

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Тукташева Русалина Радиковна

**Индукция волосовидных корней моркови при помощи различных
штаммов *Agrobacterium rhizogenes***

Научный руководитель:
Старший преподаватель
кафедры фундаментальной и
прикладной микробиологии,
младший научный сотрудник
ИБГ УФИЦ РАН



А. Р. Кулуев

Уфа – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1. Характеристика рода <i>Agrobacterium</i>	6
1.1.1. Род <i>Agrobacterium Rhizobium</i> , физиологические и генетические свойства, таксономическое положение, разнообразие, основные представители – патогены растений	7
1.1.2. Систематическое положение <i>Agrobacterium</i>	8
1.1.3. Физиологические признаки <i>Agrobacterium</i>	9
1.1.4. Вирулентность и распространение бактерий рода <i>Agrobacterium</i> ...	12
1.1.5. Геном штамма <i>K599 Agrobacterium</i>	13
бактерий рода <i>Agrobacterium</i> в генной инженерии	14
1.2.1. Трансформация растений агробактериями.....	15
1.2.2. Методы получения культуры волосовидных корней.....	16
1.3. Сладкий белок браззеин	17
1.4. Применение волосовидных корней в биотехнологической промышленности.....	19
1.4.1. Применение культур волосовидных корней в фармацевтической промышленности.....	20
1.4.2. Применение волосовидных корней в биотехнологии и промышленности.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	22
2.1. Объекты исследования	22
2.2. Приборы	22
2.3. Составы сред	23
2.4. Создание рекомбинантных векторов для проведения агробактериальной трансформации	24
2.5. Трансформация компетентных клеток <i>E.coli</i> плазмидной ДНК	27

2.6. Выделение и очистка плазмидной ДНК методом щелочного лизис	27
2.7. Выделение тотальной ДНК <i>E.coli</i> при помощи 5%-ного тритона X-100 для ПЦР-анализа	29
2.8. Полимеразная цепная реакция	29
2.9. Агарозный гель-электрофорез	31
2.10. Электропорация компетентных клеток <i>Agrobacterium rhizogenes</i> штамма K599, A4, K15834	32
2.11. Стерилизация корнеплода моркови	33
2.12. Стерилизация морковных дисков	34
2.13. Приготовление MS-среды	36
2.14. Агробактериальная трансформация дисков корнеплодов морков.	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	40
3.1. ПЦР-анализ ДНК бактерий	40
3.2. Получение волосовидных корней из дисков моркови	41
3.3. Подбор оптимальных условий и питательной среды	43
4. ВЫВОДЫ	47
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49

Список сокращений и условных обозначений

P_{Ti} и *p_{Ri}* плазмиды *Agrobacterium*spp.

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА/EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

LB-среда – среда Лурия-Бертрани

MS-среда - среда Мурасиге-Скуга

ИУК – индол-3-уксусная кислота

НУК – нафтилуксусная кислота

БАП – бензиламинопурин

ВВЕДЕНИЕ

Агробактерии - род почвенных бактерий, обладающих способностью трансформировать растительные клетки Т-ДНК, расположенной на pTi/pRi-плазмиде последовательностью, содержащей набор генов, экспрессирующихся в клетках растений. Экспрессия этих генов приводит к пролиферации трансформированных клеток с последующим образованием опухолей или разрастаний корней.

Волосовидные корни образуются под действием таких штаммов как *Agrobacterium rhizogenes*, и, несмотря на действительно имеющий место в этом случае перенос некоторой части генетического материала агробактерий, подобные процессы вполне обыденно происходят в природе, в том числе и без участия человека, тогда как под генетической трансформацией в научных исследованиях принято понимать искусственный процесс по внедрению конкретных генов или иных фрагментов ДНК в геном другого организма, что, тоже проводится над корнями, но уже с помощью рекомбинантных штаммов *Agrobacterium rhizogenes*, несущих специальный бинарный вектор со вставкой.

Волосовидные корни индуцируют для получения вторичных метаболитов, белков, микроэлементов, витаминов и т.п.

Цель: Получение волосовидных корней моркови, индуцированных при помощи штаммов *K599*, *A4*, *K15834 Agrobacterium rhizogenes*.

Задачи:

1. Получение культур индуцированных волосовидных корней моркови, вырабатывающих сладкий белок браззеин
2. Определение наиболее эффективного метода стерилизации дисков моркови.
3. Подбор оптимальной среды для выращивания культуры корней моркови.
4. Подбор оптимальной температуры для роста волосовидных корней моркови.

Объект исследования: волосовидные корни моркови, полученные с помощью *Agrobacterium rhizogenes* штамма *K599*, *A4* и *K15834*.

Предмет исследования: корнеплод моркови (*Daucus radix vegetabilis*), *Agrobacterium rhizogenes* штамма *K599*, *A4*, *K15834*.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика рода *Agrobacterium*

К роду *Agrobacterium* относят аэробные мезофильные бактерии, преимущественно обитающие в почвенной сфере. Это короткие, подвижные грамотрицательные палочки с перитрихальными жгутиками, образующие на своей поверхности полисахаридную капсулу. При культивировании на обогащенной питательными веществами среде формируют большое количество инволюционных скоплений, представленных V-образными фигурами. Агробактерии не образуют спор, способны к утилизации глюкозы и продукции бета-лактозы, дают положительный тест на каталазу[48]. Основными представителями рода *Agrobacterium* являются *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitisi* и *A. rubi*. Современные микробиологические исследования большую часть видов перечислили к роду *Rhizobium*, однако в генетической инженерии более употребительным осталось тривиальное название рода

Agrobacterium. Большинство агробактерий являются фитопатогенами двудольных растений и способны вызывать у них раковые заболевания в результате горизонтального переноса фрагмента ДНК. Например, *A. vitis* поражает корни винограда, *A. tumefaciens* вызывает болезнь корончатого гала, а *A. rhizogenes* является причиной заболевания «*hairy roots*». В отечественной литературе нет однозначного перевода этого термина и поэтому в русскоязычных научных статьях можно встретить разные варианты перевода, такие как «косматые» корни (Кулуев и др., 2015), «волосатые» корни, «волосяные» корни или «бородатые» корни. Предлагается также называть их «генетически трансформированные корни» (Кузовкина, Вдовитченко, 2012) или просто «трансформированные» (Носов, 2010). Наиболее ранний перевод этого термина на русский язык как «волосовидные» («подобные волосам») корни (Сербинов, 1912) остался практически незамеченным, хотя, возможно, является наиболее правильным[29].

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

Бактерии *Agrobacterium rhizogenes* являются причиной заболевания «бородатый корень» (Riker et al., 1930). В пределах Ri-плазмиды содержится район Т-ДНК, который способен интегрироваться в растительный геном. Экспрессия генов, содержащихся в Т-ДНК, нарушает нормальное функционирование растительного организма (в частности, влияет на гормональный баланс: изменяется содержание разных классов гормонов, их метаболизм и чувствительность к ним) и характеризуется определенными морфологическими изменениями[51].

В природных условиях почвенные бактерии *A. rhizogenes* инфицируют здоровые растения, проникая через повреждения корней. В связи с этим довольно простым и распространенным способом является

сокультивирование надрезанных скальпелем или проколотых иглой растительных эксплантов с суспензией агробактерий [49]. Для изучения особенностей взаимодействия *A. rhizogenes* с растениями, процесса образования косматых корней и возможностей их практического использования в качестве продуцентов биологически активных веществ разрабатываются все новые подходы получения бородатых корней у различных растений. Одним из недостатков описанной выше методики является достаточно трудоемкий и долгий процесс избавления от агробактерий и большая зависимость эффективности трансформации от штамма *A. rhizogenes* и вида инфицируемого растения [2].

Agrobacterium tumefaciens (лат.) – вид грамотрицательных, облигатно аэробных палочковидных почвенных альфа–протеобактерий. Отличительная особенность бактерий этого рода – 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 (Type4 Secretion System, T4SS) (Windels et al., 2003). Фитопатоген вызывает образование корончатых галлов или волосовидных «бородатых (бородчатых) корней» у большого числа видов растений, ассоциируется с ризосферой растений, а также является условным (факультативным) патогеном для людей и животных [28]. Род *Agrobacterium* широко используется в генной инженерии и биотехнологии для генетической трансформации растений и грибов и изучения транзientной экспрессии генов в растениях.

1.1.2. Систематическое положение *Agrobacterium*

Царство Прокариоты, Факультативный паразит (гемибиотроф). Род *Agrobacterium* принадлежит к семейству *Rhizobiaceae*, которое было включено в Альфа–2 подкласс *Proteobacteria* на основании сравнения последовательностей рибосомальных РНК генов. Бактерии этого рода стержнеобразные (от 0,6–1,0 мм до 1,5–3,0 мкм), располагаются по одной или

парами, без эндоспор и имеют один или шесть подвижных перитрихальных жгутика[34].

Ближайшие родственные бактерии в рамках семейства *Rhizobiaceae* принадлежат родам *Amorphomonas*, *Carbophilus*, *Ciceribacter*, *Kaistia*, *Candidatus Liberibacter*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium*, *Pseudorhizobium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Ensifer* и *Sinorhizobium*, в основном ассоциированным с растениями как симбионты или фитопатогены. В порядок *Rhizobiales* входят патогенные для человека и животных виды родов *Brucella*, *Bartonella* и симбионты растений рода *Bradyrhizobium*[9].

1.1.3. Физиологические признаки *Agrobacterium*

Согласно описанию рода, бактерия–хемоорганогетеротроф, облигатный аэроб. Она не требует специфических факторов для роста на искусственных питательных средах и способна использовать относительно большой спектр органических веществ как единственный источник углерода, включая N– ацетилглюкозамин, α –аланин, β –аланин, арабинозу, аспарат, дульцит и т. д.), способна расти в LB–бульоне. На агаризованных питательных средах *Agrobacterium* образуют выпуклые, круглые 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[23]. Рост 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. Выделяют индол, сероводород и аммиак. Образуют кислоту на сахарозе, декстрозе, лактозе, фруктозе, арабинозе, галактозе, манните. Патоген растет при 0–37 °C, оптимальная температура роста 25–30

°С, максимальная 37 °С, термальная точка их гибели в растениях 51 °С. Оптимальный диапазон pH 6,0–9,0 Биохимические признаки используются для дифференциации видов, биотипов и штаммовых групп внутри данного рода (табл. 1), а также для разработки селективных питательных сред для выделения и идентификации патогенов [8].

Таблица 1. Таксономические подразделения рода *Agrobacterium* и ключевые диагностические признаки для их дифференциации (по Schaad et al., 2001). – 80% или более штаммов отрицательно; Щ/К – щелочная/кислая реакция; +/- вариабельно; О–окислительный катаболизм глюкозы.

Диагностический тест	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>A. rhizogenes</i>	<i>A. vitis</i>
Симптомы болезни	Наросты на стебле, корнях	Бородатый корень	Наросты на стебле, корнях
Окраска по Граму	-	-	-
Подвижность	+	+	+
Окраска и вид колоний	Белые, кремовые, края ровные	Белые, кремовые, края ровные	Белые, кремовые, края ровные
Диффузный пигмент	-	-	-
Гранулы В-гидроксипутрата	+/-	+/-	+/-
Оксидаза	+	+	+
О/Ф	О	О	О
Гидролиз крахмала	-	-	-
Нитраты в	+/-	+/-	+/-

нитриты			
3-кетолактоза	+	+/-	+/-
Рост на 2% NaCl	+	-	+
Рост при 35°C	+	+/-	+/-
Лакмусовое молоко	Щ	К	Щ
Кислота из: эритритола мелицитозы	- +	+ -	- -
Щелочь из кислоты: малоновой (метандикарбоновая кислота) винной слизевой (галактаровая)	- - -	+ + +	+ + -
Цитрат аммония	+	-	-
Использование цитрата	+/-	+	+
Кислотное растворение мела на среде PDA+CaCO ₃	-	+	-
Подвижность при pH 7.0	+	+	-
Пектолитические св-ва при pH 4,5	-	-	+

1.1.4. Вирулентность и распространение бактерий рода

Agrobacterium

Agrobacterium – род повсеместно распространенных почвенных бактерий, который включает фитопатогенные изоляты, заражающие растения около 90 семейств двудольных культур [10]. Патоген поражает экономически важные фруктовые (яблоня, груша, айва, слива), ореховые (миндаль, фундук, грецкий орех) культуры, виноград, декоративные растения (розы, хризантемы, георгины). В некоторых случаях, поражаются и однолетние растения (капуста, рапс, томат, огурец, морковь и т.д.) [25].

При заражении растений бактериями рода *Agrobacterium* происходит аномальная клеточная пролиферация (гиперплазия), которая приводит к образованию корончатых галлов или к образованию «волосяного», «бородатого» или «бородчатого» корня [3].

В результате чего, корневая система отстаёт в развитии и происходит нарушение движения воды и сока по сосудам в стебле/стволе. Деревья миндаля (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) поражённые корончатым галлом, механически повреждаются при сильном ветре, в результате чего поражаются грибной инфекцией и быстро гибнут. Патогенные штаммы *Agrobacterium spp.* несут в себе по меньшей мере одну *Ti* или *Ri*–плазмиду [44]. Вирулентность определяется различными участками плазмиды включая транспортируемую ДНК (Т–ДНК) и генами вирулентности (*vir*–гены) [43].

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

Вид *A. tumefaciens* вызывает заболевания широкого круга растений,

A. vitis – поражает только виноград, *A. rhizogenes* – вызывает пролиферацию корней, а *A. rubi* вызывает «тростниковый галл» на растениях малины (*Rubus L.*). Непатогенные изоляты агробактерий по традиции относят к *A. radiobacter*. Однако, не было показано корреляции между номенклатурой на основе патогенности и таксономической структурой, основанной на

фенотипической и генотипической характеристике штаммов этого рода [45]. В частности, штаммы, вызывающие «бородатость корней» тепличных растений, также относят к *A. radiobacter* [41].

Т-ДНК из ризогенных штаммов *Agrobacterium bv1* несёт ген *rol* (*root locus*), который делает клетки растений более чувствительными к эндогенным ауксинам [42].

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

1.1.5. Геном штамма K599 *Agrobacterium*

Гены и их функции Т-ДНК из плазмиды *Ri* K599, продуцируемых в трансгенных корнях: K599 как представитель штамм типа *cuscutopine* собой продуцируемых в трансгенных корнях, был выделен из почвы в Австралии ученый Аллен Керр [47]. Он содержит эндогенную *Ri*-плазмиду *pRi2659* длиной 185 462 бп с Т-ДНК 14 982 бп (номер присоединения к Генбанку: EU186381). Область Т-ДНК содержит в общей сложности 11 генов/ORF, которые являются *orf2*, *orf3*, *orf4*, *orf8*, *ru1A*, *rolB*, *rolC*, *rolD* (*orf13*), *rolE* (*orf13*), *orf14* и *cuts*, причем *orf4* вложен в *orf3*[39].

Было показано, что гены *rolA* (*rola*), *rolB* (*rolβ*) и *rolC* (*roly*) регулируют образование и развитие волосатых корней, индуцированных K599, а ген *cus* кодирует фермент синтеза кукумопина[26]. Многие сообщения показали, что гомологичные гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* в других *A. rhizogenes* также участвуют в индукции корней волос [50]. 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) полагали, что *orf14* ассистированная индукция волосатого корня рола. Otten and Helfer (2001) сообщили, что ген *orf8* в *A. Rhizogenes* влияет 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. [21].

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

Ввиду способности вирулентных штаммов *Agrobacterium* генетически трансформировать клетки растений, бактерия используется для привнесения 28 генетического материала с целью модификации генетических признаков растений в научных и коммерческих целях [35]. *Agrobacterium* способны трансформировать двудольные растения, однодольные растения и некоторые микроскопические грибы. Поэтому были разработаны специальные векторы на основе Ti-плазмиды с удалёнными генами фитогормонов и опинов («разоруженной плазмиды») для привнесения чужеродной генетической информации в геном растений с целью получения растений с желаемыми полезными признаками[19].

Началом патогенного процесса является синтез белковых T-пилей при помощи системы секреции IV типа, осуществляющееся под действием VirB-оперона. Определённую роль в индукции экспрессии генов вирулентности *Agrobacterium* с растением-хозяином играют внутриклеточные метаболиты растения фенольного происхождения – кумарины, флавоноиды, танины и лигнин, выделяющиеся при ранении тканей растения. Внедрение T-ДНК вызывает образование характерных наростов на растениях из-за гиперсинтеза фитогормонов, и в галлах начинают накапливаться опины, секретирующиеся наружу и поддерживающие популяцию агробактерий в ризосфере и филлоплане [22]. Трансформированные клетки ввиду дисбаланса синтеза фитогормонов дифференцируются и начинают неупорядоченный (в случае корончатого галла) или дифференцированный (в случае бородатости корней) рост. На первой фазе развития бактериоза быстро разрастаются мягкие мелкие наросты (белого цвета), позднее они темнеют и затвердевают[30].

1.2.1. Трансформация растений агробактериями

Почвенные грамотрицательные бактерии рода *Agrobacterium* обладают природной способностью в местах поранения двудольных растений переносить в растительные клетки определенный сегмент ДНК (Т-ДНК, от англ. transferred DNA) своих мегаплазмид с последующей интеграцией данного сегмента в геном растительных клеток [16]. Клетки, трансформированные Т-ДНК, приобретают способность к неограниченному, нерегулируемому росту, что вызывает формирование опухолевых заболеваний, называемых «корончатым галлом» (в случае индукции опухоли *Agrobacterium tumefaciens*) и «косматым корнем» (в случае индукции опухоли *A. rhizogenes*) [20]. Трансформированные растительные клетки синтезируют новые производные аминокислот и сахаров, известные как опины. Тип опиина, синтезируемого опухолевыми клетками (нопалин, октопин, агроцинопин, маннопин, агропин), зависит от штамма агробактерий, индуцировавшего формирование опухоли. Октопин и нопалин – опины, образующиеся из аргинина; их легче всего обнаружить в клетках корончатых галлов. В соответствии с этим многие широко распространенные штаммы *A. tumefaciens* классифицируют как штаммы октопинового или нопалинового типа. В опухолях косматого корня, вызываемых *A. rhizogenes*, как правило, обнаруживается агропин – производное одного из сахаров. Штаммы агробактерий, вызывающие формирование опухолей, способны к избирательному катаболизму опинов того типа, синтез которых в растительных клетках индуцируют, используя опины в качестве источников углерода и азота[1].

В процессе агробактериальной трансформации Т-ДНК переносится в клетки растения и стабильно встраивается в ядерный геном. В геном растения могут включаться одна и более копий Т-ДНК. Множественные копии Т-ДНК способны образовывать tandemные повторы либо быть

интегрированными в различные, преимущественно активно 10 транскрибируемые участки генома растения[46].

Трансформация растительных клеток и индукция заболевания косматого корня бактериями *A. rhizogenes* аналогична трансформирующему действию *A. tumefaciens*[27]. Индукция начальных этапов трансформации происходит в местах раневого повреждения растения, где из растительной ткани выделяется сок с pH=5,0-5,8 и высокой концентрацией углеводов (например, глюкозы и глюкуроновой кислоты) и низкомолекулярных фенольных соединений, предшественников лигнина и флавоноидов. Эти условия специфически стимулируют присоединение агробактерий к рецепторам клеточной стенки растений при участии белков, кодируемых генами в составе хромосомы *Agrobacterium*[36].

1.2.2. Методы получения культуры волосовидных корней

В ранних работах по исследованию феномена «*hairy roots*» использовали метод инокуляции морковных дисков или листовых дисков табака в суспензии агробактерий. Этот метод основан на природных особенностях *A. rhizogenes*, которые инфицируют здоровые растения, проникая через повреждения корней. В лабораторных условиях имитируются природные процессы поранения, позволяя агробактериям через ранки проникать внутрь растительных тканей. В связи с этим данный метод сокультивирования надрезанных скальпелем или проколотых иглой растительных эксплантов суспензией агробактерий является самым простым и распространенным способом агробактериальной трансформации[38].

Другим часто используемым способом получения hairy roots служит укол тонкой иглой, на которую нанесена бактериальная «паста» или шприцом, содержащим суспензию агробактерий [31]. Также существует метод индуцирования бородатых корней *in vivo*, в котором проростки с удаленной корневой частью помещались в пропитанные суспензией

агробактерий специальные кубики из минеральной ваты размером около 1 см³ [17].

Более успешным и довольно широко применяемым в современной научной практике стал предложенный еще в 1987 г. практически одновременно несколькими группами авторов (Spena et al., 1987; Cardarelli et al., 1987; Vilaine et al., 1987) иной подход к получению hairy roots с помощью отдельных rol-генов или их комбинаций, помещенных в бинарные векторы. Растительный материал в этом случае инфицируется штаммами *A. tumefaciens*, несущими генно-инженерные конструкции, содержащие отдельные rol-гены. Данный метод до сих пор успешно применяется в современных исследованиях по индукции hairy roots и выделению из их культуры ценных метаболитов у *Solanum lycopersicum*, *Artemisia carvifolia*, *Silene vulgaris*, *Maackiaa murensis*, *Ajuga bracteosa*, *Lactuca sativa* и др. Причем в большинстве случаев в этих работах используется генно-инженерные конструкции, содержащие rol-гены или их комбинации [18].

Метод сокультивации растительных эксплантов (листовых дисков, черешков, гипокотилей, семядольных листьев и т.д.) в суспензии *A. rhizogenes* для получения культуры бородатых корней также успешно и широко применяется в современных исследованиях. Однако эти методы ограничиваются особенностями взаимодействия агробактерий с растениями: эффективность трансформации сильно зависит от штамма *A. rhizogenes* и вида трансформируемого растения [15].

1.3. Сладкий белок браззеин

Браззеин - белок со сладким вкусом, выделяемый из плодов западно-африканского растения *Pentadiplandra brazzeana*. Впервые был выделен в Университете Висконсина-Мэдисона в 1994г. Браззеин встречается в межклеточном пространстве мякоти, окружающей семена плода. После пентадина, открытого в 1989 году, браззеин является вторым белком сладкого вкуса, найденным в плодах *Pentadiplandra brazzeana*.

Как и другие сладкие белки, обнаруженные в растениях, например монелин и тауматин, он значительно слаще привычных подсластителей в 500 - 2000 раз слаще сахарозы. Фрукт имеет сладкий вкус для обезьян, шимпанзе и человека, но гориллы в силу мутации в рецепторах сладкого не воспринимают браззеин как сладкий и поэтому плодами растения не питаются[37].

Браззеин - мономерный белок, состоящий из 54 аминокислотных остатков, является самым маленьким из сладких белков с молекулярной массой 6.5 кДа. Аминокислотная последовательность браззеина, приведённая в базе данных белков Swiss-Prot, выглядит следующим образом:
QDKCKKVYEN YPVSKCQAN QCNYDCKLDK HARSGCFYD
EKRNLQCICD YCEY.

Структура браззеина была определена методом ядерного магнитного резонанса ЯМР при pH 5.2 и 22°C. Браззеин имеет четыре равномерно распределенные дисульфидные связи и не содержит сульфгидрильных групп. Трёхмерный анализ браззеина показал одну альфа-спираль и три антипараллельных бета-складки. Его структура не похожа ни на один из двух других сладких на вкус белков, монеллина и тауматина[13]. Заряд белка также играет важную роль в его взаимодействии с рецептором сладкого вкуса. С учётом этих факторов был синтезирован улучшенный браззеин, называемый *pGlu-1-brazzein*, который, как сообщалось, в два раза более сладкий, чем природный аналог[24].

В пересчете на массу браззеин в 500 - 2000 раз слаще сахарозы по сравнению с 10% сахарозой и 2% раствором сахарозы соответственно. Его сладкий вкус больше напоминает сахарозу, чем тауматин, с длительным послевкусием и небольшой задержкой более длительной, чем у аспартама в равносладком растворе. Браззеин стабилен в широком диапазоне pH от 2,5 до 8 и устойчив к воздействию температуры 98 °C в течение 2 часов[33].

Браззеин представляет собой альтернативу доступным низкокалорийным подсластителям. Как белок, он безопасен для диабетиков.

Он также очень хорошо растворяется в воде 50 мг/мл. При смешивании с другими подсластителями, такими как аспартам и стевия, браззеин уменьшает побочное послевкусие и дополняет их вкус. По вкусовым характеристикам он ближе к сахарозе, чем другие натуральные подсластители кроме тауматина. В отличие от других белков, обладающих сладким вкусом, он выдерживает нагревание, что делает его более пригодным для промышленной обработки пищевых продуктов. В лабораторных исследованиях сообщается о создании белка с использованием пептидного синтеза, а рекомбинантные белки были успешно получены с помощью *E.coli*[6].

1.4. Применение волосовидных корней в биотехнологической промышленности.

Известно, что в трансгенных клеточных или каллусных культурах активизируется биосинтез вторичных метаболитов, которые могут широко применяться в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. Получение таких культур особенно актуально для редких 34 видов растений, являющихся продуцентами ценных биологически активных веществ, для последующего использования полученных культур в целях биотехнологического синтеза целевых продуктов [14]. Производство вторичных метаболитов может быть увеличено, в результате подбора оптимальных условий культивирования, использования элиситоров различного происхождения, а также с помощью методов генетической инженерии. Крупномасштабное производство коммерчески ценных соединений в программируемых биореакторах является экономически выгодным, благодаря высокой скорости роста, стабильности признаков и жизнеспособности трансформированных клеток и тканей растений. Культура *hairy roots* является привлекательной биофабрикой для производства веществ фармацевтической направленности благодаря способности безопасно и недорого производить широкий спектр рекомбинантных белков [12].

1.4.1. Применение культур волосовидных корней в фармацевтической промышленности.

Культивирование *hairy roots*, синтезирующих ценные лекарственные метаболиты, открывает новые возможности в фармацевтической промышленности, благодаря своей генетической и биохимической стабильности в течение более длительного времени по сравнению с культурами клеточной суспензии на гормональных средах. В настоящее время с целью наработки коммерчески ценных вторичных метаболитов удалось индуцировать культуры *hairy roots* для многих видов растений [7].

1.4.2. 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, стали рассматриваться в качестве перспективной платформы для производства ценных, прежде всего, корневых вторичных метаболитов, таких как алкалоиды тропана и многих других метаболитов [5]. Производство вторичных метаболитов может быть увеличено, в результате подбора оптимальных условий культивирования, использования элиситоров различного происхождения, а также с помощью методов генетической инженерии. 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* [4].

Культура «*hairy roots*» проявляется значительный интерес для производства белков фармацевтической направленности, благодаря удачному сочетанию достоинств эукариотической системы экспрессии и

низкую стоимость и простоту производства бактериальных, а также гипоаллергенности, быстрой наработке корневой массы и целевого продукта [26].

Получение таких культур особенно актуально для редких 34 видов растений, являющихся продуцентами ценных биологически активных веществ, для последующего использования полученных культур в целях биотехнологического синтеза целевых продуктов. Крупномасштабное производство коммерчески ценных соединений в программируемых биореакторах является экономически выгодным, благодаря высокой скорости роста, стабильности признаков и жизнеспособности трансформированных клеток и тканей растений [11].

ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и методы исследования

Материалы: Корнеплод моркови (*Daucus radix vegetabilis*), *Agrobacterium rhizogenes* штамма K599, A4, K15834

Методы исследования:

1. Стерилизация дисков моркови
2. Агробактериальная трансформация клеток моркови
3. ПЦР-анализ
4. Изучение различных параметров корней моркови (морфометрический анализ, определение оптимальных условий выращивания).

2.2. Приборы

Для различных измерений и анализов:

- портативный pH-метр STARTER 300 ohaus (США).

Центрифугирование:

- настольные лабораторные центрифуги моделей 5804R фирмы Eppendorf, модели UNIVERSAL 32R фирмы Hettich, модели Multifuge 1 S-R фирмы ThermoElectron-Heraeus (все – Германия);
- BioSan FV-2400 мини центрифуга-вортекс Микроспин;

Вспомогательное оборудование:

- система очистки воды 18 мОм MilliQAcademic (Millipore, США);
- низкотемпературный холодильник -85°С фирмы Sanyo (Япония);
- автоклав горизонтальный электронной модели DentalLeague (Tuttnauer, Израиль);
- электронные весы Electronicscale;
- камера для роста растений Binder KBWF240 (Германия);
- шкаф сушильный ШС-80-01 СПУ;

- ламинарный бокс;
- 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);
- и другое лабораторное оборудование.

2.3. 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

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
Хелат железа	FeSO ₄ ×7H ₂ O – 558 мг (0,558 г) Na ₂ ЭДТА – 746 мг (0,746 г) Нагреть до кипения На 250 мл среды MS добавить 1,25 мл
Витамины Гамборга	20 мл мQ, 10 мг тиамин, 10 мг никотиновая к-та, 20 мг глицин

Таблица 2. Составы сред.

2.4. Создание рекомбинантных векторов для проведения агробактериальной трансформации

Природный браззеин имеет в своем составе пироглутаминовую кислоту (ругЕ) (в 1-ом аминокислотном положении), которую трудно включить в состав рекомбинантного белка, поэтому синтетический браззеин начинается не с этой аминокислоты, а с глутамина (Q). Проанализировав зарубежную литературу по нашей теме, было решено использовать 3 варианта синтетического браззеина. 1 вариант был без изменений, второй вариант была замена в 29 положении аминокислоты (аспарагин на лизин), третий вариант-замена в 41 положении аминокислоты (глутамин на лизин). Эти участки характеризуются определенными пространственными структурами. В статьях было указано, что данные замены существенно усиливают сладость браззеина по сравнению с природной формой[1, 2]. Во всех трех вариантах синтетический браззеин начинается с глутамина (Q).

Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО Евроген г.Москва. Первоначально синтезированный ген амплифицировали, клонировали в

бинарном векторе *pCambia1301* под контролем конститутивного 35S промотора. Далее целевые генно-инженерные конструкции внедряли в компетентные клетки *E.coli*. Для этого осуществляли трансформацию компетентных клеток *E.coli*. Селективный антибиотик-канамицин. Проросшие колонии отбирали в стерильных условиях стерильной бактериологической петлей в подписанные стерильные микропробирки на 1.5 мл. Далее из отобранных бактерий выделяли ДНК. Тотальную ДНК выделяли с применением хелатирующего агента – ионообменной смолы Chelex-100. Выделенную ДНК использовали для ПЦР-анализа.

ПЦР-анализ проводили с использованием праймеров *braF* и *braR* (табл. 3), синтезированными в ЗАО «Евроген», Москва. Проведение ПЦР необходимо для того, чтобы найти колонии, которые содержат в себе плазмиду с нужной нам последовательностью гена браззеина. Обнаружение рекомбинантных штаммов *E. Coli* проводили методом ПЦР, приводящий к многократному увеличению копий искомого фрагмента ДНК за 25-30 циклов последовательных циклов денатурации (расплетение ДНК), отжига (присоединение олигонуклеотидных затравок) и элонгация (построение цепей ДНК). Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле. Для контроля длин продуктов анализа ПЦР использовали маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (NEB). Данный маркер состоит из 10 фрагментов ДНК в диапазоне 500 – 10000 п.н.

Также, для того чтобы узнать, в правильном ли направлении вставился наш синтезированный ген, был проведен ПЦР – анализ с использованием праймеров 35CambF и *braR*, *braF* и 1301R (табл. 3). На основе этого анализа было отобрано по 2 колонии на первый и второй вариант синтетического гена (2-29, 21-29, 1N, 11N-соответственно) и 1 колония для 3 варианта (6-41). Из отобранных колоний выделяли плазмиды методом щелочного лизиса. Для этого использовали специальные буферы. Получение рекомбинантных

Поэтому были выбраны наиболее лучшие по скорости и качеству роста штаммы.

2.5. Трансформация компетентных клеток *E.coli* плазмидной ДНК

1. Подготовили стерильные чашки с агаризованной средой, содержащей антибиотики ампициллин и тетрациклин
2. Разморозили на льду компетентные клетки *E.coli*
3. 1 мкл плазмидной ДНК развели в 20 мкл дистиллированной воды и смешали с компетентными клетками
4. Выдержали смесь на льду в течение 30 мин
5. Поместили клетки с ДНК в водяную баню на 42°C на 2 мин (тепловой шок)
6. Добавили 1 мл среды LB и выдержали клетки 60 мин в термостате на 37°C. Через каждые 15 минут перемешивали клетки
7. Центрифугировали суспензию клеток 30 сек при 5 тыс. об/мин
8. Слили половину надосадочной жидкости, а вторую половину использовали для ресуспендирования бактерий
9. Отобрали микропипеткой 100 мкл клеток, смешанных с плазмидной ДНК и втирали в чашки Петри с агаром (круговыми движениями до полного впитывания жидкости)
10. Инкубировали в течение 16 часов в термостате при 37°C
11. При прорастании колоний произвели пересев на другую чашку Петри для выделения плазмидной ДНК

2.6. Выделение и очистка плазмидной ДНК методом щелочного лизиса

1. Приготовили растворы для лизиса

Буфер 1 (10 мл): 10мМ Трис HCl

5 мМ ЭДТА

50мМ глюкозы

Буфер 2 (10 мл): 0,2M NaOH

1% SDS

Буфер 3 (10 мл): 3M ацетат калия

2. Налили в подписанные эппендорфы по 100 мкл буфера 1

3. Стерилизовали в пламени спиртовки бактериологическую петлю. Остудили на воздухе. Соскребли с чашки Петри небольшое количество бактериальной культуры. Перенесли в эппендорф с буфером 1

4. Растерли на стенке вблизи жидкости и ресуспендировали в буфере до образования гомогенной суспензии. Закрыли крышку и 2-3 минуты перемешивали гомогенат на вортексе

5. Добавили 200 мкл буфера 2. Закрыли крышку и аккуратно перемешивали легким встряхиванием. Выдержали 10 минут при комнатной температуре.

6. Добавили 150 мкл охлажденного буфера 3.

Аккуратно перемешали встряхиванием.

Оставили на 10 минут в холодильнике при +4 - +8°C

7. Поместили эппендорфы в микроцентрифугу, не забывая про уравнивание и крутили 5 минут при максимальных оборотах.

8. Аккуратно, не задевая разрушенный клеточный дебрис, Отобрали микропипеткой водный раствор ДНК и перенесли его в другой подписанный эппендорф

9. Добавили 1 мл холодного этилового спирта. Перемешали. Осаждение проводили в течение 1 часа при -20°C

10. Центрифугировали осажденную ДНК на микроцентрифуге 8 минут

11. Удалили надосадочную жидкость. Добавили 300 мкл 70% этилового спирта для отмывания осадка от соли. Перемешали и центрифугировали 2 минуты. Удалили спирт. Осадок подсушили на воздухе.

12. Растворили осадок ДНК в 30 мкл дистиллированной воды

13. Отобрали 10 мкл раствора для анализа чистоты выделения ДНК электрофорезом в агарозном геле.

2.7. Выделение тотальной ДНК *E.coli* при помощи 5%-ного тритона X-100 для ПЦР-анализа.

1. Приготовили 10 мл 0,5%-ного раствора тритона X-100 в высокоочищенной воде с добавлением небольшого количества неионного детергента chelex.
2. При помощи бактериологической петли собрали колонию бактерий и поместили в подписанный эппендорф.
3. Добавили 30 мкл лизирующего 0,5%-ного раствора тритона X-100 и тщательно ресуспендировали на вортексе.
4. Инкубировали образцы при 95 градусов в течение 5 минут.
5. Ресуспендировали на вортексе.
6. Центрифугировали при максимальных оборотах микроцентрифуги в течение 5 минут.
7. Надосадочную жидкость можно использовать в качестве матрицы при ПЦР-анализе в течение 1 месяца, при условии хранения образцов в холодильнике.

2.8. Полимеразная цепная реакция

1 Ген бразеина был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе «Терцик» производства компании «ДНК-технология» (Москва) с использованием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* и праймеров, синтезированных в ЗАО "Евроген" (Москва). Реакции были выполнены в 30 мкл общего объема смеси, в составе которой: 67 mM трис-HCl, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Tween-20, 0,1 мкг геномной ДНК, по 10 пМ каждого праймера, по 200 мкМ дАТФ, дЦТФ, дТТФ, дГТФ, диметилсульфоксид до 0,1% и 1 единица ДНК-полимеразы. ПЦР проводили по схеме: начальная денатурация (94°C, 3 мин); 40 циклов амплификации со следующими параметрами: 1) денатурация - 94°C, 40 сек; 2) отжиг – от 35°C до 59°C, 50 сек; 3) синтез - 72°C, 90 сек. Затем проводили

инкубацию при 72°C в течение 2 мин. Последовательности праймеров, использованных в работе, представлены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательности праймеров, использованных в работе.

Название праймера	Последовательность праймеров (5'-3')	Предполагаемый размер ампликона, п.н.	Температура отжига, °C
1301R	TGCTCTAGCATTCGCCATTC	700	59
35SCamb F	CGTGTTCTCTCCAAATGAAA		
braF	TTGGAGGACAAGTGCAAAGAAG	162	55
braR	CTCGTACTCGGCAGTAGTCGCAA		

1. Выделили тотальную ДНК *E.coli* при помощи 5%-ного тритона Х-100.

2. Разморозили буфер Taq – полимеразы, dNTP, Растворы праймеров и ресуспендировали на вортексе (рис. 2).

3. ПЦР провели в 30 мкл, для этого добавили в эппендорфы на 0,6 мл следующие компоненты:

Буфер Taq – полимеразы (10x) – 3 мкл

dNTP - 3 мкл

Прямой праймер – 1 мкл

Обратный праймер – 1 мкл

Образец ДНК – 1 мкл

Taq – полимеразы 1 мкл

Высокоочищенная стерильная вода - 20 мкл

4. Все компоненты перемешали и открутили на вортексе

5. Добавили по 1 капле минерального масла и снова открутили на вортексе

6. Настроили ДНК-амплификатор и запустили программу
7. После окончания ПЦР-анализа произвели агарозный гель-электрофорез

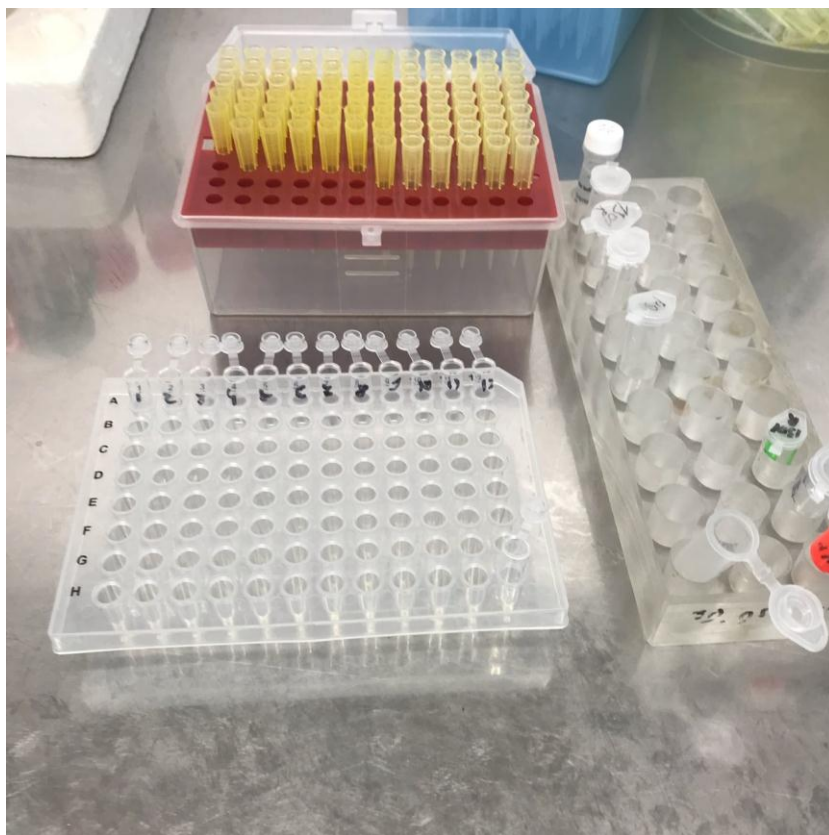


Рисунок 2. Подготовка к проведению ПЦР-анализа

2.9. Агарозный гель-электрофорез

Процесс электрофоретического фракционирования препаратов ДНК осуществляли по размеру разделяемых фрагментов ДНК и требуемого разрешения, используя 0,8 – 2,0%-ные агарозные гели. Электрофорез проводили в приборах модели SubCell GT WIDI MINI (приборы модели 250/2,5 фирмы Bio-Rad (США) или модели EC-103 (E-C Apparatus Corporation, США).

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

После окончания электрофореза гели окрашивали бромистым этидием (5 мкг/мл) в течение 10 мин. Флуоресценцию нуклеиновых кислот наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм в трансиллюминаторе ТМ-36. Гели фотографировали с помощью фотодокументационной системы Gel Camera System (UVP, Inc. США) (рис. 3,4).

2.10. Электропорация компетентных клеток *Agrobacterium rhizogenes* штамма K599, A4, K15834.

1. Подготовили стерильные чашки с агаризованной средой, содержащей антибиотики ампициллин и тетрациклин
2. Разморозили на льду компетентные клетки *Agrobacterium rhizogenes* штамма K599, A4, K15834
3. 1 мкл плазмидной ДНК развели в 20 мкл дистиллированной воды и смешали с компетентными клетками
4. Выдержали смесь на льду в течение 330 мин
5. Поместили клетки с ДНК в водяную баню на 42°C на 2 мин (тепловой шок)
6. Добавили 1 мл среды LB и выдержали клетки 60 мин в термостате на 37°C. Через каждые 15 минут перемешивали клетки
7. Центрифугировали суспензию клеток 30 сек при 5 тыс. об/мин
8. Слили половину надосадочной жидкости, а вторую половину использовали для ресуспендирования бактерий
9. Отобрали микропипеткой 100 мкл клеток, смешанных с плазмидной ДНК и втирали в чашки Петри с агаром (круговыми движениями до полного впитывания жидкости)
10. Инкубировали в течение 16 часов в термостате при 37°C
11. При прорастании колоний произвели пересев на другую чашку Петри для выделения плазмидной ДНК.

2.11. Стерилизация корнеплода моркови

Первый метод заключался в предварительной стерилизации целого корнеплода средних размеров (10-12 см). Стерилизацию проводили поэтапно. Сначала целый корнеплод промывали слабым раствором моющего средства, снимали верхнюю кожуру (для трансформации важен внутренний зеленый слой камбия). Далее погружали корнеплод в стерильных условиях в раствор 15% белизны с добавлением Tween 20% на минут 8. Затем ополаскивали корнеплод стерильной высокоочищенной водой и погружали в 70% спирт на минут 5. Далее промывали в стерильной высокоочищенной воде 5 раз. Корнеплоды после этого в стерильных условиях разрезали на тонкие диски стерильным скальпелем и ставили в заранее приготовленную стерильную среду MS. Второй способ заключался в стерильной обработке уже самих дисков, без предварительной обработки корнеплода. Наиболее удачным оказался первый способ.

Растворы для стерилизации корнеплода и дисков моркови:

1. 15%-ная белизна с 1 мкл твина
2. 70% спирт
3. Стерильная дистиллированная вода (рис. 3).



Рисунок 3. Растворы для стерилизации корнеплода и дисков моркови.

2.12. Стерилизация корнеплода морковных дисков

1. Поместили морковные диски на 3 минуты в 15% белизну (рис 4).
2. Промыли стерильной дистиллированной водой 1 раз
3. Удалили воду, добавили в 70% спирт
4. Стерилизовали 2 минуты
5. 5 раз промыли стерильной дистиллированной водой (рис. 5).



Рисунок 4. Стерилизация морковных дисков.



Рисунок 5. Простерилизованные корнеплоды моркови.

2.13. Приготовление MS-среды

Приготовили MS-СРЕДУ для того, чтобы проверить на ней насколько эффективной будет методика стерилизации дисков моркови. После приготовления среды измерили pH среды, она равнялась норме 5,75.

Метод приготовления MS-среды.

1. В колбу емкостью 2 л поместили 20 г сахарозы, долили дистиллированной водой до 400 мл и растворили.
2. Добавили к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросолей, 1 мл микросолей, 5 мл хелата железа, 5 мл хлористого кальция.
3. (Для твердой среды). Приготовили агар: навеску 5 -7 г поместили в стакан и залили водой до 200 мл, растворили, нагревая на плитке или газовой горелке, при постоянном помешивании. Готовый агар долили к раствору солей.

4. Питательную среду довели до нужного объема (100-250 мл) дистиллированной водой. (рис. 6).
5. Измерили pH среды 5,75
6. Готовую питательную среду закрыть фольгой
7. Проавтоклавировать
8. Разлить по чашкам Петри



Рисунок 6. Твердая и жидкая MS-среды.

Для того чтобы проверить эффективность проведенной стерилизации дисков моркови, поместили их на MS-среду. Чашки герметизировали парафильмом и убрали в темный климатостат при температуре 28⁰С и влажности 70%. Через 4 суток не было обнаружено следов контаминации и застарания бактериями и грибами, следовательно методика стерилизации была проведена хорошо (рис.7).



Рисунок 7. Диски моркови на MS-среде

2.14. Агробактериальная трансформация дисков корнеплодов моркови.

Агробактериальная трансформация дисков корнеплодов моркови имеет определенные трудности в своем исполнении. Существует проблема контаминации корнеплодов моркови, от которой трудно избавиться. Корнеплоды в стерильных условиях разрезали на тонкие диски стерильным скальпелем и ставили в заранее приготовленную стерильную среду MS. Рекомбинантные штаммы *Agrobacterium rhizogenes* A4, 15804, K599, несущие вектор *pCambia 1301* и заранее выращенные на агаровой среде LB, инокулировали иглой в морковные диски. Через две-пять недель после инокуляции появились бородастые корни на привитых участках. Бородастые корни были отрезаны и перенесены на среду MS без гормонов, содержащую 3% сахарозы и 0,5 мг / мл канамицина. После нескольких пересаживаний на среду MS, бородастые корни культивировали на без гормональной среде MS без антибиотика. Бородастые корни регулярно пересевались с интервалом в 3

недели и росли в темноте в среде без гормонов. В экспериментах по агробактериальной трансформации использовали морковь. Корни были проверены на сладость, возникал сладковатый вкус у вариантов 21-29, 6-41 и 11N всех 3 штаммов агробактерий.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ПЦР-анализ ДНК бактерий

Проводили ПЦР-анализ для детекции встроенного гена бразеина в плазмиды *E. coli* (рис. 8).

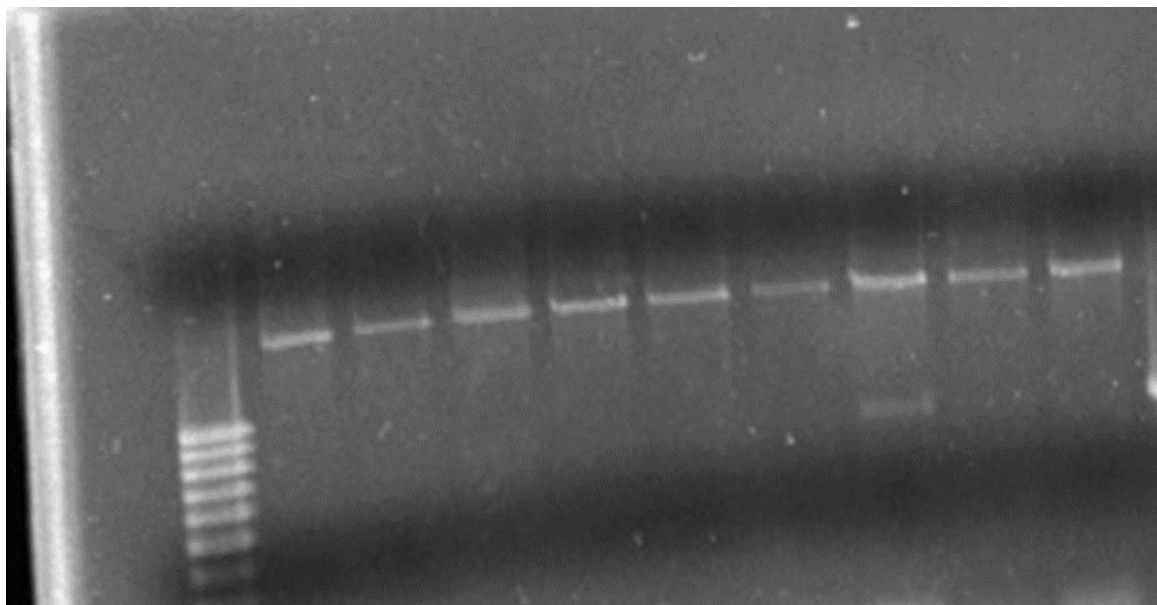


Рисунок 8. Электрофореграмма амплифицированного гена бразеина из ДНК колоний *E.coli*.

После этого отбирали те колонии, которые точно содержали ген бразеина. При этом еще проводили ПЦР-анализ с использованием праймеров 35FCamF и 1301R для оценки правильной ориентации встроенного гена (рис. 9).

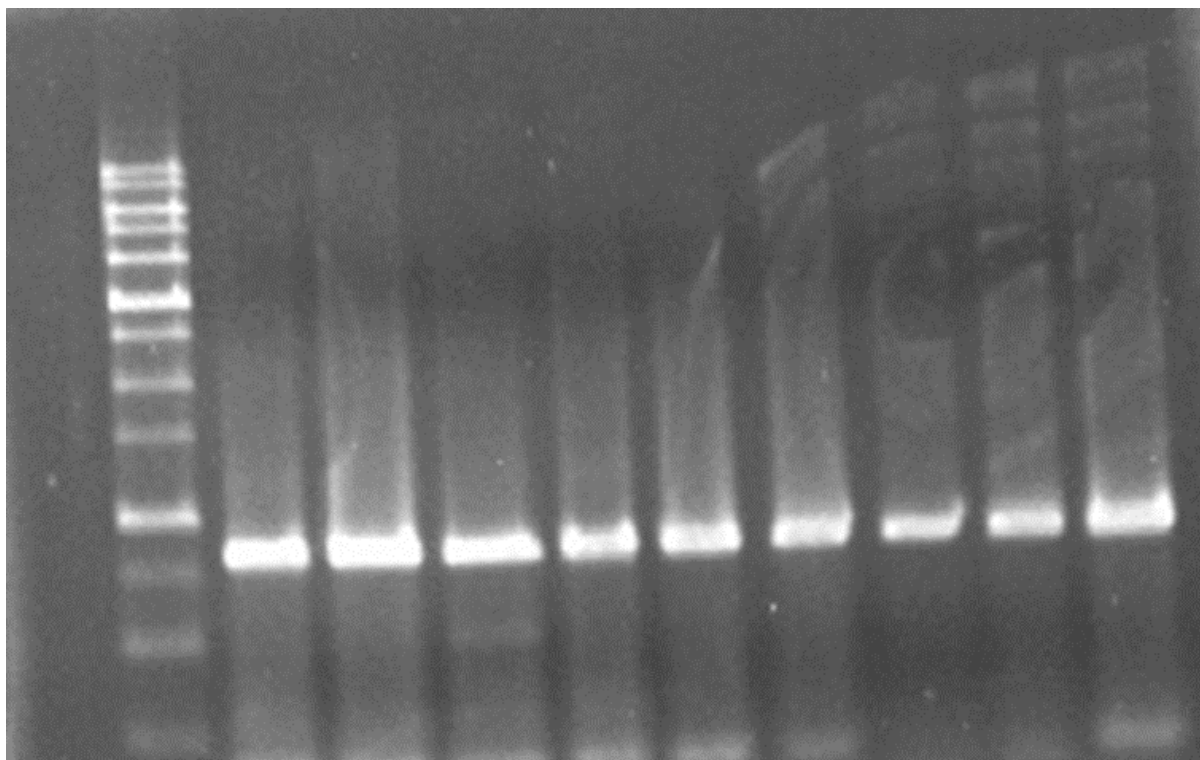


Рисунок 9. Электрофореграмма амплифицированного гена браззеина из ДНК колоний *Agrobacterium rhizogenes* штаммов K599, A4, K15834.

Далее проводили электропорацию *Agrobacterium rhizogenes* штаммов A4, 15804, K599 с плазмидной ДНК *E. coli* и также проводили отбор колоний с использованием нескольких пар праймеров, представленных в таблице 3.

3.2. Получение волосовидных корней из дисков моркови

Агробактериальная трансформация дисков корнеплодов моркови имеет определенные трудности в своем исполнении. Существует проблема контаминации корнеплодов моркови, от которой трудно избавиться. Мы применили несколько методов стерилизации. Первый метод заключался в предварительной стерилизации целого корнеплода средних размеров (10-12 см). Стерилизацию проводили поэтапно. Сначала целый корнеплод промывали слабым раствором моющего средства, снимали верхнюю кожуру (для трансформации важен внутренний зеленый слой камбия). Далее погружали корнеплод в стерильных условиях в раствор 15% белизны с добавлением Tween 20% на минут 8. Затем ополаскивали корнеплод

стерильной высокоочищенной водой и погружали в 70% спирт на минут 5. Далее промывали в стерильной высокоочищенной воде 5 раз. Корнеплоды после этого в стерильных условиях разрезали на тонкие диски стерильным скальпелем и ставили в заранее приготовленную стерильную среду MS. Второй способ заключался в стерильной обработке уже самих дисков, без предварительной обработки корнеплода. Но наиболее удачным оказался первый способ.

Рекомбинантные штаммы *Agrobacterium rhizogenes* A4, 15804, K599, несущие вектор *pCambia 1301* и заранее выращенные на агаровой среде LB, инокулировали иглой в морковные диски. Через две-пять недель после инокуляции появились бородатые корни на привитых участках (рисунок 2 а, б). Бородатые корни были отрезаны и перенесены на среду MS без гормонов, содержащую 3% сахарозы и 0,5 мг / мл канамицина. После нескольких пересаживаний на среду MS, бородатые корни культивировали на без гормональной среде MS без антибиотика (рисунок 10). Бородатые корни регулярно пересевались с интервалом в 3 недели и росли в темноте в среде без гормонов.

В экспериментах по агробактериальной трансформации использовали морковь. Были получены бородатые корни моркови, вырабатывающие сладкий белок браззеин (рис. 11). Корни были проверены на сладость, возникал сладковатый вкус у вариантов 21-29, 6-41 и 11N всех 3 штаммов агробактерий.



Рисунок 10. Индукция образования бородатых корней моркови на поверхности дисков корнеплода в условиях *invitro*.

А – каллусообразование и возникновение бородатых корней.

Б – бородатые корни моркови на поверхности морковных дисков.

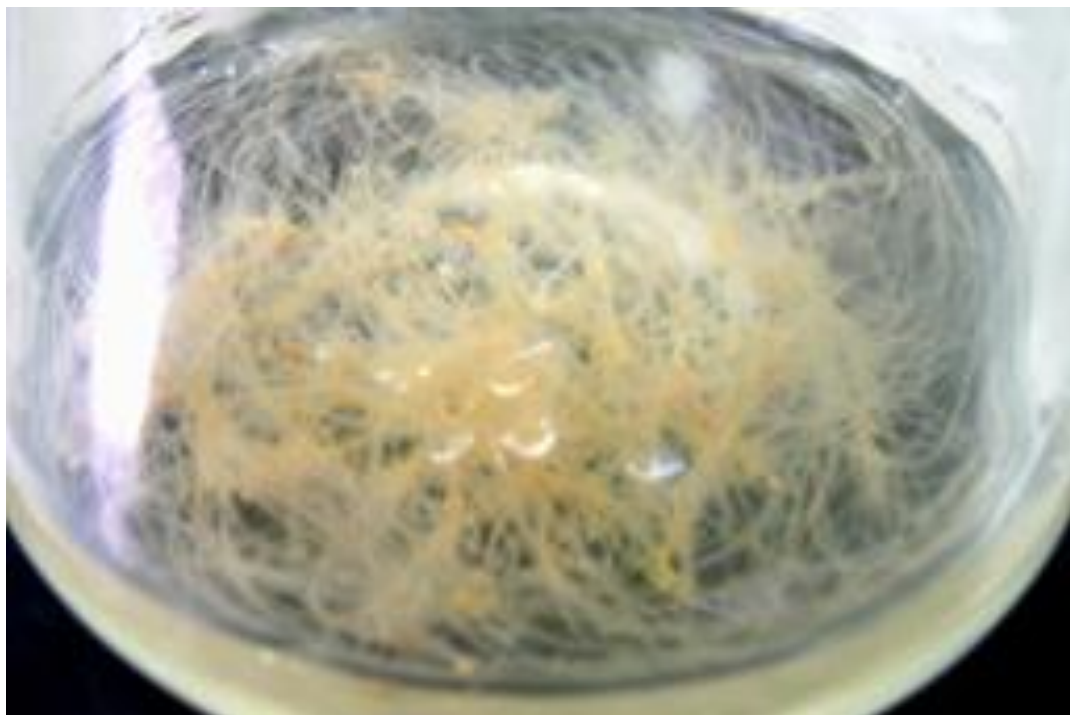


Рисунок 11. Бородатые корни моркови в жидкой среде

3.3. Подбор оптимальных условий и питательной среды

Для подбора питательной среды мы использовали разные среды. Были подобраны среды с оптимальными концентрациями веществ и неоптимальными. Также в среду добавляли витамины, в частности аскорбиновую кислоту, меняли pH (от 4,5 до 7,0). Оптимум роста наблюдался при температуре 26 °С в климатостате и относительной влажности воздуха 70% (табл.4).

Таблица 4. Подбор оптимальной температуры для роста волосовидных корней моркови.

Температура(°С)	Рост волосовидных корней (см)
-----------------	-------------------------------------

10	5
20	7
25	10
26	12
30	13

Морфометрический анализ показал, что длина волосовидных корней моркови достигает 13 см через 3 недели и дальнейший рост замедляется (табл. 5).

Таблица 5. Морфометрический анализ волосовидных корней моркови.

Продолжительность	Длина волосовидных корней
Через 1 неделю	7 см
Через 2 недели	10 см
Через 3 недели	13 см

Было решено, что для культивирования бородатых корней нужно использовать полутвердую основную регенерационную среду MS в колбах на

250 мл. Состав (на 1 литр) – соли MS (4,6 г/л), витамины B5 по Гамбургу, 100 мг/л инозитола, 3% сахарозы, 0,6-0,8% агара, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, pH 5,6-5,8. На данный момент эта питательная среда нами была испытана на бородастых корнях дисков моркови. После получения культуры, выросшие бородастые корни перенесли в биореактор с питательной средой для их дальнейшего разрастания. Соответствующий прототип биореактора нами уже апробирован при выращивании бородастых корней табака (рис.12).



Рисунок 12. Прототип биореактора для выращивания волосовидных корней моркови.

Этот прототип биореактора при используемом режиме может быть отнесен к газофазному биореактору дождевального типа. В подобного рода реакторах преобладающей фазой является газовая. Корневые культуры преимущественно находятся в атмосфере биореактора, а питательная среда, в виде мелких капель, подается через специальный рассеиватель. В сконструированном нами прототипе биореактора питательная среда

подавалась через обычный душевой рассеиватель, что приводило к образованию довольно крупных капель. При работе с биореактором предполагалось периодически открывать его для изучения роста корней, поэтому для предотвращения роста микроорганизмов в его конструкцию был встроен ультрафиолетовый стерилизатор, который включался и отключался вместе с насосом для подачи питательной среды, а свободный доступ воздуха в камеру в целом был ограничен и пассивно диффундировал через негерметично закрытую крышку биореактора.

После того как рост корней перешел «на плато», их отправили на получение браззеина, но перед этим ообрали свежие кусочки корней для дальнейшего культивирования в биореакторе.

Таким образом, были получены 9 линий культуры корней моркови, вырабатывающих сладкий белок браззеин. Эти линии были протестированы на вкус. Подобраны оптимальная среда и оптимальные условия для выращивания культуры корней моркови.

ВЫВОДЫ

1. Получено 9 линий индуцированных волосовидных культур корней моркови, вырабатывающих сладкий белок браззеин.
2. Было выяснено, что метод стерилизации целых корнеплодов моркови является наиболее эффективным.
3. Подобрана оптимальная полутвердая основная регенерационная MS среда для выращивания культуры корней моркови.
4. Подобрана оптимальная температура для роста бородатых корней моркови в климатостате: 26°C при относительной влажности воздуха 70%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения поставленных нами задач была получена культура бородатых корней моркови, вырабатывающих сладкий белок браззеин. Наличие сладкого белка было подтверждено на вкус. Также были проведены работы по подбору оптимальных условий и питательной среды. Наиболее эффективным оказалась среда MS и выращивание культуры в темноте при 26⁰C при относительной влажности 70%. Все задачи на данном этапе решены в полной мере. Полученные культуры корней моркови могут быть использованы в исследовательских целях для тестирования свойств и апробаций новых технических решений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Армитидж Ф. Агробактериальные трансформирующие векторы растений/ Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейпер // В: Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера и др.; пер. с англ. Г. И. Эйснера, В. М. Андрианова. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
- 2) Кулуев, Б.Р. Генетически трансформированные (бородатые) корни учеб. пособие / Б.Р. Кулуев, А.Б. Якупова; Башкирский государственный университет; Институт биохимии и генетики УНЦ РАН. — Уфа: РИЦ БашГУ, 2017
- 3) Ходыкина М.В., Пехтерева Э.Ш., Кырова Е.И., Виноградова С.В., Ахатов А.К., Юваров В.Н., Борисова И.П., Игнатов А.Н. БОРОДАТОСТЬ КОРНЕЙ 2014
- 4) Alpizar, E. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots conditions for long-term proliferation and morphologic and molecular characterization / E. Alpizar, E. Dechamp, F. Lapeyre-Montes, C. Guilhaumon, B. Bertrand, C. Jourdan, P. Lashermes, H. Etienne // *Annals of botany*. – 2008. – V. 101. – №. 7. – С. 929-940
- 5) 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.
- 6) Assadi-Porter F.M., Aceti D.J., Cheng H., Markley J.L. Efficient production of recombinant brazzein, a small, heat-stable, sweet-tasting protein of plant origin // *Archives of Biochemistry and Biophysics* journal. — Elsevier, 2000. — April Jayaraj J; Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, 8888 University Drive, Burnaby, British Columbia, Canada.
- 7) Bettini, P.P. *Agrobacterium rhizogenes rolA* gene promotes tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in transgenic / P.P. Bettini, E. Santangelo, R. Baraldi, F. Rapparini, P. Mosconi, P. Crino, M.L. Mauro // *Journal of plant biochemistry and biotechnology*. – 2016. – V. 25. – №. 3. – P. 225-233

- 8) Bouzφr, H. *Agrobacterium* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina* / H. Bouzar, J. B. Jones // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology – 2001. – T. 51. – №.3. – C. 1023–1026
- 9) Bouzφr, H. Request for a Judicial Opinion concerning the type species of *Agrobacterium* / H. Bouzar // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – P. 373–374
- 10) Bradbury, 1986; De Cleene and Deley, 1976
- 11) Bulgakov, V.P. Application of *Agrobacterium* rol genes in plant biotechnology 2013
- 12) Bulgakov, V.P. Application of *Agrobacterium* rol genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation / V.P. Bulgakov, Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik, T.Y. Gorpenchenko, Y.V. Inyushkina // Genetic Transformation. – InTech, 2011
- 13) Caldwell J.E., Abildgaard F., Dzakula Z., Ming D., Hellekant G., Markley J.L. Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein // Nat. Struct. Biol. : journal. — 1998. — June (vol. 5, no. 6). — P. 427—435.hairy root production, inulin and total phenolic compounds analysis
- 14) Cardarelli, M. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype / M. Cardarelli, D. Mariotti, M. Pomponi, L. Spano, I. Capone, P. Costantino // Molecular and General Genetics MGG. – 1987. – V. 209. – №. 3. – P. 475-480
- 15) Chilton, M.D. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells / M.D. Chilton, D.A. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart, J. Tempe, // Nature. – 1982. – V. 295. – №. 5848
- 16) Chilton M. D. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells:The molecular basis of crown gall tumorigenesis / 1987
- 17) Choi, P.S. Plant regeneration from hairy root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus* / P.S. Choi, Y.D. Kim, K.M. Choi, H.J. Chung, D.W. Choi, J.R. Liu // Plant cell reports. – 2004. – V. 22. – №. 11. – P. 828-831

- 18) Diaz, C.L. Genomic requirements of *Rhizobium* for nodulation of white clover *hairy roots* transformed with the pea lectin gene / C.L. Diaz, H.P. Spaink, C.A. Wijffelman, J.W. Kijne // Molecular plant-microbe interactions: MPMI (USA). – 1995
- 19) Diner A.M., Karnosky D.F.. In: Genetic manipulation of woody plants (eds. J. Hanover, D. Keathley) – New York: Plenum Press, 1987
- 20) Escobar M. A. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease / M. A. Escobar, A. M. Dandekar // Trends Plant. Sci. – 2003. – V. 8. – P. 380-386
- 21) Estrada-Navarrete, G. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics / G. Estrada-Navarrete, X. Alvarado-Affantranger, J.E. Olivares, C. Diaz-Camino, O. Santana, E. Murillo, G. Guillen, N. Sanchez-Guevara, J. Acosta, C. Quinto, D. Li, P.M. Gresshoff, F. 132 Sanchez // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2006
- 22) E. Dilshad, R.M. Cusido, K.R. Estrada, M. Bonfill, B. Mirza Genetic transformation// PLoS One. – 2015
- 23) Farrand, S.K. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae* / S.K., Farrand, P.B. van Berkum, P. Oger // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2003. – V. 53. – №. 5. – P. 1681-1687
- 24) Faus I., Sisniega H. Sweet-tasting Proteins // Biopolymers: Polyamides and Complex Proteinaceous Materials II (англ.) / Hofrichter M., Steinbüchel A.. — 8th. — Weinheim: Wiley-VCH., 2004
- 25) G. Falasca, M.M. Altamura, S. D'Angeli, D. Zaghi, P. Costantino, M.L. Mauro // Plant Physiology and Biochemistry. – 2010. – V. 48. – №. 9. – P. 797-804.
- 26) Georgiev, M.I. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource / M.I. Georgiev, E. Agostini, J. Ludwig-Müller, J. Xu // Trends in biotechnology. – 2012. – V. 30. – №. 10. – P. 528-537

- 27) Gelvin S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration / S. B. Gelvin // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 51. – P. 223-256.32
- 28) Giovannini, A. Genetic transformation of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Griseb.) by *Agrobacterium rhizogenes* / A. Giovannini, A. Allavena, N. Pecchioni // Journal of Genetics and Breeding (Italy). – 1996
- 29) Giri, A. Transgenic *hairy roots*: recent trends and applications / A. Giri, M.L. Narasu // Biotechnology Advances. – 2000
- 30) Giri, A. Transgenic hairy roots: recent trends and applications / A. Giri, M.L. Narasu // Biotechnology Advancys. – 2002
- 31) Hanafy, M.S. *Agrobacterium rhizogenes*-mydiated genetic transformation in Hanafy, M.S. Asker, H. El-Shabrawi, M.A. Møttter // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. – 2018. – P. 1-9
- 32) Hodges, L.D. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* single-stranded DNA-binding protein VirE2 / L.D. Hodges, J. Cuperus, W. Ream // Journal of bacteriology. – 2004. – V. 186. – №. 10. – P. 3065-3077
- 33) Izawa H., Ota M., Kohmura M., Ariyoshi Y. Synthesis and characterization of the sweet protein brazzein (англ.) // Biopolymers : journal. — 1996. — July (vol. 39, no. 1). — P. 95—10
- 34) Kersters and Ley, Willems and Collins, 1993
- 35) M. Doma, G. Abhayankar, V.D. Reddy, P.B. Kishor // Indian Journal of Experimental biology. – 2012
- 36) Magrelli, A. Splicing of the *rolA* transcript of *Agrobacterium rhizogenes* in *Arabidopsis* / A. Magrelli, K. Langenkemper, C. Dehio, J. Schell, A. Spena // Science. – 1994. – V. 266. – №. 5193. – P. 1986-1988
- 37) Ming D., Hellekant G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B (англ.) // FEBS Lett. (англ.)русск. : journal. — 1994. — November (vol. 355, no. 1). — P. 106—108.

- 38) Munusamy U., Abdullah S.N.A., Aziz M.A., Khazaai H. (2013) Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for *Agrobacterium*-mediated transformation
- 39) Roychowdhury, D. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges / D. Roychowdhury, A. Majumder, S. Jha // *Biotechnology for medicinal plants*. – Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 29-68
- 40) Sajjalaguddam, R.R. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains and elicitation on *hairy root* induction and glycyrrhizin production from *Abrus precatorius* / R.R. Sajjalaguddam, A. Paladugu // *J. Pharm. Sci. Res.* – 2016. – V. 8. – №. 12. – P. 1353-1357.
- 41) 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
- 42) Setamam, M.N. Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants / M.N. Setamam, J.N. Sidik, A.Z. Rahman, C.R. Che Mohd Zain // *BMC research notes*. – 2014. – V. 7. – №. 1. – P. 414
- 43) Sharafi, A. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation / A. Sharafi, S.H. Hashemi, A. Mousavi, P. Azadi, B. Dehsara, K.B. Hosseini // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 29. – №. 11. – P. 2125-213
- 44) Skarjinskaia, M. *Hairy roots* as a vaccine production and delivery system. / M. Skarjinskaia, K. Ruby, A. Araujo, K. Taylor, V. Gopalasamy-Raju, K. Musiyuchuk, J.A. Chichester, A.G. Palmer, P. Rosa, V. Mett, N. Ugulava, S.J. Streatfield, V. Yusibov // *Biotechnology of Hairy Root Systems*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. – P. 115-134
- 45) Slightom, J.L. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading

frames / J.L. Slightom, M. Durand-Tardif, L. Jouanin, D. Tepfer // Journal of Biological Chemistry. – 1986. – V. 261. – №. 1. – P. 108-121.

46) Stanton B. G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the gene-jockeying tool / B. G. Stanton // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2003. – V. 67. – P. 16-37

47) Tepfer, D. Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology, and evolution // Plant-microbe interactions (USA). – 1989

48) Tepfer, D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype / D. Tepfer // Cell. – 1984.

49) Thilip, C. Improved *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root culture system of *Withania somnifera* (L.) Dunal using sonication and heat treatment / C. Thilip, C.S. Raju, K. Varutharaju, A. Aslam, A. Shajahan // Biotech. – 2015

50) Toro, N. Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium* / N. Toro, A. Datta, M. Yanofsky, E. Nester // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988.

51) Tusevski, O. *Hairy roots* of *Hypericum perforatum* L.: a promising system for xanthone production / O. Tusevski, J.P. Stanoeva, M. Stefova, D. Kungulovski, N.A. Pancevska, N. Sekulovski, S. Panov, S.S. Gadzovska // Open Life Sciences. – 2013

СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

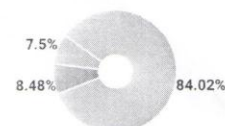
Башкирский государственный медицинский
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.VUZ

Автор работы: Тукташева Русалина Радиковна
Самоцитирование
рассчитано для: Тукташева Русалина Радиковна
Название работы: Индукция волосовидных корней моркови при помощи различных штаммов *Agrobacterium rhizogenes*
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	8.48%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	84.02%
ЦИТИРОВАНИЯ	7.5%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 24.06.2021

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; Перефразирование по eLIBRARY.RU; Перефразирование по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

24.06.2021


Подпись проверяющего



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

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

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России
НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы _____ Б-401 А группы _____

Тукташевой Русалины Радиковна

на тему: «Индукция волосовидных корней моркови при помощи различных штаммов *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 Технично-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. отличный 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, заслуживают 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

ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по

научно-производственной работе

профессор, д.б.н.

(Место работы, занимаемая должность)



А.П. Шепелин

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Тукташевой Русалины Радиковны
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Индукция волосовидных корней моркови при помощи различных штаммов *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 Антибактериальная активность экстрактов инулинсодержащих растений

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.

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

(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 хорошо и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент

Профессор кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ д.б.н.

А.Х. Баймиев.



ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401А
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)
Тукташевой Русалины Радиковны
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Индукция волосовидных корней моркови при помощи различных штаммов *Agrobacterium rhizogenes*»

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

2 Актуальность темы выпускной квалификационной работы (ВКР).

Тема работы актуальна, так как на сегодняшний день ведётся поиск методов для изучения функционально-метаболической активности микроорганизмов

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 использовались следующие программы: Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint

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

6 Соблюдение календарного графика подготовки ВКР. График выполнения проекта соблюдался

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

8 Дополнительные сведения о ВКР и работе студента в период ее подготовки (при необходимости). Работа выполнена в соответствии с требованиями. По материалам работы выполнены 2 публикации, которые находятся в печати

(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 изучена, заслуживают внимания результаты и выводы

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. Результаты работы могут быть в дальнейшем использованы для научно-исследовательской деятельности и в учебном процессе.

11 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно") и рекомендация о присвоении квалификации. Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки отлично и рекомендована к защите.

Руководитель выпускной квалификационной работы:

Старший преподаватель кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии, младший научный сотрудник ИБГ УФИЦ РАН
Кулуев А.Р.

(Подпись)

