

На правах рукописи

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Шауф' with a horizontal line extending from the end.

Таипова Рагида Мухтаровна

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКИ
ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ И МУТАНТНЫХ ФОРМ *AMARANTHUS SP***

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа-2023

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий»

Научный руководитель:

Кулуев Булат Разяпович

доктор биологических наук, заведующий лабораторией геномики растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН

Официальные оппоненты:

Соловьев Александр Александрович

доктор биологических наук, профессор, заместитель директора Всероссийского центра карантина растений

Ермошин Александр Анатольевич

кандидат биологических наук, доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет им. первого Президента Б.Н. Ельцина»

Ведущая организация:

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН (г. Владивосток)

Защита диссертации состоится 21 декабря 2023 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.479.01 на базе ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий» по адресу: 450008, г. Уфа, ул. Карла Маркса, д. 12, e-mail: disbiobsu@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», адрес сайта: <http://www.uust.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.



Григориади Анна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одной из перспективных сельскохозяйственных культур для России является амарант (*Amaranthus* spp). К основным видам зерновых амарантов, выращиваемых для потребления человеком и животными, относятся такие виды как *Amaranthus cruentus*, *A. hypochondriacus* и *A. caudatus* (Castellanos-Arévalo et al., 2020). Зерно амаранта богато углеводами (48-69%), белком (12-18%) и жиром (5-8%). Отличительная особенность культуры амаранта и продуктов из него заключается в высоком уровне сбалансированного по аминокислотному составу белка (Кононков, Гинс, 2008; Михеева и др., 2014). В отличие от основных зерновых культур мира амарант содержит в высоких концентрациях незаменимую аминокислоту лизин (0.73-0.84% от общего количества белка) (Becker et al., 1981; Bressani, 1994). Амарант также богат серосодержащими аминокислотами, которых обычно недостаточно в зернобобовых культурах (Bressani et al., 1987). Отмечено, что амарант богат витаминами, такими как β -каротин, пиридоксин, фолиевая кислота, рибофлавин, аскорбиновая кислота, а также содержит макро – и микроэлементы (Amanabo et al., 2011). Многочисленными исследованиями подтверждены антиоксидантная и противовоспалительная эффекты продуктов из амаранта на организм человека (Kushwaha et al., 2014; Amornrit, Santiyanont, 2015). Важной целью селекции амаранта является получение сортов с повышенной урожайностью, а также высокой устойчивостью к вредителям и действию абиотических стрессовых факторов. В целях повышения генетического разнообразия и получения новых линий и сортов в селекции применяют различные технологии, одним из которых является химически индуцированный мутагенез. Широко используемым, дешевым и эффективным мутагеном химической природы является азид натрия (Adamu, Aliyu, 2007). Имеются данные об успешном применении азидата натрия для внесения точечных мутаций с целью получения сортов с повышенной урожайностью у пшеницы (Haridy et al., 2022), чечевицы (Raina et al., 2022), гороха (Bansod et al., 2022) риса (Omoregie et al., 2023), томата (Kumar et al., 2023) и других культурных растений (Лаштабова и др., 2017). Мутационные изменения в генетическом аппарате, возникающие в результате действия азидата натрия, могут положительно повлиять на устойчивость растений к абиотическим стрессовым факторам и способствовать развитию механизмов резистентности к патогенам (Wang, et al., 2019), что может эффективно отразиться на урожайности растений. В качестве способа повышения продуктивности амаранта рассматриваются также современные методы генетической инженерии, в основе которых лежит создание трансгенных растений этой культуры с целью дальнейшего получения генно-модифицированных сортов с хозяйственно-ценными признаками. Для создания высокоурожайных сортов культурных растений могут быть использованы гены семейства *ARGOS*, которые при сверхэкспрессии оказывают позитивное влияние на деление клеток и их рост растяжением. Сообщалось об успешном использовании генов *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* для создания линий риса, кукурузы и пшеницы с улучшенными параметрами роста и стрессоустойчивости (Wang et al., 2009; Guo et al., 2014; Zhao et al., 2017). Зерновой амарант - это культура, которая неизменно вызывает интерес во всем мире как источник высококачественного зерна в условиях, малоприспособленных для выращивания других зерновых культур. Однако урожайность амаранта ниже, чем у других зерновых культур, поэтому, крайне важна разработка методов по созданию новых сортов амаранта с высокой продуктивностью и стрессоустойчивостью. Большой интерес также представляет выяснение физиологических и молекулярных механизмов изменения продуктивности и стрессоустойчивости у трансгенных и мутантных форм амаранта.

Цель работы: создание генетически трансформированных и мутантных форм амаранта и их физиолого-биохимическая характеристика.

Задачи:

1. Подобрать оптимальную концентрацию мутагена азидата натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* и получить мутантные линии этого растения.

2. Провести морфометрический анализ и определить антиоксидантный статус мутантных линий *Amaranthus cruentus* при норме и действии засухи и засоления.

3. Определить содержание общего растворимого белка и состав липидов в семенах мутантных линий *Amaranthus cruentus*.

4. Получить трансгенные растения *Amaranthus retroflexus* с повышенной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* методом погружения цветков в условиях *in planta* и провести их морфометрический анализ.

5. Получить трансгенные растения *Amaranthus cruentus* с повышенной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* методом сокультивации эксплантов с *Agrobacterium tumefaciens* в условиях *in vitro*.

Научная новизна.

- Проведены работы по определению оптимальной концентрации мутагена для обработки семян амаранта *A. cruentus*, которая оказалась в диапазоне 0.5–1 мМ, результаты данного исследования в дальнейшем позволяют проводить работы по увеличению генетической изменчивости амаранта;

- Проведен химический мутагенез амаранта *A. cruentus* с помощью азидата натрия, что позволило получить новые мутантные формы амаранта, характеризующиеся достоверным увеличением содержания линолевой и пальмитиновой кислот и высоким содержанием общего растворимого белка, на 52% выше по сравнению с диким типом.

- Методом химического мутагенеза созданы солеустойчивые и засухоустойчивые линии амаранта, которые могут быть использованы в селекции амаранта с целью получения его новых стрессоустойчивых сортов;

- Методом погружения цветков получены генетически трансформированные растения амаранта *A. retroflexus* со сверхэкспрессией гена *ARGOS-LIKE*, характеризующиеся увеличением размеров листьев и стебля по сравнению с диким типом, что позволяет использовать примененную методику и выбранный целевой ген для улучшения морфометрических показателей растений амаранта;

- Разработана технология создания трансгенных растений *A. cruentus* путем сокультивации сегментов эпикотилей с *A. tumefaciens* в условиях *in vitro*, что позволяет эффективно использовать данную методику для получения генно-модифицированных растений амаранта.

Достоверность научных положений, рекомендаций и выводов.

Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается применением современных методов физиологии, биохимии и молекулярной биологии растений, соответствующего оборудования, а также достаточной выборкой и большим объемом проведенной работы. Для интерпретации и анализа полученных результатов привлечено достаточное количество данных литературы. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы увеличения производства высококачественной продукции сельского хозяйства» (г. Уфа, 2017), XXX Зимней молодежной научной школе «Перспективы направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018), Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Уфа, 2018), Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Саратов, 2020), Всероссийской конференции «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (г. Санкт-Петербург, 2022), Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (г. Санкт-Петербург, 2022), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института биохимии и генетики

Уфимского федерального исследовательского центра РАН «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства» (г. Уфа, 2022).

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе работы трансгенные и мутантные линии амаранта могут эффективно применяться в дальнейшей селекции с целью выведения новых сортов этой культуры с увеличенными размерами надземных органов. Разработанные методы генетической трансформации *A. retroflexus* и *A. cruentus* могут быть использованы в геномной инженерии и геномном редактировании данных видов амаранта. Разработанный метод обработки семян амаранта азидом натрия может быть использована при химическом мутагенезе амаранта для увеличения содержания линолевой и пальмитиновой кислот и повышения содержания общего растворимого белка. Основные результаты исследований могут быть использованы при проведении лабораторных занятий по дисциплинам «Основы геномной инженерии» и «Биотехнология растений».

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа выполнена в рамках специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений и охватывает исследования в области интенсификации растениеводства. Методами геномной инженерии растений получены хозяйственно-ценные генотипы с увеличенными размерами надземных органов. Методами индуцированного мутагенеза созданы линии амаранта, устойчивые к абиогенным факторам среды. Проведены морфофизиологические анализы, определены содержание белков, состав липидов и антиоксидантный статус у мутантных линий амаранта. Проведенные в рамках диссертационной работы исследования соответствуют следующим направлениям паспорта специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений: 5 (Экологическая физиология растений. Растение и стресс), 8 (Культура изолированных клеток, тканей и органов растений; дифференцировка, регенерация, микрклональное размножение), 9 (Генная инженерия растений, физиология трансгенных растений. Получение хозяйственно-ценных генотипов).

Положения выносимые на защиту.

1. Оптимальная концентрация мутагена азиды натрия для обработки семян и получения мутантных линий *Amaranthus cruentus* находится в диапазоне 0.5-1 мМ.
2. Химический мутагенез азидом натрия может быть использован в селекции амаранта для увеличения в семенах содержания белка, линолевой и пальмитиновой кислот, а также для получения стрессоустойчивых линий.
3. Метод погружения цветков может быть использован для получения трансгенных форм *Amaranthus retroflexus*, с эффективностью трансформации около 1.4%.
4. При агробактериальной трансформации *Amaranthus cruentus* стабильные трансформанты наиболее эффективно регенерируют с эксплантов эпикотилей.

Структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 136 страницах, содержит 7 таблиц и 20 рисунков. Включает в себя введение, обзор литературы (глава 1), описание методов исследования (глава 2), результаты и их обсуждение (глава 3), заключение, выводы и список литературы (249 источников, в том числе 224 на иностранных языках).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из которых 3 в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК МОН РФ и 3 статьи в журналах из базы данных Scopus. Результаты были представлены на 11 конференциях в виде тезисов, стендовых и устных докладов.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Б.Р. Кулуеву за формулирование основной идеи работы, постановку цели и задач исследования и

помощь при подготовке публикаций и текста диссертации, к.б.н. В.В. Федяеву (Уфимский университет науки и технологий), к.б.н. Х.Г. Мусину и К.П. Гайнуллиной (ИБГ УФИЦ РАН) за помощь в проведении физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследований, а также сотрудникам Самарского федерального исследовательского центра РАН к.б.н. В.Н. Нестереву, д.б.н. О.А. Розенцвет за помощь в проведении анализа липидного состава и Л.М. Тарановой, инженеру-исследователю лаборатории экологической биохимии ИЭВБ РАН, за техническую поддержку экспериментальной работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для опытов по индуцированному мутагенезу азидом натрия в концентрации от 0.1 до 40 мМ были использованы семена *A. cruentus* сорта Багряный. В качестве объектов исследования для агробактериальной трансформации использовались *A. cruentus* сорта Багряный и *A. retroflexus* (сорное растение, амарант запрокинутый). Для анализа мутантных растений амаранта использовали морфометрический анализ, определяли площадь поверхности листьев с помощью программного обеспечения Easy Leaf Area и относительное содержание воды в побеге (relative water content, RWC). В работе были использованы различные методы физиологии и биохимии растений: определение содержания общего растворимого белка, состава липидов и жирных кислот, общей антиоксидантной способности, активности каталаз, супероксиддисмутаза, аскорбатпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, содержание малонового диальдегида и пролина у мутантных популяций *A. cruentus*. Для доказательства мутагенного действия азид натрия на геном амаранта использовали метод микросателлитного (SSR) анализа. Для агробактериальной трансформации *A. cruentus* использовали метод сокультивации эксплантов эпикотилей и регенерацию на питательной среде с добавлением регуляторов роста 6-бензиламинопурина (БАП) и нафтилуксусной кислоты (НУК). Для получения трансгенных растений *A. retroflexus* использовали метод погружения цветков (floral dip). Для обоих видов амаранта целевым геном для обеспечения конститутивной экспрессии служил ген *ARGOS-LIKE*, продукт которого участвует в негативной регуляции передачи этиленового сигнала. При анализе трансгенных растений использовали методы морфометрического анализа, выделения ДНК методами солевой экстракции и стандартным ЦТАБ-методом, выделения РНК при помощи тризола, полимеразной цепной реакции (ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией), аналитического электрофореза ДНК в агарозном геле. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с применением U-критерия Манна – Уитни и метода LSD.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химический мутагенез *A. cruentus* при помощи азид натрия

Имеются сведения о подборе оптимальных концентраций азид натрия в исследованиях по мутагенезу гороха посевного (Kumar, 1988), овса щетинистого (Papadopoulou et al., 1999), твердой пшеницы (Agata et al., 2001), подсолнечника однолетнего (Skoric et al., 2008), ячменя обыкновенного (Dyulgerova, 2012) и других растений, однако для амаранта такие работы нам неизвестны. Исходя из этого, целью первой части нашей работы являлся подбор оптимальных концентраций азид натрия для индукции химического мутагенеза в семенах и проростках *A. cruentus*. Для этого семена предварительно выдерживали в растворе азид натрия различных концентраций (40, 20, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 и 0.1 мМ) в фосфатном буфере pH 3, в соответствии с методом указанным у Adamu, Aliyu (2007) в течение 5 часов. В качестве же контроля использовали семена, замоченные в фосфатном буфере (pH 3). Далее проростки проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге (рис. 1а).



Рис. 1. Результаты обработки амаранта азидом натрия: а) проростки из семян, обработанных 0.1 мМ азидом натрия через 3 дня; б) проростки через 1 месяц после обработки семян мутагеном, слева направо: контрольный и опытные варианты (0.5 и 1 мМ азид натрия, соответственно).

Было замечено, что в контрольном варианте растений, без обработки химическим мутагеном, прорастание сеянцев амаранта отмечается уже на второй день (обработаны только фосфатным буфером pH 3). Тогда как семена обработанные азидом натрия в концентрациях от 0.1 до 5 мМ проросли на 3-4 суток (рис. 1а), обработанные 20 и 40 мМ азидом натрия - на 6 день. Нами была определена лабораторная всхожесть анализируемых семян амаранта без обработки мутагеном. В целом процент проросших семян составил в среднем 86%. Поскольку семена амаранта при данной обработке подвергаются действию кислого фосфатного буфера, мы допустили возможность изменения процента всхожести. В итоге было отмечено, что процент всхожести семян растений обработанных фосфатным буфером без добавления азид натрия действительно снизился и составил 41%. Так как все семена с добавлением азид натрия также будут инкубироваться в кислом фосфатном буфере, в качестве контроля были использованы семена, обработанные фосфатным буфером без азид натрия. Наши опыты показали, что при обработке семян азидом натрия в концентрации 5 мМ процент всхожести заметно уменьшается - до 6%. Полученные данные по проценту всхожести семян позволяют нам сделать вывод о том, что наилучшая всхожесть обнаруживается при наименьшей концентрации азид натрия (табл. 1). Можно полагать, что оптимальной для обработки семян *A. cruentus* является раствор азид натрия в концентрации 0.5-1 мМ, так как при этом всхожесть семян уменьшается примерно в 2 раза, по сравнению с контролем. То есть негативный эффект, складывающийся из токсического и мутагенного эффектов при этом очевиден, но в то же время, возможно получение довольно большого числа потенциально мутантных форм амаранта. Таким образом, полуметальная концентрация азид натрия для семян *A. cruentus* составила 0.5-1 мМ. Мутантные формы 1-7 (табл. 1) в дальнейшем были размножены и были использованы в дальнейшей работе в качестве линий 1-7. Мутантные формы 8 и 9 не использовались в дальнейших исследованиях.

Таблица 1. Процент всхожести семян *A. cruentus* после обработки азидом натрия

Мутантные формы	Концентрация NaN_3 , мМ	Общий процент всхожести семян, (%)	Процент всхожести семян по отношению к контролю
	Контроль (фосфатный буфер, pH 3)	41	100
№1	0.1	24	58
№2	0.5	22	53
№3	1	20	49
№4	2	12	29
№5	3	8	20
№6	4	8	20
№7	5	6	14
№8	20	1	2
№9	40	1	2

Оценка генетического разнообразия мутантных линий амаранта

Азид натрия может оказывать свой мутагенный эффект на весь геном, поэтому предугадать какие именно гены при этом мутировали невозможно, в то же время полногеномное секвенирование для анализа таких растений остается крайне дорогостоящим методом. Поэтому нами была поставлена задача доказать общие генетические изменения путем изучения стандартных ДНК-маркеров. С целью общей оценки генетического полиморфизма мутантных популяций амаранта был проведен анализ 7 линий мутантов (№№1-7 согл. табл. 1) с помощью микросателлитных маркеров по трем SSR-локусам (Suresh et al., 2014). В целом было выявлено 3 разных аллеля и 3 их сочетания (рис. 2, табл. 2). По SSR-маркерам GB-AM-132 и GB-AM-137 мутантные растения не отличались как между собой, так и от дикого типа (ДТ). По SSR-маркеру GB-AM-099 для ДТ был характерен условный генотип АН, тогда как для мутантных линий были характерны следующие варианты: №1 – АІ, №2 – ІІ/АІ/АН, №3 – ІІ, №4 – АН, №5 – АІ/ІІ, №6 и №7 – АН (табл. 2). Это говорит о том, что у разных линий, по всей видимости, произошли разные изменения в геноме.

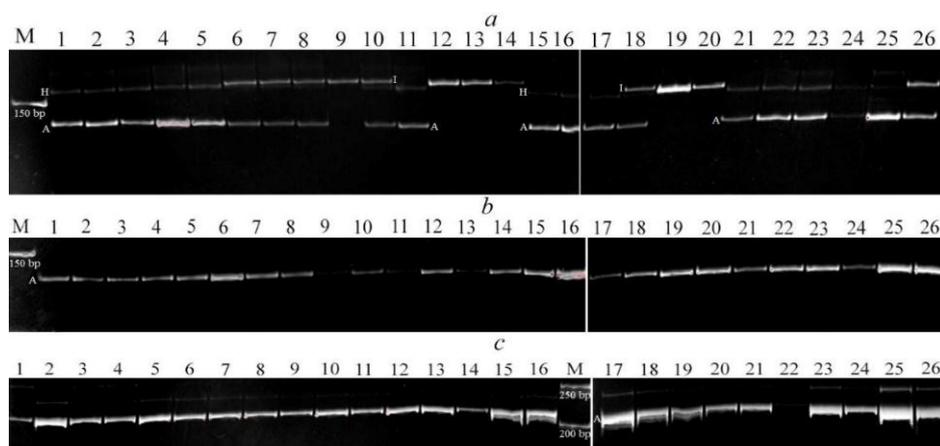


Рис. 2. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов. GB-AM-099 (а), GB-AM-132 (б), GB-AM-137 (с): 1-5 – растения дикого типа; 6-8 – мутантные растения линии №1; 9-11 – мутантные растения линии №2; 12-14 – мутантные растения линии №3; 15-17 – мутантные растения линии №4; 18-20 – мутантные растения линии №5; 21-23 – мутантные растения линии №6; 24-26 – мутантные растения линии №7; М – маркер Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Таблица 2. Результаты генотипирования линий *A. cruentus*

Концентрация NaN ₃ , мМ	Мутантная линия	GB-AM-099			GB-AM-132			GB-AM-137		
		АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
Дикий тип		АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
0.1	№1	АІ	АІ	АІ	АА	АА	АА	АА	АА	АА
0.5	№2	ІІ	АІ	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
1	№3	ІІ	ІІ	ІІ	АА	АА	АА	АА	АА	АА
2	№4	АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
3	№5	АІ	ІІ	ІІ	АА	АА	АА	АА	АА	АА
4	№6	АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
5	№7	АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА

Для характеристики генотипа растений амаранта до наших исследований применялись различные типы молекулярных маркеров, включающих в себя случайную амплифицированную полиморфную ДНК (RAPD) (Snezana et al. 2012), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP) (Wassom, Tranel, 2005), полиморфизм длин рестриционных фрагментов (RFLP) (Park et al. 2012). Однако более часто используемыми маркерами для генотипирования культурных растений, не потерявшие актуальность и на сегодняшний день, является микросателлитная ДНК или простые повторяющиеся последовательности (SSRs) (Tautz, 1989). SSR-маркеры остаются широко используемым

типом ДНК-маркеров для характеристики наследуемого материала сельскохозяйственных культур ввиду их универсальности, относительно низкой цены и большей степени полиморфизма, обеспечиваемой большим количеством аллелей на locus (Vignal et al. 2002). Применение SSR-маркеров с целью выявления полиморфизмов в амаранте описано в работах Lee et al. (2008), Mallory et al. (2008), Suresh et al. (2014). Нами же впервые SSR-анализ был применен для оценки наличия генетических изменений индуцируемых азидом натрия у *A. cruentus*. Из трех испытанных SSR-маркеров полиморфизм удалось выявить при анализе локуса GB-AM-099 (табл. 2). Результаты нашего SSR-анализа позволяют нам говорить о доказанном мутагенном воздействии использованного нами азида натрия на генетический аппарат исследуемых растений. Низкий уровень выявляемого полиморфизма очевидно связан с тем, что воздействие азид натрия чаще всего приводит к заменам пар оснований (Till et al., 2007), которые можно выявить только дорогостоящим методом полногеномного секвенирования. Однако в результате обработки азидом натрия могут происходить и другие мутации, например, изменения длины нуклеотидной последовательности (Wannajindaporn et al., 2016) с чем возможно и связаны выявленные нами полиморфные участки. Таким образом, метод SSR-анализа может быть использован для первичного доказательства генетических изменений после химического мутагенеза, причем метод анализа микросателлитной ДНК ранее уже применялся для этого (Pilu et al., 2003; Monteiro et al., 2009).

Морфометрические показатели линий амаранта поколения M₂, полученных после обработки азидом натрия

Большой интерес вызывает рассмотрение морфометрических параметров амаранта, полученных в ходе химического мутагенеза, так как изменения фенотипических характеристик могут быть обусловлены действием мутагенного фактора на геном растительного организма. Нами была измерена высота стебля анализируемых растений через 30 дней после переноса проростков в почву. Проростки, полученные из обработанных мутагеном семян (от 0.5 мМ и выше), были в среднем в 2 раза ниже контроля по высоте стебля. В то же время проростки амаранта полученные после обработки 0.1 мМ раствором азид натрия достоверно не отличались от контрольных проростков по высоте стебля. С другой стороны группа проростков полученных после обработки семян азидом натрия в концентрациях от 0.5 до 40 мМ достоверно не отличались по высоте стебля между собой. Исходя из полученных результатов, мы предположили, что оптимальная концентрация азид натрия для мутагенеза амаранта может лежать в диапазоне от 0.1 до 5 мМ. Поэтому мы продолжили наблюдения за обработанными в этом диапазоне концентраций мутагена растениями амаранта в полевых условиях и нами были измерены высота стебля, длина и ширина трех самых крупных листьев с интервалом через 2 и 3 месяца после переноса проростков амаранта на почву и проведена статистическая обработка результатов измерений.

Из полученных данных следует, что на третий месяц выращивания средняя высота стебля растений амаранта, полученных после обработки 0.5 мМ азидом натрия была наибольшей, составила в среднем 50 см, что достоверно превышает показатели как остальных опытных растений, так и контрольных растений. Растения амаранта, полученные от семян после обработки другими концентрациями мутагена, по морфометрическим параметрам также превышали контроль, но в меньшей степени (рис. 3).

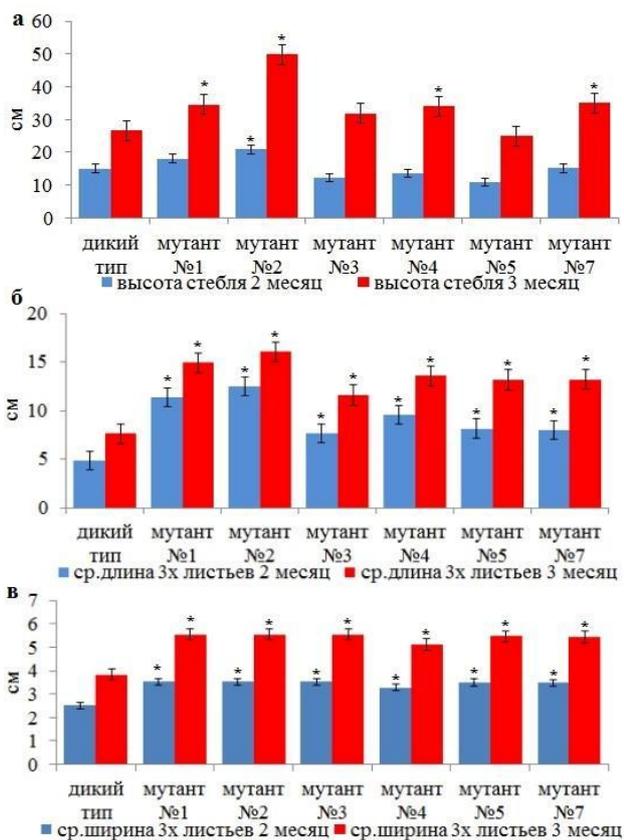


Рис. 3. Морфометрический анализ мутантных растений амаранта поколения M_1 : а – высота стебля через 2 и 3 месяца; б – длина 3-х самых крупных листьев через 2 и 3 месяца; в – ширина 3-х самых крупных листьев через 2 и 3 месяца. Мутанты 1-7 соответствуют растениям полученным после обработки азидом натрия в концентрациях 0.1; 0.5; 1; 2; 3; 5 мМ (согл. табл. 2). $n=15$, * - $p<0.01$.

Такие данные о стимулирующем влиянии обработки азидом натрия были характерны для всех исследованных растений амаранта как через 2, так и через 3 месяца наблюдений. Проведенный нами морфометрический анализ растений показывает, что увеличение концентрации химического мутагена применяемый для обработки семян сказывается отрицательно на параметрах роста, что указывает на нежелательность использования высоких концентраций мутагена для работ по мутагенезу амаранта. Таковыми для амаранта являются концентрации азиды натрия выше 5 мМ.

У амаранта человеком используются корни, стебель, листья, соцветия и семена (Rastogi, Shukla 2013). В последние 20 лет наблюдается рост интереса к зерну амаранта из-за его сельскохозяйственных особенностей, нутрицевтических и питательных свойств (Khandaker et al., 2010). При этом эффекты от применения азиды натрия на массу семян могут быть различны. В литературе отмечены данные как о положительном (Animasaun et al., 2014), так и об его отрицательном влиянии на этот показатель (Hussain et al., 2017). Однако по нашим данным контрольные и опытные растения очень мало различались по массе 1000 семян. В целом лишь во втором поколении было выявлено небольшое, но достоверное увеличение массы семян у растений полученных после обработки азидом натрия в концентрациях 0.1 и 1 мМ. У растений полученных путем обработки более высокими концентрациями азиды натрия как в первом (M_1), так и во втором (M_2) поколениях наблюдалось небольшое уменьшение массы семян. Для эффективного химического мутагенеза амаранта должен быть использован раствор азиды натрия в концентрации от 0.5 до 5 мМ, так как именно в этом диапазоне рост проростков явно замедлялся, однако процент всхожести семян оставался на относительно высоком уровне (не меньше 10%). Можно предполагать, что эффективной будет та концентрация мутагена, которая будет способствовать уменьшению всхожести примерно на 50%. Исходя из этих соображений, в ходе проведенной работы нами была определена оптимальная концентрация азиды натрия для обработки семян амаранта *A. cruentus*, она лежит в диапазоне 0.5-1 мМ. По результатам морфометрического анализа следует, что для обработки семян *A. cruentus* можно использовать 0.5 мМ раствор азиды натрия, так как он обладает вдобавок стимулирующим

действием на рост вегетирующих растений, причем это проявляется в последующих поколениях и видимо связано с мутагенным действием данного вещества. Поэтому в дальнейших работах по индуцированному мутагенезу мы предлагаем использовать протокол обработки семян амаранта, который заключается в пятичасовом вымачивании семян в растворе азиды натрия в фосфатном буфере (рН 3), при этом концентрация мутагена должна лежать в диапазоне от 0.5 до 1 мМ.

Анализ мутантных линий амаранта поколения М₂ на содержание общего растворимого белка и состава липидов

У всех проанализированных мутантных линий был выявлен достоверно более высокий уровень содержания белка в семенах, чем в контроле (рис. 4). К примеру, у мутантной линии №5 было зафиксировано наибольшее количество белка, в среднем, 13.78 мг/г, что на 52% выше, чем у контрольной группы растений (рис. 4).

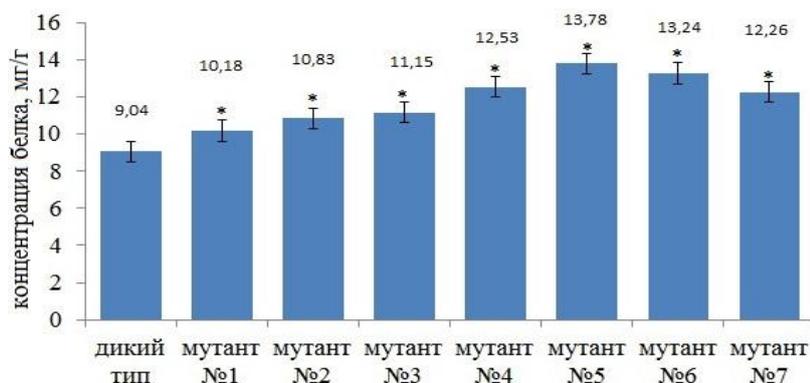


Рис. 4. Содержание общего белка у мутантных линий *A. cruentus*. Ось x – мутантные линии амаранта; ось y – концентрация белка, мг/г семян.

По результатам исследований нейтральных липидов (НЛ) семена амаранта преимущественно состоят из триацилглицеролов и жирных кислот, остальная часть НЛ представлена стеринами и их эфирами. Наибольшее накопление НЛ (40.8 мг/г) было выявлено у линии №1. У данной линии было отмечено также максимальное содержание триацилглицеролов, в сравнении с остальными мутантами *A. cruentus*. Достоверно повышенное по сравнению с контролем содержание НЛ, триацилглицеролов и эфиров было характерно для мутантов №№1, 3, 4 и 7. В составе ЖК семян амаранта нами было идентифицировано 15 компонентов, среди которых преобладали линолевая (18:2), олеиновая (18:1), пальмитиновая (16:0) и стеариновая (18:0) кислоты. Действие всех испытанных концентраций азиды натрия, в конечном счете, приводило к увеличению содержания линолевой кислоты у мутантных линий по сравнению с контролем. Максимальные значения содержания линолевой кислоты выявлены у четырех линий амаранта: №№1, 4, 6 и 7. При этом увеличивалось также относительное содержание пальмитиновой кислоты от 17.8% в контроле до 19.9% в опытных вариантах, а содержания олеиновой и стеариновой кислот наоборот снижалось (табл. 3).

Таблица 3. Состав и содержание жирных кислот в семенах мутантных популяций амаранта (% от суммы). Жирным отмечены достоверно различающиеся от дикого типа результаты (* $p < 0.01$)

Состав жирных кислот	Контроль	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7
Насыщенные:								
Миристиновая	0.3±0.1	0	0	0.2±0.1	0.2±0.3	0.2±0.1	0.2±0.1	0
Пентадекановая	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
Пальмитиновая	17.8±0.5	19.4±0.5	19.7±0.6	19.7±0.5	19.7±0.2	19.6±0.7	19.6±0.6	19.9±0.8
Маргариновая	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
Стеариновая	5.1±0.3	4.2±0.3	4.3±0.2	3.8±0.2	3.9±0.4	4.1±0.1	4.1±0.3	4.2±0.2
Арахидовая	0.9±0.1	0.9±0.2	1±0.1	0.8±0.1	0.9±0.3	0.8±0.2	0.9±0.3	0.9±0.1
Бегеновая	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.2	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
Лигноцериновая	0.3±0.2	0.2±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
Мононенасыщенные:								
Пальмитолеиновая	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
Гептадеценовая	0.9±0.1	1±0.3	1.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.2	1.1±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2
Олеиновая	32.5±2.2	22.3±0.3	23.2±0.1	23.3±0.2	21.9±0.3	24.4±0.1	21.8±0.2	21.6±0.1
Эйкозеновая	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0	0.1±0.1	0.1±0.1
Полиненасыщенные:								
Линолевая	40.4±1.5	50±0.9	48.5±0.6	49±1.1	50±1.3	47.9±1.2	50±1.6	50±1.6
Линоленовая	0.6±0.1	0.8±0.1	0.7±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1	0.7±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1
Гексадекадиеновая	0.3±0.1	0.4±0.2	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1

Для определения содержания фосфолипидов были выбраны мутантные линии №2 и №3, полученными путем обработки оптимальной концентрацией азиды натрия (0.5 и 1 мМ). Содержание ФЛ во всех проанализированных линиях составило от 8.3 до 10.1 мг липидов/г семян. Фракционный состав ФЛ зерен амаранта содержал следующие компоненты: фосфатидилхолины до 5.0, фосфатидилэтаноламины до 2.5, фосфатидилинозиты до 2.4 мг/г. Достоверное увеличение по сравнению с контролем было выявлено по содержанию ФЛ и фосфатидилэтаноламина для линии №3. Контроль и линия №2 достоверно не отличались по большинству компонентов ФЛ. Интересно отметить, что лишь у мутантных линий был обнаружен фосфатидилглицерол, тогда как у контроля он не выявлялся.

Определение морфометрических параметров и антиоксидантного статуса мутантных линий амаранта поколения М₃ в условиях засухи

Морфометрические параметры и антиоксидантный статус определяли у линий амаранта №4, 5 и 6 поколения М₃. Выбор именно этих линий был обусловлен предыдущими результатами исследований, связанных с определением содержания общего растворимого белка. Этот показатель был наибольшим у линий №4-6. При выращивании опытных линий амаранта в условиях засухи были оценены параметры роста побега, площадь листовой пластины, сырая и сухая масса побега и относительное содержание воды в побегах (RWC). Так, линия №4 при действии засухи обладала высотой стебля в 1.2 раза выше, чем у ДТ (рис. 5а), также у нее были больше сырая и сухая масса побега на 16.9% и 10% соответственно (рис. 5в, г). По сравнению с ДТ в 1.1 раза было больше RWC (рис. 5д), а вот суммарная площадь листьев достоверно не отличалась от ДТ (рис. 5б). С целью выяснения возможных механизмов регуляции окислительно-восстановительных реакций, необходимых для того, чтобы переносить последствия стресса, вызванного засухой, в листьях измеряли ряд параметров антиоксидантной системы. Для растений линии №4 в условиях дефицита влаги был выявлен в 1.3 раза более низкий уровень пролина (рис. 7в), в 1.1 раза - КАТ и СОД (рис. 6а, в), но в 1.3 раза выше содержание МДА (рис. 7а) и в 1.1 и 1.4 раза выше активности АПО и GST (рис. 6б,

г), соответственно, по сравнению с ДТ, а общая антиоксидантная способность была на одном уровне с показателями ДТ (рис. 7б). У линии №5 в условиях засухи высота стебля не отличалась от ДТ (рис. 5а), суммарная площадь листовой пластины была в 1.2 раза (рис. 5б), сырая масса побега на 24.7%, а сухая масса – на 38.5% больше, а RWC ниже в 1.1 раза (рис. 5д), по сравнению с ДТ (рис. 5в, г). Изучение активности ферментов у линии №5 показало активность КАТ и СОД ниже в 1.2 раза (рис. 6а, в), а GST и ОАС выше в 1.2 раза (рис. 6г, 7б) по сравнению с ДТ. Активность АПО, содержание МДА и пролина находились на одном уровне с показателями ДТ (рис. 6б, 7а, в). Линия №6 в условиях засухи не отличалась от ДТ по высоте стебля (рис. 5а). У данной линии в 1.3 раза была ниже суммарная площадь листа (рис. 5б), в 1.1 раза больше RWC (рис. 5д), а также ниже на 59.3% сырая и на 32.3 % сухая масса побега, по сравнению с ДТ (рис. 5в, г). Для опытных растений были показаны более низкие уровни пролина - в 2.2 раза (рис. 7в), активности КАТ - в 1.3 раза (рис. 6а), СОД – в 1.8 раза по сравнению с ДТ (рис. 6в). Активность GST была выше в 1.1 раза, чем у ДТ (рис. 6г), а по ОАС и содержанию МДА и АПО линия №6 достоверно не отличались от ДТ (рис. 6б, 7а, б).

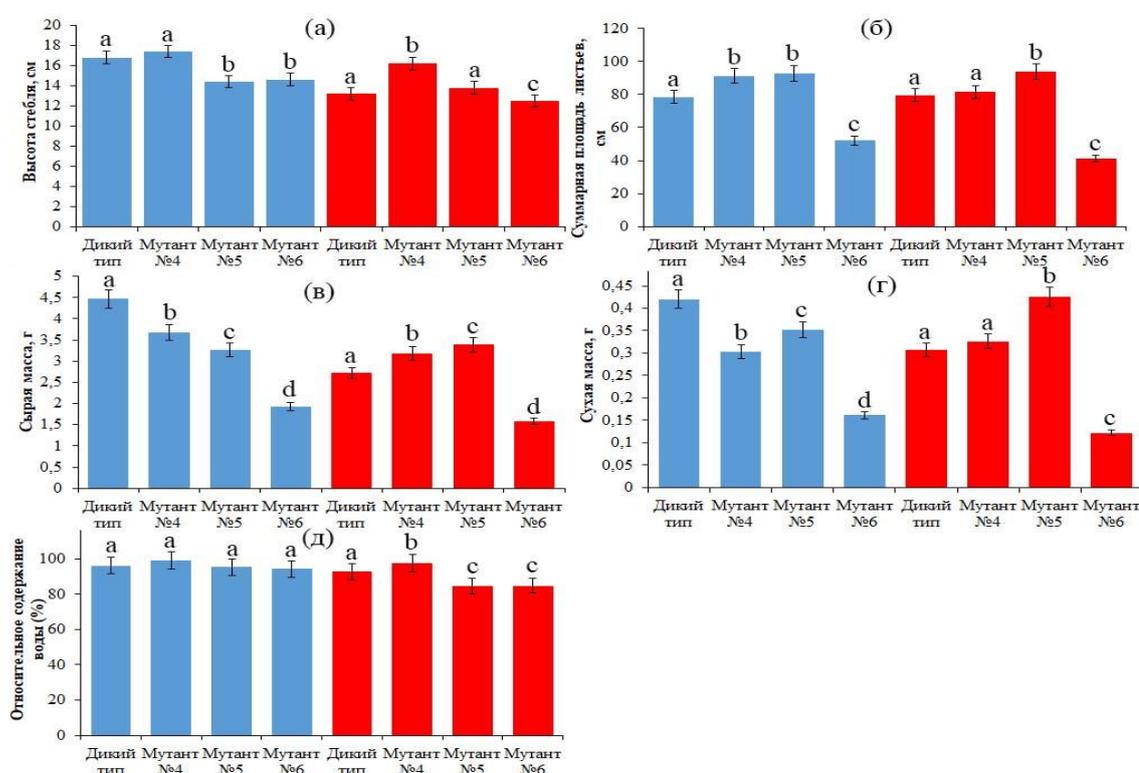


Рис. 5. Морфометрические параметры растений (n = 5) амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и воздействии засухи (обозначено красным): (а) – высота стебля; (б) – суммарная площадь листьев; (в) – сырая масса побега; (г) – сухая масса побега; (д) – относительное содержание воды (RWC) в побегах после 10-дневной засухи. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

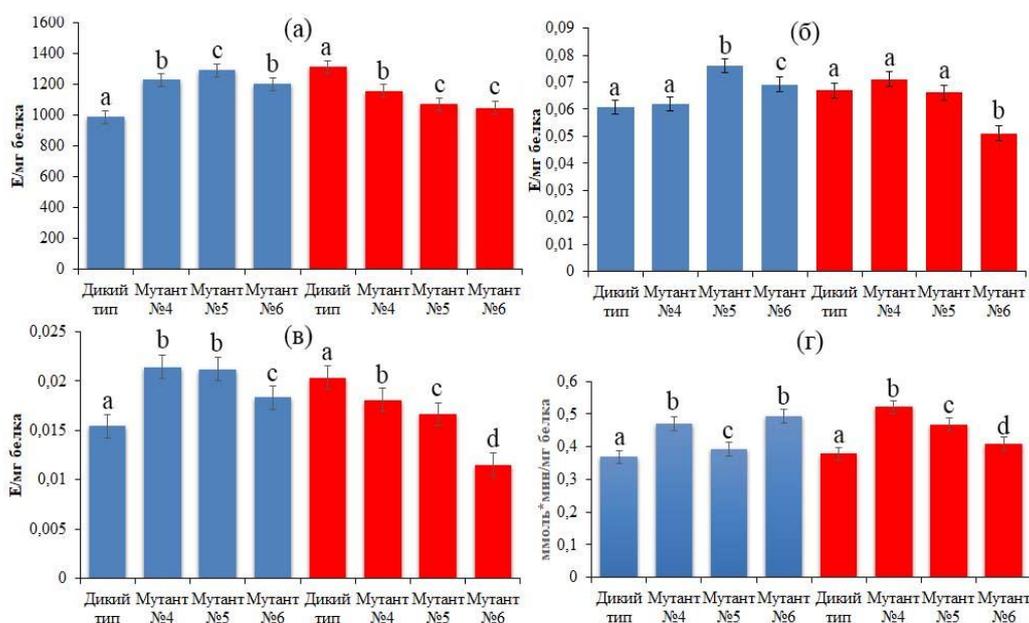


Рис. 6. Анализ активности ферментов антиоксидантной системы в листьях растений (n = 5) дикого типа и опытных линий амаранта при нормальных условиях (обозначено синим) и воздействии засухи (обозначено красным): а – активность каталаз, б – активность аскорбатпероксидаз, в – активность супероксиддисмутаза, г – активность глутатион-S-трансфераза. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

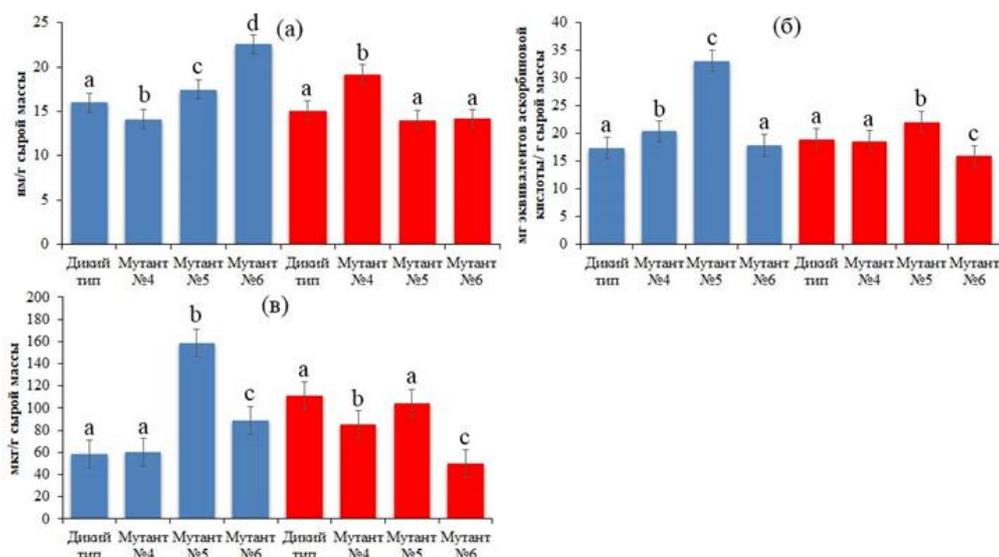


Рис. 7. Анализ компонентов антиоксидантной системы в листьях растений (n=5) дикого типа и опытных линий амаранта при нормальных условиях (обозначено синим) и воздействии засухи (обозначено красным): а – содержание малонового диальдегида, б – общая антиоксидантная способность, в – содержание пролина. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

Для лабораторной экспресс-оценки засухоустойчивости и отбора наиболее засухоустойчивых генотипов можно использовать показатель относительного содержания воды - RWC. Так Turkan и др., (2005), Cia и др., (2012) показали, что устойчивые сорта имеют большие значения RWC в условиях засухи. В нашем исследовании при засухе, показатель RWC по сравнению с ДТ был наиболее высоким у линии №4. Также растения данной линии характеризовались лучшими результатами по высоте стебля и биомассе при засухе. Очевидно, что из трех исследованных опытных растений амаранта именно линия №4 характеризуется наибольшим уровнем засухоустойчивости. Другим важным маркером засухоустойчивости могут быть изменения в содержании и активности неферментативных и ферментативных антиоксидантов при засухе (Dawood et al., 2014). У линии №4, к примеру, зафиксировано

повышение активности АПО и GST, по сравнению с ДТ. Так как увеличение активности АПО и GST обычно рассматривается как защитная реакция против стрессовых факторов (Tausz, Grill, 2000), эти результаты также позволяют предположить, что линия №4 более устойчива к засухе, по сравнению с линиями №5 и 6. При воздействии засухи у растений происходят сильные окислительные процессы, в том числе в результате интенсивного фотосинтеза и дыхания, что возможно является причиной выявленного нами высокого содержания МДА у линии №4 (Мао, Ху 2005). С другой стороны, у линий №5 и №6 были выявлены в основном негативные изменения в антиоксидантной системе в условиях засухи, хотя это не всегда ассоциировалось с ухудшением морфометрических показателей.

Определение морфометрических параметров и антиоксидантного статуса мутантных линий амаранта Мз в условиях засоления

Другим актуальным стрессором для растений является избыточное содержание NaCl в почве. Растения линии №4 в условиях хлоридного засоления по высоте стебля были выше в 1.1 раза (рис. 8а), а по суммарной площади листовой пластины меньше в 1.3 раза по сравнению с ДТ (рис. 8б). Анализ антиоксидантной системы показал, что при солевом стрессе у данной линии растений были ниже активности КАТ в 1.3 раза, СОД в 1.2 раза, АПО в 0.7 раза, GST в 1.3 раза и содержание пролина в 1.4 раза, чем у ДТ (рис. 9, 10в). В то же время содержание МДА у линии №4 было в 1.9 раза (рис. 10а), ОАС в 1.1 раза больше, по сравнению с ДТ (рис. 10б). У линии №5 при засолении высота стебля и суммарная площадь листьев были ниже в 1.1 и в 1.6 раза, соответственно, чем у ДТ (рис. 8а, б). В ответ на засоление почвы у этой линии были ниже в 1.5 раза содержание пролина (рис. 10в), в 1.2 раза активности КАТ и СОД (рис. 9а, в), в то же время в 1.9 раза выше уровень накопления МДА, а содержание АПО достоверно не отличалось от значений у ДТ (рис. 10а, 9б). В то же время у линии №5 показатели активности GST и общей антиоксидантной способности были выше в 1.3 и 1.1 раза, соответственно, по сравнению с ДТ (рис. 9г, 10б). По данным морфометрического анализа растения линии №6 при солевом стрессе, имели высоту стебля в 1.2 раза выше, а суммарная площадь листовой пластины была ниже в 1.1 раза, по сравнению с ДТ (рис. 8а, б). Линия №6 в условиях засоления характеризовалась количеством пролина ниже в 1.4 раза (рис. 10в), содержанием МДА выше в 3.4 раза (рис. 10а), активностью СОД и КАТ ниже в 2 и 1.3 раза (рис. 9в, а), соответственно, по сравнению с ДТ. При этом активность GST была выше в 1.1 раза (рис. 9г), а активность АПО и ОАС в 1.2 раза больше, чем у ДТ (рис. 9б, 10б). В условиях засоления увеличение высоты стебля было зафиксировано у линий №4 и №6. Однако у линии №4 обнаруживалось падение содержания и активности большинства изученных компонентов антиоксидантной системы, кроме ОАС. В то время как растения линии №6 в условиях засоления демонстрировали увеличение ОАС, а также активностей АПО и GST по сравнению с ДТ. Полученные нами данные свидетельствуют о большей солеустойчивости линии №6, по сравнению с ДТ и линиями №4 и №5.

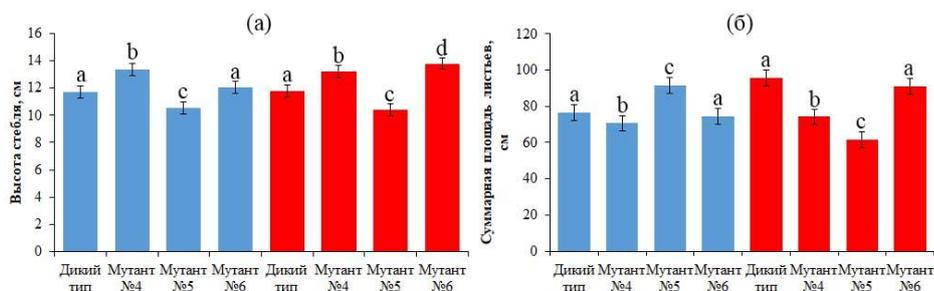


Рис. 8. Морфометрические параметры растений (n=5) дикого типа и опытных растений амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и при действии засоления (обозначено красным): (а) – высота стебля; (б) – суммарная площадь листьев. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

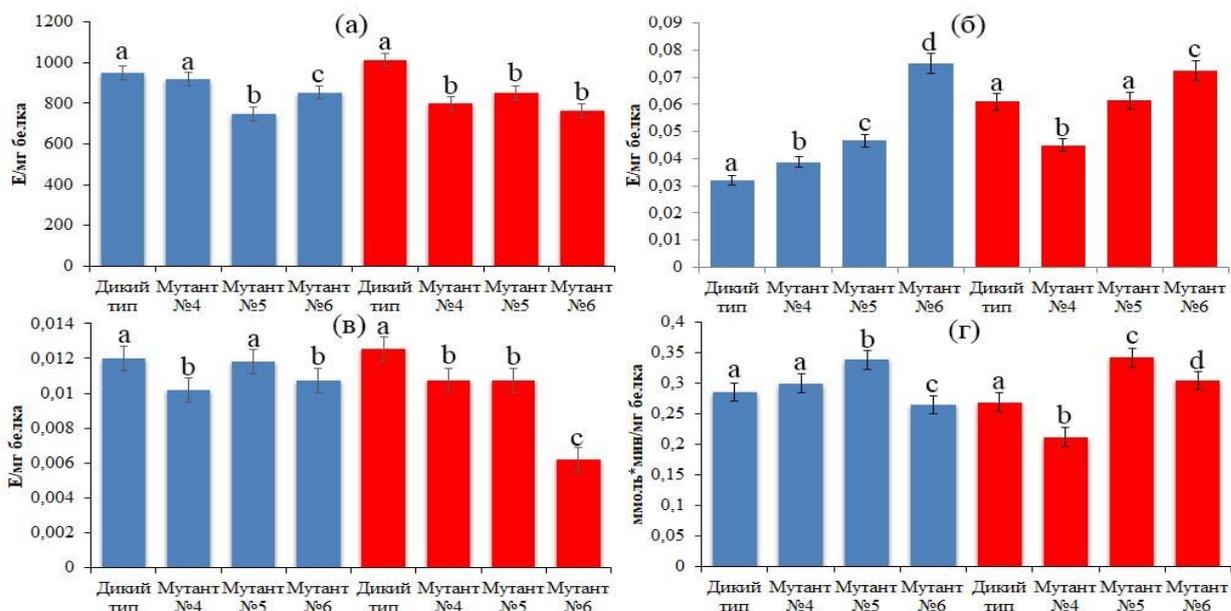


Рис. 9. Анализ активности ферментов антиоксидантной системы в листьях растений (n=5) дикого типа и опытных растений амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и при действии засоления (обозначено красным): а – активность каталаза, б – активность аскорбатпероксидазы, в – активность супероксиддисмутазы, г – активность глутатион-S-трансферазы. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

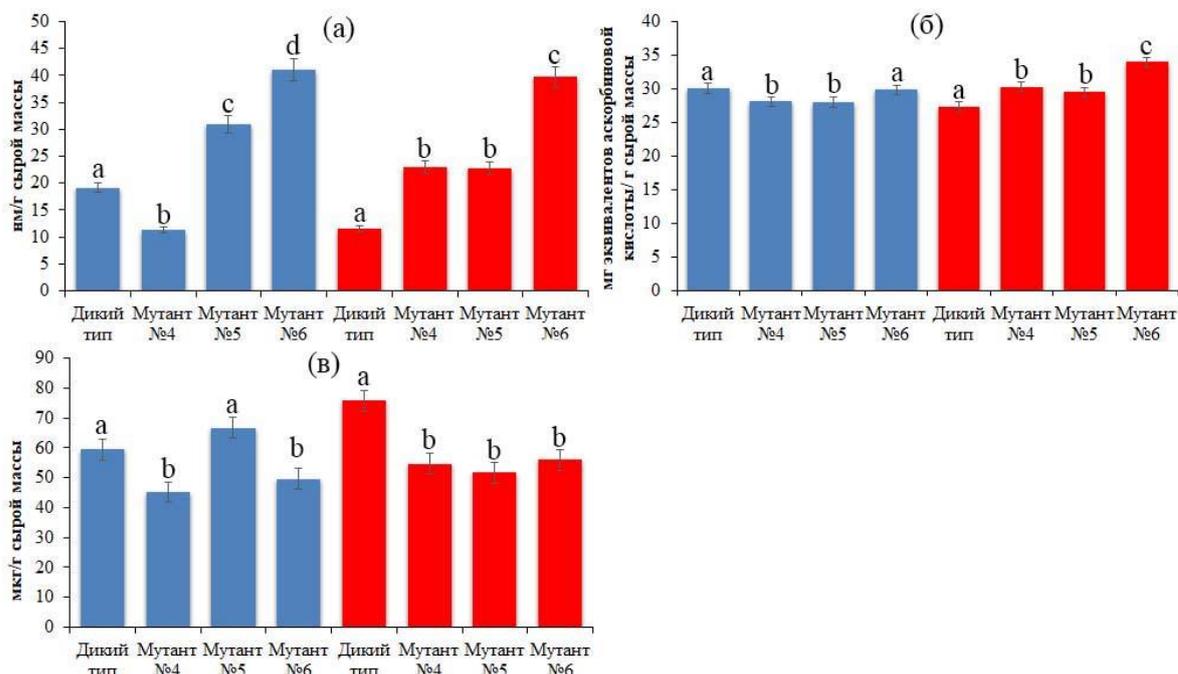


Рис. 10. Анализ компонентов антиоксидантной системы в листьях растений (n=5) дикого типа и опытных растений амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и при действии засоления (обозначено красным): а – содержание малонового диальдегида, б – общая антиоксидантная способность, в – содержание пролина. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

Получение трансгенных растений *A. retroflexus* методом погружения цветков

Агробактериальной трансформации методом floral dip были подвержены 18 цветущих растений амаранта запрокинутого, семена которых после обработки селективным антибиотиком гигромицином и проращивания в камере роста были высажены в почву. Каждое

трансформированное растение амаранта (18 растений) было посеяно в отдельную емкость. На каждый случай трансформации (18 растений) было использовано по отдельной емкости, в итоге в почву было высажено 1800 семян. В результате первичного визуального отбора, в целом, осталось 414 проростков. После дополнительного опрыскивания раствором гиромидина и дополнительного отбора в каждой из 18 емкостей оставалось не более 7–8 проростков (рис. 11а). Эти растения выращивали в течение 1 мес. (рис. 11б) и подвергали ПЦР-анализу. После дополнительной обработки раствором гиромидина и отбора 126 проростков были выбраны предположительно трансгенные формы амаранта для ПЦР-анализа.



Рис. 11. Визуальный отбор предположительно трансгенных растений амаранта первого поколения: а – проростки амаранта после опрыскивания их гиромидином, стрелками показаны наиболее крупные и здоровые проростки, которые отбирались для дальнейшей работы; б – отобранные для ПЦР-анализа предположительно трансгенные растения амаранта через 1 мес. выращивания.

Вначале методом ПЦР анализировали качество выделенной геномной ДНК отобранных растений амаранта. Для этого проводили детекцию хозяйского гена ацетолактатсинтазы и добивались того, чтобы у каждого из 126 образцов ДНК амплифицировался этот специфичный участок. Хорошо известно, что после инокуляции соцветий агробактерии могут сохраняться в цветках до 20 дней, однако нельзя было исключать возможной контаминации образцов ДНК амаранта агробактериальной ДНК. Поэтому была проведена дополнительная ПЦР-идентификация специфичного агробактериального гена *rpoA*, показавшая присутствие этого гена в 4 образцах ДНК, которые были исключены из дальнейшего анализа. Отбор трансгенных растений проводили путем ПЦР-идентификации целевого гена *ARL* и конститутивного промотора вируса мозаики георгина. В контрольных нетрансгенных растениях амаранта специфичные ампликоны при ПЦР не образовывались. Методом ПЦР было проанализировано ДНК 122 растений, отобранных на первом этапе работы (рис. 12). При помощи ПЦР наличие как целевого гена, так и промотора удалось доказать лишь для 46 растений. Таким образом, в нашей экспериментальной работе точность визуального выявления трансгенных проростков среди всходов амаранта составила только 36%.

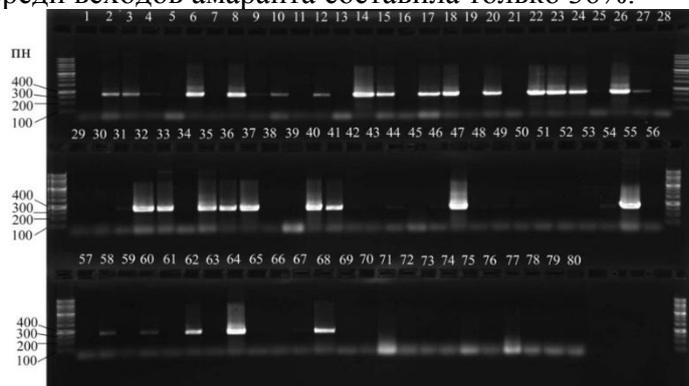


Рис. 12. Электрофореграмма результатов ПЦР-идентификации гена *ARL* в отобранных визуально растениях амаранта первого поколения. Размер ампликона составляет 386 пн, слева и справа – маркер молекулярного веса 100 бр (Сибэнзим, Россия). ПЦР-положительными по гену *ARL* считались образцы в дорожках 2, 3, 6, 8, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 26, 32, 33, 35, 36, 37, 40, 41, 47, 55, 62, 64, 68. Дорожки с небольшим содержанием ампликона игнорировались.

Всего с применением генно-инженерной конструкции гена *ARL* с промотором вируса мозаики георгина было получено 46 трансгенных растений, отобранных как по фенотипу, так и путем ПЦР-идентификации целевого гена и промотора. От этих растений получали семена, из них выращивали проростки второго поколения, которые подвергали таким же процедурам

селективного отбора. Трансгенные растения второго поколения также анализировали методом ПЦР. Доказать содержание целевого гена и промотора во втором поколении удалось лишь для потомков 26 растений из 46 отобранных в первом поколении. Таким образом, были отобраны 26 трансгенных растений второго поколения, которые стали родоначальниками линий амаранта третьего поколения, использованных при морфометрическом анализе. Также было проверено качество выделенной ДНК и у семи образцов амплифицировать специфичный для амаранта участок ДНК не удалось. Полученные данные могут свидетельствовать о наличии загрязнений в этих семи образцах, что могло способствовать уменьшению количества отобранных ПЦР-положительных растений второго поколения.

Погружение цветков как способ получения трансгенных форм растений является перспективным методом, может успешно применяться для увеличения эффективности трансформации достигаемый по результатам уровень обычной агробактериальной трансформации эксплантов *in vitro* или даже превзойти их при внедрении модификаций в состав агробактериальной суспензии. Нами для агробактериальной трансформации *A. retroflexus* был применен метод *floral dip*, заключающийся в полном погружении соцветий в агробактериальную суспензию на некоторое время (Clough et al., 1998), но с модификацией состава суспензии с добавлением ацетосирингона, 6-БАП и суперсмачивателя Silwet Gold с большей концентрацией, чем в стандартном протоколе. При выбранном подходе нам удалось достичь эффективности трансформации до 1.4%, что соотносится с результатами Munusamy et al. (2013). Тем не менее, по сравнению с другими исследованиями такой процент эффективности относительно невысокий, например, имеются данные об эффективности агробактериальной трансформации *floral dip* рапса примерно 10% (Михайлова, Кулуев, 2015), а для льна эффективность составила 50–60% (Zhang, Chen, 2012). Перед проведением морфометрического анализа в 26 линиях трансгенных растений амаранта было проверено содержание транскриптов трансгена *ARL* методом качественной ОТ-ПЦР. При агарозном геле-электрофорезе визуально детектируемое содержание транскриптов гена *ARL* было показано для 10 линий трансгенных растений амаранта третьего поколения под номерами: 11, 12, 45, 55, 58, 61, 84, 103, 104 и 112, которые были отобраны для морфометрического анализа. При выращивании в теплице все отобранные линии трансгенных растений амаранта визуально отличались от контроля увеличением размеров и количества листьев (рис. 13).



Рис. 13. Внешний вид трансгенных растений амаранта третьего поколения дикого типа (а), линий 61 (б), 84 (в) и 104 (г). Масштаб 85 × 55 мм.

Более детальный морфометрический анализ показал, что трансгенные растения характеризуются достоверным увеличением длины листьев в среднем от 30% (линия 112) до 140% (линия 11) по сравнению с контролем. В то же время по высоте стебля трансгенные растения амаранта отличались от контроля в меньшей степени. Например, трансгенные амаранты линий 12, 45, 55, 58 и 112 по высоте стебля от контрольных растений не отличались.

Наиболее существенное увеличение высоты стебля было характерно для линии 104, при этом разница с контролем составила в среднем 69%.

Сверхэкспрессия гомологов гена *ARL* главным образом оказывает положительное влияние на рост надземных органов (Hu et al., 2003; 2006). Но в литературе имеются сведения и о положительном влиянии одного из гомологов гена *ARL*, а именно гена *OsARGOS* риса, на рост корней *A. thaliana* (Wang et al., 2009). Тем не менее, как и в трансгенных растениях табака (Кулуев и др., 2013), сверхэкспрессия гена *ARL* не оказывала существенного влияния на длину корней амаранта. Это означает, что зафиксированное увеличение сырой массы трансгенных амарантов было связано в основном со стимуляцией роста их надземных частей. Отметим, что рост корней нами оценивалась лишь по результатам выращивания на опытном участке, к сожалению выкапывание корня в полную длину не представлялась возможной. Для более тщательного анализа необходимо проведение отдельных работ по выращиванию растений в лабораторных условиях, лучше в условиях *in vitro*. Нами на амаранте были обнаружены типичные фенотипические проявления сверхэкспрессии гена *ARL*, которые ранее были выявлены на *A. thaliana* (Hu et al., 2006), табаке (Кулуев и др., 2013) и рапсе (Михайлова, Кулуев, 2015). Таким образом, нами были проанализированы 1800 семян трансформированных амарантов, при проращивании которых визуальное и путем ПЦР-анализа были отобраны 46 трансгенных растений второго поколения. Дальнейший отбор путем селекции и ПЦР-анализа привел к получению 26 линий трансгенных растений амаранта. Исходя из этих данных следует, что эффективность трансформации амаранта при использованном нами подходе составила не менее 1.4%.

Введение в культуру *in vitro* *A. cruentus* и индукция органогенеза *A. cruentus*

Достигнуть положительного результата от применения методов генетической трансформации в культуре тканей возможно при условии использования эффективных способов регенерации побегов в культуре *in vitro*. Необходимо подобрать подходящую концентрацию регуляторов роста растений, тип экспланта, условия освещения и температуры (Niazian et al., 2017). Для культуры амаранта известна прямая регенерация побега из эксплантов междоузлий стебля (Swain et al., 2010) и регенерация из каллусной ткани, полученных из зрелого эмбриона (Jofre-Garfias et al., 1997) и эпикотилия (Pal et al., 2013). Прежде чем приступить к работам по генетической трансформации эксплантов амаранта *A. cruentus* необходимо разработать метод введения в культуру *in vitro* и микрклонального размножения в асептических условиях с дальнейшей акклиматизацией регенерантов к условиям почвы и открытого воздуха. Для этого стерильные семена *A. cruentus*, которые получали путем последовательной обработки 70% этанолом, 20% белизной и стерильной дистиллированной водой, проращивали на питательной среде МС, при температуре 27±1°C. Через 2 дня наблюдали прорастание семян. Затем их выращивали до появления эпикотилей не менее десяти дней. Подготовленные в стерильных условиях экспланты из семядольных листьев, эпикотилей и гипокотилей культивировали на регенерационной среде с добавлением регуляторов роста: 13 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 1 мкМ нафтилуксусной кислоты (НУК) (согл. Pal et al., 2013) в течение пяти дней для достижения увеличения размеров этих эксплантов (рис. 14б, в).

Нами было отмечено, что регенерация побега наблюдается преимущественно на сегментах эпикотилей, в то время как экспланты из семядольных листьев отмирали, а на сегментах гипокотилей на некоторое время образовывался каллус, но регенерации побегов не происходило (рис. 14б). В ходе экспериментов из эпикотильных сегментов было получено 14 растений-регенерантов. Укоренение регенерантов осуществляли на питательной среде МС с добавлением 2 мкМ ИУК (рис. 14г).



Рис. 14. Введение в культуру *in vitro* и регенерация побегов амаранта из эксплантов эпикотилей: а – проростки *A. cruentus* в культуре *in vitro*; б, в – регенерация побегов из эксплантов эпикотилей и образование каллуса на сегментах гипокотилей на среде МС, содержащей БАП и НУК; г – укоренение побегов амаранта *in vitro*.

Затем 8 растений из укоренившихся побегов амаранта были акклиматизированы к условиям почвы и открытого воздуха. С этой целью укоренившиеся побеги амаранта переносили в вегетационные сосуды с универсальным грунтом Terra vita (Россия). Растения сверху были накрыты прозрачным пластиковым сосудом приблизительно на неделю и росли при комнатной температуре без дополнительного освещения.

Получение трансгенных растений *A. cruentus* методом агробактериальной трансформации эпикотилей

При агробактериальной трансформации *A. cruentus* с помощью *A. tumefaciens* использовали эпикотильные сегменты проростков амаранта, выращенных в асептических условиях. Решение применить такой подход было обусловлено результатами наших предыдущих экспериментов, в котором было показано, что регенерация побега успешно осуществляется из эксплантов эпикотилей при использовании БАП и НУК, но не из сегментов гипокотилей или семядольных листьев при тех же условиях культивирования (рис. 15а). В связи с этим для агробактериальной трансформации амаранта использовались сегменты эпикотилей в количестве 70 эксплантов, предварительно культивированные в течение 6 дней на среде МС с регуляторами роста БАП и НУК. Эпикотильные экспланты подвергали инокуляции *A. tumefaciens* штамма AGL, несущей генно-инженерную конструкцию 35S::ARL, предварительно поранив их иглой. Такой дополнительный этап работы был проведен для повышения частоты попадания агробактерий в ткани амаранта. В ходе работы из эпикотильных эксплантов на селективной среде было получено 18 побегов (рис. 15б). Укоренение полученных побегов производили также на среде МС, содержащей 2 мкМ ИУК. В ходе работы укоренились 14 побегов (рис. 15в). Далее все укоренившиеся побеги были использованы для оптимизации методов акклиматизации растений к условиям почвы и открытого воздуха (рис. 15г). 11 из 14 укоренившихся регенератов удалось акклиматизировать к условиям почвы.

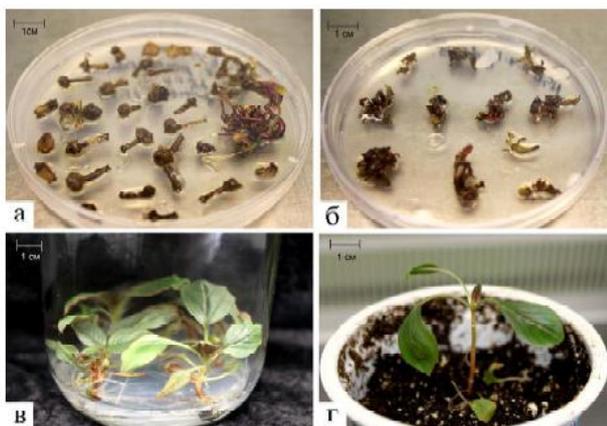


Рис. 15. Опыты по агробактериальной трансформации *A. cruentus*: а – образование каллуса на сегментах гипокотилей и регенерация побегов на сегментах эпикотилей на среде МС, содержащей БАП и НУК; б – регенерация побегов из сегментов эпикотилей после агробактериальной трансформации на селективной среде МС с БАП и НУК; в – укоренение на среде МС с ИУК; г – акклиматизация амаранта к условиям почвы.

Трансгенность полученных в ходе работы растений амаранта была определена методом ПЦР-анализа на наличие маркерных и целевого генов. ПЦР-анализ показал, что нами были получены 3 трансгенных растения вида *A. cruentus*, несущих генно-инженерную конструкцию 35S::*ARL*. Методом ПЦР было показано наличие в этих 3 растениях как целевого гена *ARL*, так и маркерных генов *HPT* и *GUS (uidA)*. ОТ-ПЦР показал наличие экспрессии трансгена *ARL* в анализируемых трансгенных растениях амаранта. Процент эффективности агробактериальной трансформации *A. cruentus* при использованном нами методе составил 4%, то есть всего 4% обработанных агробактериями эксплантов эпикотилей дали трансгенные растения. ПЦР-анализ на наличие гена *rpoA A. tumefaciens* показал его отсутствие во всех образцах ДНК анализируемых амарантов. Эти данные свидетельствуют об отсутствии агробактериальной контаминации в регенерантах амаранта, что в свою очередь доказывает трансгенность трех полученных нами растений. У двух трансгенных растений удалось получить семена, однако они оказались невсхожими. Мы полагаем, что невсхожесть семян связана не с генетической трансформацией, а с неоптимальными условиями выращивания амаранта. Новизна нашей работы заключается в том, что мы впервые показали возможность агробактериальной трансформации вида *A. cruentus*, при этом впервые для амаранта был использован бинарный вектор, несущий ген гигромицинофосфотрансферазы (*HPT*).

ВЫВОДЫ

1. Наиболее оптимальная концентрация мутагена азид натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* лежит в диапазоне от 0.5 до 1 мМ.
2. Методом химически индуцированного мутагенеза с использованием азид натрия получены линии *Amaranthus cruentus*, характеризующиеся увеличением содержания белка, линолевой и пальмитиновой кислот и одновременным уменьшением содержания стеариновой и олеиновой кислот в семенах по сравнению с диким типом.
3. Получены мутантные растения *Amaranthus cruentus* характеризующиеся устойчивостью к засухе и засолению. Устойчивость мутантных форм амаранта выражалась улучшением морфометрических параметров, а также увеличением активностей аскорбатпероксидаз и глутатион-S-трансфераз при действии абиотического стресса по сравнению с диким типом.
4. Впервые получены трансгенные растения амаранта *Amaranthus retroflexus*. Метод погружения цветков был впервые применен у растений вида *Amaranthus retroflexus*. Эффективность трансформации *floral dip* составила 1.4%.
5. Конститутивная экспрессия гена *ARGOS-LIKE* у трансгенных растений *Amaranthus retroflexus* способствует увеличению длины стебля в среднем на 21%, а длины листьев на 79%, по сравнению с диким типом.
6. Путем сокультивации эксплантов эпикотилей с *Agrobacterium tumefaciens* впервые получены трансгенные растения *Amaranthus cruentus*. Эффективность агробактериальной трансформации сегментов эпикотилей *Amaranthus cruentus* составила 4%.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в международные базы Scopus или RSCI

1. 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.
2. Таипова Р.М., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей амаранта багряного *Amaranthus cruentus* // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. - 2020. - Т. 13, № 2. - С. 179-187.
3. Таипова Р.М., Нестеров В.Н., Розенцвет О.А., Кулуев Б.Р. Изменения в содержании белков, липидов и состоянии антиоксидантной системы у мутантных форм амаранта *Amaranthus cruentus* L // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. - 2021. - № 1. - С. 76-85.

Публикации в научных изданиях из Перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК

1. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Введение в культуру *in vitro* и регенерация побегов из эксплантов эпикотилей амаранта *Amaranthus cruentus* // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2018. - Т. 14, № 1. - С. 64-66.
2. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Определение оптимальной концентрации мутагена азида натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* L // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2021. - № 3. - С. 34-41.
3. Таипова Р.М., Мусин Х.Г., Гайнуллина К.П., Кулуев Б.Р. Оценка генетического разнообразия и устойчивости мутантов *Amaranthus cruentus* L. к засухе и засолению // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. - 2023. - № 2. С. 77-93.

Публикации в изданиях, входящих в перечень РИНЦ

1. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Амарант: особенности культуры, применение, перспективы возделывания в России и создания трансгенных отечественных сортов // Биомика. - 2015. - Т. 7, № 4. - С. 284-299.

Подписано в печать 20.10.2023 г. Формат 60x84 ¹/₁₆.
Бумага офсетная. Печать лазерная. Тираж 100 экз. Заказ 030.
Гарнитура «TimesNewRoman». Отпечатано в типографии
«Печатный ДомЪ» ИП Верко А.В.
Объем 1,47 п.л. Уфа, Карла Маркса 12 корп. 5/1,
т/ф: 27-27-600, 27-29-123