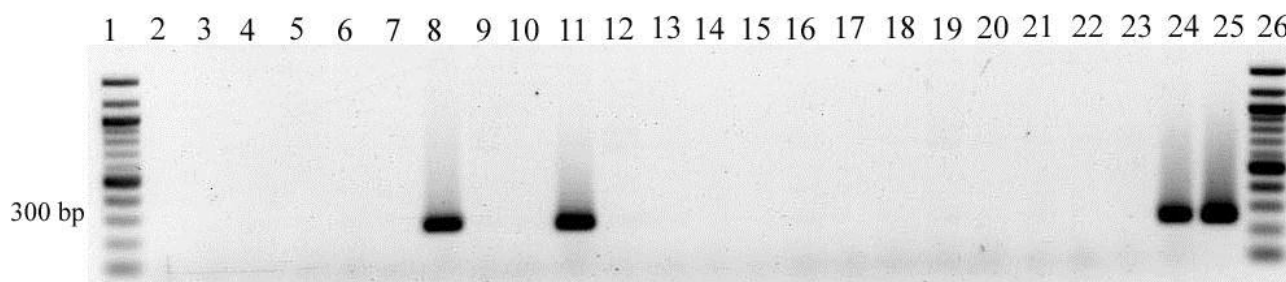


Рисунок 8. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа адвентивных корней, индуцированных после биобаллистической трансформации: 1, 26 – маркер молекулярной массы; 2-21 – 20 линий предполагаемых бородачатых корней; 22 – отрицательный контроль (вода); 23 – ДНК нетрансгенного табака; 24 – ДНК истинных бородачатых корней табака (плюс-контроль); 25 – ДНК *A. rhizogenes* (плюс-контроль).

По результатам ПЦР-анализа выяснилось, что только 2 линии содержат ген *rolB* (рис. 8), то есть эффективность трансформации составила 1.3%. Можно предполагать, что остальные корни имеют морфологические признаки бородачатых корней, вследствие транзientной экспрессии *rol*-генов. Таким образом, для 18 линий

корней стабильной встройки целевых генов добиться не удалось. Дополнительные ПЦР-анализы на гены *rolA* и *rolC* подтвердили полученные результаты.

При биобаллистической трансформации семядольных и первых настоящих листьев табака при этих же условиях и параметрах были получены отличающиеся результаты. В работе было использовано по 80 семядольных и первых настоящих листьев, среди которых на 6 (7.5%) и 15 (18.75%) эксплантах соответственно началось корнеобразование, однако ПЦР-анализ показал отсутствие агробактериальных генов в ДНК этих корней. На контрольных чашках (30 семядольных листьев), где бомбардировка проводилась золотыми частицами без ДНК, корнеобразования не было зафиксировано, а на чашках с первыми настоящими листьями наблюдали спонтанный ризогенез (ПЦР-анализ на наличие гена *rolB* и *rolC* оказался отрицательным) с вероятностью 16% (4 из 25 контрольных эксплантов). В связи с этим, можно предполагать, что достаточно интенсивный рост индуцированных бомбардировкой адвентивных корней на ранних этапах развития активировался за счет транзientной экспрессии *rol*-генов, то есть без стабильной встройки в геном растений.

Для проверки нашей гипотезы о транзientной экспрессии был проведен сравнительный морфологический и ОТ-ПЦР анализ корней различного происхождения. В эксперименте использовали истинные бородачатые корни, корни дикого типа, адвентивные корни табака, полученные в результате бомбардировки. Также в качестве модельного объекта были специально получены ауксин-индуцированные адвентивные *in vitro* корни табака.

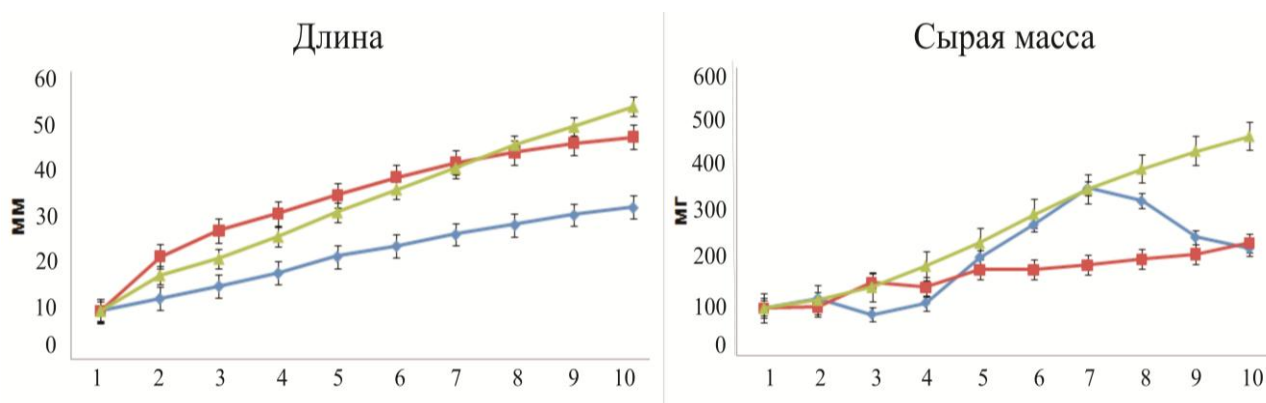


Рисунок 9. Морфологический анализ линий корней, полученных различными способами (♦ – корни дикого типа, ■ – ауксин-индуцированные корни и ▲ – истинные бородачатые корни табака).

Средняя масса корней дикого типа при культивировании в жидкой безгормональной среде увеличивалась незначительно (рис.9). К окончанию опыта эти корни даже теряли свою массу. В случае с культурами ауксин-индуцированных адвентивных корней наблюдалось постепенное увеличение массы и длины корней в течение всего месяца (рис. 9). Для настоящих hairy roots табака на твердой и жидкой

средах был характерен экспоненциальный рост (рис. 9). Стоит отметить, что измерение длины истинных hairy roots сильно затруднялось в связи с особенностями их роста, а именно с отсутствием у них апикального доминирования.

При помощи метода ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 10) было показано, что рост корней во всех случаях коррелирует с повышением уровня экспрессии генов, контролирующего клеточное деление (ген циклин-зависимой протеинкиназы *NtCDKB1-1*) и клеточное растяжение (ген экспансина *NtEXPA5*). В hairy roots был обнаружен очень высокий уровень экспрессии гена циклин-зависимой протеинкиназы *NtCDKB1-1* (1742% по отношению к референсному гену EF-1A), в отличие от более низкого уровня содержания мРНК гена *NtEXPA5* (233%), что говорит о том, что в бородачатых корнях рост обеспечивается главным образом за счет стимуляции клеточных делений. В культуре бородачатых корней также был детектирован достоверно более высокий уровень экспрессии агробактериального гена *rolC* по сравнению с геном *rolB* (выше в 128 раз).

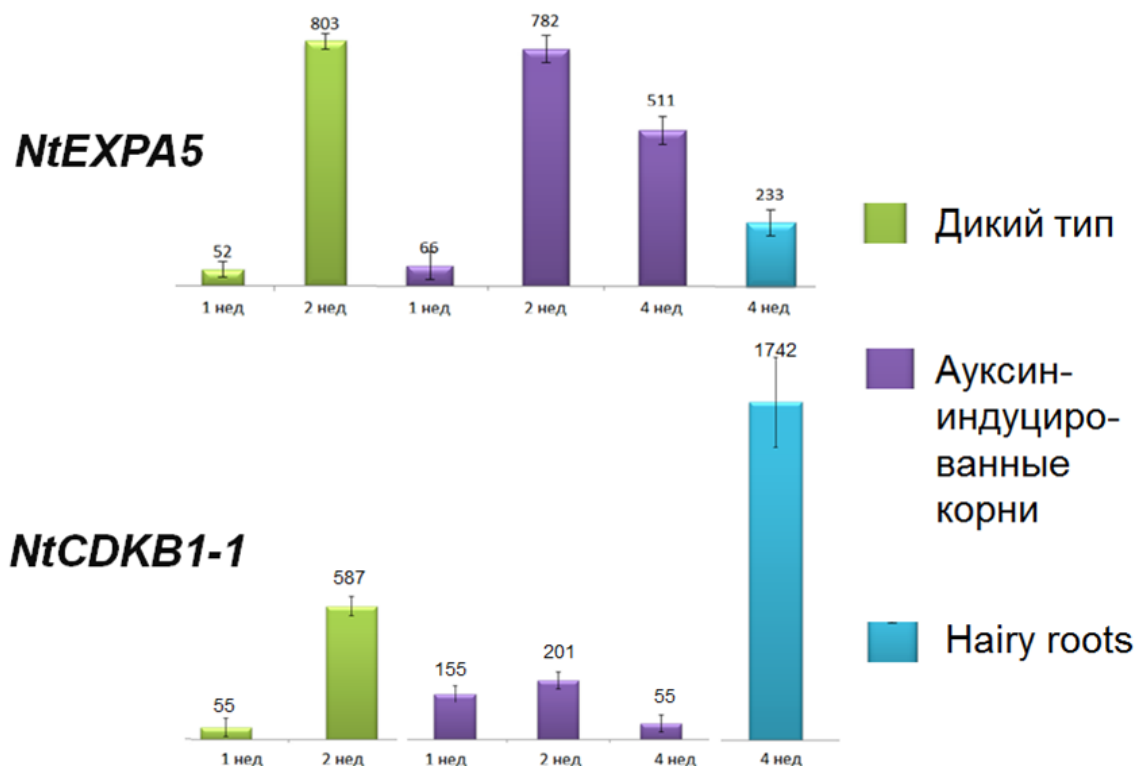


Рисунок 10. ОТ-ПЦР анализ уровней экспрессии генов экспансина *NtEXPA5* и циклин-зависимой протеинкиназы *NtCDKB1-1* в культуре корней, полученных различными способами.

Таким образом, нами показана положительная корреляция уровня экспрессии трансгена *rolC* и хозяйского гена циклин-зависимой протеинкиназы с быстрым ростом hairy roots табака. Необходимо отметить, что в некоторых культурах адвентивных корней табака, полученных в результате бомбардировки, обнаруживалась экспрессия генов *rolB* и *rolC* в следовых количествах, что

подтверждает гипотезу об их транзientной экспрессии. В то же время ПЦР-анализ их геномной ДНК всегда оказывался отрицательным.

Биобаллистическая трансформация мягкой пшеницы с помощью модифицированного ампликона, содержащего *rol*-гены

Классические методы получения hairy roots в основном подходят только для трансформации двудольных растений, тогда как у однодольных растений такими способами получить бородатые корни весьма трудоемко и чаще всего невозможно. Таким образом, можно предположить, что предложенный нами безбактериальный способ индукции бородатых корней может оказаться эффективным при трансформации клеток однодольных. Для проверки этой гипотезы в качестве объекта трансформации была выбрана мягкая пшеница *Triticum aestivum*.

Для биобаллистической трансформации были использованы каллусы *T. aestivum*, индуцированные из незрелых зародышей. Всего для трансформации было отобрано около 300 каллусов, 60 (2 чашки) из которых являлись контрольными образцами. Эти образцы подвергались такой же биобаллистической бомбардировке, но без добавления ДНК. После 10-15 дней культивирования на бомбардированных каллусах пшеницы наблюдали начало ризогенеза. Полученные корни можно было разделить на три морфотипа (рис. 11): морфотип 1 - короткие неветвящиеся адвентивные корни на каллусах, которые появились на наибольшем количестве образцов, в том числе и на контрольных чашках Петри без добавления ДНК (рис. 11А, Б); морфотип 2 - длинные ветвящиеся адвентивные корни, которые отсутствовали на контрольных образцах (рис. 11В); морфотип 3 - корни с многочисленными очагами каллусообразования (рис. 11Г).

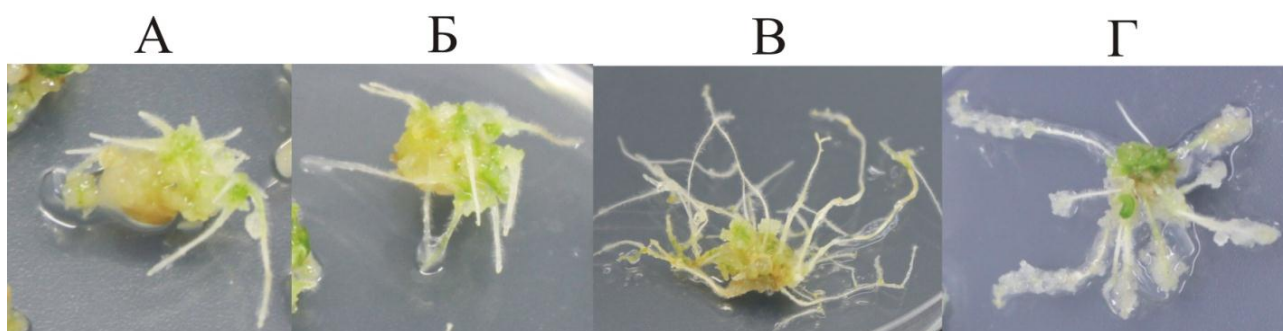


Рисунок 11. Адвентивные корни мягкой пшеницы морфотипа 1 на контрольных каллусах после бомбардировки без ДНК (А); корни морфотипа 1 (Б); морфотипа 2 (В) и морфотипа 3 (Г), образованные после биобаллистической трансформации.

Количество корней морфотипа 1 значительно превышало количество корней других морфотипов. Наибольший интерес вызывали корни морфотипа 2, так как по внешним признакам они напоминали истинные бородатые корни (рис. 11В). С целью проверить данное предположение мы отделили адвентивные корни морфотипа 1 из

контрольного и опытного образцов, а также корни морфотипа 2 из каллусной ткани и перенесли на безгормональную среду МС для оценки их способности к росту в изолированных культурах. Уже спустя одну неделю культивирования наблюдали умеренный рост корней морфотипа 2, а корни первого морфотипа признаков роста не проявляли. В течение месяца культивирования корни морфотипа 2 продолжали расти, а корни первого морфотипа (как из контрольного, так и из опытного образцов) погибали в результате развития некротических процессов. Интересно отметить, что при длительном культивировании в условиях искусственного освещения на некоторых линиях корней морфотипа 2 наблюдали позеленение (рис. 12), что может быть связано с накоплением фотосинтезирующих хлоропластов в корневых клетках.



Рисунок 12. Зеленые адвентивные корни пшеницы, полученные в результате опытов по биобаллистической трансформации, характеризующиеся способностью к неограниченному росту на безгормональных питательных средах.

Среди корней морфотипа 2 были отобраны 10 наиболее активно растущих предполагаемых бородачатых корней и перенесены в жидкую безгормональную среду. Сырая масса корней морфотипа 1 в течение месяца не изменилась, даже в некоторых случаях уменьшилась, а корней морфотипа 2 увеличилась незначительно на 44.46%. В случае с зелеными адвентивными корнями пшеницы морфотипа 2 наблюдали активное наращивание сырой массы - на 485.64%, значение которой даже превышало скорость роста истинных hairy roots табака (360.49%). Таким образом, спонтанно позеленевшие корни мягкой пшеницы были способны к активному росту на безгормональной среде МС, что возможно связано, в том числе, с активацией фотосинтетической системы. Следует отметить, что эти культуры зеленых адвентивных корней пшеницы продолжали свой рост и не имели склонности к некрозу в течение длительного культивирования (культура сохранялась более двух лет). Однако ПЦР-анализ со специфическими праймерами к гену *rolB* показал отсутствие последнего в тотальной ДНК адвентивных корней пшеницы всех трех морфотипов, в том числе и у зеленых корней. Появление адвентивных корней пшеницы морфотипа 2 может быть связано как с транзientной экспрессией агробактериальных онкогенов, так и опосредованным влиянием механического стресса, вызванного бомбардировкой золотыми частицами. Мы предполагаем, что изолированно растущие культуры зеленых адвентивных корней однодольных могут стать альтернативой истинным hairy roots, которые довольно трудно получить у представителей этого класса растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культура hairy roots хозяйственно-ценных видов растений, специфически сверхпродуцирующих ценные метаболиты является перспективной технологией культивирования органов для синтеза, накопления и регуляции производства целевых соединений, благодаря их способности к быстрому росту в недорогой культуральной среде без фитогормонов и возможности длительного культивирования с сохранением генетической и биохимической стабильности. Индукция таких бородатых корней происходит в результате естественной трансформации растительного организма почвенной агробактерией *A. rhizogenes*.

Уже более 30 лет культура hairy roots используется для самых разнообразных целей: от метаболической инженерии и производства рекомбинантных белков до анализа фиторемедиационной способности растений, изучения взаимодействия растения-бактерии и, возможно, в недалеком будущем культура бородатых корней будет рассматриваться как потенциальная система даже для производства биотоплива (Wilson, Roberts 2012; Praveen *et al.*, 2014). Еще одним весомым преимуществом производства вторичных метаболитов с использованием культуры бородатых корней является их способность производить некоторые фитомолекулы, которые путем химического синтеза получить практически невозможно. В настоящее время с помощью этой технологии синтезирован широкий спектр химических веществ (Giri, Narasu, 2000).

Однако, несмотря на все преимущества технологии культивирования hairy roots и всестороннего изучения взаимодействия *A. rhizogenes* с растительной клеткой, она остается неприменимой для многих хозяйственно-ценных видов растений. Поэтому важно совершенствование существующих и создание новых универсальных методов трансформации растений, которые позволили бы обойти природные ограничения *A. rhizogenes* и зависимость эффективности трансформации от штамма агробактерии и вида инфицируемого растения, что и являлось целью данной диссертационной работы. Нами был предложен метод безбактериальной и безплазмидной трансформации табака с помощью биобаллистической пушки, где в качестве трансформационного агента служил линейный модифицированный ампликон, содержащий все 4 *rol*-гена *A. rhizogenes*. Опыты на модельном объекте табаке показали принципиальную возможность такой трансформации, которая, однако, имела низкую эффективность и оказалась безуспешной на данный момент времени для представителя однодольных *T. aestivum*. В связи с чем наши исследования в дальнейшем будут направлены на оптимизацию предложенного метода, например, путем применения системы направленного геномного редактирования CRISPR/Cas 9, первые шаги к которому нами уже сделаны. Таким образом, с помощью предложенного метода появляется возможность преодоления природной невосприимчивости некоторых видов растений к заражению агробактериями и, как следствие, образованию бородатых корней, а также благодаря использованию

фрагмента Т-ДНК *A. rhizogenes*, содержащего только *rol*-гены без генов синтеза опинов, отпадает необходимость в постоянном удалении из культуры этих веществ, так как растения не способны к их усваиванию. Еще одним неоспоримым преимуществом такого способа трансформации является отсутствие агробактерий как таковых на всех этапах получения hairy roots, что облегчает дальнейшее крупномасштабное производство в биореакторах.

Совершенствование существующих методик индукции бородачатых корней позволило получить культуры hairy roots витании пригодных для производства витанолидов, кок-сагыза и крым-сагыза для продуцирования каучука, а также hairy roots параспонии, которые могут быть использованы для изучения азотфиксирующего симбиоза. Полученные результаты имеют большое теоретическое и прикладное значение в физиологии растений для исследования особенностей взаимодействия растительного организма с агробактериями.

Проведенная экспериментальная работа позволила сделать следующие **ВЫВОДЫ:**

1. Оптимизированы способы индукции бородачатых корней *Withania somnifera*, *Parasponia andersonii*, *Taraxacum kok-saghyz* и *Taraxacum hybernum* и получены их *in vitro* культуры, которые могут быть использованы в фундаментальных исследованиях и для продуцирования ценных вторичных метаболитов.

2. Предложен новый способ получения бородачатых корней путем биобаллистической трансформации с использованием линейного ампликона, содержащего все 4 *rol*-гена *Agrobacterium rhizogenes*, который может стать основой при дальнейшей разработке универсальных методов индукции hairy roots.

3. Обнаружена способность культуры зеленых адвентивных корней *Triticum aestivum* к быстрому и долгосрочному росту на безгормональной среде, что делает ее привлекательной альтернативной истинным бородачатым корням системой для продукции вторичных метаболитов у злаковых.

4. Показана положительная корреляция уровня экспрессии трансгена *rolC* и хозяйского гена *CDKB1-1* с быстрым ростом hairy roots табака.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ

1. Гумерова (Ясыбаева) Г.Р., Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. (2016) Безбактериальное получение косматых корней. *Вестник защиты растений*, 89(3), 187-188.
2. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Гумерова (Ясыбаева) Г.Р., Чемерис А.В. (2017) Создание культур бородачатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*, 13(2), 40–45.

3. **Гумерова Г.Р.**, Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р. (2018) Морфологический и молекулярный анализ изолированных культур адвентивных корней табака, полученных методами биобаллистической бомбардировки и агробактериальной трансформации. *Физиология растений*, 65(5), 376–387.

Публикации в журналах, индексируемые в базе данных Scopus

4. **Gumerova (Yasybaeva) G.**, Vershinina Z., Kuluev B., Mikhaylova E., Baymiev A., Chemeris A. (2017) Biolistic-mediated plasmid-free transformation for induction of hairy roots in tobacco plants. *Plant Root*, 11, 33–39.

5. Knyazev A., Kuluev B., Mikhaylova E., **Gumerova (Yasybaeva) G.**, Chemeris A. (2017) Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Plant Root*, 11, 64–69.

6. Knyazev A., Kuluev B., Vershinina Z., **Gumerova (Yasybaeva) G.**, Chemeris A. (2017) *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in *Parasponia andersonii* Planch. *Asian J Plant Sci*, 16, 227–234.

7. Knyazev A., Kuluev B., Fateryga A., **Gumerova (Yasybaeva) G.**, Chemeris A. (2017) Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum hybernum* Steven. *Plant Tissue Cult Biotechnol*, 27(2), 141–151.

Публикации в журналах, индексируемых в базе данных РИНЦ

8. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., **Гумерова Г.Р.**, Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2017) CRISPR/Cas редактирование геномов растений. *Биомика*, 9(3), 154–181.

9. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., **Гумерова Г.Р.**, Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2017) Эволюция методов редактирования геномов. *Биомика*, 9(3), 243–250.

10. Кагирова А.С., **Гумерова Г.Р.**, Гуменко Р.С., Кашапова Г.М., Кулуев Б.Р. (2017) Особенности фенотипического проявления *rol*-генов *Agrobacterium rhizogenes* в растениях. *Биомика*, 9(4), 304–316.

11. **Гумерова Г.Р.**, Кулуев Б.Р., Кагирова А.С., Вершинина З.Р., Чемерис А.В. (2017) Биобаллистическая трансформация *Triticum aestivum* *rol*-генами *Agrobacterium rhizogenes*. *Биомика*, 9(4), 317–324.

12. Кагирова А.С., **Гумерова Г.Р.**, Кашапова Г.М., Кулуев Б.Р. (2017) Создание трансгенных растений табака с генами *rol* *Agrobacterium rhizogenes*. *Биомика*, 9(4), 349–355.