

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

Ахтямова Валерия Юрьевна

**ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ
ПРИ ПОМОЩИ ШТАММА *K599 AGROBACTERIUM RHIZOGENES***

Научный руководитель:

профессор, д.б.н.

Б. Р. Кулуев

Уфа – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Род <i>Agrobacterium/Rhizobium</i> , физиологические и генетические свойства, разнообразие, таксономическое положение, основные представители – патогены растений	8
1.1.1. Систематическое положение рода <i>Agrobacterium</i>	8
1.1.2. Физиологические признаки рода <i>Agrobacterium</i>	9
1.1.3. Вирулентность и распространение бактерий рода <i>Agrobacterium</i> ..	11
1.1.4. Другие инфекционные и неинфекционные заболевания, сходные с бородатостью корней по симптомам	13
1.2. Молекулярный механизм трансформации растений и использование бактерий рода <i>Agrobacterium</i> в генной инженерии	13
1.3. Геном штамма <i>K599 Agrobacterium rhizogenes</i>	16
1.3.1. <i>Rol</i> -гены штамма <i>K599 Agrobacterium rhizogenes</i>	17
1.3.2. Морфологические эффекты и функции <i>rol</i> -генов <i>A, B, C</i> и <i>D</i>	17
1.4. Применение волосовидных корней в биотехнологии и промышленности	20
1.5. Вывод по главе 1	21
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1. Объекты исследования	22
2.2. Использованные реактивы	22
2.3. Приборы	23
2.4. Составы сред	24
2.5. Метод агробактериальной трансформации	26
2.5.1. Подготовка к трансформации <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	26
2.5.2. Инокуляция и совместное культивирование	27

2.5.3. Промывка эксплантов и начало культивирования	28
2.6. Каллусообразование корней	29
2.7. Укоренение побегов	29
2.8. Электропорация агробактерий	29
2.9. Выделение ДНК	31
2.10. Изучение и подбор соответствующих праймеров на <i>rol</i> -гены.	32
2.11. Полимеразная цепная реакция	32
2.12. Аналитический гель-электрофорез ДНК.....	33
2.13. Статистическая обработка результатов.....	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Агробактериальная трансформация табака	34
3.1.1 Появление точек регенерации на эксплантах табака	34
3.1.2. Пересадка регенерантов	36
3.1.3. Пересадка волосовидных корней	38
3.1.4. Побег, который дал корни без добавления гормонов.....	38
3.1.5. Волосовидные корни, которые дали побеги без гормонов.....	39
3.1.6. Каллусообразование и появление побегов из волосовидных корней	40
3.1.7. Морфология трансгенного и нетрансгенного побега после трансформации	41
3.1.8. Акклиматизация трансгенных растений на почве	43
3.2. Результаты ПЦР-анализа	44
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
ВЫВОДЫ	55
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

Список сокращений и условных обозначений

pTi и *pRi* плазмиды *Agrobacterium spp.*

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА/ EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

LB-среда – среда Лурия-Бертрани

ИУК – индол-3-уксусная кислота

НУК – нафтилуксусная кислота

пн – пара нуклеотидов

rpm – Rate Per Minute

БАП – бензиламинопурин

ТЕ – трис-ЭДТА буфер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

МС – среда Мурасиге и Скуга

Rol – root locus

п.о. – пара оснований

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Разные виды *Agrobacterium* поражают более 140 видов двудольных растений, принадлежащих 93 семействам [41]. *Agrobacterium rhizogenes* (син. *Rhizobium radiobacter*) – вид грамотрицательных, облигатно аэробных почвенных бактерий семейства *Rhizobiaceae*. *A. rhizogenes* – обитают в почве и вызывают образование волосовидных корней на месте ранения и заражения у двудольных и некоторых других групп растений. Ri-плазмида агробактерий кодирует генный локус *rol* (англ. root locus), который содержит гены *rolA*, *rolB* и *rolC*, иногда еще *rolD*. Данные гены встраиваются в геном клетки-хозяина. Такая генетическая трансформация может вызывать образование сильно разветвленных волосовидных корней на месте заражения [47].

В биотехнологических лабораториях мира наиболее популярными являются штаммы *ATCC15834* и *A4*. Корни, полученные *A. rhizogenes* штамма *A4* более разветвленные («косматые») и новые волосовидные корни на семядольных эксплантах продолжают формироваться в течение 2 месяцев, тогда как после трансформации штаммом *15834* новые корни образуются только в течение первого месяца. Для корневых культур, полученных обоими типами штаммов, помимо плагиотропного роста корней, было характерно их быстрое ветвление на фоне не столь хорошо выраженного апикального роста кончиков корней, что приводило к очень плотному переплетению образующихся боковых корней [46].

Штамм *A4* характеризуется более толстыми и темными корнями с большим количеством коротких, растущих вертикально вверх «пушистых» корешков, имеющих потемневший кончик и иногда останавливающихся в росте через месяц культивирования на жидкой среде MS.

Трансформация штаммом *15834* отличается от трансформации штаммом *A4* меньшей толщиной корней, отсутствием потемнения кончиков

корней и замедление их роста не фиксировалось ни у одной линии, по крайней мере, через 1 месяц после отделения от материнского экспланта.

Использование диких штаммов, полученных методами генной инженерии, штаммов бактерий с модифицированными *Ri*-плазмидой и *Ti*-плазмидой, или комбинированных с плазмидами (содержащие гены *rol* вместе или по отдельности), так же повышало вирулентность агробактерии (Valdes et al., 2016). Фенотипические эффекты, наблюдаемые в линиях растений *Ri*, являются прямым следствием процессов переноса, интеграции и экспрессии Т-ДНК *Ri*-плазмиды в клетку растения-хозяина. После успешного завершения этапов генетической трансформации многие из генов Т-ДНК вызывают сильные морфогенные эффекты, которые возникают в результате изменений метаболизма растительных гормонов и чувствительности клеток к ним [51].

Культуры волосовидных корней в биотехнологическом производстве могут подвергаться отрицательному влиянию изменений состава среды, температуры, и т.д., поэтому создание не только высокопродуктивных, но и стрессоустойчивых волосовидных корней весьма актуально.

Личный вклад автора. Автор принимал личное участие во всех этапах исследований, а именно в постановке целей, задач, разработке плана, экспериментальных исследованиях, обработке, анализе и интерпретации полученных данных.

Предмет исследования: особенности инфекционного процесса при трансформации штаммом *K599*, в отличие от классических штаммов *A. rhizogenes* *A4* и *15834*.

Объектом исследования является *Agrobacterium rhizogenes* штамма *K599*.

Цель исследования: Определение особенностей штамма *K599* *Agrobacterium rhizogenes* при генетической трансформации растений.

Задачи исследования:

1. Провести агробактериальную трансформацию листовых эксплантов табака при помощи штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes*;
2. Получить волосовидные корни и регенеранты побегов на эксплантах табака;
3. Получить культуры волосовидных корней и укоренить побеги, полученные при помощи штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes*;
4. Доказать трансгенный статус волосовидных корней и растений, полученных после генетической трансформации при помощи штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes*.
5. Определить особенности штамма *K599* при агробактериальной трансформации растений.

Дипломная работа выполнена на базе Института биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук в лаборатории геномики растений под руководством заведующего лабораторией, д.б.н. Кулуева Булата Разяповича.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Род *Agrobacterium/Rhizobium*, физиологические и генетические свойства, разнообразие, таксономическое положение, основные представители – патогены растений

Agrobacterium rhizogenes (лат.) – это облигатно аэробный вид грамотрицательных протеобактерий и главное свойство бактерий этого рода является способность к генетической трансформации клеток растений при помощи Т–ДНК фрагмента плазмиды (*Ti*, *Ri*) размером не менее 4000 тыс. п.о. и бактериальной транспортной (секреторной) системы 4–го типа (Type 4 Secretion System, T4SS) [76]. Фитопатоген обуславливает образование волосовидных корней у значительно числа видов растений, а также является факультативным патогеном для животных и людей (<http://medbiol.ru>). Род *Agrobacterium* применяется в генной инженерии и биотехнологии для генетической трансформации растений и изучения транзитной экспрессии генов в растениях [6].

1.1.1. Систематическое положение рода *Agrobacterium*

Царство Прокариоты *Prokaryota*

Группа Грамотрицательные аэробные палочки и кокки

Семейство *Rhizobiaceae*

Род *Agrobacterium*

Биологическая группа – факультативный паразит (гемибиотроф). Бактерии этого рода стержнеобразные (от 0,6–1,0 мм до 1,5–3,0 мкм), располагаются по одной или несколько пар, имеют один или шесть подвижных перитрихальных жгутика, и без эндоспор. Этот род включен в α –2 подкласс *Proteobacteria* на основании сравнения последовательностей рибосомальных РНК генов [44, 75].

Ближайшие родственные бактерии в рамках семейства *Rhizobiaceae* принадлежат родам *Carbophilus*, *Neorhizobium*, *Ciceribacter*, *Candidatus*, *Liberibacter*, *Rhizobium*, *Amorphomonas*, *Pararhizobium*, *Pseudorhizobium*, *Ensifer*, *Sinorhizobium* и *Shinella* в основном ассоциированы с растениями как симбионты или фитопатогены. В порядок *Rhizobiales* входят патогенные для животных и человека виды родов *Bartonella*, *Brucella* и симбионты некоторых растений рода *Bradyrhizobium* [81].

1.1.2. Физиологические признаки рода *Agrobacterium*

В соответствии с описанием рода *Agrobacterium*, бактерия–хемоорганогетеротроф и облигатный аэроб. Она не нуждается в специфических факторах для роста на искусственных питательных средах и способна использовать сравнительно большой спектр органических веществ как единственный источник углерода, включая N– ацетилглюкозамин, α –аланин, β –аланин, арабинозу, аспартат, дульцит и т. д., так же способна расти на жидкой среде LB–бульоне. На агаризованных питательных средах *Agrobacterium* образуют выпуклые, округлые гладкие непигментированные или слабо–бежевые колонии. На картофельном агаре колонии приподнятые, влажно–блестящие, светло–бежевые с ровным просвечивающим краем. Утилизируют маннитол и другие углеводы с образованием кислоты. Бактерии оксидазо–положительны, образуют уреазу, не образуют индол [14]. Развитие патогена на средах с углеводами сопровождается обильным образованием внеклеточной полисахаридной слизи. Крахмал не гидролизуют. Молоко створаживают, но не пептонизируют. Лакмусовое молоко подкисляют. Нитраты редуцируют. Желатин не разжижают или разжижают очень медленно. Реакция на каталазу, оксидазу и уреазу, как правило, положительная. Абсорбируют индол, сероводород и аммиак. Образуют кислоту на сахарозе, арабинозе, декстрозе, лактозе, галактозе, манните, фруктозе. Патоген вырастает при 0–37 °C, наилучшая температура

роста 25–30 °С, максимальная 37 °С, термальная точка их гибели в растениях 51 °С. Необходимый диапазон pH 6,0–9,0 [14]. Биохимические признаки применяются для дифференциации видов, биотипов и штаммовых групп внутри данного рода (Таблица 1), а также для разработки селективных питательных сред для выделения и идентификации патогенов.

Таблица 1

Таксономические подразделения рода *Agrobacterium* и ключевые диагностические признаки для их дифференциации

Диагностический тест	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Вид колоний	края ровные	края ровные
Гранулы В–гидроксипутрата	+/-	+/-
Гидролиз крахмала	-	-
Диффузный пигмент	-	-
Использование цитрата	+	+/-
Кислота из: эритритола мелицитозы	+	-
	-	+
Кислотное растворение мела на среде PDA+CaCO ₃	+	-
Лакмусовое молоко	К	Щ
Нитраты в нитриты	+/-	+/-
Пектолитические св-ва при pH 4,5	-	-
Подвижность	+	+
Подвижность при pH 7.0	-	-
Окраска	Белые, кремовые	Белые, кремовые
Окраска по Граму	-	-
Оксидаза	+	+
Рост на 2% NaCl	-	+
Рост при 35°C	+/-	+
Симптомы болезни	Волосовидный корень	Наросты на стебле и на корнях
Цитрат аммония	-	+
Щелочь из кислоты: малоновой (метандикарбоновая кислота) винной слизевой (галактаровая)	+	-
	+	-
	+	-
3-кетолактоза	+/-	+
O/F	O	O

– 80% или более штаммов отрицательно;

+/- вариабельно;

Щ/К – щелочная/кислая реакция;

О–окислительный катаболизм глюкозы.

1.1.3. Вирулентность и распространение бактерий рода *Agrobacterium*

Agrobacterium – род всюду распространенные почвенные бактерии, которые содержат фитопатогенные изоляты, заражающие растения около 90 семейств двудольных культур [15, 20]. Поражает в основном экономически важные фруктовые (яблоня, айва, слива груша) культуры, ореховые (миндаль, грецкий орех, фундук) культуры, виноград, декоративные растения (розы, хризантемы, георгины). В отдельных случаях, заражаются и однолетние растения (капуста, рапс, томат, огурец и т.д.). Этот фитопатоген имеет обширное распространение в разных странах мира. Он встречается на всей территории России, где выращивают плодовые и ягодные культуры (Рисунок 1). На Украине и в Армении данный род агробактерий наносит большой вред сельскохозяйственным культурам.



Рис. 1. Зоны распространения и вредоносности *Agrobacterium* spp [84]

Когда растения заражаются бактериями рода *Agrobacterium* происходит anomальная клеточная гиперплазия, она приводит к формированию корончатых галлов или к образованию «волосяного»,

«бородатого» или «бородчатого» корня или волосовидного или «*hairy roots*» [9].

Впоследствии чего, корневая система отстаёт в росте и происходит нарушение движения воды и сока по сосудам в стебле/стволе. Поражённые корончатым галлом деревья миндаля (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb), механически повреждаются при сильном ветре, в результате чего поражаются грибной инфекцией и быстро гибнут [43, 54].

Патогенные штаммы *Agrobacterium spp.* содержат в себе, по меньшей мере одну *Ti* или *Ri*–плазмиду [74]. Вирулентность определяется различными участками плазмиды включая транспортируемую ДНК (Т–ДНК) и генами вирулентности (*vir*–гены). Гены вирулентности являются посредниками в передаче Т–ДНК в инфицируемые растительные клетки [18].

Классификация корнеобразующих и галлообразующих изолятов агробактерий до недавнего времени основывалась на проявлении признаков заболевания, характеристике плазмиды и биохимических признаках.

Вид *A. tumefaciens* вызывает заболевания обширного круга растений, *A. vitis* – поражает виноград, *A. rhizogenes* – вызывает пролиферацию корней, а *A. rubi* вызывает «тростниковый галл» на растениях малины (*Rubus L.*). Непатогенные изоляты агробактерий относят к *A. radiobacter*. Тем не менее, на основе патогенности и таксономической структурой, не было показано корреляции между номенклатурой, основанной на фенотипической и генотипической характеристике штаммов этого рода [44]. В частности, штаммы которые вызывают «бородатость корней», «*hairy roots*» тепличных растений, также относят к *A. radiobacter* [62].

Т–ДНК из ризогенных штаммов *Agrobacterium bv1* несёт ген *rol* (*root locus*), который делает клетки растений более чувствительными к эндогенным ауксинам [65].

Хоть и плазмиды *Ti* и *Ri* очень различаются у штаммов разного происхождения, они все несут сходный набор основных *vir*–генов [40].

1.1.4. Другие инфекционные и неинфекционные заболевания, сходные с бородатостью корней по симптомам

В дополнение к инфекционному процессу, который был вызван переносом плазмид в корни растений вирулентными агробактериями, симптомы волосовидности корней могут быть связаны с другими патогенами, секретирующими микробные ауксины, а также с чрезмерным использованием синтетических ауксинов, стимулирующих рост корневой системы растений [26].

В 2009 году Будынков Н. И. (Научно-исследовательский институт фитопатологии, Б. Вяземы) провел исследование влияния регуляторов роста (синтетических ауксинов) на тепличные растения огурцов. Эксперимент включал использование Экогеля (1% раствор), Превикура (0,15%), Этамона (0,0015%) и Циркона (0,04%) отдельно и в различных комбинациях. По полученным результатам можно было сказать, что эти препараты не влияют на максимальную длину корня, но все же вдвое или более увеличивают массу корня и общую длину боковых корней (т. е. вызывают «волосовидность» корня) по сравнению с контролем [1].

В результате, согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что визуально распознанные передозировки стимуляторов роста могут быть схожи с признаками повреждения *Agrobacterium* bv. 1, поэтому сходные признаки заболевания автоматически не указывают на сходные патогены и диагнозы должны устанавливаться только на основе молекулярно-биологического анализа.

1.2. Молекулярный механизм трансформации растений и использование бактерий рода *Agrobacterium* в генной инженерии

Благодаря способности патогенных штаммов *Agrobacterium* генетически трансформировать растительные клетки, бактерия используется

для введения генетического материала для трансформации генетических признаков растений в научных и коммерческих целях [82, 83].

Agrobacterium может модифицировать двудольные растения [59], однодольные растения [22] и некоторые грибы [39]. Поэтому были разработаны специальные векторы с удаленными генами фитогормонов и опинов («обезоруженная плазмида») на основе *Ti*-плазмиды для введения чужеродной генетической информации в геном растения [32] с целью приобретения растений с желаемыми полезными признаками.

Несмотря на противоречивые данные, использовать названия *A. tumefaciens* для штаммов, вызывающих корончатый галл у широкого круга растений, *A. vitis* – для патогенов винограда и *A. rhizogenes* – для патогенов «волосовидности корней», а название *Rhizobium radiobacter* будет использовано для невирулентных штаммов этого рода.

Началом патогенного процесса является синтез белка *T-pili* с использованием системы секреции IV типа, которая осуществляется под действием *VirB*-оперона. Внутриклеточные метаболиты растений фенольного происхождения-кумарины, флавоноиды, дубильные вещества и лигнин [69] - играют определенную роль в индуцировании экспрессии генов вирулентности *Agrobacterium* у растения-хозяина [68].

Agrobacterium прикрепляется к растительной клетке с помощью *T-pili*, образуя мост конъюгации, и переносит комплекс белка *VirE2* и одноцепочечной *T*-ДНК [23], образованный из плазмиды-*Ti* [30] в растительную клетку. В ядре *T*-ДНК интегрируется в геном клетки-хозяина [33] путем сайт-специфической рекомбинации [45, 82]. Успех трансформации растительных клеток определяется специфическим белком *VirE3*, который транспортируется в ядро вместе с *T*-ДНК и связывается с фактором транскрипции растений-белком *pBrp*, используемым для индуцирования экспрессии генов, необходимых для развития галла [31].

Введение *T*-ДНК вызывает образование характерных наростов на растениях из-за гиперсинтеза фитогормонов, и опины начинают

накапливаться в галлах, которые секретируются наружу и поддерживают популяцию агробактерий в ризосфере и филлоплане [33]. Трансформированные клетки, из-за дисбаланса в синтезе фитогормонов, дедифференцируются и начинают неупорядоченный (в случае корончатого галла) или дифференцированный (в случае волосовидности корней) рост. В первой фазе развития бактериоза быстро растут мягкие мелкие наросты (белые), позже они темнеют и затвердевают.

К концу вегетации молодые побеги достигают диаметра 3,5-7,0 см на виноградных, ягодных и овощных растениях от 8-12 см и более на 3-4-летних саженцах плодовых культур. Часто галлы покрывают весь побег растения, полностью деформируя его (Рисунок 2)..



Рис. 2. Галлы, вызванные *Argobacterium* на побегах розы сорта За-За (лат. Rosa).

Волосовидные корни имеют определенные морфологические особенности, корни разветвленные и быстро растут на среде без растительных гормонов. Кроме того, волосовидные корни анатомически сохраняют характеристики обычной корневой системы и имеют очень стабильную наследственность, так как происходят от одноклеточных, не содержащих химер [13, 60].

Многие исследования показали, что *A. rhizogenes* K599 может эффективно индуцировать волосовидный корень в широком диапазоне двудольных и однодольных растений. В частности, штамм K599 очень заразен на бобовых растениях, и большинство связанных с ним сообщений было получено на сое и родственных родах. Например, Cho et al. (2000) сообщили о 54 - 95% - ной частота индукции волосовидных корней по K599 у сои с различными генотипами. Сян и др. (2005) использовали дикий тип K599 для заражения семядолей сои, огурца и бальзама для индуцирования волосовидных корней с частотой 100, 65 и 91% соответственно. Штамм K599 также индуцировал образование волосовидных корней в почках огурца без обрезки с частотой 10%. Частота образования корней, индуцированных инфекцией штаммом K599 на гравированных асептических листьях хризантемы *in vivo*, составила 88% [77]. Штамм K599 оказался подходящим предшественником для новых штаммов *Agrobacterium* для трансформации растений.



Рис. 3. Волосовидные корни, вызванные *A. rhizogenes*

1.3. Геном штамма K599 *Agrobacterium rhizogenes*

Гены и функции Т-ДНК из *Ri*-плазмиды *A. K599*, продуцируемых в трансгенных корнях: K599 как представитель штамм тип *cucumtorpine* собой

продуцируемых в трансгенных корнях, он был выделен из почвы в Австралии ученым Аллен Кепп. Он содержит эндогенную *Ri*-плазмиду *pRi2659* с длиной 185 462 bp с Т-ДНК 14 982 bp (номер доступа Генбанк: EU186381). Область Т-ДНК содержит в общей сложности 11 генов/ORF, которые являются *orf2*, *orf3*, *orf4*, *orf8*, *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD* (*orf13*), *rolE* (*orf13*), *orf14* и *cuts*, причем *orf4* вложен в *orf3* [5, 48, 50, 56].

1.3.1. *Rol*-гены штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes*

Гены *rolA* (*rolα*), *rolB* (*rolβ*) и *rolC* (*rolγ*) регулируют развитие и образование волосовидных корней, которые были индуцированы штаммом *K599*, а ген *cus* кодирует фермент синтеза кукумопина [28, 67]. Так же было исследовано, что гомологичные гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* в других *A. rhizogenes* также участвуют в индукции волосовидных корней (Казанова и др., 2005). Hansen et al. (1994) предположили, что эта роль (*orf13a*) в маннопине типа *A. rhizogenes* 8196-это класс регуляторных белков, в то время как Aoki et al. (1994) считали, что *orf14* индукция волосовидного корня *rolA*. Otten (2001) сообщил, что ген *orf8* в *A. rhizogenes* воздействует на метаболизм глюкозы в растениях, в то время как Umber et al. (2005) обнаружили, что трансгенные растения табака *orf8* выглядят более короткими и пестрыми. Белковая последовательность, выведенная из *K599 orf3*, в значительной степени гомологична белковой последовательности *orf3*, кодируемой геном *orf3* на плазмиде *A. rhizogenes Ri*, *pRi1724*, сообщенной Moriguchi et al. (2001).

1.3.2. Морфологические эффекты и функции *rol*-генов *A*, *B*, *C* и *D*

Активация транскрипции генов *rol* происходит только после их интеграции в геном растения. После интеграции в геном растения гены *rolA*, *B*, *C* и *D* экспрессируются в различных тканях и органах [66]. Модульная

организация промоторов генов *rol* позволяет создавать уникальные комбинации элементов и факторов транскрипции для стимуляции экспрессии различных тканеспецифичных / органоспецифичных генов по отношению к каждой растительной ткани (Dypan, 1989).

Ген *rolA* (*orf 10*) присутствует во всех плаزمидах *Ri*, и его промоторная область состоит из трех функциональных доменов А, В и С [36]. Последовательное удаление каждого из них приводит к уменьшению количества транскрипта гена *rolA* в листьях и в конечном итоге приводит к его полному отсутствию. У трансгенных растений, содержащих только домен А в промоторной области, ген *rolA* экспрессировался в листьях, но не был обнаружен в тканях стебля и корня [21]. Кооперативный механизм действия доменов В и С приводил к появлению морщинистых листьев и укороченных междоузлий у трансформированных растений, а наличие только домена С определяло карликовый фенотип с нормальной формой листьев [7].

Все *Ri*-плазмиды, индуцирующие образование корней, содержат ген *rolB* (*orf 11*), гомология последовательности которого у различных штаммов *A. rhizogenes* составляет около 60%. Длина кодирующей области гена *rolB* варьируется от 765 п. н. (штамм 8196) до 840 п. н. (штаммы 2659 и 1724). Промотор гена *rolB* представляет собой комплекс из пяти доменов: А, В, С, D и Е. Каждый из этих доменов взаимодействует с различными регуляторами растений, которые модулируют работу онкогена в зависимости от типа ткани, гормональных сигналов и стадии развития растений. В корнях табака наличие всех доменов в промоторе приводит к экспрессии гена в корневом покрове, в протодерме, в меристемах коры и в проводящей системе, т. е. в тех клетках, из которых развиваются различные ткани этого органа. Появление делеции в домене А приводит к подавлению экспрессии в корневом случае и протодерме, та же мутация в доменах В и Е блокирует работу гена по всей меристеме табака. Таким образом, белок *rolB* участвует в каскаде реакций, определяющих трансдукцию сигнала ауксина, и уровень экспрессии этого белка зависит от ауксина. Добавление ауксина в культуру нетрансгенных

эксплантов приводит к индукции адвентивных корней с фенотипом, типичным для корней *rolB* [2, 17].

Наиболее консервативный из онкогенов, ген *rolC* (*orf 12*), также есть в геноме всех изученных штаммов *A. rhizogenes*. Длина гена *rolC*, выделенного из различных плазмид *Ri*, варьируется от 537 (штамм 8196) до 543 п. н. (штаммы 2659, 1724, A4). Они кодируют белки размером от 178 до 180 аминокислот (приблизительно 20 кДа) со степенью гомологии около 65% [52]. Предполагается, что белок *rolC* представляет собой β -глюкозидазу, способную высвобождать свободные активные цитокинины из их неактивных глюкозидных конъюгатов [27]. Отмечается, что экспрессия гена *rolC* является органоспецифичной, поэтому она максимальна в корнях и уменьшается в ряду: корни-стебель-цветы-листья. На тканевом уровне продукты транскрипции *rolC* были обнаружены во флоэме и в железистых клетках табака [36, 71].

Ген *rolD* (*orf 15*) включен в TL-ДНК только протоплазмид агропина [19]. Анализ нуклеотидной последовательности показал, что *rolD* имеет гомологию с последовательностью орнитинциклодеаминазы. Экспериментальные данные подтвердили, что этот белок обладает биохимической активностью, которая обеспечивает НАД-зависимое превращение L-орнитина в L-пролин [52]. Предполагается, что фенотипические эффекты гена *rolD*, основным из которых является раннее цветение, связаны с изменением концентрации пролина [10]. В культуре тонких клеточных слоев табака экспрессия гена *rolD* приводила к обильному образованию цветочных меристем даже в том случае, когда в норме должны появляться корни, т. е. можно предположить, что этот онкоген подавляет образование корней [49].

1.4. Применение волосовидных корней в биотехнологии и промышленности

Волосовидные корни способны производить основные метаболиты нативного растения или даже новые метаболиты незамеченные ни в исходном растении, ни в других видах лабораторных культур. Эти волосовидные корни, которые в русскоязычной литературе более известны как «бородатые» или «косматые» корни [46], стали рассматриваться в качестве перспективной платформы для производства ценных, прежде всего, корневых вторичных метаболитов [37], таких как алкалоиды тропана [29] и многих других метаболитов [35]. Производство вторичных метаболитов может быть увеличено, в результате подбора оптимальных условий культивирования, использования элиситоров различного происхождения, а также с помощью методов генетической инженерии [12, 34].

При помощи волосовидных корней можно изучать функции встроенных генов благодаря нокауту или сверхэкспрессии этих генов, без получения целых трансгенных растений. Также можно выявлять пути биосинтеза, например, как в случае с ферментами, участвующими в биосинтезе алкалоидов в *Nicotiana glauca* [42].

Культура «*hairy roots*» представляет значительный интерес для производства фармацевтически ориентированных белков благодаря успешному сочетанию преимуществ системы экспрессии эукариот и низкой стоимости и простоте бактериального производства, а также гипоаллергенности, быстрому развитию корневой массы и целевого продукта [77].

Получение таких культур особенно важно для редких 34 видов растений, являющихся продуцентами ценных биологически активных веществ, для последующего использования полученных культур с целью биотехнологического синтеза целевых продуктов [70, 78]. Крупномасштабное производство коммерчески ценных соединений в

программируемых биореакторах является экономически эффективным благодаря высокой скорости роста, стабильности признаков и жизнеспособности трансформированных растительных клеток и тканей [3].

1.5. Вывод по главе 1

Культуры волосовидных корней обладают многими преимуществами, включая высокий и непрерывный выход широкого спектра метаболитов и высокий потенциал роста на относительно дешевых питательных средах без гормонов. Большое количество индуцированных линий волосовидных корней предполагает возможность скрининга и селективного отбора лучших форм [79].

Возможность крупномасштабного культивирования и долгосрочная стабильность делают этот биотехнологический подход надежным источником вторичных метаболитов [60], а также довольно эффективным инструментом для изучения путей биосинтеза сложных растительных продуктов [63].

ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Для агробактериальной трансформации использовали листья *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR-1 в возрасте от двух до трех месяцев. Штамм *Agrobacterium rhizogenes* K599 использовали для получения трансгенных форм табака.

2.2. Использованные реактивы

Агароза легкоплавкая (Bio-Rad, США)

Ауксины:

ИУК – индолил-3-уксусная кислота (НМ, Китай)

НУК – нафтилуксусная кислота (RussSam, Россия)

Ацетат аммония (Sigma, США)

Бакто-агар (Difco, США)

Бакто-триптон (Difco, США)

Борная кислота (Eti Maden, Турция)

Бромфеноловый синий (Serva, ФРГ)

Глицерин (Serva, ФРГ)

Глицин (Amresco Inc., США)

Дезоксинуклеотидтрифосфаты:

дАТФ (MBI Fermentas, Литва)

дЦТФ (MBI Fermentas, Литва)

дГТФ (MBI Fermentas, Литва)

дТТФ (MBI Fermentas, Литва)

Дигидроортофосфат калия (Solins, Россия)

Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Solins, Россия)

Дрожжевой экстракт (Difco, США)

Изопропанол (Solins, Россия)
Иодид калия
Кальций хлористый (Serva, ФРГ)
Магний хлористый (Serva, ФРГ)
Молибдат натрия (Honeywell, Китай)
Натрий хлористый (Serva, ФРГ)
Никотиновая кислота (Sigma, США)
Нитрат аммония (CP UG, Германия)
Нитрат калия (Clearsynth, Германия)
Стрептомицин (Serva, ФРГ)
Сульфат железа (Clearsynth, Германия)
Сульфат магния (CP UG, Германия)
Сульфат марганца
Сульфат меди (CP UG, Германия)
Сульфат цинка (Clearsynth, Германия)
Тиамин (Serva, ФРГ)
Трис (гидроксиэтиламинометан) "тризма" или "Sigma 7-9" (Sigma, США)
Фосген (Corund, Россия)
Хлороформ (Sigma, США)
Цефотаксим (Molekula, Германия)
Цитокинины:
 БАП – бензиламинопурин (Honeywell, Китай)
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль) (Serva, ФРГ)
Этидиум бромид (Fluka, Швейцария)
Этиловый спирт (Metanol, Россия)

2.3. Приборы

Для различных измерений и анализов:

– портативный рН-метр STARTER 300 OHAUS (США).

Центрифугирование:

– BioSan FV-2400 мини центрифуга-вортекс Микроспин;

Вспомогательное оборудование:

– система очистки воды 18 мОм Milli Q Academic (Millipore, США);

– низкотемпературный холодильник -85°C фирмы Sanyo (Япония);

– автоклав горизонтальный электронной модели Dental League (Tuttnauer, Израиль);

– электронные весы Electronic scale;

– камера для роста растений Binder KBWF240 (Германия);

– шкаф сушильный ШС-80-01 СПУ;

– ламинарный бокс;

– смеситель ротационный RM-1L Intelli Mixers

– шейкеры New Brunswick Scientific (Excella E24 Incubator Shaker Series) (США);

– термостат твердотельный с таймером ТТ-2-«Термит»;

– термостат программируемый для проведения ПЦР-анализа 4-х канальный ТП4-ПЦР-01-«ТЕРЦИК» ООО «НПО ДНК-Технология» (Московская область, г. Протвино);

– камера для электрофореза

– камера для горизонтального электрофореза Sub Cell GT (США)

– источник питания Эльф-4 PS-400 Эльф-4 ДНК-Технология (Россия)

– прибор для детекции результатов Gel Doc EZ Gel Documentation System (США)

2.4. Составы сред

Название среды	Состав среды
среда LB	бакто-триптон (1%), дрожжевой экстракт (0,5%), NaCl (1%)
среда LB агаризованная	бакто-триптон (1%), дрожжевой

	экстракт (0,5%), NaCl (1%), агар-агар (1,5%)
среда MS	макросоли 20х (5%), CaCl ₂ (5%), Fe-EDTA (0,25%), микросоли (0,25%), сахароза (1,5%), pH 5,7
среда MS агаризованная	макросоли 20х (5%), CaCl ₂ (5%), Fe-EDTA (0,25%), микросоли (0,25%), сахароза (1,5%), агар-агар (0,65%), pH 5,7

Состав среды MS

Компоненты среды MS	Состав
Макросоли 20х	8,25 М NH ₄ NO ₃ , 9,5 М KNO ₃ , 0,85 мМ KH ₂ PO ₄ , 1,85 мМ MgSO ₄ *7H ₂ O
CaCl ₂	60 мМ CaCl ₂ *2H ₂ O
Микросоли	40 мМ H ₃ BO ₃ , 40 мМ MnSO ₄ *H ₂ O, 12 мМ ZnSO ₄ *7H ₂ O, 2 мМ KI, 0,04 мМ CuSO ₄ *5H ₂ O, 0,04мМ CoCl ₂ *6H ₂ O, 0,26 мМ Na ₂ (MoO ₄) ₂ *H ₂ O
Антихлорозин	FeSO ₄ *7H ₂ O – 558 мг (0,558 г) Na ₂ ЭДТА – 746 мг (0,746 г)
Витамины Гамборга	20 мл мQ, 10 мг тиамин, 10 мг никотиновая к-та, 20 мг глицин
Инозитол	инозит –1030,928мг, птероилглутаминовая (фолиевая) кислота – 0,120 мг

2.5. Метод агробактериальной трансформации

2.5.1. Подготовка к трансформации *Agrobacterium rhizogenes*

Подготовка: большие стерильные пинцеты и скальпели, выдержанные в спирту не менее суток; агробактерии выращенные на среде LB со Streptomycin (можно вырастить агробактерии и на твердой среде); чашки Петри с твердой агаризованной средой MS (содержащей все компоненты кроме фитогормонов БАП и НУК), чашки Петри со средой MS твердой с антибиотиком цефотаксим (3 чашки), жидкая среда MS 100 мл, стерильная дистиллированная вода – 1 л, стерильная фильтровальная бумага 9 шт. (нарезанная кружками под стеклянную чашку Петри). Количество ч.П. необходимых для проведения данного метода: для нарезки листа – 1 шт; для инокуляции – 3 шт; для высушивания эксплантов – 1 шт; для промывания и фильтровальной бумаги – 3 шт. Стерильные стаканы: 70% спирт (100 мл) (73 мл спирта, 27 мл дистиллированной воды); 10% белизна (100 мл) (85 мл воды, 15 мл белизны); для табака 500 мл; большая колба для слива воды 1000 мл. Большой стерильный фалькон для центрифугирования и 5 фальконов для измерений. Tween 20, инсулиновый шприц, наконечники.

Заранее вырастили в стерильных колбах на 100 мл 50 мл суспензии агробактерий в селективной среде. Выращивали на орбитальном шейкере в течение суток при 200 об/мин.

Начало работы

1. Взяли лист от крепкого здорового растения, желательно не самый молодой и не старый, лучше не волнистый, а плоский. Лист порезали на крупные куски, не убирая центральную жилку, и потом поместили в подходящий стерильный сосуд.

2. Далее добавили в сосуд 70% этанол так, чтобы он полностью покрыл кусочки листьев. Осторожно перемешивали в течение 15 сек, стараясь избавиться от пузырьков воздуха. Далее требуется слить этанол.

3. Добавляли в сосуд 10% раствор «Белизны» с одной каплей Tween 20, так чтобы он полностью покрыл кусочки листьев, и стерилизовали около 10 минут при осторожном периодическом перемешивании или покачивании (надо быть очень нежным и осторожным). Аккуратно слили стерилизующий раствор.

4. Потом эти кусочки листьев промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой. Промывали аккуратно и без особой спешки.

5. Переносили куски листа, в пустую стерильную чашку для резки. Обрезали побелевшие края. Резали скальпелем на части приблизительно 0,5 x 0,5 см, жилки оставляли. Скальпель и пинцет периодически погружали в спирт, и обжигали в пламени спиртовки и обязательно охлаждали (2-3 мин).

6. Готовые экспланты сразу переносили на чашки Петри с агаризованной MS, чтобы не подсыхали, ориентируя их нижней стороной листа вверх. Нарезанные экспланты распределяли по чашкам в случайном порядке. Чашки запечатали парафином и поставили на предварительную инкубацию при слабом освещении (температура – 24-25°C) на 2 часа.

2.5.2. Инокуляция и совместное культивирование

1. Стерилизовали пинцеты, чашки Петри, приготовили 50 мл стерильной среды MS без агара и фитогормонов.

2. Центрифугировали суспензию агробактерий при 4000 об/мин в течение 10 минут. Сливали жидкость, агробактерии ресуспендировали в 20 мл стерильной среды MS без агара.

3. Переносили экспланты листьев с регенерационных чашек, в пустую чашку Петри, и проводили поранение их инсулиновым шприцем, который постоянно обмакивали в суспензии агробактерий. Наливали в эту чашку 10 мл жидкой среды MS. Нужно, чтобы экспланты плавали в среде так же, как и лежали на чашке, то есть нижней стороной листа вверх, но не тонули и не намокали.

4. Добавляли в чашку около 3 мл суспензии агробактерий. Осторожно перемешивали и далее инокулировали в течение 30 минут с осторожным периодическим покачиванием. Стараться, чтобы на верхнюю поверхность эксплантов инокулюм не попадал. Чем меньше капель инокулюма попадет на верхнюю поверхность эксплантов, тем легче будет избавиться от агробактерий на дальнейших этапах.

5. Взяли новую пустую стерильную чашку и поместили в нее 1-2 кружка стерильной фильтровальной бумаги. Экспланты по очереди отбирали из инокуляционной среды обожженным и охлажденным стерильным пинцетом, промокали на фильтровальной бумаге и выкладывали снова на старые чашки с твердой MS верхней стороной листа в контакте со средой.

6. Чашки вновь заклеивали парафильмом и ставили на слабый свет при температуре 23 - 25°C на совместное культивирование на 2-3 сутки

2.5.3. Промывка эксплантов и начало культивирования

1. Экспланты переносили из чашек с MS, обожженных стерильным холодным пинцетом, в чашку с 10 мл жидкой среды MS, содержащей стрептомицин.

2. Осторожно покачивая, помешивали в течение нескольких минут, пытаясь смыть капли агробактерий, если они уже появились. Если на верхней части эксплантов были отчетливо видны колонии агробактерий или на некоторых эксплантах по краю был виден рост бактерий, то лучше промыть каждый такой эксплант с обеих сторон.

3. Брали новую пустую стерильную чашку и положили в нее кружок стерильной фильтровальной бумаги. Промытые экспланты по очереди брали пинцетом из промывочной среды, быстро промокали на фильтровальной бумаге и раскладывали (как и раньше, верхней стороной листа, контактирующей со средой) на чашки отбора (с цефатоксимом), плотно прижимая их к среде.

4. Чашки запечатывали парафином и помещали в климатическую камеру (температура инкубации-23-25°C, фотопериод 16 часов).

В дальнейшем за чашками тщательно следили, чтобы они не заросли агробактериями, при необходимости экспланты промывали раствором антибиотиков и переносили на свежую среду с антибиотиком. Через 7-10 дней наблюдалось появление волосовидных корней. Через две недели после инокуляции корни отделяли от эксплантов и пересаживали в свежую, свободную от гормонов среду MS с пониженным содержанием антибиотиков.

2.6. Каллусообразование корней

Развитие каллуса не всегда связано с травматическим и механическим воздействием. Каллус может появиться и в результате пролиферации внутренних тканей экспланта без связи с поверхностью среза из-за нарушения гормонального баланса. Когда каллус растет, он начинает разрывать слои ткани и развивается на поверхности корня. Для приобретения культивируемых каллусных клеток кусочки волосовидных корней помещали на среду MS с антибиотиком цефотаксимом в чашки Петри (*in vitro*) [2].

2.7. Укоренение побегов

Укоренение побегов проводили на среде MS 50 мл + 40 мкл гормона ИУК (конц. 1мг/мл – в стаканчиках 100 мл) (перед каждой манипуляцией инструменты обрабатывали спиртом и обжигали на пламени спиртовки). Колбы переносили в культуральную комнату с температурой 18-22°C, влажностью воздуха 70 % и интенсивностью освещения 5кЛх.

2.8. Электропорация агробактерий

Электропорацию компетентных клеток проводили с помощью микропульсарного электропоратора Bio-Rad, используя кюветы для электропорации с расстоянием между электродами 0,1 см. При использовании для трансформации лигазной смеси ее сначала очищали от содержащихся в ней солей с помощью нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 22-40 мкм. Для этого небольшой кусочек мембраны помещали в кювету на поверхность очищенной дистиллированной воды MilliQ гладкой стороной вверх. На поверхность наносили смесь лигаз объемом 10-20 мкл и проводили диализ в течение 20-30 минут. После проведенного таким образом диализа лигазную смесь концентрировали, а ее объем уменьшали до 3-5 мкл. При использовании для трансформации плазмид, выделенных мягким лизисом, их дополнительно очищали смесью фенол-хлороформ, а ДНК повторно осаждали несколько раз и каждый раз промывали 70%-ным спиртом для снижения концентрации солей, которые могут вызвать электрическую дугу в кювете электропорации.

При электропорации, а также при подготовке электрокомпетентных ячеек все манипуляции проводили на льду при 0°C и в камере с ламинарным потоком. Необходимое количество эппендорфов с компетентными клетками и гальваническими ячейками было помещено в лед. После размораживания клеток в пробирки вводили 1-2 мкл раствора ДНК, перемешивали и переносили в охлажденные кюветы, затем, выбрав соответствующий режим электропорации (для *Agrobacterium rhizogenes*-Agr), пропускали через кювету электрический ток, кратковременно нажимая кнопку «Импульс».

При электропорации *A. rhizogenes* в большинстве случаев для роста клеток использовали среду LB с повышенным содержанием питательных веществ (1,5% бактотриптона, 1% дрожжевого экстракта, 1% NaCl). Клетки *A. rhizogenes* после электропорации помещали в стерильный эппендорф и выдерживали при 27°C в течение 3-4 часов при постоянном перемешивании. Затем клетки также осаждали и суспендировали в 100 мкл среды и протирали

на чашках Петри агаризованной средой TY (1,5% бактоагара, 0,2% дрожжевого экстракта, 1% бактотриптона и 0,1% CaCl₂) и добавляли соответствующий селективный антибиотик. Чашки Петри с трансформированными клетками *A. rhizogenes* выдерживали в термостате (37°C) от 2 до 2,5 дней, пока не вырастали отдельные клоны, которые затем пересаживали и проводили ПЦР-анализ для поиска трансформированных клеток.

2.9. Выделение ДНК

ДНК из листьев выделяли СТАВ-методом. Растирали в 800 мкл 2хСТАВ буфера около 200 мг свежего растительного материала, гомогенизировали в эппендорфе. Инкубировали 40-80 минут при 60 °C, каждые 15 мин трясли на вортексе. Охлаждали в холодильнике 5 мин до 3°C. Добавляли по 600 мкл смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1), далее встряхивали на вортексе. После этого встряхивали на Ротамикс RM-1 – 15-30 мин. Центрифугировали 2 мин 12 krpm. Верхний водно-солевой слой, который содержит нуклеиновые кислоты, отбирали дозатором по 400 мкл, и добавляли равный объем холодного (-20°C) изопропанола, после осторожно перемешали содержимое, при этом переворачивали микропробирку. Затем инкубировали при -20°C 15-20 мин. Образцы центрифугировали при максимальных оборотах 10-15 мин.

При необходимости проводили очистку ацетатом аммония. Микропробирки споласкиваем 80% этиловым спиртом, высушиваем осадок, растворяем в воде.

Состав буферов:	
2хСТАВ (40ml)	0,8g – СТАВ, 3,27g – NaCl, 1,6 ml – 0,5M EDTA, 4 ml – 1M Tris-HCl (pH8.0)

2.10. Изучение и подбор соответствующих праймеров на *rol*-гены.

Для идентификации присутствия генов были подобраны оптимальные универсальные праймеры для ПЦР-анализа волосовидных корней и трансгенных растений на наличие *rol*-генов, представленными в табл 2.

Таблица 2

Используемые праймеры

Праймер	Последовательность 3' – 5'	Температура отжига, °С	Размер п.н.
RolAB1	F:AATTGCTACGAGGGGACGCTTTGT	59,6	1112
	R:ACGCTCCGCCGGTGGTCATACTTA		
RolAB2	F:TCGGCGGGCTAAGGTCAAGAA	58,5	1127
	R:CTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTA		
RolCPlant2	F:GGCGCACTCCTCACCAACCTTC	59	267
	R:CTCGCCATGCCTCACCAACTCA		

2.11. Полимеразная цепная реакция

Для идентификации присутствия генов в растительных и бактериальных клетках проводили классический ПЦР-анализ по конечной точке с праймерами.

Реакцию проводили в 30 мкл смеси, состоящий из однократного стандартного буфера для Taq-полимеразы («Evrogen» Россия), 0,1 мкг геномной ДНК, 10 мкм прямого и обратного праймеров, хлорид магния 3 мкл, 200 мкм каждого нуклеозидтрифосфата и 1 единица Taq-полимеразы. Для ПЦР был использован следующий режим.

Цикл 1: 95°C 3 минуты – для предварительной денатурации ДНК-материала.

Цикл 2: 95°C – 40 сек; температура отжига праймера (табл. 2) – 40 сек; 72°C – 80 сек. Цикл 2 повторялся 35 раз.

Цикл 3: 72°C 7 минут – для завершающей элонгации недостроенных цепей ДНК. После завершения ПЦР проводили агарозный гель-электрофорез.

2.12. Аналитический гель-электрофорез ДНК

Процесс электрофоретического фракционирования препаратов ДНК проводили в зависимости от размера отделенных фрагментов ДНК и требуемого разрешения с использованием 1,0% агарозного геля. Электрофорез проводили в приборах модели SubCell GT WIDI MINI (приборы модели Bio-Rad 250/2,5 (США) или модели EC-103 (E-C Apparature Corporation, США).

При разделении фрагментов ДНК электрофорез проводили в 1,0% агарозных гелях соответственно при напряжении 8-10 В на см длины геля (Sealey et al., 1982). В качестве буферной системы использовали ТАЕ-буфер, содержащий 40 мм трис-ацетата (pH 7,6) и 2 мм ЭДТА.

После электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг / мл) в течение 10 минут. Флуоресценцию нуклеиновых кислот наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм в трансиллюминаторе Gel Doc EZ Imager. Гели были сфотографированы с помощью системы гелевых камер (UVP, Inc. США).

2.13. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили с применением программы Image Lab 5.1. В настройке сбора данных программное обеспечение автоматически оптимизирует время экспозиции изображения для интенсивных полос. Параметры отображения: выделение насыщенных пикселей, цвет изображения выбран – серый.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Агробактериальная трансформация табака

Агробактериальная трансформация – один из наиболее эффективных методов генетической трансформации растений, основанный на естественном переносе фрагмента *pTi/Ri*-плазмиды (Т-ДНК) в геном растения, что приводит к образованию либо корончатых галлов в первом случае, либо волосовидных корней во втором. Изучение этого естественного процесса позволило разработать методы получения трансгенных растений в результате заражения агробактериями, несущими генно-инженерные структуры с генами-мишенями.

3.1.1 Появление точек регенерации на эксплантах табака

Волосовидные корни табака были получены с использованием штамма *A. rhizogenes* K599 на листовых эксплантах (выделенных из взрослого растения *in vivo*) и на первых настоящих листьях с использованием стандартного протокола агробактериальной трансформации (рис. 4). Около 50 эксплантов были трансформированы путем инокуляции в суспензию *A. rhizogenes* штамма K599.



Рис. 4. Начало процесса агробактериальной трансформации

Культура волосовидных корней некоторых видов растений известна довольно высокой регенеративной способностью. Действительно, через

некоторое время на эксплантах наблюдались точки спонтанной регенерации (рис. 5А, Б, В) и дальнейший успешный морфогенез.

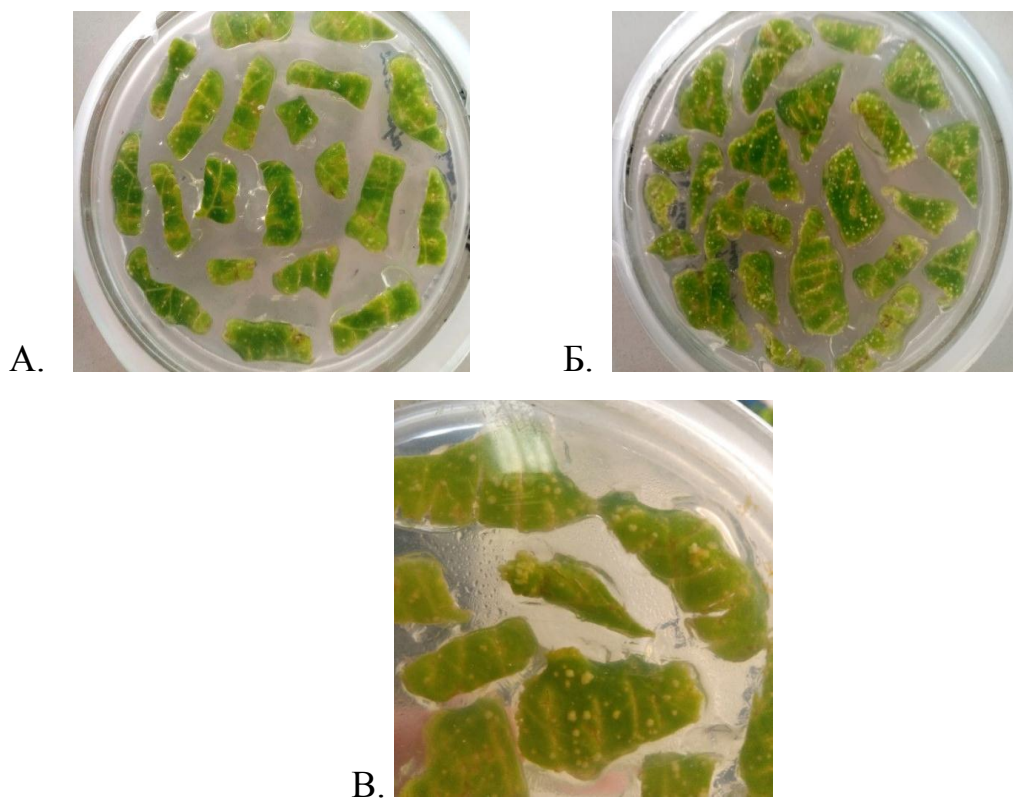


Рис. 5. Экспланты после воздействия *A.rhizogenes* штамма K599: спонтанные точки регенерации – А – на 10-й день, Б – на 13-й день, В – на 23-й день;

Спустя 15-20 дней наблюдали формирование каллусов приблизительно у 70% эксплантов (рис. 6).

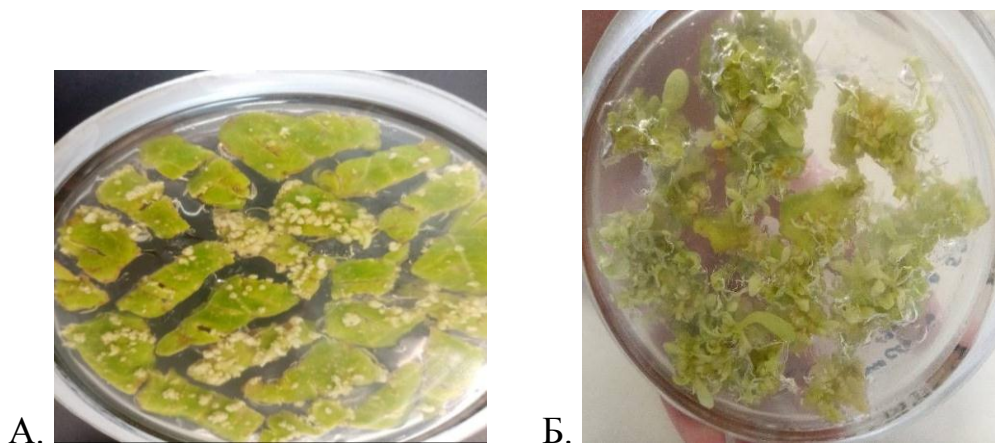


Рис. 6. Образование побегов на эксплантах табака

А – на 33-й день, Б – на 56-й день

Помимо появления регенерантов на эксплантах появляются также и волосовидные корни (рис. 7), которые в дальнейшем пересаживаются и из них также получают трансгенные растения, но более длинным путем.

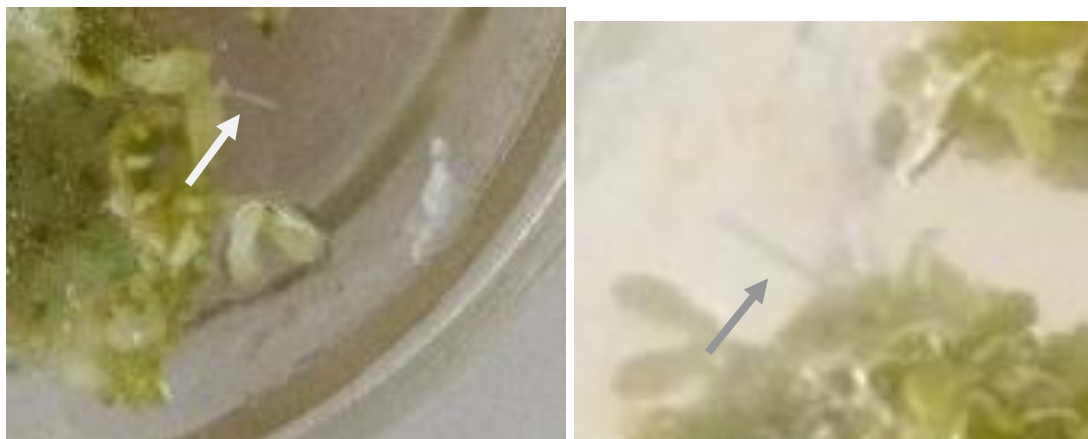


Рис. 7. Появление волосовидных корней из эксплантов

3.1.2. Пересадка регенерантов

Эти регенеранты имели фенотип, характерный для растений, трансгенных по генам *rol*: темно-зеленые морщинистые листья, укороченные междоузлия и высокую способность к укоренению [2].

Кроме того, волосовидные корни часто способны регенерировать целые жизнеспособные растения и поддерживать их генетическую стабильность во время непрерывного культивирования и регенерации растений (рис. 8).

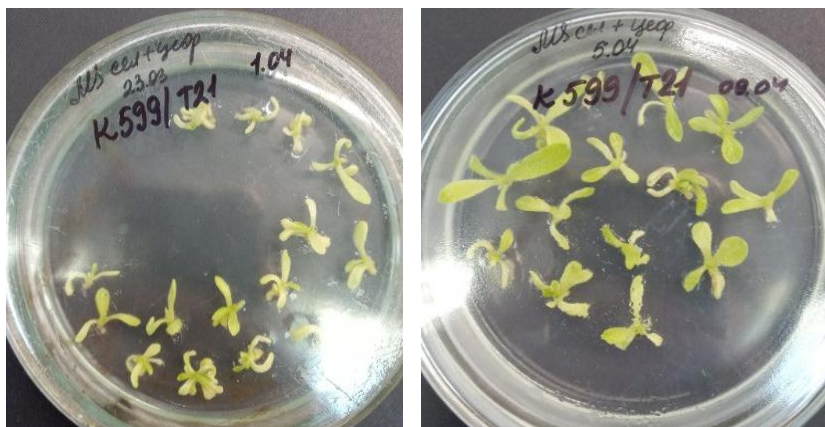




Рис. 8. Побеги после пересадки с эксплантов, на среду MS с антибиотиком цефотаксимом

Регенерация трансгенных побегов является неотъемлемой стадией в процессе получения растений с интересующими характеристиками, поскольку эта стадия может стать лимитирующей из-за большой зависимости эффективности регенерации от вида и даже сорта исследуемого растения. Регенерация возможна через каллусную стадию, эмбриониды и т.д., а также прямая регенерация из корней или листьев путем индукции различными фитогормонами, такими как ИУК, НУК, 6-БАП (рис. 9). Когда у побегов выросли достаточно большие листья, мы эти листья отобрали для дальнейшего анализа. Регенеранты хорошо укоренялись на среде MS, после чего их пересаживали на почвенную смесь (рис. 20).



Рис. 9. Культивирование регенерантов в сосудах со средой MS

3.1.3. Пересадка волосовидных корней

Помимо регенерантов на эксплантах также образовались волосовидные корни. Каждый волосовидный корень имеет свою уникальную ДНК, поэтому корни в итоге рассаживали индивидуально в чашки со средой для дальнейшего получения трансгенных растений с каждого имеющегося корня.

Волосовидные корни табака, полученные методом инокуляции в суспензии агробактерий, пересаживали на безгормональную твердую среду MS с цефотаксимом (рис. 10). Образцы культивировали при 23°C в темноте.

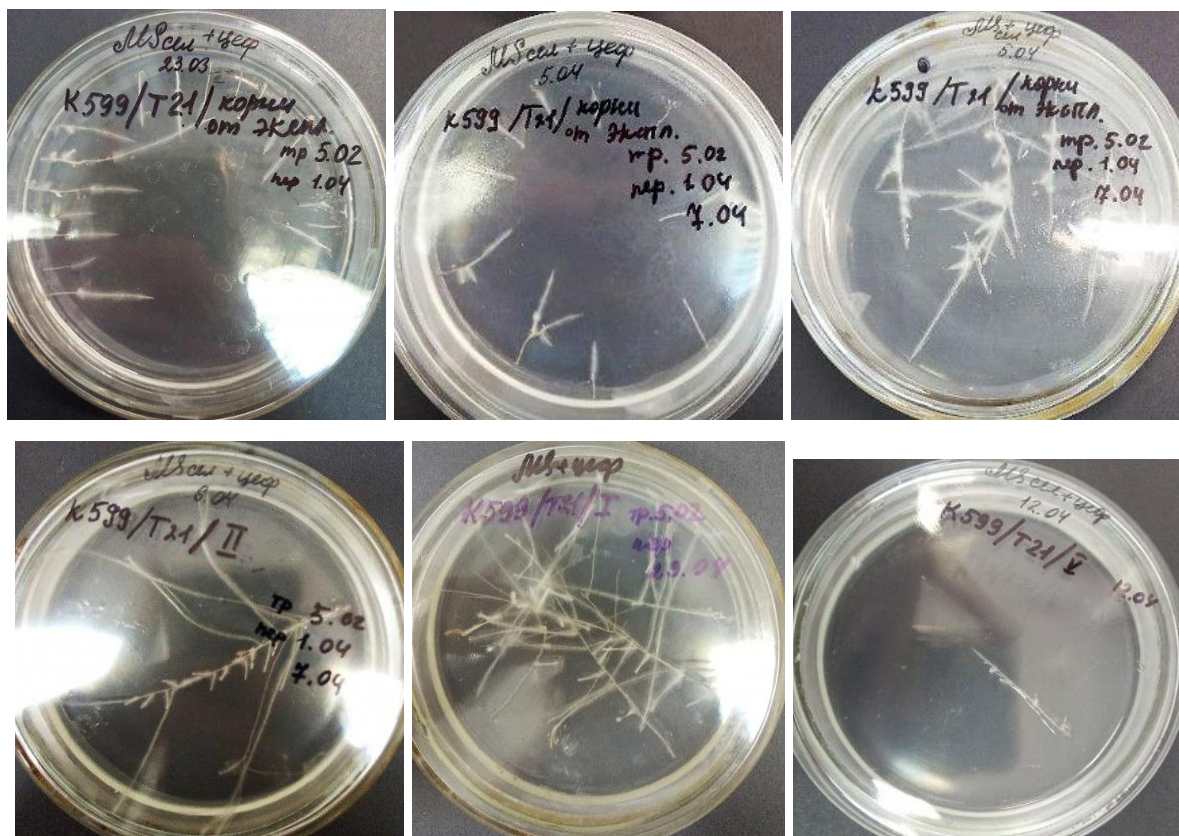


Рис. 10. Волосовидные корни табака

3.1.4. Побеги, которые дали корни без добавления гормонов

Некоторые побеги способны давать корни сразу без добавления индолил-уксусной кислоты в среду (рис. 11). Такие побеги можно сразу пересаживать в почву для дальнейшего роста.

В итоге побег с корнем пересаживают в почву для получения семян.

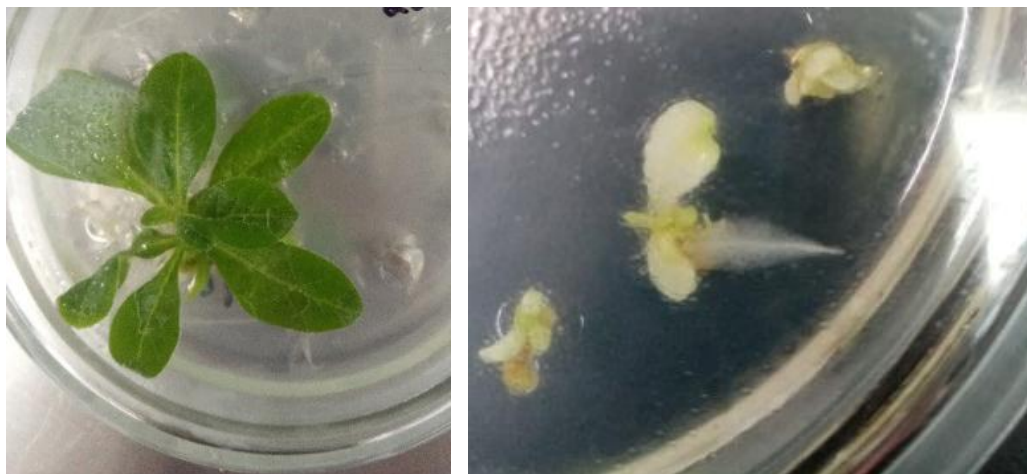


Рис. 11. Побеги выросшие на MS с цефотаксимом, дали корни.

3.1.5. Волосовидные корни, которые дали побеги без гормонов

Оказывается, трансгенные корни могут дать побеги без каких-либо фитогормонов (рис. 12). Они могут прижиться на среде MS с цефотаксимом. Так же можно отметить, что их корни могут расти как вверх направленными, так и направленными в среду.

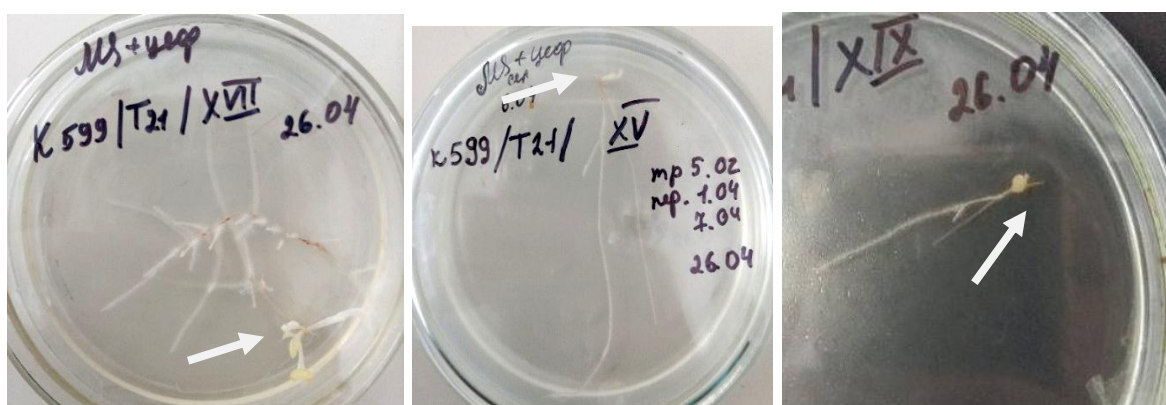


Рис. 12. Корни, которые дали побеги без гормонов.

Корни растут в темноте при 22°C, поэтому побеги изначально тоже белые. Позже они подрастают и начинают фотосинтезировать. Далее эти побеги пересадили уже самостоятельно и перенесли в климатостат со светом, где они уже полностью переходят на фотосинтез (рис. 13).



Рис. 13. Побеги от волосовидных корней

3.1.6. Каллусообразование и появление побегов из волосовидных корней

Здоровые каллусы пересаживали на среду для индукции побегов, которая содержала следующие гормоны: 1 мМ ИУК и 1 мМ БАП (рис. 14). Из морфогенного каллуса формировали полноценные растения, которые пересаживали в банку со средой MS с добавлением 0,1 мг/л ИУК для укоренения. По результатам исследования на табаке получены здоровые побеги из 80% каллуса (рис. 15).

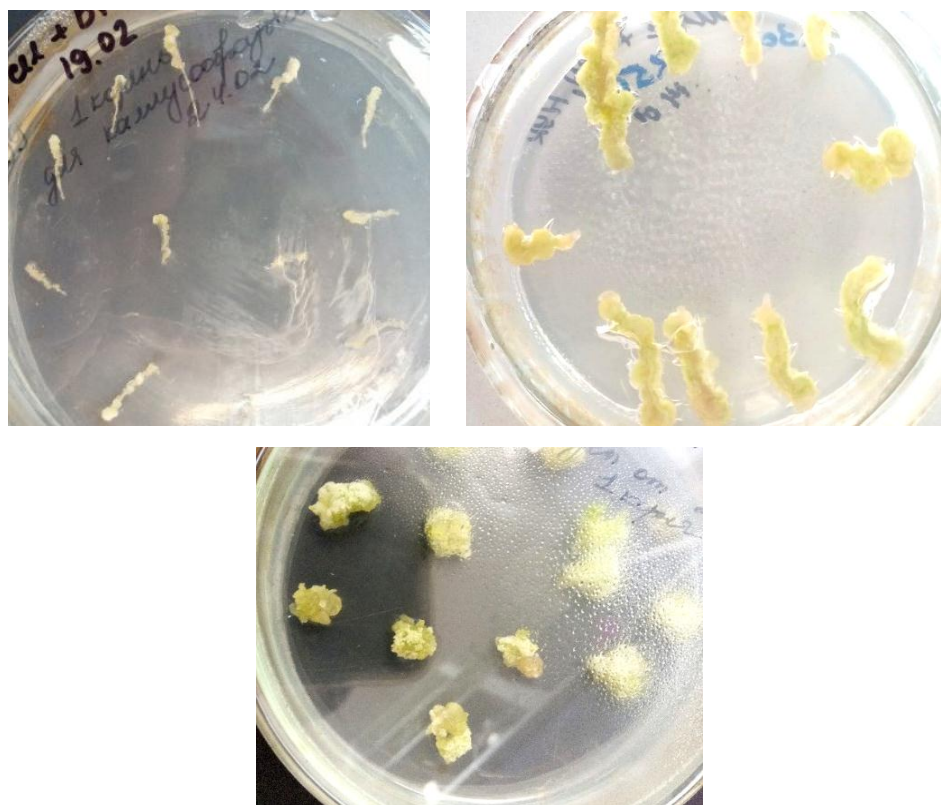


Рис. 14. Регенерация через стадию каллуса

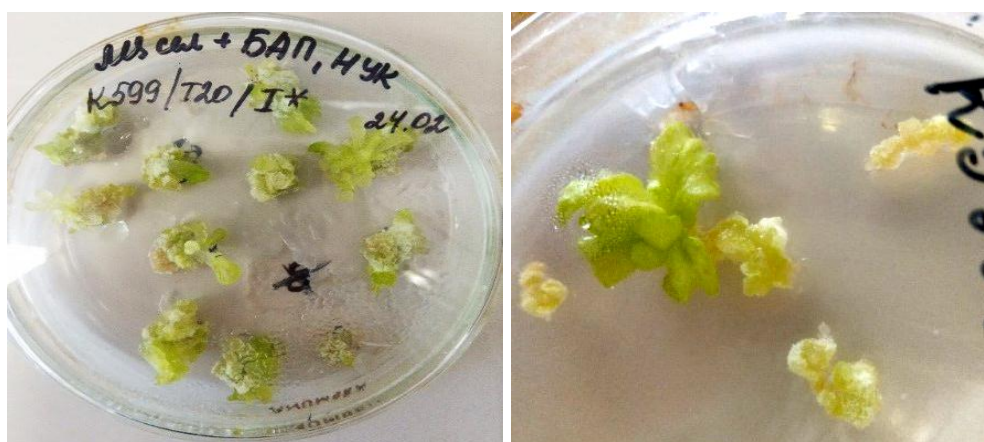


Рис. 15. Прямая регенерация после перенесения морфогенных каллусов, образование побегов на среде MS

3.1.7. Морфология трансгенного и нетрансгенного побега после трансформации

В результате трансформации помимо трансгенных побегов (рис. 17) табака могут также получиться и нетрансгенные (рис. 16).



Рис. 16. Нетрансгенный побег

Таблица 3

Отличия трансгенного табака от нетрансгенного (рис. 18)

Фенотип	Трансгенный	Нетрансгенный
Корни	Корни тянутся вверх	Корни в среде
Локализация образования корня	Возможно образование корней на листьях	Зона корневой шейки
Листовая пластинка	Закругленные	Продолговатые

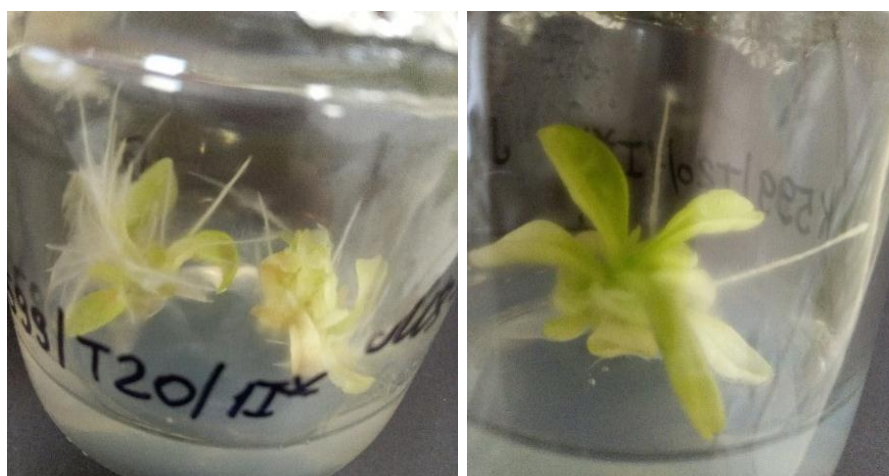


Рис. 17. Трансгенный побег.



Рис. 18. Сравнение трансгенного табака (слева), от нетрансгенного (справа)
Около 3% побегов получились нетрансгенными.

3.1.8. Акклиматизация трансгенных растений на почве

Регенеранты пересаживали в почвенную смесь, покрывали пленками и выращивали при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$ на свету (рис. 19). Регенеранты, акклиматизированные к почвенным условиям, имели характеристики, характерные для растений, трансгенных по генам *rol*. Например, они имели ярко выраженную кустистость, карликовость, темно-зеленые вытянутые морщинистые листья, короткие междоузлия и образование корней на листьях.

В ходе агробактериальной трансформации листовых дисков табака было отобрано около 30 первичных побегов. Из этих побегов укоренились на селективной среде около 20 растений, 7 из которых по морфологическим признакам были трансгенные. Из этих растений шесть были успешно акклиматизированы к условиям почвы и отобраны для дальнейшей работы для получения семян (рис. 20).



Рис. 19. Регенеранты, пересаженные на почвенную смесь для акклиматизации



Рис. 20. Акклиматизированное *in vivo* трансгенное растение по *rol*-генам

3.2. Результаты ПЦР-анализа

Из отобранных растений табака была выделена тотальная ДНК и проведен анализ на наличие генов *rolA*, *rolB* и *rolC*. Для ПЦР-анализа волосовидных корней на наличие генов *rolA*, *rolB* и *rolC* использовали

праймеры с нуклеиновой последовательностью указанные в таблице 2. Праймер *RolAB1* и *RolAB2* использовался для доказательства наличия гена *rolA* и *rolB*, праймер *RolCPlant2* использовался для доказательства наличия гена *rolC*. +К – ДНК *A. rhizogenes* штамма *K599*; -К – отрицательный контроль (вода); 1-39 – анализируемые линии побегов; 1-5 – анализируемые линии волосовидных корней; М-маркер.

Для подтверждения наличия в ДНК полученных побегов *rol*-генов проводили ПЦР-анализ (рис. 21, 22) с праймерами к фрагменту *rolA* и *rolB* гена, так как эти гены считаются ключевыми в образовании волосовидных корней [57]. По результатам ПЦР-анализа с праймерами *RolAB1* и *RolAB2* выяснилось, что в праймере *RolAB1* только 2 линии побегов не содержат гены *rolA* и *rolB*, образцы под номерами 21 и 24 не трансгенные (рис. 21). А в праймере *RolAB2* (рис. 22) всего лишь один образец побегов является не трансгенным. Результат волосовидных корней с праймерами *RolAB1* и *RolAB2* на наличие *A* и *B* *rol*-генов (рис. 24), оказались трансгенными и имеют морфологические признаки волосовидных корней. Результат ПЦР-анализа с праймером *RolCPlant2* (рис. 23), образцы побегов 21 и 24 оказались нетрансгенными. Образцы ДНК волосовидных корней (рис. 24) с праймером *RolCPlant2*, доказали наличие гена *rolC*, что является признаком трансгенности корней.

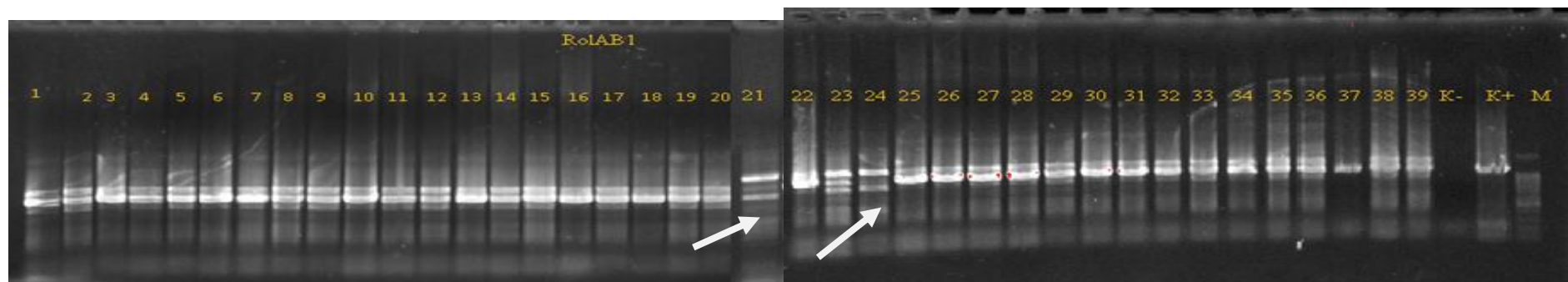


Рис. 21. Проведение ПЦР с использованием праймера RolAB1. 1-39 – анализируемые линии побегов; +K – ДНК *A. rhizogenes* штамма K599; -K – отрицательный контроль (вода); M-маркер

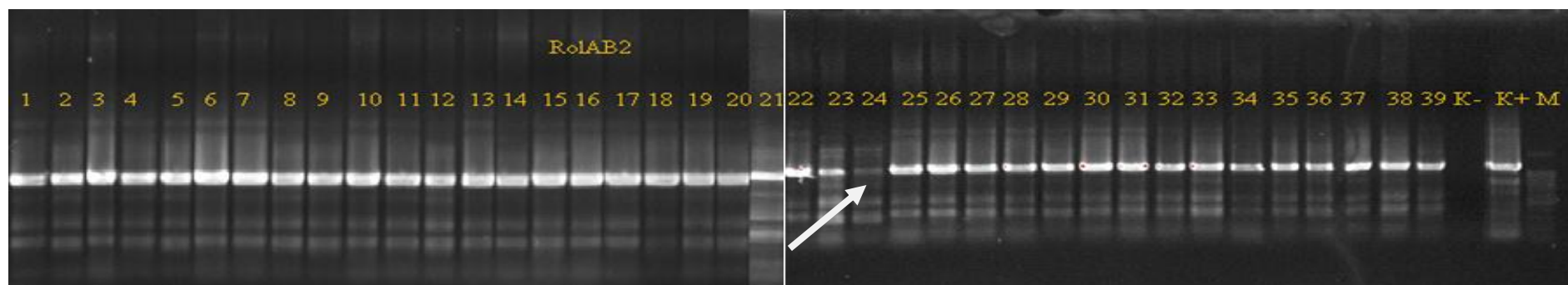


Рис. 22. Проведение ПЦР с использованием праймера RolAB2. 1-39 – анализируемые линии побегов; +K – ДНК *A. rhizogenes* штамма K599; -K – отрицательный контроль (вода); M-маркер

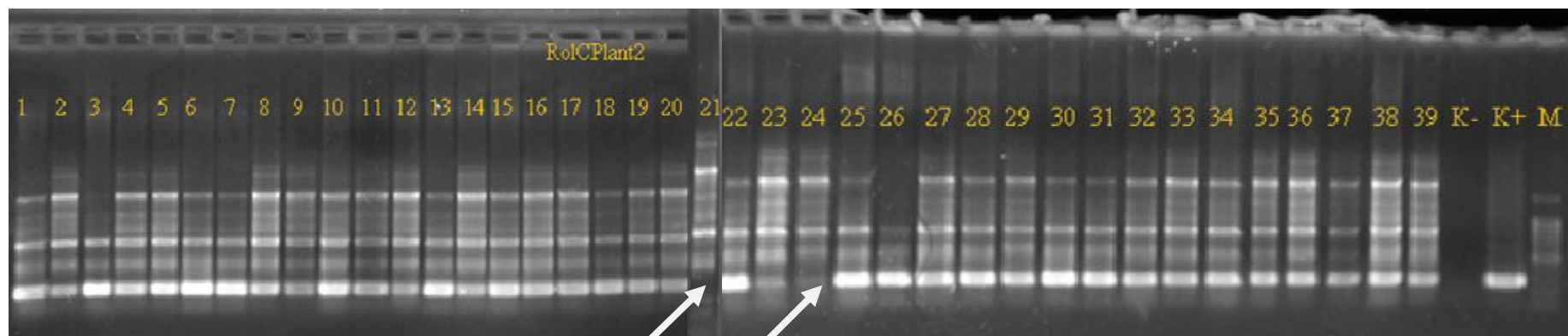


Рис. 23. Проведение ПЦР с использованием праймера RolCPlant2. 1-39 – анализируемые линии побегов; +К – ДНК *A. rhizogenes* штамма K599; -К – отрицательный контроль (вода); М-маркер

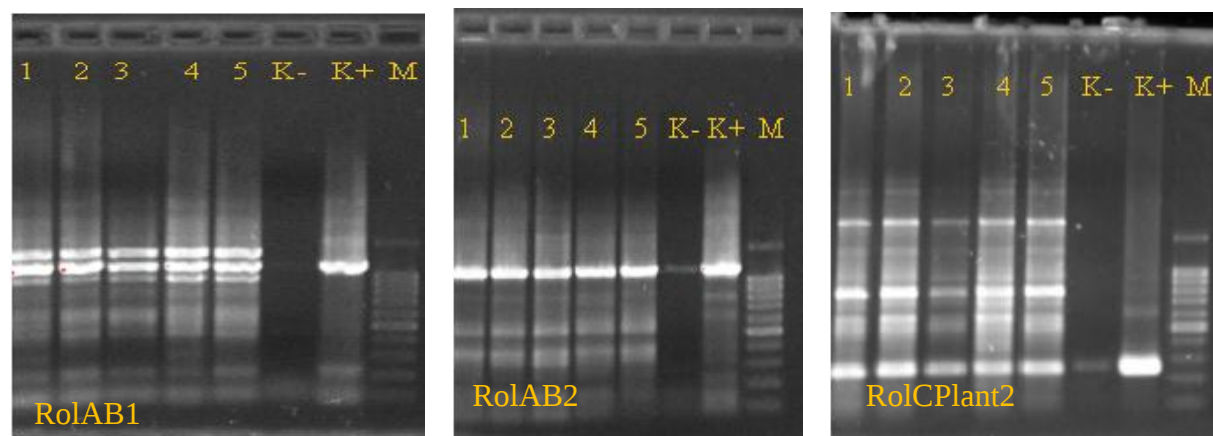


Рис. 24. Наличие *rol*-генов в волосовидных корнях. 1-5 – анализируемые линии волосовидных корней; +К – ДНК *A. rhizogenes* штамма K599; -К – отрицательный контроль (вода); М-маркер

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 *Agrobacterium rhizogenes*.

В ходе проведенных экспериментов нами получены взрослые трансгенные по *rol*-генам растения табака. На эксплантах листьев этих трансгенных растений на безгормональных питательных средах индуцировалось образование волосовидных корней. Это позволяет сделать заключение о том, что регенерирующая способность *N. tabacum* достаточно высока, что дает возможность использование такого способа для устойчивого сохранения культур hairy roots с полезными признаками в течение длительного времени. Также нами получены семена у трансгенных растений и планируются работы по получению растений с *rol*-генами второго поколения и проведению их морфофизиологического анализа при нормальных и стрессовых условиях.

Почвенная агробактерия *A. rhizogenes* трансформирует растения так называемыми *rol*-генами, что и приводит к неопластическому плагиотропному разрастанию корней, фактически соответствующих ювенильному растению. В настоящее время экспериментаторы по всему миру применяют в фундаментальных и прикладных исследованиях для получения волосовидных корней не менее 90 штаммов *A. rhizogenes*. Некоторые из них используются довольно редко, тогда как другие можно считать гораздо более «популярными». При этом в подавляющем

большинстве работ использованы два агропиновых штамма: *ATCC15834* и *A4*, отличающиеся довольно высокой степенью вирулентности.

A. rhizogenes штамм *K599* обладает высокой инфекционностью на различных растениях. Особенностью данного штамма агробактерий является то, что под их действием образуются не только волосовидные корни, но происходит и побегообразование. При этом методом ПЦР-анализа нам удалось доказать, что формирующиеся побеги являются трансгенными. Трансгенные волосовидные корни могут быть непосредственно использованы для изучения генов, функций плазмид и взаимодействий между растениями и их корневыми вредителями; они могут быть использованы в качестве биореакторов для производства активных ингредиентов лекарственных растений, а также могут быть использованы для регенерации полных трансгенных растений. Культуры волосовидных корней обладают многими преимуществами, включая высокий и непрерывный выход широкого спектра метаболитов и высокий потенциал роста на относительно дешевых питательных средах без фитогормонов.

ВЫВОДЫ

1. При агробактериальной трансформации листовых эксплантов табака при помощи штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes* в отличие от штаммов *A4* и *15834* активируется не только ризогенез, но и геммогенез;
2. Из прямых регенерантов побегов, полученных при генетической трансформации штаммом *K599*, могут быть получены полноценные растения, акклиматизированные к условиям почвы;
3. Путем использования фитогормонов 6-БАП и НУК из волосовидных корней *K599* могут быть получены побеги и полноценные растения с фенотипом «hairy root»;
4. Методом ПЦР-анализа доказано наличие *rol*-генов *A*, *B*, *C* в волосовидных корнях, прямых регенерантах и растениях полученных при регенерации из волосовидных корней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будынков, Н.И. Механически распространяемые опасные инфекции в овощеводстве защищаемого грунта / Н.И. Будынков // . – 2009.- № 3.– С. 29-32.
2. Гумерова, Г.Р. Физиологические характеристики трансформированных различными способами культур корней / Гумерова Г.Р., Кулуев Б.Р. // 2018.
3. Казанова И.Н. Культивирование генетически трансформированных корней растений: возможности и перспективы использования в физиологии растений // Физиология растений. 2005. Т.39. С.1208- 1214.
4. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 787-797.
5. Кулаева О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Горизонтальный перенос генов от агрообактерий к растениям // Экологическая генетика. 2006. Т. IV. № 4. С. 10–19. [Kulaeva O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A Horizontal transfer of genes from agroobacteria to plants Трансгенный табак с rol-генами 354 // Ecological Genetics. 2006. V. IV. № 4. P. 10–19. In Russian].
6. Лутова, Л.А. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений: (Обзор) / Л.А. Лутова, З.Б. Павлова, М.М. Иванова // Генетика. – 1998. – Т. 34. – № 2. – С. 165– 182.
7. Павлова, О.А. Rol-гены Agrobacterium rhizogenes / О.А. Павлова, Т.В. Матвеева, Л.А. Лутова // Ecological genetics. – 2013. – Т. 11. – №. 1.
8. Розов, Г.А. Как цитокинины действуют на клетку / Г.А. Романов // Физиология растений. – 2018. – Т. 56. – №2. – С. 295-319.
9. Ходыкина, М.В. Антибактериальная активность антибиотиков в сочетании с препаратом серебра Зерокс® против возбудителей ряда бактериозов растений/ М.В. Ходыкина, В.А. Политыко, Е.И. Кырова, Ю.А.

Крутяков, П.М. Жеребин, А.Н. Игнатов // Защита картофеля. – 2014. – №2. – С. 83–86.

10. Altamura, M.M. *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development / M.M. Altamura // Plant cell, tissue and organ culture. – 2004. – V. 77. – №. 1. – С. 89-101.

11. Aoki S., Syono K., 1994. Synergistic function of *rolB*, *rolC*, *ORF13* and *ORF14* of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in hairy root induction in *Nicotiana tabacum* // Plant Cell Physiol. Vol. 40. P. 252–256.

12. Atanasov, A. G. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review / A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E. M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. H. Heiss, J. M. Rollinger, D. Schuster, J. M. Breuss, V. Bochkov, M. D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V. M. Dirscha, H. Stuppner // Biotechnology advances. – 2015. – V. 33. – №. 8. – P. 1582-1614.

13. Banerjee S, Singh S and Ur Rahman L 2012. Biotransformation studies using hairy root cultures - A review. Biotechnol. Adv. 30: 461-468.

14. Bergey, Michelotti S., Bindi D. et al., 2010. Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* *rolD* gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // Theor. Appl. Genet. Vol. 107. P. 831–836.

15. Bradbury, J. F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria / J. F. Bradbury // Ferry Lane, Kew, Surrey, England. CAB International. – 1986. – P. 332

16. Bulgakov, V.P. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism / V.P. Bulgakov, Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik, T.Y. Gorpenchenko, Y.V. Vereshchagina // Biotechnology of Hairy Root Systems. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 1-22.

17. Capone, I. Upstream non-coding region which confers polar expression to Ri plasmid root inducing gene *rolB* / I. Capone, M. Cardarelli, M. Trovato, P. Costantino // Molecular and General Genetics MGG. – 1989. – V. 216. – №. 2-3. – P. 239-244.

18. Chilton, M. D. T-DNA from *Agrobacterium* is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells / M.D. Chilton, R.K. Saiki, N. Yadav, M.P. Gordon and F. Quetier // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – P. 4060–4064.
19. Christey, M.C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants / M.C. Christey // *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* – 2001. – V. 37. – №. 6. – P. 687-700.
20. De Cleene M., De Ley J. The host range of infectious hairy-root // *The Bot. Rev.* 1976. V.47. P. 147-194.
21. Dehesh, K. A trans-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter / K. Dehesh, W.B. Bruce, P.H. Quail // *Science.* – 1990. – V. 250. – №. 4986. – P. 1397-1399
22. Devey, M.E., Jermstad, K.D., Tauer, C.G., and Neale, D.B. (1991) Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine three-generation pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 83, 238-242.
23. Duckely, M. The VirE2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*: the Yin and Yang of T-DNA transfer / M. Duckely, B. Hohn // *Vol. 223. – Issue 1. – 6. – 2003. – P. 1–6.*
24. Dym,O., Albeck,S., Unger,T., Jacobovitch,J., Branzburg,A., Michael,Y., Frenkiel-Krispin,D., Wolf,S.G. and Elbaum,M. (2008) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 105, 11170–11175.
25. Dynan, W.S. Modularity in promoters and enhancers / W.S. Dynan // *Cell.* – 1989. – V. 58. – №. 1. – P. 1-4.
26. Egamberdieva, D. Iidole –acetic acid production by root associated bacteria and its role in plant growth and development In: *Auxins: Structure, Biosynthesis and Functions* / D. Egamberdieva // Nova Science Publishers – 2011. ISBN: 978–1–62100–504–9
27. Estruch, J.J. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates / J.J. Estruch, D. Chriqui, K. Grossmann, J. Schell, A. Spena // *The EMBO journal.* – 1991. – V. 10. – №. 10. – P. 2889-2895.

28. Failla, O., Tura, D. and Bassi, D. 1990. Genotype-environment-year interaction on oil antioxidants in an olive district of northern Italy. *Acta Hort.* 586: 171-174.
29. Flores H. E., Filner P. Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae //Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1985. – C. 174-185.
30. Frenkiel–Krispin, D. Plant Transformation by *Agrobacterium tumefaciens* modulation of single stranded DNA–VirE2 complex assembly by VirE1 / D. Frenkiel–Krispin // *JBC Papers*. – 2006. – DOI 10.1074/jbc.M605270200
31. Garcia–Rodriguez, F.M. The *Agrobacterium* VirE3 effector protein: a potential plant transcriptional activator. / F.M. Garcia–Rodriguez, B. Schrammeijer, P.J. Hooykaas // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – 34. – P. 6496– 6504.
32. Gelvin, S.B. (2008) *J. Bacteriol.*, 180, 4300– 4302
33. Gelvin, B. et al *Agrobacterium* – Mediated Plant Transformation: the Biology behind the «Gene–Jockeying» / B. Gelvin et al // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2003. – P. 16–37.
34. Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig–Müller J., Xu J. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource // *Trends Biotechnol.* –2012, T.30. – C.528–537. [doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.001];
35. Giri A., Narasu M. L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications // *Biotechnology advances*. – 2000. – T. 18. – №. 1. – C. 1-22
36. Guivarc'h, A. Tissue-specific expression of the *rolA* gene mediates morphological changes in transgenic tobacco / A. Guivarc'h, M. Carneiro, F. Vilaine, V. Pautot, D. Chriqui // *Plant Molecular Biology*. – 1996. – V. 30. – №. 1. – P. 125-134.
37. Hamill, J. D., Parr, A. J., Rhodes, M. J. C., Robins, R. J., and Walton, N. (1987). New routes to plant secondary products. *Nat. Biotechnol.* 5, 800–804. doi: 10.1038/nbt0887-800

38. Hansen J., Beck E. (1994) Seasonal changes in the utilization and turnover of assimilation products in a 8-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees, *Trees* 8, 172–182.
39. Janyce, Wong B., Wu A., Cheng G., Li Z., Dong S. A method to construct a thirdgeneration horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network // *Analytical Chemistry*. 2002. V. 74, No. 9. – P. 2217–2223.
40. Jouanin, L. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids / L. Jouanin // *Plasmid*. – 1984. – 12. – P. 91– 102.
41. Kado, E.I. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas* / E. I. Kado and M. G. Heskett // *Phytopathology*. – 1970. – 60. – P. 969–976.
42. Kajikawa M., Hirai N., Hashimoto T. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids // *Plant Mol. Biol.* – 2009, T.69. C.287-298;
43. Kennedy, B.W. Estimates of U.S. crop losses to procaryote plant pathogens / B.W. Kennedy // *Plant Dis.* – 1980. – 647. – P. 674–676.
44. Kersters, K. Genus *Agrobacterium* / K. Kersters & J. De Ley // In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. – 1984. – vol. 1. – P. 361–373.
45. Krishnamohan Efficient vir gene induction in *Agrobacterium tumefaciens* requires virA, virG, and vir box from the same Ti plasmid / Krishnamohan, Atmakuri, V. Balaji, K. Veluthambi // *Journal of Bacteriology*. – 183 (13). – 2001. – P. 4079–4089. ISSN 0021–9193
46. Kuluev, B.R. Natural rubber, its sources and components / B.R. Kuluev, R.R. Garafutdinov, I.V. Maksimov, A.M. Sagitov, D.A. Chemeris, A.V. Knyazev, Z.R. Vershinina, An.K. Baymiev, A.A. Muldashev, Al.K. Baymiev, A.V. Chemeris // *Biomics* . – 2015. – V. 7. – P. 224-283
47. Lima, J. A. Delepelaire P., Rouzé P. et al., 2009. Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Mol. Biol.* Vol. 11. P. 731–744

48. Mankin SL, Hill DS, Olhoft PM, Toren E, Wenck AR, Nea L, Xing L, Brown JA, Fu H, Ireland L, Jia H, Hillebrand H, Jones T and Song H.-S 2007. Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant* 43: 521-535.
49. Mauro, M.L. The plant oncogene rolD stimulates flowering in transgenic tobacco plants / M.L. Mauro, M. Trovato, A. De Paolis, A. Gallelli, P. Costantino, M.M. Altamura // *Developmental biology*. – 1996. – V. 180. – №. 2. – P. 693-700.
50. Mohajjel-Shoja H. Contribution to the study of the *Agrobacterium rhizogenes* plast genes, rolB and rolC, and their homologs in *Nicotiana tabacum*. Thesis of University of Strasbourg. 2010.
51. Tempe J., Costantino P. Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes // *Plant-microbe interactions*. – 1996. – T. 5. – C. 93-139
52. Trovato M., Maras B., Linhares F., Costantino P., 2001. The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase // *Proc. Natd. Acad. Sci. USA*. Vol. 98. P. 13449–13453.
53. Meyer, A. Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes / A. Meyer, J. Tempe, P. Costantino // *Plant-microbe interactions*. – 2000. – V. 5. – P. 93-139.
54. Mishra, B.N. Growth of hairy - root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites / B.N. Mishra, R. Ranjan // *Biotechnology and applied biochemistry*. – 2008. – V. 49. – №. 1. – P. 1-10.
55. Moore, L.W. Biology of *Agrobacterium tumefaciens* plant interactions. *Biology of the Rhizobiaceae* / L. W. Moore and D. A. Cooksey // Academic Press, New York – 1981. – P. 15–46.
56. Moriguchi K, Maeda Y, Satou M, Hardayani NS, Kataoka M, Tanaka N and Yoshida K 2001. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in *Rhizobiaceae*. *J. Mol. Biol.* 307: 771-774.

57. Nilsson, O. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots / O. Nilsson, O. Olsson // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – V. 100. – №. 3. – P. 463-473.
58. Nilsson O., Tumineh H., Sundberg B., Olsson O. The *Agrobacterium rhizogenes* rolB and rolC promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen // *Physiologia Plantarum*. 1997. V. 100. P. 456–462. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03050.x
59. Otten L and Helfer A 2001. Biological activity of the rolB-like 5' end of the A4-orf8 gene from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA. *Mol. Plant Microbe Interact* 14: 405-411.
60. Parsons, T.J. Transformation of Poplar by *Agrobacterium tumefaciens* / T.J. Parsons et al // *Nature Biotechnology*. – 1986. – 4. – P. 533–536.
61. Peebles CA, Sander GW, Li M, Shanks JV and San KY 2009. Five year maintenance of the inducible expression of anthranilate synthase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 1521- 1525.
62. Peebles C.A., Gibson S.I., Shanks J.V., San K.Y. Long-Term Maintenance of a Transgenic *Catharanthus roseus* Hairy Root Line. // *Biotechnol Prog.* – 2007, T. 23, №. 6. – C. 1517-1518;
63. Sawada, H. Studies on the classification and evolution of phytopathogenic bacteria of the genera *Agrobacterium* and *Pseudomonas* / H. Sawada // *Journal of General Plant Pathology: JGPP*. – 2014. – T. 80. – №. 6. – P. 519.
64. Robins R.J. The application of root cultures to problems of biological chemistry // *Nat Prod Rep.* – 1998, T. 15. – C. 549-570;
65. Sealey, P. G. Gel electrophoresis of nucleic acids / P.G. Sealey, E.M. Southern (Rickwood, D., & Hames, B. D., Eds.) / IRL, Oxford. – 1982. – P. 39-76.
66. Schmu Uing, T. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development / T. Schmu Uing, J. Schell and A. Spena / *EMBO J.* – 1988. – 7. – P. 2621–2629.

67. Schmulling, T. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development / T. Schmulling, J. Schell, A. Spena // *The EMBO journal*. – 1988. – V. 7. – №. 9. – P. 2621-2629.
68. Serino G, Clerot D, Brever J, Costantino P and Cardarelli M 1994. rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* cucumopine strain: sequence, effects and pattern of expression. *Plant Mol. Biol.* 26: 415-422.
69. Stachel, S.E. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* / S.E. Stachel, E. Messens, M. Van Montagu, P. Zambryski // *Nature*. – 1985. – 318. – P. 624–630.
70. Stachel, S.E. Generation of single – stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells / S.E. Stachel, B. Timmerman , P. Zambryski // *Nature*. – 1986. – 322. – P. 706–712.
71. Sudha, C.G. Production of ajmalicine and ajmaline in hairy root cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant / C.G. Sudha, B.O. Reddy, G.A. Ravishankar, S. Seenii // *Biotechnology letters*. – 2003. – V. 25. – №. 8. – P. 631-636.
72. Sugaya, S. Cell-specific expression of the rolC gene of the TL-DNA of Ri plasmid in transgenic tobacco plants / S. Sugaya, K. Hayakawa, T. Handa, H. Uchimiya // *Plant and cell physiology*. – 1989. – V. 30. – №. 5. – P. 649-653.
73. Trovato, M. The plant oncogene rolD encodes a functional ornithine cyclodeaminase / M. Trovato, B. Maras, F. Linhares, P. Costantino // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – V. 98. – №. 23. – P. 13449-13453.
74. Umber M, Clément B, Otten L. 2005. The T-DNA oncogene A4-orf8 from *Agrobacterium rhizogenes* A4 induces abnormal growth in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact* 18: 205-211.
75. Van Larebeke, N. Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer / N. Van Larebeke, C. Genetello J. Schell R.A. Schil-eroort, A. K. Hermans, M. P. Hemalsteens, and M. Van Montagu// *Nature*. – 1975. – 255. – P. 742–743.

76. Willems, A. Phylogenetic Analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene Sequences Int. / A. Willems and M. Collins // J.Syst. Bacteriol. –1993. – 43. – P. 305–13.
77. Windels, P. T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of DNA sequences / P. Windels, S. De Buck, E. Van Bockstaele et al. // Plant Physiol. – 2003. – V. 133. – P. 2061–2068.
78. Xu Q., Xu X., Shi Y., Xu J., Huang B. Transgenic tobacco plants overexpressing a grass PpEXP1 gene exhibit enhanced tolerance to heat stress // PLOS One. – 2012, T. 8. – C. e100792. [doi: 10.1371/journal.pone.0100792];
79. Yao, S.C. Hairy root induction and polysaccharide production of medicinal plant *Callerya speciosa* Champ / S.C. Yao, L.H. Bai, Z.Z. Lan, M.Q. Tang, Y.J. Zhai, H. Huang, R.C. Wei // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2016. – V. 126. – №. 1. – P. 177-186.
80. Yu R.M., Ma N., Yan C.Y., Zhao Y. Effects of exogenous phytohormones on hairy root growth of *Polygonum multiflorum* and biosynthesis of anthraquinones in its hairy root cultures // Chin J Biotech. – 2006. T. 22. – C. 619-623;
81. <http://medbiol.ru>
82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
83. <http://www.ejbiotechnology.info>
84. <http://archive.bio.ed.ac.uk>
85. www.agroatlas.ru

ОТЗЫВ

на _____ выпускную квалификационную работу студента группы _____ Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
_____ Ахтямова Валерия Юрьевна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: Особенности генетической трансформации растений при помощи штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes*

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и графического материала, соответствие работы заданию
_____ Полностью соответствует

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).

Актуальность темы ВКР связана с тем, что использование штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes* для трансформации растений индуцирует побегообразование, что позволяет существенно упростить методику получения трансгенных растений. Полученные волосовидные корни могут быть источником накопления ценных метаболитов

3 Умение самостоятельно и творчески решать задачи, поставленные в задании на выполнение ВКР, подготовленность к выполнению профессиональных задач. Выпускник проявил отличное умение самостоятельно и творчески решать поставленные задачи, практическая и теоретическая подготовленность на отличном уровне, выпускник готов к выполнению профессиональных задач.

4 Использование современных информационных технологий при выполнении и оформлении ВКР.
при написании работы использовалась программа Microsoft Word, владение программы хорошее

5 Умение пользоваться справочной, научной, научно-технической и патентной литературой, в том числе зарубежной. Выпускник показал отличное умение использовать справочную, научную, научно-техническую и патентную литературу

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР.

7 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала ВКР в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствие с требованиями оформления, предъявляемые к оформлению содержания выпускных квалификационных работ (ВКР) студентов выпускных курсов БГМУ

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости).
_____ Работа выполнена в соответствии с требованиями
(дополнительные сведения представлены на _____ листах приложения)

9 Апробация и реализация результатов, полученных в ВКР: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. Автором тема глубоко проработана, и глубоко изучена, заслуживает внимания результаты и обсуждения

10 Возможность использования результатов, полученных в ВКР, в учебном процессе и в производстве, а также возможность опубликования в открытой печати результатов, полученных в ВКР или другое

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. «Отлично» _____

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично при успешной сдаче
Руководитель выпускной квалификационной работы

Научный руководитель:
Профессор, д.б.н.
Кулуев Булат Разяпович

(Фамилия, имя, отчество, должность)



РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Ахтямова Валерия Юрьевна
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: « Особенности генетической трансформации растений при помощи штамма *K599 Agrobacterium rhizogenes* »

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.
Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике

4 Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств. Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Хороший уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.
Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений
Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживает внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента
Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.
Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени).

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент ФГБОУ ВО БГМУ
профессор кафедры ФММ
(Место работы, занимаемая должность)

А. К. Баймиев

А. К. Баймиев
(Инициалы и фамилия)



РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы
(Форма выпускной квалификационной работы)

Б-401 А группы

(Шифр группы)

Ахтямова Валерия Юрьевна

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: « Особенности генетической трансформации растений при помощи штамма K599 *Agrobacterium rhizogenes* »

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения – Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике

4. Техничко-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе. _____ имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств.

Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др.

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. Хороший уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов.

Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений

Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживает внимания результаты и

обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента

Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11. Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др.

Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) квалификации (степени) студенту-выпускнику

Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент

Научный сотрудник ИБГ УФИЦ РАН, к.б.н.

(Место работы, занимаемая должность)

Вершинина Зилья Рифовна

(Инициалы и фамилия)





АНТИПЛАГИАТ
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Башкирский государственный медицинский
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Ахтямова Валерия Юрьевна
Самоцитирование
рассчитано для: Ахтямова Валерия Юрьевна
Название работы: ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ РАСТЕНИЙ ПРИ ПОМОЩИ ШТАММА K599
AGROBACTERIUM RHIZOGENES
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	23.68%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	22.45%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	51.86%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	76.87%
ЦИТИРОВАНИЯ	24.46%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.68%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 21.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 21.06.2021 07:25

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

21.06.2021 г.

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.