ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ПОЛУЧЕНИЕ ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ *AMARANTHUS CRUENTUS* L. И ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИХ РОСТА

Таипова Р.М.[1], Мусин Х.Г.[2], Кулуев Б.Р.[1,2]

[1] Башкирский государственный университет, г. Уфа
E-mail: Taipova.Ragida@yandex.ru
[2] Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа

Амарант является одной из важных кормовых и зерновых культур. Для быстрого получения новых сортообразцов этой культуры могут быть использованы методы агробактериальной генетической трансформации. В данной работе описаны результаты исследования по получению и изучению волосовидных (бородатых) корней *Amaranthus cruentus* с помощью двух штаммов *Agrobacterium rhizogenes* A4 и 15834. Индукцию волосовидных корней наблюдали на сегментах гипокотилей через 5-6 суток после процедуры инокуляции агробактериями. По результатам оценки параметров роста бородатых корней можно сделать вывод о том, что наиболее интенсивно растут их линии, полученные после трансформации штаммом A4. Попытки индукции побегообразования на волосовидных корнях амаранта при помощи различных сочетаний фитогормонов оказались безуспешными. Требуются дальнейшие исследования, направленные на регенерацию побегов из волосовидных корней и создание трансгенных растений *A. cruentus* при помощи ризогенных агробактерий.

Ключевые слова: волосовидные корни, бородатые корни, *Amaranthus cruentus*, амарант багряный, *Agrobacterium rhizogenes*, агробактериальная трансформация, трансгенные растения

OBTAINING HAIRY ROOTS OF *AMARANTHUS CRUENTUS* L. AND EVALUATION OF THEIR GROWTH INDICATORS

Taipova R.M.[1], Musin Kh.G.[2], Kuluev B.R.[1,2]

[1] Bashkir State University, Ufa
E-mail: Taipova.Ragida@yandex.ru
[2] Institute of Biochemistry and Genetics of the Russian Academy of Sciences, Ufa

Amaranth is one of the important forage and grain crops. Methods of agrobacterium-mediated transformation can be used to obtain new forms and lines of this culture. This paper describes the results of study to obtain the hairy roots of *Amaranthus cruentus* using two strains of *Agrobacterium rhizogenes* A4 and 15834. Induction of hairy roots was observed on the segments of hypocotyls 5-6 days after the inoculation with agrobacteria. According to the results of the evaluation of the growth parameters of hairy roots, it can be concluded that the hairy roots obtained after transformation by the A4 strain grow most intensively. Attempts to induce shoot formation on the hairy roots of amaranth were unsuccessful. Further research is needed to create transgenic plants of *A. cruentus* using *A. rhizogenes.*

Keywords: hairy roots, *Amaranthus cruentus*, red amaranth, *Agrobacterium rhizogenes*, Agrobacterium-mediated transformation, transgenic plants

Поступила в редакцию: 28.11.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-574-581

ВВЕДЕНИЕ

Амарант является ценным культурным растением, имеющим перспективы для его широкого применения в качестве овощной, кормовой, зерновой, лекарственной и декоративной культуры. Высокая питательная ценность, обусловленная повышенным содержанием белка, сбалансированного по аминокислотному составу, витаминов и минеральных солей дает возможность использования амаранта в кулинарии, медицине и сельском хозяйстве. В результате активной работы отечественных селекционеров были

выведены новые сорта амаранта с улучшенными ростовыми характеристиками и другими хозяйственно ценными признаками [Кононков и др., 2008, Мирошниченко и др., 2012]. Для увеличения продуктивности и урожайности амаранта кроме классических методов селекции могут быть использованы современные методы генной инженерии. В литературе имеются некоторые данные по получению трансгенных форм различных видов амаранта следующими способами: агробактериальная трансформация эмбриогенного каллуса [Jofre-Garfias et al., 1997] и сегментов эпикотилей [Pal et al., 2013, Таипова и др., 2019], метод погружения цветков [Кулуев и др., 2016], а также регенерация трансгенных форм амаранта из волосовидных корней [Swain et al., 2010, Pal et al., 2013]. Волосовидные корни (hairy roots) получают при помощи ризогенных агробактерий *Agrobacterium rhizogenes*, причем наиболее часто используются штаммы A4 и 15834 [Михайлова и др. 2017]. При определенных условиях из этих генетически трансформированных волосовидных корней можно стимулировать регенерацию побегов, что и используют для создания трансгенных растений [Kuluev et al., 2016]. Так как ранее ризогенные агробактерии не использовались для создания трансгенных форм *Amaranthus cruentus,* целью настоящей работы было получение волосовидных корней этого вида амаранта, а также попытка индукции регенерации из этих корней трансгенных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе по получению волосовидных (бородатых) корней амаранта использовали семена *A. cruentus* L. сорта «Багряный» (Агросервер, Россия). Стерилизацию растительного материала проводили 70%-ным этиловым спиртом в течение 1 минуты, затем 20%-ным раствором отбеливателя «Белизна» (ООО «Башбытпром», Стерлитамак, Россия, который представляет собой 15%-ный раствор гипохлорита натрия) в течение 8 минут, после чего семена тщательно промывали стерильной дистиллированной водой 5-6 раз и рассевали на среду, содержащую половинную концентрацию солей Мурасиге-Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1962], витамины среды Гамборга [Gamborg et al., 1968], 30 г/л сахарозы. Семена проращивали при температуре 27±1°С и интенсивности света 35 мкмоль/м^2·с.

Для инокуляции эксплантов амаранта использовали культуры клеток штаммов *A. rhizogenes* A4 и 15834, которые выращивали в 20 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мг/л рифампицина, на орбитальном шейкере при температуре 28ºС и скорости вращения 180 об/мин. Наращивание агробактерий продолжали до достижения оптической плотности, соответствующей концентрации 2–3x10^8 клеток/мл (обычно около 1 суток). Полученную суспензию агробактерий центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 минут, надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали в эквивалентном объеме жидкой среды МС.

Из семидневных проростков в стерильных условиях вырезали сегменты семядольных листьев и гипокотилей (экспланты) и культивировали в течение 5 суток на регенерационной среде МС, содержащей 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК). Затем сегменты, предварительно подвергнутые поранению, погружали в жидкую среду МС, содержащую инокулюм и 100 мкМ раствор ацетосирингона на 10 минут, после чего немного подсушивали стерильной фильтровальной бумагой и переносили на такую же регенерационную среду для сокультивации с агробактериями.

Совместное культивирование эксплантов с агробактериями проводили в течение двух суток, по истечении которых их промывали раствором антибиотика цефотаксима (300 мг/л) и

переносили на твердую среду МС, содержащую аналогичную концентрацию антибиотика цефотаксима. Через 12 дней предположительно волосовидные корни длиной 10-15 мм переносили на среду МС без добавления антибиотиков для оценки ростовых параметров. Для доказательства трансгенного статуса полученных волосовидных корней проводили ПЦР-анализ на наличие гена *rolB* при помощи праймеров 5'-TTCAGATTTACTATAGCAGGC-3' и 5'-GCAAGTACCTTGTTCATTCA-3' (размер ампликона – 266 п.н.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспланты из листовых дисков и сегментов гипокотилей культивировали на регенерационной среде с добавлением БАП и НУК в течение пяти дней до проведения работ по генетической трансформации с *A. rhizogenes*. За это время происходило увеличение размеров исходных эксплантов, по-видимому, благодаря наличию в среде фитогормонов, ответственных за нормализацию процессов роста.

Рост волосовидных (бородатых) корней амаранта индуцировался на среде МС с цефотаксимом через 5-6 суток после проведения работ по инокуляции с *A. rhizogenes* но только на сегментах гипокотилей, в то время как на эксплантах из листовых дисков образование волосовидных корней не наблюдалось (рис. 1а). При перенесении фрагментов корней размером около 10-15 мм на среду МС без фитогормонов прослеживался их интенсивный рост с образованием боковых ответвлений, что косвенно указывало на трансгенный статус полученных нами культур корней амаранта (рис. 1б).

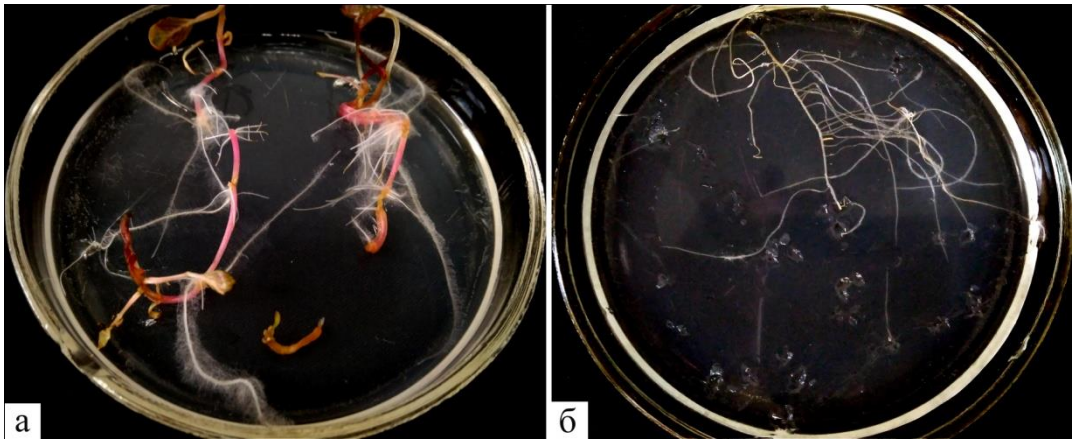

Рис. 1. Получение волосовидных корней амаранта: а – образование волосовидных корней на гипокотилях, обработанных штаммом 15834 *A. rhizogenes* через 8 дней после инокуляции; б - изолированные волосовидные корни амаранта на среде МС

Изолированные культуры волосовидных корней инкубировали в чашках Петри при температуре +26°С и плотности потока фотонов 20 мкмоль $м^{-2}$ $сек^{-1}$. Для дальнейшей работы отбирались только волосовидные корни, в которых было доказано наличие гена *rolB* при помощи ПЦР-анализа. В итоге для каждого из вариантов штаммов агробактерий было выбрано по 20 корней. С целью оценки параметров роста волосовидных корней разных линий, полученных трансформацией двумя штаммами *A. rhizogenes* А4 и 15834, оценивалось изменение их длины за одну неделю. По результатам измерений можно сделать вывод о том, что более интенсивно растут волосовидные корни, полученные после трансформации штаммом А4, чем штаммом 15834 (рис. 2).

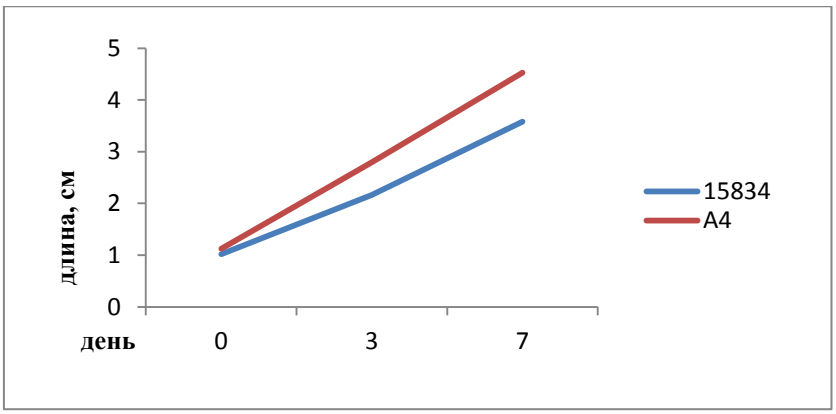

Рис. 2. Оценка изменения длины волосовидных корней, полученных путем трансформации штаммами 15834 и A4 *A. rhizogenes*

Большой интерес представляет получение трансгенных растений *A. cruentus* из волосовидных корней, так как этот подход может стать довольно легковоспроизводимым способом генетической трансформации амаранта. В наших исследованиях спонтанной регенерации побегов из волосовидных корней не происходило, как это было показано ранее для некоторых других растений [Knyazev et al., 2017]. Поэтому было решено добавить в среду регуляторы роста ауксиновой и цитокининовой природы. При культивировании волосовидных корней на среде МС с добавлением фитогормонов наблюдали интенсивное каллусообразование (рис. 3). Для инициации каллуса нами были использованы следующие регуляторы роста: 6-БАП (0,2 мг/л и 0,5 мг/л) и НУК (0,2 мг/л), а также зеатин (2 мг/л) и индолилмасляную кислоту (ИМК) (1 мг/л). На свету через 7 дней на волосовидных корнях образовывался каллус, причем наилучший рост каллуса был отмечен на среде МС, содержащей зеатин (2 мг/л) и ИМК (1 мг/л) (рис. 3в). Однако, при использованных нами концентрациях и сочетаниях регуляторов роста регенерации побегов амаранта не происходило, по крайней мере, в течение двух месяцев наших наблюдений. Однако нельзя исключать того, что культуры корней амаранта можно использовать для дальнейшей регенерации из них трансгенных растений, однако для этого необходимо проведение дополнительных исследований по выяснению оптимального сочетания фитогормонов для индукции побегообразования амаранта из каллуса или непосредственно из волосовидных корней. Вероятнее всего необходимо использовать более высокие концентрации цитокининов причем без добавления в среду регуляторов роста ауксиновой природы [Pal et al., 2013].

Рис. 3. Каллусообразование на волосовидных корнях *A. cruentus* на среде Мурасиге-Скуга при добавлении различных регуляторов роста: а – БАП (0,5 мг/л) и НУК (0,2 мг/л); б – БАП (0,2 мг/л) и НУК (0,2 мг/л); в – зеатин (2 мг/л) и ИМК (1 мг/л).

ОБСУЖДЕНИЕ

Агробактериальная трансформация является наиболее распространенным и эффективным методом переноса ДНК в растительную клетку [Hwang et al., 2017]. В отношении генетической трансформации различных видов амаранта в литературе имеются данные по агробактериальной трансформации эмбриогенного каллуса [Jofre-Garfias et al., 1997] и сегментов эпикотилей [Pal et al., 2013, Таипова и др., 2019], а также результаты исследования, направленного на регенерацию трансгенных форм амаранта из волосовидных корней [Swain et al., 2010, Pal et al., 2013]. Ранее нами была испытана технология трансформации сорного вида амаранта запрокинутого *Amaranthus retroflexus* L. (щирица) методом погружения цветков, однако эффективность трансформации данным методом оказалась довольно низкой (не более 1,4 %) [Кулуев и др., 2016], а для *A. cruentus* за два года работ методом погружения цветков нам не удалось получить ни одного трансгенного растения, что побудило нас к поиску более эффективных методов генетической трансформации для этого вида амаранта.

A. rhizogenes представляет собой грамотрицательную почвенную бактерию, *rol*-гены которой при включении в геном растения индуцируют образование волосовидных корней [Ozyigit et al., 2013]. Особенностями волосовидных корней являются быстрый рост на питательных средах без фитогормонов, интенсивное боковое ветвление, генетическая стабильность, способность синтезировать вторичные метаболиты [Shanks, Morgan, 1999, Srivastava, Srivastava, 2007], а также возможность их успешного культивирования в биореакторах [Khan et al., 2018]. Таким образом, полученные нами волосовидные корни амаранта могут быть использованы для продукции корнеспецифических метаболитов этого вида растений. Кроме того, волосовидные корни довольно часто обладают высокой способностью к регенерации из них целых растений, что достаточно давно используется для создания трансгенных растений [Godo et al., 1997].

Известно, что с помощью *A. rhizogenes* были получены трансгенные растения 89 различных таксонов, представленных 79 видами из 55 родов и 27 семейств. Более половины этих растений были трансформированы чужеродными генами, несущими агрономически полезные признаки. Растения-регенеранты из волосовидных корней, часто характеризуются измененной морфологией, отмечается, что для них присуще карликовость, усиленное укоренение, измененное цветение, морщинистые листья и / или повышенное ветвление вследствие экспрессии *rol*-генов. Однако эти *rol*-гены могут фенотипически и не проявляться, поэтому проведение генетических манипуляций с *A. rhizogenes* имеет огромный потенциал для получения трансгенных растений: декоративных и древесных форм [Christey, 2001], сельскохозяйственных и лекарственных растений, в частности, *Ipomoea batatas* (L.) Lam [Luo et al., 2006], *Rehmannia glutinosa* Liboschitz [Hwang, 2008], *Panax ginseng* [Yang, Choi, 2000], *Taraxacum platycarpum* [Lee et al., 2004], рис [Lee et al., 2001] и др.

Ранее волосовидные корни различных видов амаранта уже были созданы и исследованы. Так, Swain с соавт. (2010), приводя результаты работы по трансформации *Amaranthus tricolor*, указывают, что экспланты и стеблевые междоузлия из растений, выращенных в теплице лучше подвержены агробактериальной трансформации, нежели экспланты, полученные из *in vitro* культур и сегментов листьев. Также замечено, что погружение предварительно пораненных эксплантов в бактериальную суспензию приводит к заметно более высокой частоте трансформации, причем волосовидные корни появляются в течение 5 дней с максимальной частотой 97,22% [Swain et al., 2010]. Pal и соавт. (2013) в

своих исследованиях по агробактериальной трансформации *Amaranthus spinosus* использовали сегменты листьев и междоузлий трехмесячных растений амаранта, выращенных в условиях теплицы. Они сообщают, что инициация образования волосовидных корней происходит непосредственно в местах нанесения поранений на сегментах междоузлий и листьев на 8-10-й день после заражения. Регенерацию побега проводили на среде МС с добавлением цитокининов, из которых зеатин (2,0 мг/л) был наиболее эффективным. У некоторых из этих растений при выращивании в теплице проявлялись фенотипические аномалии характерные для экспрессии *rol*-генов, такие как сильное боковое ветвление, более короткие междоузлия, приводящие к карликовости и к различным вариациям формы и размера листьев [Pal et al., 2013]. Волосовидные корни также были получены на *Amaranthus caudatus* L.: сортов Helios, Кармин, Кремовый ранний, а также гибридах: *A. caudatus* x *Amaranthus paniculatus* L. - сорт Стерх, *A. caudatus* x сорт Стерх – сорт Жайвир. В этом эксперименте к трансформации были подвергнуты 14-ти дневные проростки, и образование волосовидных корней наблюдали через 20-25 дней на сегментах гипокотилей после проведенных работ по трансформации [Yaroshko, Kuchuk, 2018].

В нашем исследовании были использованы 13-ти дневные экспланты листьев и сегменты гипокотилей, полученные из *in vitro* культур, однако образование волосовидных корней наблюдали только на сегментах гипокотилей и уже на 5-6 сутки после проведенных работ по инокуляции. Таким образом, у *A. cruentus* из сегментов гипокотилей образование волосовидных корней происходит несколько быстрее, чем у других видов амаранта. Хотя у *A. tricolor* волосовидные корни также появлялись на 5-й день [Swain et al., 2010].

Использование волосовидных корней может стать перспективным методом создания трансгенных растений амаранта. Для регенерации побегов из волосовидных корней нами были использованы различные сочетания фитогормонов, однако индуцировалось лишь каллусообразование. Поэтому требуются дальнейшие исследования по подбору регуляторов роста для индукции побегообразования из волосовидных корней *A. cruentus*.

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А19-119021190011-0 ИБГ УФИЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кононков П.Ф., Гинс М.С. Интродукция амаранта в России // Научно-практический журнал "Овощи России". 2008. №1–2. С. 79–82.
2. Кулуев Б. Р., Михайлова Е. В., Таипова Р. М., Чемерис А. В. Изменение фенотипа трансгенных растений амаранта *Amaranthus retroflexus L.* с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* // Генетика. 2016. Т. 52. № 12. С. 1388–1397. DOI: 10.7868/S0016675816120067
3. Мирошниченко Л.А., Золоедов В.И., Жаркова И.М. О реализации проекта "Амарант" на воронежских черноземах // Инновационные фирмы и проекты. ИнВестРегион. 2007. № 3. С. 52–53.
4. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 40–45.

5. Таипова Р.М., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2019. С. 11–19 DOI: 10.17516/1997-1389-0292
6. Christey M. C. Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 2001. V. 37. No. 6. P. 687–700. DOI: 10.1007/s11627-001-0120-0
7. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Experimental Cell Research. 1968. V. 50. No. 1. P. 151–158.
8. Godo T., Tsujii O., Ishikawa K., Mii M. Fertile transgenic plants of *Nierembergia scoparia* sendmer obtained by a mikimopine type strain of *Agrobacterium rhizogenes* // Scientia Horticultura. 1997. V. 68(1). P. 101–11. DOI: 10.1016/s0304-4238(96)00964-8
9. Hwang Hau-Hsuan, Manda Yu, Erh-Min Lai. Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications // The arabidopsis book. 2017. V. 15. DOI: 10.1199/tab.0186
10. Hwang S.J. Plant Regeneration from Hairy Root of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz Transformed by *Agrobacterium rhizogenes* // Korean Journal of Medicinal Crop Science. 2008. V. 14. P. 31–35
11. Jofre-Garfias A.E., Villegas-Sepulveda N., Cabrera-Ponce J.L. Agrobacterium-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: light- and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter // Plant Cell Reports. 1997. V.16. P. 847–852. DOI: 10.1007/s002990050332
12. Khan S.A., Siddiqui M.H., Osama K. Bioreactors for Hairy Roots Culture: A Review // Current Biotechnology. 2018. V.7 No. 3. P. 417–427. DOI: 10.2174/2211550108666190114143824
13. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin // Plant Root. 2017. V. 11. P. 64–69. DOI: 10.3117/plantroot.11.64
14. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. The poplar ARGOS-LIKE gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size // Biologia Plantarum. 2016. V. 60. P. 513–522. DOI: 10.1007/s10535-016-0610-x
15. Lee M.H., Yoon E.S., Jeong J.H., Choi Y.E. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters // Plant Cell Reports. 2004. V. 22 (11). P. 822–827. DOI: 10.1007/s00299-004-0763-5
16. Lee S.H., Blackhall N.W., Power J.B., Cocking E.C., Tepfer D., Davey M.R. Genetic and morphological transformation of rice with the rolA gene from the Ri TL-DNA of Agrobacterium rhizogenes // Plant Science. 2001. V. 161 (5). P. 917–925. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00488-5
17. Luo H. R., Santa Maria M., Benavides J., Zhang D. P., Zhang Y. Z. And Ghislain M. Rapid genetic transformation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) via organogenesis // African Journal of Biotechnology. 2006. V. 5. P. 1851–1857.
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. 1962. V. 15. No. 3. P. 473–497.
19. Ozyigit II, Dogan I, Tarhan E.A., Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation and its biotechnological applications in crops // Crop Improvement. 2013. P. 1–48 DOI: 10.1007/978-1-4614-7028-1_1

20. Pal A., Swain S.S., Das A.B. Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 2013. V. 49. P.114–128. DOI: 10.1007/s11627-013-9489-9
21. Pal A., Swain S.S., Mukherjee A. K., Chand P.K. *Agrobacterium* pRi TL-DNA *rol*B and TR-DNA Opine Genes Transferred to the Spiny Amaranth (*Amaranthus spinosus* L.) – A Nutraceutical Crop // Food technology and Biotechnology. 2013. 51 (1). P. 26–35.
22. Shanks J.V., Morgan J. Plant «hairy root» culture // Current Opinion in Biotechnology. 1999. V. 10. P. 151–155. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)80026-3
23. Srivastava S., Srivastava A.K. Hairy root culture for mass production of high-value secondary metabolites // Critical Reviews in Biotechnology. 2007. V. 27(1). P. 29–43. DOI: 10.1080/07388550601173918
24. Swain S.S., Sahu L., Barik D.P., Chand P.K. *Agrobacterium*×plant factors influencing transformation of "Joseph's coat" (*Amaranthus tricolor* L.) // Scientia Horticulturae. 2010. V. 125. P. 461–468. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.04.034
25. Yang D.C., Choi Y.E. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Panax ginseng* // Plant Cell Reports. 2000. V. 19(5). P. 491–496. DOI: 10.1007/s002990050761
26. Yaroshko O.M., Kuchuk M.V. *Agrobacterium* – caused transformation of cultivars *Amaranthus caudatus* L. and hybrids of *A. caudatus* L. x *A. paniculatus* L. // International Journal of Secondary Metabolite. 2018. V. 5. No. 4. P. 312–318. DOI: 10.21448/ijsm.478267