

УДК 581.1

## БЕЗБАКТЕРИАЛЬНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ КОСМАТЫХ КОРНЕЙ

Г.Р. Ясыбаева, З.Р. Вершинина, Б.Р. Кулуев, А.В. Чемерис

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия, gulnar.yas@mail.ru*

Целью данного исследования стала разработка нового подхода безбактериального получения косматых корней и изучение их морфофизиологических особенностей. В работе были использованы молекулярно-биологические методы. Результатами данного исследования стали: 1) амплификация *rol*-генов с *Ri*- плазмиды *Agrobacterium rhizogenes* штамма *A4*, которые специфически модифицировались с целью дальнейшей рекомбинации с геномом растений; 2) подбор и оптимизация условий для проведения биобаллистической трансформации; 3) получение двух линий косматых корней, в результате трансформации листовых эксплантов табака ампликоном *rol*-генов с помощью биобаллистического метода. Полученные корни имели характерный для косматых корней фенотип. Морфофизиологические показатели регенировавших *in vitro* растений соответствовали фенотипам растений табака, полученных из косматых корней, образованных штаммами *A. rhizogenes*. Тем самым показана возможность получения косматых корней без использования *A. rhizogenes*, что имеет перспективы для трансформации растений не подверженных агробактериальной инфекции.

**Ключевые слова:** косматые корни, *rol*-гены, биобаллистика, трансгенные растения, табак.

Грамотрицательная почвенная фитопатогенная бактерия *Agrobacterium rhizogenes* вызывает неопластический плагиотропный рост косматых (англ. «hairу roots») корней

у различных растений, относящихся к классу двудольных. Данная бактерия содержит *Ri*-плазмиду, T-ДНК которой способна интегрироваться в растительный геном. Экспрес-

сия *rol*-генов (*root locus*) – *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*, содержащихся в Т-ДНК, нарушает нормальное функционирование растительного организма (в частности, влияет на гормональный баланс), что приводит к определенным морфологическим изменениям трансформированных растительных тканей, в частности появлению косматых (бородатых) корней. Инфицированные растения продуцируют различные вторичные метаболиты – алкалоиды, терпеноиды, фенолы, гликозиды и др., часть из которых служит сырьем для получения лекарственных препаратов или относятся к другим хозяйственно-ценным соединениям, включая инулин, полиизопрен и др.

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 [Van de Velde et al., 2003]. 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 [Кулуев и др., 2015]. 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. Более того, данный метод подходит в основном только для трансформации двудольных растений, так как у однодольных и голосеменных растений таким способом получить косматые корни весьма трудно.

Для преодоления этих трудностей в нашей лаборатории был предложен новый метод безбактериального получения косматых корней. Сущность данного подхода заключается в биобаллистической трансформации стерильных растительных эксплантов микрокапсулами золота, покрытых ампликоном, содержащим все 4 *rol*-гена и ограниченного с двух сторон Т-границами Т-ДНК *A. rhizogenes*.

В работе использованы бактерии *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4. Тотальную ДНК бактерий выделяли с помощью набора ДНК-Сорб (ИнтерЛабСервис, Россия). Фрагмент ДНК агробактерии размером 5401 п.н., содержащий гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*, был амплифицирован из плазмидной ДНК *A. rhizogenes* при помощи LR Plus поли-

меразы (Силекс, Россия). Для добавления в ампликон последовательностей правой и левой границ Т-ДНК *A. rhizogenes* проводили реамплификацию при помощи модифицированных прямого и обратного праймеров. Биобаллистическая трансформация проводилась с использованием “генной пушки” Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad, США), где в качестве микроносителя были использованы микрокапсулы золота Bio-Rad, средний размер которых составлял 0.6 мкм. Преципитацию ДНК проводили кальций-спермидиновым способом, по Файнер. Для повышения выживаемости трансформируемой ткани проводили осмотическую предобработку (культивация листовых пластинок табака в среде с содержанием сахарозы 90 г/л). Для биобаллистики было использовано расстояние от источника частиц до ткани мишени 6 см. После выстрела листовые экспланты помещали на агаризованную безгормональную среду Мурасиге-Скуга. Чашки выдерживались при 25 °С в темноте.

Через 10–15 дней культивирования на отдельных листовых эксплантах появились косматые корни. Эффективность трансформации листовых пластинок табака с использованием оптимизированных параметров составила 4%. Полученные корни имели характерный для косматых корней фенотип: активное образование боковых корней, быстрый и аграмитропный рост. Через 20–30 дней на бородатых корнях появились точки регенерации, которые дали начало нескольким побегам. Фенотипы этих *in vitro* растений соответствовали фенотипам растений табака, зараженных *A. rhizogenes* в природе (низкорослые, кустистые растения с темно-зелеными морщинистыми листьями). Для подтверждения косматости корней проводили ПЦР-анализ с праймерами к фрагменту *rolB*-гена, так как это ген является ключевым в корнеобразовании [Nilsson, Olsson, 1997]. Основным преимуществом разработанного *de novo* биобаллистического метода получения косматых корней является то, что нет необходимости удалять агробактерии при дальнейшей культивации культуры корней (в частности в биореакторах), поскольку они уже изначально не присутствуют в процессе трансформации. Также этот метод (в перспективе) позволит получать бородатые корни у некоторых растений, трудно или совершенно не поддающихся агробактериальной трансформации (например, у однодольных растений и голосеменных растений).

Исследования проводились при финансовой поддержке грантов РФФИ-Поволжье – № 14-04-97005 р\_поволжье\_a; РФФИ-Инициативный – № 16-04-00902 А.

#### Библиографический список (References)

- Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев А.Х., Чумаков М.И., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений – важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производственников // Биомика, 2015. Т. 7, № 2, 70–120;
- Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 187–188
- Nilsson O., Olsson O. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots // *Physiol. Plant.* 1997. V. 100. P. 463–473;
- Van de Velde W., Karimi M., Den Herder G., Van Montagu M., Holsters M., Goormachtig S. *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation of plants. In: Jackson J.F., Linskens H.F. (eds.) *Genetic Transformation of Plants*. Springer Berlin Heidelberg, 2003. P. 23–44.

## INDUCTION OF HAIRY ROOTS WITHOUT AGROBACTERIUM TRANSFORMATION

G.R. Yasybaeva, Z.R. Verшинina, B.R. Kuluev, A.V. Chemeris

*Institute of Biochemistry and Genetics Ufa Scientific Centre RAS, gulnar.yas@mail.ru*

The *Ri*-plasmid А4 of *Agrobacterium rhizogenes* contains within its T-DNA genetic information which able to trigger the hairy root syndrome in infected plants. We proposed a new method of induction of hairy roots without agrobacterium transformation. The possibility of development of hairy roots on tobacco leaves through biobalistic transformation was shown.