

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«УФИМСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ НАУКИ И ТЕХНОЛОГИЙ»

*На правах рукописи*

*Таип*

ТАИПОВА РАГИДА МУХТАРОВНА

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

1.5.21. Физиология и биохимия растений

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
д.б.н. Кулуев Б.Р.

Уфа-2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Общая характеристика рода <i>Amaranthus</i> L.....	13
1.2. Сорты амаранта .....	14
1.3. Состав и питательные свойства амаранта .....	19
1.4. Исследования засухо- и солеустойчивости амаранта.....	24
1.5. Биотехнология и генная инженерия амаранта .....	27
1.6. Ген <i>ARGOS LIKE</i> и его функции в регуляции роста и стрессоустойчивости .....	30
1.7. Азид натрия - химический мутаген, используемый в селекции растений	33
Заключение к главе 1 .....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	38
2.1. Объекты исследования, бактериальные штаммы и векторы.....	38
2.3. Подбор концентраций азиды натрия.....	38
2.4. Измерение морфометрических параметров у линий <i>A. cruentus</i> , полученных обработкой семян мутагеном азидом натрия .....	39
2.5. Определение содержания общего растворимого белка .....	40
2.6. Анализ липидов и жирных кислот .....	40
2.7. Оценка генетического полиморфизма мутантных линий амаранта .....	41
2.8. Анализ антиоксидантной системы <i>A. cruentus</i> .....	41
2.9. Определение активности каталаз .....	42
2.10. Определение активности супероксиддисмутаза.....	42
2.11. Определение активности аскорбатпероксидазы.....	43
2.12. Определение активности глутатион-S-трансферазы.....	43
2.13. Определение содержания малонового диальдегида.....	44
2.14. Определение содержания пролина.....	44
2.15. Общая антиоксидантная способность.....	44

2.16. Определение относительного содержания воды .....	45
2.17. Определение площади поверхности листа с помощью программного обеспечения Easy Leaf Area.....	45
2.18. Агробактериальная трансформация <i>A. retroflexus</i> методом погружения цветков.....	46
2.19. Селективный отбор трансгенных проростков <i>A. retroflexus</i> .....	47
2.20. Выделение растительной ДНК методом солевой экстракции.....	48
2.21. Выделение ДНК из растительного материала при помощи ЦТАБ.....	48
2.22. Морфометрическая характеристика трансгенных растений <i>A. retroflexus</i> .....	49
2.23. Введение в культуру <i>in vitro</i> и микрклональное размножение <i>A. cruentus</i> .....	49
2.24. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей <i>A. cruentus</i> .....	50
2.25. Полимеразная цепная реакция.....	52
2.26. Агарозный гель-электрофорез ДНК.....	53
2.27. Статистическая обработка полученных результатов .....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Химический мутагенез <i>A. cruentus</i> при помощи азиды натрия.....	56
3.1.1. Определение оптимальной концентрации азиды натрия для индукции мутагенеза <i>A. cruentus</i> .....	56
3.1.2. Морфометрические показатели линий амаранта поколения $M_2$ , полученных после обработки азидом натрия.....	60
3.1.3. Оценка генетического разнообразия мутантных линий амаранта.....	67
3.1.4. Анализ мутантных линий амаранта поколения $M_2$ на содержание общего растворимого белка и состава липидов .....	70
3.1.5. Определение морфометрических показателей и антиоксидантного статуса мутантных линий амаранта поколения $M_3$ в условиях засухи.....	76
3.1.6. Определение морфометрических параметров и антиоксидантного статуса мутантных линий амаранта $M_3$ в условиях засоления .....	81
Заключение к параграфу 3.1.....	84

3.2. Получение трансгенных растений <i>A. retroflexus</i> и их морфометрическая характеристика .....	86
3.2.1. Трансформация <i>A. retroflexus</i> методом погружения цветков .....	86
3.2.2. Отбор трансгенных растений амаранта <i>A. retroflexus</i> методом ПЦР-анализа .....	88
3.2.3. Морфометрический анализ трансгенных растений <i>A. retroflexus</i> , содержащих ген <i>ARL A. thaliana</i> .....	92
Заключение к параграфу 3.2.....	96
3.3. Введение в культуру <i>in vitro</i> и индукция органогенеза <i>A. cruentus</i> .....	97
Заключение к параграфу 3.3.....	100
3.4. Получение трансгенных растений <i>A. cruentus</i> методом агробактериальной трансформации эпикотилей .....	101
Заключение к параграфу 3.4.....	104
ВЫВОДЫ .....	105
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	106

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

пн – пара нуклеотидов

ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЖК – жирные кислоты

НЛ – нейтральные липиды

ФХ – фосфатидилхолины

СТ – стерины

ФЛ – фосфолипиды

LB – lysogeny broth

ОРБ – общий растворимый белок

БАП – 6-бензиламинопурин

ИУК – 3-индолилуксусная кислота

КАТ – каталаза

МДА – малоновый диальдегид

МС – Мурасиге-Скуга (питательная среда)

ОАС – общая антиоксидантная способность

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПО – пероксидаза

СА – супероксид-анион

АПФ - ангиотензинпревращающий фермент

ДПП-4 - дипептидилпептидаза-4

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Одной из перспективных сельскохозяйственных культур для России является амарант (*Amaranthus spp.*). 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  $\beta$ -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. Данное растение от природы имеет повышенную засухо- и жароустойчивость (Johnson, Henderson, 2002; Omami et al., 2006), что объясняется его высокоэффективной способностью поглощать воду по сравнению с пшеницей, кукурузой, хлопком и сорго (Weber, 1990). Реализация C4-пути фотосинтеза, способность образовывать длинные стержневые корни, развивать боковую корневую систему в ответ на нехватку воды в почве способствует устойчивости амаранта к абиотическому стрессу (Kadereit et al., 2003; Omami et al., 2006).

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 (Omoriegbe 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. Имеются сведения, что повысить урожайность культурных видов удастся в результате сверхэкспрессии генов семейства ARGOS, которые 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 азиды 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 азиды 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.

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

- Получены методом погружения цветков 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 генной 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 генной 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 «Физиолого-биохимическая характеристика генетически трансформированных и мутантных форм *Amaranthus spp*» выполнена в рамках специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений и охватывает исследования в области интенсификации растениеводства. Методами генной 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 135 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.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Общая характеристика рода *Amaranthus* L.

Амарант (род *Amaranthus* L.) относится к однолетнему травянистому растению семейства Амарантовые (*Amaranthaceae*) и включает в себя около 70 видов. На сегодняшний день 12 видов этого растения одомашнены для возделывания в качестве овощной, зерновой, кормовой и декоративной культур (Kalac et al., 2000; Anjali et al., 2013). К основным видам зерновых, выращиваемых для потребления человеком и животными, относятся такие виды как *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* и два подвида *A. caudatus*: *caudatus* и *mantegazzianus* Passerini (Castellanos-Arévalo et al., 2020). Кроме того, *A. cruentus* возделывается и как овощная культура (Bello, Walker, 2017).

Амарант входит в группу НАД-малик-энзимного типа С4 фотосинтеза с кранц-анатомией листьев, семядолей и прицветников (Wang et al., 1999; Costea, Tardif, 2003). Растения с С4-фотосинтезом, по сравнению с растениями С3-пути, характеризуются способностью эффективно поглощать CO<sub>2</sub> из атмосферы и накапливать его в хлоропластах клеток вокруг эпидермиса листа. В результате начальной фиксации атмосферного углекислого газа под действием фермента фосфоенолпируваткарбоксилазы образуются оксалоацетат, аспартат и малат (Gardner et al., 2017; Leegood, Edwards, 1996).

Растения, использующие С4-путь связывания углерода, как правило, меньше требовательны к воде, так как потеря воды при испарении происходит в меньших количествах (Spreeth, 2004). Поскольку амарант способен использовать межклеточный углекислый газ малых концентраций при низкой проводимости устьиц, он является перспективной культурой для применения в засушливых и полузасушливых регионах (Leegood, Edwards, 1996). Отмечено, что в амаранте пролин и общие растворимые сахара являются важными осмолитами, поддерживающими тургор растений в ответ

на засуху (Huerta-Ocampo et al., 2010). Протеомный и геномный анализы амаранта показали, что реакция на засуху включает скоординированный процесс накопления осмолитов и активацию связанных со стрессом генов. Данный сигнальный путь необходим для стабилизации РНК и белков, регуляции транскрипции, детоксикации клеток и контроля роста клеток (Huerta-Ocampo et al., 2009).

C4-фотосинтез, экспрессия генов, связанных со стрессом (Palmeros-Suárez et al., 2021), способность развивать длинную стержневую корневую систему с обширным боковым ветвлением и эффективно поглощать воду (Johnson, Henderson, 2002) делают амарант устойчивым к абиотическим стрессам. Амарант активно растет в условиях неблагоприятных для традиционных зерновых культур, поскольку характеризуется высокой адаптивной способностью к разным условиям возделывания, таким как почвы с низким содержанием питательных веществ, повышенным содержанием соли (Huerta-Ocampo et al., 2014), а также засуха (Huerta-Ocampo et al., 2011) и жара (Maughan et al., 2009). Данная особенность амаранта вызывает огромный интерес не только у растениеводов, но и у исследователей (Barba de la Rosa et al., 2009).

## 1.2. Сорты амаранта

Во всем мире ведутся активные исследования в области выведения новых сортов амаранта и оценке их агрономических качеств. Так, к примеру, в 2001 году национальный список сортов Литвы пополнили сорта амаранта Raudonukai, Geltonukai вида *A. cruentus* и Rausvukai вида *A. hypochondriacus*. По полученным данным исследователи рекомендуют использовать сорт Geltonukai в производстве продуктов питания, сорт Raudonukai в технических целях, а сорт Rausvukai в качестве силосной культуры (Svirskis, 2003). В США наиболее широко выращиваемым сортом амаранта стал сорт Plainsman из-за его относительно высокого потенциала урожайности (Guillen-Portal et

al., 1999). Corke с соавторами (1997) рекомендуют сорта *A. cruentus* R104, *A. cruentus* K112, *A. hypochondriacus* 1023, *A. hypochondriacus* 1024 и *A. hybridus* 1004 как наилучшие для интродукции в Китае. В районах северного и северо-восточного Китая, в провинциях Сычуань и Юньнань площадь, ежегодно засеваемая зерновым и кормовым амарантом, достигала 86000 га (Corke et al. 1997).

Сорта амаранта, зарегистрированные в Европейском Союзе, такие как Annapurna и Koniz *A. hypochondriacus*, сорт Oscar Blanco *A. caudatus*, сорта Golden Giant и Rawa *A. cruentus* рекомендуются в качестве источника полифенолов (Vollmannová et al., 2021).

По состоянию на 2023 год в реестре селекционных достижений допущенных к использованию указаны 35 сортов амаранта отечественной селекции, разработанные ФГБНУ Российский НИПТИ сорго и кукурузы, ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», ООО «Русская олива», ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» и др., (Госреестр РФ, 2023).

Группа силосных *Amaranthus* включает в себя следующие сорта:

1. «Чергинский», включен в государственный реестр в 1995 году; селекция ФГБНУ Федерального исследовательского центра института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук;
2. «Подмосковный», включен в государственный реестр в 2000 году, селекция ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института кормов им. В.Р. Вильямса;
3. «Кизлярец», включен в государственный реестр в 2001 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;
4. «Кинельский 254», включен в государственный реестр в 2004 году, селекция ФГБНУ Поволжской НИИ Селекции и семеноводства им. П.Н.Константинова;

5. «Янтарь», включен в государственный реестр в 2006 году, селекция ФГБНУ Федерального Алтайского научного центра агrobiотехнологий;
6. «Каракула», включен в государственный реестр в 2007 году, селекция ФГБНУ Ставропольского научно-исследовательского института сельского хозяйства;
7. «Полет», включен в государственный реестр в 2009 году, селекция ФГБНУ Российского НИПТИ сорго и кукурузы;
8. «Иристон», включен в государственный реестр в 2010 году, селекция ФГБНУ Северо-Кавказского НИИ горного и предгорного сельского хозяйства;
9. «Воронежский», включен в государственный реестр в 2011 году, селекция ООО «Русская олива»;
10. «Гигант», включен в государственный реестр в 2011 году, селекция ООО «Русская олива»;
11. «Император», включен в государственный реестр в 2014 году, селекция ИП Саратовский Леонид Иванович;
12. «Липецкий», включен в государственный реестр в 2014 году, селекция ФГБНУ Всероссийского научно-исследовательского института рапса;
13. «Светлана», включен в государственный реестр в 2014 году, селекция ФГБОУ ВО Башкирского государственного аграрного университета;
14. «Универсал», включен в государственный реестр в 2014 году, селекция ИП Саратовский Леонид Иванович;
15. «Кинес», включен в государственный реестр в 2015 году, селекция ФГБНУ Поволжской НИИ Селекции и семеноводства им. П.Н.Константинова;
16. «Воронежский 36», включен в государственный реестр в 2016 году, селекция ИП Саратовский Леонид Иванович;
17. «Добрыня», включен в государственный реестр в 2017 году, селекция ФГБОУ ВО Воронежского государственного аграрного университета имени императора Петра I;

18. «Рубин», включен в государственный реестр в 2017 году, селекция ИП Саратовский Леонид Иванович;

19. «Саша», включен в государственный реестр в 2023 году, селекция ФГБОУ ВО Башкирский государственный аграрный университет.

В группу овощных культур включены четыре сорта *A. hypochondriacus*:

1. «Валентина», включен в государственный реестр в 1999 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

2. «Крепыш», включен в государственный реестр в 2004 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

3. «Памяти Коваса», включен в государственный реестр в 2004 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

4. «Рубиновый букет», включен в государственный реестр в 2019 году, селекция ООО «Агрофирма поиск»;

а также два сорта *A. tricolor*:

5. «Неженка», включен в государственный реестр в 2015 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

6. «Факел», включен в государственный реестр в 2015 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства.

В группу цветочно-декоративных культур включены шесть сортов *A. cruentus*:

1. «Дюймовочка», включен в государственный реестр в 2008 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

2. «Султан», включен в государственный реестр в 2008 году, селекция Фермерского хозяйства «КАПРИС»;

3. «Вулкан», включен в государственный реестр в 2009 году, селекция ФГБНУ Российского НИПТИ сорго и кукурузы;

4. «Властелин», включен в государственный реестр в 2019 году, селекция ФГБНУ Российского НИПТИ сорго и кукурузы;

5. «Франт», включен в государственный реестр в 2022 году, селекция ФГБНУ Федерального исследовательского центра всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И.Вавилова;

6. «Вектор», включен в государственный реестр в 2023 году, селекция ФГБОУ ВО Ставропольского государственного аграрного университета и ФГБНУ Северо-Кавказского ФНАЦ;

а также четыре сорта *A. caudatus*:

1. «Зеленая сосулька», включен в государственный реестр в 2004 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

2. «Булава», включен в государственный реестр в 2005 году, селекция ФГБНУ Федерального научного центра овощеводства;

3. «Ангелина», включен в государственный реестр в 2005 году, селекция ФГОУ ВПО Саратовский государственный университет и ФГНУ Российский НИПТИ Сорго и кукурузы;

4. «Талисман», включен в государственный реестр в 2019 году, селекция ФГБНУ Российского НИПТИ сорго и кукурузы (Таипова, Кулуев, 2015; Госреестр РФ, 2023).

В целом, наблюдается прогресс в отечественной селекционной работе по выведению новых сортов амаранта с повышенной урожайностью зерна и зеленой массы, устойчивых к болезням и вредителям, а также приспособленных к различным климатическим условиям.

В России на 2019 год площадь посевов под амарант оценивалась в 3,5 тысячи га. Для примера, на Украине в 2010-е гг. для выращивания амаранта отводилось 20 000 га более 130 агрохозяйствам. Однако амарант в нашей стране тоже стремительно набирает популярность. Новые поля под амарант засевают в Саратовской, Воронежской, Волгоградской и других областях южных регионов России (Южанинова, 2020). Так, на полях Кубани и Сибири возделывание амаранта производит ООО «Русская олива». В Башкирии на экспорт выращивается сорт Крепыш производственным хозяйством

«Северная Нива Башкирия» где урожайность амаранта составляет до 2000 кг/га.

Урожайность амаранта зависит от погодных условий, вида и генотипа растения, технологии выращивания, применения удобрений. При благоприятных условиях выращивания можно ожидать урожайность зерна амаранта в пределах 1500 – 3000 кг/га (Williams, Brenner, 1995). По данным Jamrika (1990) и Kaul (1996) в Европе урожайность колеблется от 2000 до 3800 кг/га.

### 1.3. Состав и питательные свойства амаранта

По компонентному составу семена и листья *A. cruentus* отличаются от представителей злаковых содержанием белка со сбалансированным аминокислотным составом (Gorinstein et al., 2002; Alvarez-Jubete et al., 2009), высоким содержанием минералов, таких как Ca, K и P (Jiménez-Aguilar, Grusak, 2017). Mbugu и др., (2012) отмечают, что амарант содержит более чем в три раза больше кальция, чем основные злаки, и богат железом, магнием, фосфором и калием. По качеству белка амарант превосходит традиционные пищевые источники: пшеницу, ячмень и кукурузу (Venskutonis, Kraujalis, 2013). А в масле присутствуют смешанные токоферолы, 0.3–0.4% фитостерины и около 5% сквалена (Gamel, Tamer, 2007).

Отличительной особенностью семян *A. cruentus* от зерна злаковых культур является содержание высококачественного белка (Ogrodowska et al., 2014). В том случае если наивысшую биологическую ценность белка условно принять за 100%, то биологическая ценность белка коровьего молока будет иметь значение 73-77%, а для амаранта этот показатель будет в пределах 75-79% (Robertson, Clemants, 2003).

Белковый состав семян *A. cruentus* представлен фракциями альбуминов 48.9-65%, глобулинов 13.7-18.1%, проламинов 1.0-3.2% и глютелинов 22.4-42.3% от общего содержания белка (Fidantsi, Doxastakis, 2001). Небольшое

содержание проламинов снижает риск возникновения отрицательных для организма иммунных реакций (Januszewska-Jóźwiak, Synowiecki, 2008). Кроме того стоит отметить тот факт, что зерно амаранта может быть введено в рацион питания людей, страдающих непереносимостью глютена (Alvarez-Jubete et al., 2009). Безглютеновый белок амаранта в сочетании с высоким уровнем кальция в зерне, подходит для употребления больным целиакией и будет способствовать лучшему метаболизму костной ткани (Fasano, Catassi, 2001; Rodrigo, 2006). У большинства видов амарантовых, было показано содержание глютена меньше 20 мг/кг, что является допустимой нормой для безопасного потребления глютена при целиакии, таким образом, продукция из амаранта может быть введена в рацион пациентов, страдающих непереносимостью глютена (Ballabio et al., 2011).

В альбуминовой, глобулиновой и проламиновой белковых фракциях амаранта был идентифицирован пептид луназин, однако наибольшую концентрацию этого пептида имела глютелиновая фракция (3.0 мкг/г) (Silva-Sánchez et al., 2008). Maldonado-Cervantes и др., (2010) сообщают, что луназин *A. hypochondriacus* эффективен в качестве антиконцерогенного пептида. Исследования этой группы ученых показали подавление трансформации клеток NIH-3T3 в раковые (Maldonado-Cervantes et al., 2010). Считается, что одной из причин развития онкологии выступает воспаление (Oseguera-Toledo et al., 2011). В этой связи был доказан противовоспалительный механизм действия экстрадированных гидролизатов *A. hypochondriacus* за счет ингибирования воспаления, вызванного липополисахаридами, и снижения активации пути NF-κB (Montoya-Rodriguez et al., 2014). Противоопухолевый эффект был показан также у *A. caudatus* и *A. mantegazzianus* (Yu et al., 2001; Barrio, Anon, 2010). Так, лектины *A. caudatus* могут распознавать опухолевый фактор и связываться с ним (Yu et al., 2001). В этом исследовании было отмечено, что лектин действует как маркер пролиферации злокачественных эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта и может играть определенную роль в диагностике рака

кишечника. Другая группа исследователей сообщает о потенциальном противоопухолевом эффекте белкового изолята семян *A. mantegazzianus* (Barrio, Anon, 2010). Они обнаружили механизм действия антипролиферативной активности белкового изолята, заключающийся в ингибировании клеточной пролиферации и клеточной адгезии наряду с повреждением клеток. В связи с антипролиферативным действием на опухолевые клетки белки амаранта можно использовать в функциональных пищевых продуктах с целью снижения риска заболеваний человека раком или даже для предотвращения такой патологии в целом (Sabbione et al., 2019).

Биоактивные компоненты белка амаранта могут оказывать антигипертензивную активность. Ввиду того, что основные фракции запасных белков представлены глобулинами и глютелинами, семена амаранта можно использовать и как потенциальный источник антигипертензивного пептида луназина (Silva-Sánchez et al., 2008). Из альбумина 1 и глобулина семян *A. hypochondriacus* с использованием алькалазы были выделены пептидные фракции, ингибирующие ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) (Tovar-Perez et al., 2009). АПФ играет важную роль в регуляции кровяного давления, однако высокий уровень АПФ может привести к усилению сужения сосудов и, как следствие, к развитию высокого кровяного давления с сопровождающими его патологическими симптомами. Ученые отмечают, что белки амаранта являются хорошим сырьем для производства пептидов, ингибирующих АПФ (Vecchi, 2009).

Velarde-Salcedo с соавт. (2013) сообщают, что пептиды амаранта *A. hypochondriacus* могут быть использованы в качестве функциональных пищевых ингредиентов для профилактики диабета. Новым классом препаратов, снижающих уровень сахара в крови, являются ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4). ДПП-4 в организме выступает как деактиватор инкретина - гормона, участвующего в секреции инсулина. В

этом исследовании показано ингибирование фермента ДПП-4 *in vitro* пептидами белков семян амаранта после их ферментативного расщепления (Velarde-Salcedo et al., 2013). Другая группа исследователей (Conforti et al., 2005) выделила экстракты из *A. caudatus*, проявляющие противодиабетическую активность за счет ингибирования  $\alpha$ -амилазы.

Биоактивные соединения амаранта способны снижать риск возникновения ряда заболеваний. К примеру, у этих фитонутриентов были определены антиоксидантная, антигипертензивная и антитромботическая активности, антипролиферативное действие на раковые клетки, эффект снижения уровня холестерина в сыворотке крови.

Полифенолы амаранта оказывают антиоксидантную активность (Gorinstein et al., 2007). В разных сортах *A. hypochondriacus* были обнаружены изокверцетин, рутин, фенольные кислоты, такие как сирингиновая и ванилиновая кислоты, обладающие антиоксидантными свойствами (Barba de la Rosa, 2009). Отмечено, что проростки амаранта обладают значительно более высокой антиоксидантной активностью, чем семена, что может быть результатом разницы в содержании полифенолов и антоцианов (Lopez-Mej et al., 2014).

Потребление экструдированного амаранта снижает уровни липопротеинов низкой плотности и общего холестерина и может быть еще одним вариантом предотвращения ишемической болезни сердца (Plate, Arêas, 2002; Mendonca et al., 2009), а высокое содержание клетчатки в амаранте может быть одним из ответственных соединений для снижения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз (Pavlik, 2012). Антиатеросклеротическое действие амаранта было зафиксировано на опытах над кроликами с гиперхолестеринемией в результате снижения уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), триглицеридов и окисленных липопротеинов низкой плотности - основной молекулы в развитии атеросклероза (Kabiri et al., 2010; Tate, 2007).

Отмечено, что масло амаранта в своем составе имеет высокие концентрации токотриенолов и редкой формы витамина Е, ингибирующего ферменты ответственные за биосинтез холестерина (Budín et al., 1996). Одной из особенностей амарантового масла является содержание в своем составе сквалена, представляющего собой ненасыщенный тритерпеноидный углеводород, состоящий из 6 изолированных двойных связей. Поскольку промысел *Squalus* spp. привел к угрозе исчезновения некоторых видов *Squalus*, например, *Squalus acanthias*, *S. albifrons*, *S. brevirostris*, на сегодняшний день существует необходимость получения сквалена из альтернативных источников. Было обнаружено его присутствие в неомыляемой фракции некоторых растительных масел. Так, установлено содержание сквалена в оливковом масле *Olea europaea* в пределах 0.6-0.7%, а семена амаранта, в зависимости от сорта, могут содержать до 8% сквалена (Ogrodowska et al., 2014).

Суточная доза сквалена от 2000 до 5000 мг считается терапевтической против рака и способна снизить риск развития рака кишечника, молочной железы и кожи. Также отмечена способность сквалена уменьшать рост опухолевых клеток и вызывать уменьшение уже существующих опухолей. В последние несколько лет была продемонстрирована защитная роль сквалена в отношении ряда канцерогенов, вызывающих, например, рак кожи и хроническое лимфопролиферативное заболевание, поражающее костный мозг и селезенку. Сообщается о роли сквалена в усилении действия противоопухолевых средств, таких как адриамицин, 5-фторурацил и блеомицин. Дозы до 500 мг в сутки благотворно влияют на уровень накопленного в организме холестерина. Такие дозы повышают количество положительного холестерина липопротеинов высокой плотности и снижают уровень холестерина ЛПНП. Прием 860 мг в день в течение 20 недель людьми с гиперхолестеринемией привел к значительному снижению общего холестерина, ЛПНП и триглицеридов (Wołosik et al., 2012).

Масло амаранта преимущественно извлекается из двух видов амаранта: *A. cruentus* и *A. hypocondriacus* (Gamel et al., 2007; He, Corke, 2003). Это масло содержит в основном неполярные липидные соединения, особенно триглицериды 80.3-82.3% и около 9.1–10.2% фосфолипидов (Gamel et al., 2007). Амарантовое масло также содержит токолы 1465.15 мг/кг и как уже отмечалось, сквален до 6.8%, по сравнению с маслом зародышей пшеницы, в котором его содержится всего 0.1–1.7%. В масле *A. cruentus* содержится 4.0–10.0% сквалена (Gamel и др., 2007; Grazdienė, 2007), в *A. hypocondriacus* – 6.1%, в *A. tricolor* – 5.1% (He, Corke, 2003; He et al., 2002). Кроме того, в составе амарантового масла идентифицированы миристиновая (до 0.6%), пальмитиновая (до 18.7%), стеариновая (до 5.3%), бегеновая (до 2.6%), олеиновая (до 30.5%), линоленовая (до 62%) и линолевая кислоты (до 40%) (Jahaniaval et al., 2000).

Благодаря содержанию высокопитательных компонентов зерно амаранта достаточно широко применяется для повышения биологической ценности пищевых продуктов. Так, имеются данные по использованию амарантового зерна при приготовлении паст, заправок для салатов (Stallknecht, Schulz-Schaeffer, 1993), также хлеба, печенья из пшеничной и амарантовой муки (Ауо, 2001; Sindhuja et al., 2005). Рассматривается способ повышения питательной ценности пшеничного хлеба путем его обогащения натуральными растительными компонентами, одним из которых может быть зерно амаранта (Giami et al., 2003). Выбор амаранта в качестве добавки в хлебобулочные изделия объясняется высоким содержанием в его белке незаменимой аминокислоты лизина, которого не хватает в зерне злаковых культур (Bodroža-Solarov et al., 2008).

#### **1.4. Исследования засухо- и солеустойчивости амаранта**

Засуха отрицательно сказывается на показателях продуктивности культурных растений. Результаты исследования Sarker, Oba (2018) на

засухоустойчивом (VA13) и умеренно чувствительном к засухе (VA15) сортах *A. tricolor* в условиях засухи показали снижение общей биомассы за счет замедления роста растений. Также авторы отмечают снижение показателей RWC (относительное содержание воды), толщины листьев. Однако у толерантного сорта, по сравнению с чувствительным к засухе сорту амаранта, наблюдалось снижение показателя RWC и толщины листьев в меньшей степени. Характерным показателем негативного действия засухи как стрессового фактора на растительный организм являются изменения в содержании хлорофилла. Так, при засухе активируется окисление пигмента хлорофилла, приводящее к уменьшению его количества, разрушению хлоропластов (Kato, Shimizu, 1985) или увеличению активности хлорофиллазы (Parida et al., 2004). В опытах Sarker, Oba (2018) наблюдали большее содержание хлорофиллов у засухоустойчивого генотипа VA13, что позволяет сделать вывод о большей устойчивости этого генотипа к засухе по сравнению с генотипом VA15 (Sarker, Oba, 2018). Стресс, вызванный засухой, повышает образование активных форм кислорода (АФК) в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах. Авторы отмечают значительную выработку перекиси водорода, увеличение уровня перекисного окисления липидов и оттока электролитов у генотипа VA15 по сравнению с генотипом VA13. В данном исследовании показана роль супероксиддисмутазы, каталазы и глутатиона в детоксикации основных АФК у толерантного генотипа амаранта, поскольку наибольшая активность данных компонентов антиоксидантной системы наблюдалась у генотипа VA13 (Sarker, Oba, 2018).

Другая группа исследователей (Valdayskikh et al., 2019), измеряя скорость фотосинтеза и транспирацию, изучили влияние почвенной засухи на рост и развитие *A. caudatus*. Авторы отмечают способность растений амаранта поддерживать уровень гидратации тканей, благодаря уменьшению потери воды, закрытию устьиц и уменьшению транспирации, что приводит к повышению эффективного использования воды. Также гидратация тканей

поддерживается за счет уменьшения размеров и массы побегов при относительном увеличении способности корневой системы поглощать воду (Valdayskikh et al., 2019).

Matzrafi с соавт., (2021) опытным путем на *A. palmeri* определили способность растений, испытывающих стресс от недостатка влаги во время вегетации, давать семена устойчивые к засухе. Таким образом, полученные семена могут прорасти в более сухих условиях по сравнению с семенами растений, не подвергавшихся стрессу.

Исследование влияния разного уровня дефицита влаги на качество и количество кормового амаранта было проведено на трех генотипах *A. hypochondriacus* – Сем, Харьковский и Лера (Ahrar et al., 2020). Авторы установили наилучшие показатели урожайности у сорта Сем, по сравнению с двумя другими сортами. Кроме того, отмечается, что, несмотря на короткий жизненный цикл, растение амаранта производит достаточно высокое количество качественного урожая (Ahrar et al., 2020).

Другим ограничивающим экологическим фактором для сельского хозяйства является засоление почв. Bellache с соавт., (2022) проанализировали солеустойчивость двух видов амаранта *A. albus* и *A. hybridus*. Так, было установлено, что оба вида переносят умеренные концентрации NaCl, однако их параметры в условиях засоления были разными. При сравнении этих видов между собой было обнаружено, что *A. albus* проявляет большую устойчивость во время прорастания, тогда как *A. hybridus* характеризуется большей устойчивостью во время вегетативного роста. Поскольку *A. hybridus* обладает ценностью как овощная культура, его разведение рекомендуется в регионах с повышенным содержанием соли в почве (Bellache et al., 2022).

Снижение роста растений из-за высокого содержания соли в почве показана на амарантах *A. tricolor*, *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. hybridus* (Makus, 2003; Omami et al. 2006; Omami, Hammes, 2006; Qin et al. 2013; Amukali et al. 2015; Lavini et al., 2016). Снижение объема биомассы может

быть последствием снижения внешнего осмотического потенциала или же из-за накопления токсичных ионов (Odjegba, Chukwunwike, 2012). Встречаются данные о положительном эффекте повышения содержания соли в умеренных количествах. Так, для *A. hybridus* отмечено стимулирование роста корней, увеличение сухой массы, количества листьев при действии соли (Amukali et al. 2015).

### 1.5. Биотехнология и генная инженерия амаранта

Первые разработки методов органогенеза и эмбриогенеза амаранта *in vitro* представлены в работах Flores с соавт. (1982) и Bagga с соавт., (1987). Flores и др., (1982) в исследовании использовали листовые диски и гипокотильные экспланты *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. tricolor* и *A. paniculatus*. Авторы описали возможность получения эмбриогенного каллуса при использовании высоких концентраций 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) от 1 до 10 мг/л, однако регенерация растения из этих каллусов не удалась. Регенерация побега из гипокотилей была достигнута при одновременном использовании 0.1 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0.1-1.0 мг/л зеатина, в то время как более низкие соотношения зеатина и НУК приводили к образованию корней (Flores et al., 1982). У Bagga с соавторами (1987) отмечена успешная индукция каллусообразования на сегментах гипокотилей 5-8 мм с последующей регенерацией побега при использовании кинетина 0.5 мг/л и НУК 0.1 мг/л (Bagga et al., 1987). Разработанные методики работы в культуре *in vitro* могут быть положены в основу опытов по получению трансгенных растений в асептических условиях. Так, имеются данные о создании генно-модифицированных амарантов в культуре *in vitro* через стимуляцию процессов органогенеза. Например, Jofre-Garfias с коллегами (1997) удалось трансформировать зерновой вид *A. hypochondriacus* сорта Azteca штаммом *A. tumefaciens* содержащим плазмиду pGV2260 (pEsc4) с маркерными генами,

кодирующими неомицинофосфотрансферазу II (*nptII*) и  $\beta$ -глюкуронидазу (*uidA*). В этом эксперименте были использованы эмбрионы из зрелых семян, выращенные на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 10% жидкого эндосперма кокосового ореха, 3% сахарозы и 10 мкМ 2,4-Д. Авторы отмечают развитие побега из отдельных соматических эмбрионов и из неэмбриогенной каллусной ткани исключительно в присутствии жидкого эндосперма из плодов кокоса. Присутствие трансгена в геномах трансформированного амаранта и следующих трансгенных поколений было доказано с помощью метода саузерн-блот гибридизации (Jofre-Garfias et al., 1997).

Генетической трансформации подвергалась также овощная культура *A. tricolor* (Pal et al., 2013b). В данном эксперименте авторы проводили процесс совместного культивирования эксплантов эпикотилей со штаммами ЕНА 105 и LBA 4404 *A. tumefaciens*, несущими бинарную плазмиду p35SGUSINT с маркерными генами неомицинофосфотрансферазы II (*nptII*) и  $\beta$ -глюкуронидазы (*uidA*). Pal с соавторами (2013b) отмечают высокий процент трансформации побегов (24.24%) при поранении эпикотильных эксплантов и добавлении 100 мкМ ацетосиренгона в среду для инокуляции.

Таким образом, генетическая трансформация амаранта успешно проводится с помощью *A. tumefaciens* в условиях *in vitro*, однако для этого может быть использована также почвенная агробактерия *A. rhizogenes*. Swain и др., (2010) описали процедуру агробактериальной трансформации листового амаранта *A. tricolor* штаммами LBA9402 и A4 *A. rhizogenes*. При этом исследователи определили, что наилучший эффект трансформации обнаруживается при использовании эксплантов междоузлий стебля из растений, выращенных в тепличных условиях. По полученным данным сделан вывод о том, что максимальная частота появления волосовидных корней достигается при предварительном поранении эксплантов и их культивировании вместе с агробактериями на твердой питательной среде МС не содержащей регуляторы роста. Трансгенный статус полученных корней

был подтвержден обнаружением биосинтеза агропина и маннопина. Авторы отмечают спонтанное развитие побегов из волосовидных корней на питательной среде МС без добавления регуляторов роста, однако при добавлении зеатина в концентрации 2.0 мг/л регенерация побегов шла наилучшим образом. В ходе данного исследования были получены растения-регенеранты с измененным фенотипом, внешне проявляющимся в карликовости растений и форме, размере и цвете листьев (Swain et al., 2010).

В работе Pal и др., (2013а) указывают частоту трансформации равную 98.57% при получении трансгенного овощного амаранта *A. spinosus* штаммом LBA 9402 *A. rhizogenes*. Авторы отмечают появление волосовидных корней на эксплантах листьев и междоузлий стебля после 8-12 дней со дня совместного культивирования эксплантов с агробактерией. Успешная регенерация побега из волосовидных корней была достигнута на питательной среде МС с фитогормоном зеатином в концентрации 2.0 мг/л (Pal et al., 2013а).

Положительный эффект от трансформации амаранта также был отмечен при использовании соцветий этой культуры *in planta*. Munusamy и др., (2013) испытали способ трансформации амаранта методом погружения цветков. Принцип метода заключался в нанесении по каплям суспензии с агробактериями на метелки цветущего амаранта для получения семян первого поколения ( $M_1$ ). Авторы сообщают, что частота трансформации при применении этого метода находилась в диапазоне 0.5-3% (Munusamy et al., 2013). В недавних отчетах Yaroshko и др., (2019) сообщалось о результатах успешной трансформации *A. caudatus* и гибридов *A. caudatus* × *A. paniculatus* методами погружения цветков и вакуумной инфльтрации (Yaroshko et al. 2018; Yaroshko, Kuchuk, 2019). Таким образом, для трансформации амаранта могут быть предложены как методы сопряженные с индукцией органогенеза в условиях *in vitro*, так и метод погружения цветков проводимый в условиях *in planta*.

Разработка эффективных и воспроизводимых методов генетической трансформации зернового амаранта была труднодостижимой. Однако недавние успешные результаты исследований показывают, что использование различных комбинаций ауксинов и цитокининов, ионов кальция, красного света и т.д. может позволить создать более быстрые и эффективные генетические методы трансформации зерновых амарантов, в том числе *A. cruentus*. Кроме того, генетическая трансформация с целью получения волосовидных корней амаранта может быть применена для биосинтеза привлекательных вторичных метаболитов или белков. Например, пептидов, которые обладают потенциальным терапевтическим эффектом против хронических патологий человека. Однако следует отметить, что до наших исследований технологии генетической трансформации к виду *A. cruentus* не применялись как в условиях *in vitro*, так и *in planta*.

#### **1.6. Ген *ARGOS LIKE* и его функции в регуляции роста и стрессоустойчивости**

При создании трансгенных растений первой задачей является выбор целевого гена. В селекции сельскохозяйственных культур важная роль отводится генам, продукты которых участвуют в контроле размеров органов растений и, соответственно, влияющим на продуктивность. Внешнее строение растения в значительной степени зависит от количества, размера и формы его органов, а размер органа определяет такие агрономические показатели, как урожайность и биомасса растений (Gonzalez et al., 2009). На рост органов у растений оказывают влияние внутренние сигналы и сигналы окружающей среды, включающие в себя растительные гормоны, свет, температуру и питательные вещества, а конечный размер органов в значительной степени обуславливается комбинированным эффектом этих сигналов в процессе органогенеза (Tsukaya, 2003, 2005).

У растений рост органа до его характерного размера происходит в две последовательно-перекрывающиеся фазы: фаза пролиферации клеток, во время которой увеличивается количество клеток, и фаза роста клеток растяжением, во время которой клетки увеличиваются до соответствующих размеров (Anastasiou, Lenhard, 2007).

Генетические анализы позволили идентифицировать множество генетических факторов, которые контролируют размер органа, регулируя пролиферацию клеток и/или процесс растяжения клеток у растений. К примеру, для факторов AINTEGUMENTA, STRUWWELPETER, KLUM, JAGGED, ANGUSTIFOLIA3, SWELLMAP1 и GROWTH-REGULATING FACTOR5 был отмечен положительный эффект их сверхэкспрессии на деление клеток во время роста органов. Повышенная экспрессия этих генов у *A. thaliana* продлевает продолжительность клеточной пролиферации, приводя к образованию более крупных органов с большим количеством клеток, в то время как мутации в генах, кодирующих эти факторы, сокращают продолжительность клеточной пролиферации и, таким образом, приводят к уменьшению размеров органов (Mizukami, Fischer, 2000; Autran et al., 2002; Dinneny et al., 2004; Ohno et al., 2004; Clay, Nelson, 2005; Horiguchi et al., 2005; Anastasiou et al., 2007; Lee et al., 2009). Напротив, некоторые другие факторы, в том числе AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2), BLADE ON PETIOLE1 (BOP1), PEAPOD1/2 (PPDs), BIG BROTHER (BB) и DA1, по-видимому, являются негативными регуляторами роста органов, ограничивая период пролиферации, поскольку потеря функции каждого из этих генов приводит к увеличению органов в результате увеличения числа клеток (Ha et al., 2003; Disch et al., 2006; Schruff et al., 2006; White, 2006; Li et al., 2008). Таким образом, можно сделать вывод о том, что регуляция длительности времени клеточной пролиферации, а не скорости клеточного деления, является одним из ключевых механизмов для определения конечного размера органа у растений (Anastasiou, Lenhard, 2007). Также были идентифицированы несколько генов, которые регулируют рост органов растений за счет влияния

на рост клеток растяжением. Например, ROTUNDIFOLIA3 (ROT3) стимулирует увеличение полярных клеток в продольном направлении (Kim et al., 1998), транскрипционный фактор BIGPETAL контролирует размер клеток лепестков (Szécsi et al., 2006), а сверхэкспрессия AtGRF1/2 увеличивает размер листа за счет увеличения размера клеток (Kim et al., 2003).

Известно, что семейство ARGOS (или ORGAN SIZE RELATED, OSR) регулирует экспрессию генов, ответственных за размер органов растений (Qin et al., 2014). Ген ARGOS *A. thaliana* определяется как ген индуцируемый ауксином и кодирует белки OSR. Сверхэкспрессия гена ARGOS у *A. thaliana* приводит к увеличению размера боковых органов за счет продолжительной экспрессии транскрипционного фактора AINTEGUMENTA, влияющий на пролиферацию клеток за счет регуляции экспрессии гена *Cyclin D3;1* (*CycD3;1*) во время роста органов (Krizek, 1999; Mizukami, Fischer, 2000; Hu et al., 2003). В геноме *A. thaliana* определен гомолог ARGOS именуемый ARGOS-LIKE (ARL), и отмечено, что ARL отвечает за регуляцию роста органов, влияя на рост клеток растяжением (Hu et al., 2006). Wang с соавт. (2009) в исследовании генома *Oryza sativa* показали наличие копии ортолога гена ARGOS - *OsARGOS*, а подробный клеточный анализ трансгенных растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих данный ген, показал, что *OsARGOS* влияет на увеличение размера органов, способствуя как делению, так и растяжению клеток.

Ген ARGOS в кукурузе существует в виде восьми копий. Guo и др. (2014) отметили положительный эффект действия сверхэкспрессии *ZmARGOS1* на рост органов кукурузы и повышение урожайности этой культуры. В тоже время авторы сообщают о положительном действии гена ARGOS кукурузы при абиотическом стрессе (Guo et al., 2014). Например, сверхэкспрессия *ZmARGOS1* и *ZmARGOS8* *A. thaliana* и кукурузы повышает устойчивость к засухе этилен-зависимым путем регуляции. Было отмечено, что сверхэкспрессия гена *ZmARGOS8* обуславливает более высокий урожай, чем контрольные растения, как в условиях засухи, так и в условиях хорошего

полива (Shi et al., 2015). Похожие результаты были получены у Zhao и др., (2017), которые выделили гомологичные гены пшеницы *TaARGOS* и доказали их участие в прорастании семян, росте проростков и устойчивости к абиотическим стрессам (Zhao et al., 2017).

Дальнейшие исследования показали, что семейством генов *ARGOS* кодируются белки, представляющие собой негативные регуляторы передачи сигнала этилена (Shi et al., 2015). Было показано, что сверхэкспрессия генов *ZmARGOS1*, *ZmARGOS8*, *AtOSR1* и *AtOSR2* снижают чувствительность растений *A. thaliana* к этилену, тем самым повышают устойчивость растений к засухе. Ген *ARGOS* взаимодействуя с сигнальным комплексом рецептора этилена посредством белков RTE и RTL, осуществляет рецепцию и трансдукцию этиленового сигнала (Shi et al., 2016).

Таким образом, увеличение биомассы у растений со сверхэкспрессией генов *ARGOS* позволяет планировать работы по их использованию в качестве целевых в генной инженерии для повышения урожайности и стрессоустойчивости.

### **1.7. Азид натрия - химический мутаген, используемый в селекции растений**

С целью получения новых сортов с высокой урожайностью и устойчивостью к неблагоприятным условиям среды широко применяются химические мутагены (Adamu, Aliyu, 2007; Al-Qurainy, Khan, 2009).

В результате исследований различных типов мутагенов установлено, что эффективность мутагена зависит от вида и сорта культурного растения. Безусловно, эффективность мутагена также обусловлена его химической или физической природой, а также концентрацией действующего вещества и дозы воздействия. Так, Dassharma и др., (2015) на двух моделях растений *Pisum sativum* L. и *Hordeum vulgare* L. показали изменения в генетическом аппарате клетки в результате воздействия химических мутагенов и УФ

облучения. В целом, авторы указывают на зависимость увеличения количества хромосомных аномалий от концентрации мутагена или времени экспозиции. При этом хромосомных аномалий у *H. vulgare* было установлено больше, чем у *P. sativum* (Dassharma et al., 2015). Bala и др., (2018) сообщили о влиянии разных концентраций азидата натрия на морфологические характеристики томатов *Solanum lycopersicum* Mill сортов Roma и UC82B. Авторами сделан вывод, что сорт UC82B отличался лучшими показателями, а концентрация азидата натрия в 0.1 мМ является оптимальной для индуцирования изменчивости с целью улучшения параметров роста и урожайности у томатов (Bala et al., 2018).

В настоящее время эффективным и широко используемым растительным мутагеном является азид натрия. Мутагенный эффект его достигается в кислой среде при pH=3 и обусловлен образованием и облегченным проникновением через мембрану клетки незаряженной молекулы азидоводорода (HN<sub>3</sub>). Активация мутагенного воздействия в клетке связана с образованием органического азидата - L-азидоаланина (Owaís, Kleinhofs, 1988). Наиболее известным эффектом азидата натрия на геномы растений является замена GC на AT или AT на GC, что не сопровождается сдвигом рамки считывания. Это способствует сохранению биологических свойств белка из-за изменения в аминокислотном составе, но может приводить к изменению его функциональности (Suprasanna et al., 2015).

Необходимо отметить, что для азидата натрия, как и любого мутагена, также известны токсические эффекты на физиологию растений. Азид натрия широко известен тем, что подавляет дыхательные процессы, происходящие в клетках живых организмов (Khan et al., 2009), поскольку его соединения вызывают ингибирование каталазы, пероксидазы и цитохромоксидазы (Suzuki et al., 2022). Данный мутаген оказывает влияние на протон-транслоцирующий АТФ-азный комплекс, катализирующий в мембранах хлоропластов и митохондрий конечную стадию фото- или окислительного фосфорилирования. Вследствие этого возникает сокращение выработки

молекул АТФ, что влечет за собой снижение синтеза ДНК, РНК и белка в клетке. Например, в результате исследований Grant и Salamone (1994) установили токсический эффект азид натрия для животных и растительных клеток, заключающийся в ингибировании синтеза белка и репликации ДНК (Grant, Salamone, 1994). Кроме того, дефицит АТФ может быть одной из причин снижения митотического индекса. Установлено, что азид натрия снижает уровень клеточного кальмодулина (Osborn, Weber, 1980), представляющего собой кальций-связывающий белок, необходимый для передачи сигнала и деления клеток. Что касается мутагенного эффекта, то доказана способность азид натрия индуцировать хромосомные aberrации, такие как транслокации, хромосомные мосты, отстающие или липкие хромосомы (Siddiqui et al., 2007; Maxim et al., 2009). Азид натрия способен вызывать мутации у многих культур. В своем исследовании Maxim и др., (2009) указывают на цитогенетические изменения в клетках кончиков корней лекарственного культурного растения *Carum carvi* L. после обработки раствором азид натрия. В ходе данной работы, авторы установили снижение митотического индекса и увеличение хромосомных aberrаций (Maxim et al., 2009). Mostafa (2011) в своей работе изучал влияние азид натрия на рост подсолнечника *Helianthus annuus* сортов Giza 1 и 102. В ходе эксперимента были обнаружены изменения формы листьев и соцветий. Влияния азид натрия на количественные и качественные признаки стебля было изучено у четырнадцати генотипов эфиопского кунжута (*Sesamum indicum* L.). Авторами получено большое генетическое разнообразие этой культуры со значительными различиями между генотипами из-за воздействия химического вещества (Weldemichael et al., 2021).

Химически индуцированный мутагенез азидом натрия ведет к возникновению изменений в геноме, способствующих улучшению свойств многих культурных растений (Adamu, Aliyu, 2007). Hoda, Gehan (2014) на садовом декоративном растении *Browallia speciosa* отметили увеличение

количества ветвей и листьев, содержания хлорофилла, сырой и сухой массы, изменение окраски цветка, формы листьев в мутантных поколениях  $M_1$  и  $M_2$ .

Omoregie с соавт. (2023) изучили влияние азид натрия на параметры роста и урожайности риса *O. sativa* сортов FARO44, FARO52 и FARO57. Были установлены самый высокий процент прорастания и наибольшее количество метелок на растении при сборе урожая у сортов FARO44 и FARO52. Мутагенез азидом натрия позволил увеличить урожайность томата (Kumar et al., 2023), пшеницы (Haridy et al., 2022), чечевицы (Raina et al., 2022), гороха (Bansod et al., 2022).

Таким образом, согласно данным литературы, азид натрия – это эффективный и дешевый химический мутаген, широко используемый в селекции растений для увеличения уровня генетического полиморфизма и получения новых форм с хозяйственно-ценными признаками.

## Заключение к главе 1

Амарант приобрел популярность благодаря своей целебной и питательной ценности (Bressani, 1990). Кроме того, он привлекает внимание исследователей благодаря своей стойкости к неблагоприятным условиям произрастания по сравнению с другими зерновыми, в том числе, злаковыми культурами (Jefferson, 2007). Для зерна амаранта характерен уникальный состав углеводов, белков и жиров. Он содержит белок с высокой биологической ценностью и биодоступностью (George et al., 2006; Vodroza-Solarov et al., 2008). Отмечено, что в зерне амаранта высокий уровень содержания лизина 3.2–18% - незаменимой аминокислоты, которой так мало в большинстве других злаков (George et al., 2006). Зерно амаранта также богато ненасыщенными жирными кислотами, особенно линолевой кислотой (Mburu et al., 2011).

Актуальной задачей аграрной индустрии является получение высоких объемов урожая сельскохозяйственных культур растений. В связи с

продолжающимися глобальными изменениями климата также возрастает актуальность создания стрессоустойчивых форм амаранта. Для достижения этих целей могут быть применены классические методы селекции, индуцированный мутагенез и современные методы геномной инженерии. Наибольший интерес для России представляет амарант багряный (*A. cruentus*), методы химического мутагенеза для которого пока не применялись. Поэтому представляет большой интерес проведение экспериментов по обработке семян этого амаранта азидом натрия, при этом могут быть получены мутантные линии с хозяйственно-ценными признаками. Любопытно, что для *A. cruentus* до начала наших исследований о генетической трансформации не сообщалось, хотя для других видов амарантов эти технологии были применены. Поэтому представлял большой интерес испытание и оптимизация методов генетической трансформации на отечественных сортах *A. cruentus*. В качестве целевого было решено использовать ген *ARL*, сверхэкспрессия которого на других видах растений способствовала увеличению продуктивности и стрессоустойчивости. С другой стороны, важно проводить физиолого-биохимические исследования полученных мутантных линий и трансгенных растений амаранта. В цитируемой литературе, к сожалению, уделяется недостаточно внимания на исследования генетически измененных форм и линий амаранта. Такие исследования позволяют получить ряд фундаментальных данных о механизмах регуляции роста и стрессоустойчивости растений. Также большой интерес представляет изучение генетически трансформированных форм амаранта на изменения в липидном составе семян и состоянии компонентов антиоксидантной системы.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования, бактериальные штаммы и векторы

В качестве объекта исследования для работ по получению мутантных линий амаранта был использован вид *A. cruentus* L. сорта Багряный (Агросервер, Россия) (Таипова, Кулуев, 2021).

Для опытов по агробактериальной трансформации были использованы растения амаранта двух видов: сорный (щирица) – *A. retroflexus* L., произрастающий на территории Республики Башкортостан, и зерновой - *A. cruentus* L. сорта Багряный (Агросервер, Россия).

С целью получения трансгенных форм амаранта использовали бактерии *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0 с бинарным вектором pCambia 1301, в который дополнительно клонированы 35S кассета с целевым геном *ARGOS-LIKE*. Также в работе использован тот же вектор с целевым геном *ARGOS-LIKE*, находящийся под контролем промотора вируса мозаики георгина (Кулуев и др., 2016; Таипова и др., 2020).

### 2.3. Подбор концентраций азидата натрия

При подборе концентрации азидата натрия опирались на общепринятый метод (Adamu, Aliyu, 2007), заключающийся в предварительном замачивании семян *A. cruentus* в дистиллированной воде в течение 8 часов с последующим подсушиванием на воздухе в течение 1 часа. Далее семена выдерживали в растворе азидата натрия различных концентраций (40, 20, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 и 0.1 мМ) в фосфатном буфере pH 3 в течение 5 часов. Для удаления мутагена семена промывали дистиллированной водой 8-10 раз. Контрольные же варианты семян замачивали только в фосфатном буфере pH 3. Подготовленные таким образом семена проращивали на увлажненном листе фильтровальной бумаги при комнатной температуре. На каждый вариант

концентрации мутагена использовали по 100 семян. Полив производили каждые два дня чистой дистиллированной водой. Проростки пересаживали в вегетационные сосуды объемом 500 мл с универсальным грунтом “Terra vita”, выращивали растения в лабораторных условиях при интенсивности света  $35 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с.}$ , температуре  $+25^\circ\text{C}$ , длине дня 16 часов. С целью определения оптимальной концентрации азиды натрия для получения мутантных линий амаранта опыт проводили в двух повторностях. За оптимальную концентрацию было принято считать ту, которая по токсическому эффекту будет близка к полублетальной дозе  $\text{ЛД}_{50}$ .

В результате обработки разными концентрациями азиды натрия были получены мутантные линии № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, что соответствует использованным концентрациям 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 20, 40 мМ азиды натрия для мутагенеза (Таипова, Кулуев, 2021).

#### **2.4. Измерение морфометрических параметров у линий *A. cruentus*, полученных обработкой семян мутагеном азидом натрия**

Морфометрические показатели отражают влияние мутаций на фенотип растения. Для этого через месяц выращивания растений поколения  $M_2$  на почве измеряли длину стебля проростков *A. cruentus*, а показатели длины и ширины листа определяли через два и три месяца выращивания. Выборка при морфометрическом анализе через 1, 2 и 3 месяца вегетации составила 15 растений на каждый вариант. Также рассчитали всхожесть семян амаранта в процентах, в зависимости от использованных для обработки концентраций мутагена (100 шт. - 100%), по отношению к контролю. Второе поколение ( $M_2$ ) для морфометрического анализа выращивали в полевых условиях. У первого и второго поколения определяли массу семян (Вавилов и др., 1983).

Полученные результаты эксперимента представляли в виде гистограмм или таблиц со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех

экспериментах оценивали при помощи U-критерия Манна-Уитни. Для оценки различий между всеми анализируемыми линиями амаранта использовали LSD-тест (Таипова, Кулуев, 2021).

## **2.5. Определение содержания общего растворимого белка**

Содержание общего растворимого белка (ОРБ) измеряли в соответствии с методикой Бредфорда (Bradford, 1978), используя бычий сывороточный альбумин (BSA) в качестве стандарта белка для построения калибровочной кривой. Образцы семян амаранта экстрагировали в буфере, состоящем из 50 мМ Na-фосфатного буфера (pH7.0), 0.1 мМ ЭДТА, 0.1% тритона X-100, 10 мМ меркаптоэтанола. Измеряли поглощение при 595 нм (Таипова и др., 2022).

## **2.6. Анализ липидов и жирных кислот**

Липиды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1:2) с одновременным механическим разрушением тканей (Кейтс, 1975). Разделение липидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Количество мембранных фосфолипидов (ФЛ) и запасных нейтральных липидов (НЛ) определяли денситометрическим методом, используя программу Денскан-04 «Ленхром» (Россия). Хроматограммы анализировали в режиме параболической аппроксимации по градуировочным зависимостям, используя фосфатидилхолины (ФХ), спирты и стеринны (СТ) в качестве стандартов.

Метанолиз жирных кислот (ЖК) осуществляли кипячением в 5%-ном растворе HCl в метаноле. Полученные эфиры анализировали на хроматографе Кристалл 5000.1 «Хроматэк» (Россия) в изотермическом режиме с использованием капиллярной колонки длиной 105 м и диаметром 0,25 мм «RESTEK» (США). Температура колонки – 180°C, испарителя и

детектора – 260°C, скорость тока газа-носителя (гелий) – 2 мл/мин (Таипова и др., 2022).

## **2.7. Оценка генетического полиморфизма мутантных линий амаранта**

Для генетического анализа семена опытных линий амаранта проращивали в вегетационных сосудах объемом 500 мл с универсальным грунтом “Terra vita” в лабораторных условиях при интенсивности света 350 мкмоль/м<sup>2</sup> с, температуре +25°C, длине дня 16 часов. Для выделения ДНК использовали по 50 мг высушенных листьев амаранта. С целью выявления возможного полиморфизма особей в каждой линии анализировали по 3-5 растений. ДНК выделяли стандартным ЦТАБ-методом (Doyle et al., 1987) (параграф 2.21). SSR-анализ амаранта M<sub>3</sub> проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (параграф 2.25).

Выявленные аллели получили условные обозначения буквами латинского алфавита. Последовательности праймеров приведены в табл. 1, параграф 2.25 (Таипова и др., 2023).

## **2.8. Анализ антиоксидантной системы *A. cruentus***

Для проведения биохимического анализа стресс опосредованных изменений антиоксидантной системы растений амаранта выращивали в течении 30±1 дней в условиях действия стресс-фактора. Активность всех ферментативных систем была пересчитана на мг общего растворимого белка. Все остальные показатели пересчитывали на 1 г сырой массы. Все биохимические исследования по определению активности антиоксидантной системы имели по меньшей мере 15 повторностей (n≥15) (Таипова и др., 2023).

## 2.9. Определение активности каталаз

Каталазы (КАТ) экстрагировали в растворе Серенсена (50 мМ рН 7.0) с добавлением тритона X-100 (0.1%) и ЭДТА (0.1 мМ) (Panchuck et al., 2002). Реакционная смесь включала 100 мкл супернатанта и 2 мл 0.15%  $H_2O_2$ . Реакцию останавливали через 10 мин путём добавления 1 мл 4% молибдата аммония (Полевой, Максимов, 1978). Измерения проводили при 410 нм. Активность КАТ вычисляли относительно оптической плотности холостой пробы (Таипова и др., 2023).

## 2.10. Определение активности супероксиддисмутаз

Для определения активности супероксиддисмутаз (СОД) применяли метод, основанный на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксид-анионы, образующиеся в результате аэробного взаимодействия НАДФ и феназинметасульфата (ФМС) (Чевари и др., 1985). В результате реакции НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия. В качестве экстрагирующего буфера использовали натрий-фосфатный буфер (150 мМ; рН7,8), который перемешивали с реакционным буфером (раствор А (0,3 мМ ФМС, 0,6 мМ НСТ, 150 мМ натрий-фосфатного буфера рН7,8): раствор В (0.115 мМ НАДФ, 2 мМ Трис-ЭДТА в объемном соотношении 20:1) в объемном соотношении 1:40. Измерения проводили через 10 мин при 540 нм относительно чистого реакционного буфера. На основании калибровочной кривой по расчетному проценту торможения степени восстановления НСТ оценивали содержание фермента в исследуемой пробе (Таипова и др., 2023).

### 2.11. Определение активности аскорбатпероксидаз

Навеску листьев амаранта растирали в микропробирках в 200 мкл экстракционного буфера (рН 7,8) и общий объем доводили до 1 мл, далее гомогенат центрифугировали 5 минут при 12 тыс. об/мин, а полученный супернатант хранили в холодильнике при +4 °С и использовали для оценки активности аскорбатпероксидаз (АПОК).

Реакционная смесь для анализа состояла из 20 мкл 50 мМ К, Na-фосфатного буфера (рН 7,0), 30 мкл раствора аскорбиновой кислоты, 30 мкл раствора ЭДТА и 10 мкл супернатанта. Реакция активировалась путем внесения в лунку с реакционной смесью 30 мкл 0,06% раствора  $H_2O_2$ . Анализ оптической плотности полученного раствора проводили при  $\lambda = 290$  нм через каждые 10 сек в течение 150 сек. Активность фермента АПОК рассчитывалась по формуле (Verma, Dubey, 2003; Таипова и др., 2023).

### 2.12. Определение активности глутатион-S-трансфераз

Листья амаранта растирали с помощью пестика в 100 мкл экстракционного буфера, затем доводили объем до 1 мл. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 минут при 10 тыс. об/мин. Для оценки активности фермента глутатион-S-трансферазы (GST) использовали полученный супернатант.

Реакционная смесь состояла из 200 мкл 0,1 М К, Na-фосфатного буфера, 200 мкл 0,015 М раствора GSH и 100 мкл супернатанта. Реакция начиналась после внесения в кювету 200 мкл 0,015 М раствора ХДНБ. Контрольная проба состояла из тех же растворов, но без добавления ХДНБ. В ходе реакции происходит увеличение глутатион-S-конъюгатов, которые образуются между GSH и 1-хлор-2,4-динитробензолом, которые

регистрируются спектрофотометрически при  $\lambda = 340$  нм каждые 3 сек в течение 1.5 минут при температуре +25 °С. Расчет активности GST осуществляли по формуле (Habig et al., 1974; Таипова и др., 2023).

### **2.13. Определение содержания малонового диальдегида**

Количество малонового диальдегида (МДА) в навеске определяли с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Экстракцию проводили в 80% этаноле, центрифугировали при 12000 g 10 мин. После чего супернатант делили на 2 равные части, в одну часть добавляли равный объем 20% ТХУ + 0.5% ТБК, в другую – 20%ТХУ. Оптическую плотность измеряли при 440, 532 и 600 нм (Taylor et al., 2007) и вводили поправки на сахара и другие неспецифические вещества (Таипова и др., 2023).

### **2.14. Определение содержания пролина**

В экспериментах использовали метод определения пролина, основанный на работе Bates (1973) с модификациями от Khedr с соавт. (2003). Экстрагировали пролин с помощью 3% сульфосалициловой кислоты, центрифугировали при 8000 g 10 мин. Реакционная смесь состояла из супернатанта, ледяной уксусной кислоты, нингидринового реактива (140 мМ нингидрин, 5 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 2,4 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), которые смешивали в объемном соотношении 1:1:1 и держали в кипящей водяной бане 1 час. После охлаждения в реакционную смесь добавляли равный объем толуола и спектрофотометрировали толуоловый слой при 520 нм. Концентрацию пролина в пробе рассчитывали по калибровочной кривой (Таипова и др., 2023).

### **2.15. Общая антиоксидантная способность**

Основной вклад в формирование общей антиоксидантной способности (ОАС) вносят витамины Е и С, каротиноиды, флаваноиды и производные коричной кислоты (Prieto et al., 1999). ОАС оценивалась на этанольных (80%) экстрактах по восстановлению Mo(VI) до Mo(V) при кислом pH. Экстракт перемешивали с реагентом (0,6 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 28 мМ Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>) в объемном соотношении 1:10 (соответственно) и инкубировали при 95°C 90 мин. После охлаждения до комнатной температуры, измеряли оптическую плотность при 695 нм относительно 80% метанола. Калибровочную кривую составляли по аскорбиновой кислоте, результаты выражали в мг эквивалентов аскорбиновой кислоты в 1 г сырого веса (Boestfleisch et al., 2014; Таипова и др., 2023).

## **2.16. Определение относительного содержания воды**

Показатель относительного содержания воды (Relative Water Content, RWC) определяли у растений, выращенных в течение 30 дней на почве, при этом опытные варианты не поливали 10 дней. Первым определяли показатель сырая масса (Fresh Weight, FW). Затем гидратировали в деионизированной воде в течение 4 часов при 25 градусах. Подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 3 минут и немедленно взвешивали для получения данных о тургорной массе (Turgid Weight, TW). Эти растения подвергали сушке 24 часа при 80°C и взвешивали сухую массу (Dry Weight, DW). Показатель Relative water content (RWC) рассчитывали по формуле:  $RWC (\%) = (FW - DW) / (TW - DW) \times 100$  (Lü et al., 2013; Таипова и др., 2023).

## **2.17. Определение площади поверхности листа с помощью программного обеспечения Easy Leaf Area**

Площадь поверхности листа была определена у опытных линий амаранта после воздействия на растения искусственно созданными

стрессовыми факторами в течение 14 дней: засухой и засолением. Площадь листьев определяли методикой описанной Easlon, Bloom (2014). Лист растения помещали на белую бумагу вместе с кусочком красной бумаги размером 2 x 2 см и делали снимок. Подготовленные таким образом изображения листьев были помещены в программное обеспечение Easy Leaf Area (Easlon, Bloom, 2014) для определения площади поверхности листа (Таипова и др., 2023).

### **2.18. Агробактериальная трансформация *A. retroflexus* методом погружения цветков**

В работе использовали бактерии *A. tumefaciens* штамма AGL0, содержащие генно-инженерную конструкцию гена *ARL* под контролем промотора вируса мозаики георгина в бинарном векторе pCambia 1301 (Михайлова, Кулуев, 2015). Трансгенные растения амаранта *A. retroflexus* получали методом погружения цветков (floral dip) (Clough, Bent, 1998). Амарант проращивали из семян при искусственном освещении в почвенном грунте в сосудах объемом 450 мл. Трансформацию осуществляли начиная с момента перехода к стадии бутонизации и до наступления периода интенсивного цветения. Агробактерии, содержащие целевую генно-инженерную конструкцию заранее проращивали в течение суток на среде LB при температуре 27°C. Далее агробактерии центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин, выливали осветленную питательную среду и осадок ресуспендировали в растворе, содержащем 0.075 мкМ ацетосирингона (Sigma-Aldrich, США), 0.1% Silwet Gold (Chemtura, USA), 100 нг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 30г/л сахарозы. Для трансформации амаранта концентрация реагента Silwet Gold была увеличена в 2 раза по сравнению с составом агробактериальной суспензии, использованной для рапса (Михайлова, Кулуев, 2015), так как соцветия амаранта содержат большое количество гидрофобных волосков.

Соцветия амаранта с бутонами и молодыми цветками погружались в 50 мл емкость с суспензией на 1-2 минуты, затем оборачивались полиэтиленовой пленкой на сутки для предотвращения высыхания суспензии и для обеспечения оптимальных для проникновения агробактерий условий. После созревания осуществлялся ручной сбор семян (Кулуев и др., 2016).

### **2.19. Селективный отбор трансгенных проростков *A. retroflexus***

Первичный отбор трансгенных проростков амаранта осуществлялся путем выдерживания семян в растворе гигромицина с концентрацией 150 мг/л в течение двух суток. После этого семена без предварительной обработки и промывки высаживались в четырёхлитровые емкости с грунтом Terra vita (Россия) по 100 семян. Семена проращивали в климатокамере Binder (Германия) при температуре 23°C с освещенностью 5 клк и фотопериодом 16/8 часов (свет/темнота).

У проростков амаранта в результате обработки семян гигромицином наблюдалось лишь отставание в росте и некоторые признаки хлороза на листьях, при этом полного побеления первых настоящих листьев не происходило, как в случае с рапсом в работе (Михайлова, Кулуев, 2015). Таким образом, в течение первых 2 недель проращивания количество проростков в каждой емкости сокращали примерно с 80–90 до 20–30 штук. Через 3 недели после посева семян проростки амаранта дополнительно опрыскивали раствором антибиотика с концентрацией 150 мг/л. Через 5 суток после обработки проводили дополнительный визуальный отбор устойчивых к гигромицину проростков (без признаков хлороза на листьях) и в итоге в каждой емкости оставалось не более 10 проростков, которые использовали для ПЦР-анализа (Кулуев и др., 2016).

## 2.20. Выделение растительной ДНК методом солевой экстракции

Для быстрого выделения геномной ДНК использовали метод солевой экстракции (Aljanabi, Martinez, 1997). Для этого около 50-60 мг (1 см<sup>2</sup>) листа растения гомогенизировали на гомогенизаторе Minilys (Bertin Technologies) в 400 мкл солевого буфера (0.4 М NaCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 2 мМ ЭДТА). Затем добавляли в эту смесь 40 мкл 20% SDS и 400 мкг/мл протеиназы К и тщательно перемешивали. После этого образцы инкубировали при 55-65°C в течение 1 часа, добавляли 300 мкл 6М NaCl, перемешивали и центрифугировали 30 мин при 12 тыс. об/мин и температуре 4°C в центрифуге с охлаждением. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли эквивалентное количество изопропанола, перемешивали и смесь инкубировали при -20°C в течение 1 часа.

Затем образцы снова центрифугировали при тех же условиях. Осадок промывали 2 раза 70% этиловым спиртом и растворяли его в 30-40 мкл стерильной деионизированной воды (Milli-Q). После этого с выделенной ДНК проводили полимеразную цепную реакцию (Кулуев и др., 2016).

## 2.21. Выделение ДНК из растительного материала при помощи ЦТАБ

Тотальную ДНК из листьев предполагаемых трансгенных растений выделяли с помощью ЦТАБ-метода (Doyle J.J., Doyle J.L., 1990) с некоторыми модификациями для удаления фенольных соединений. Буфер для экстракции ДНК готовили на основе 0.1 М трис(гидроксиметил)аминометана (далее «трис») гидрохлорид (Трис-HCl (pH8,0)), включал 20 г/л цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), 1.4 М NaCl, 13.75 г/л поливинилпирролидона, 0.05 М аскорбиновой кислоты, 0.04 М этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA). 200 мг свежего материала растирали в ступках, охлажденных до 4°C, в буфере для экстракции до

гомогенной массы, переливали в 1.5 мл микропробирки типа Eppendorf и инкубировали при 65°C на твердотельном термостате 80 минут периодически перемешивая. После чего образцы охлаждали до 4°C и очищали хлороформом. Для разделения фаз центрифугировали при 8000 g 2 мин и из водной фазы ДНК осаждали изопропанолом. Дополнительную очистку ДНК проводили с использованием 2.5 М ацетата аммония в ТЕ (Трис-EDТА (рН8.0)) буфере. Пересаживание ДНК проводили с использованием этилового спирта. Осадок промывали 80% этиловым спиртом и растворяли в воде. После чего для подтверждения наличия ДНК ставили электрофорез в агарозном геле. Образцы ДНК хранили при -20°C (Таипова и др., 2023).

## **2.22. Морфометрическая характеристика трансгенных растений *A. retroflexus***

Морфометрический анализ трансгенных растений проводился для изучения влияния экспрессии целевого гена на фенотип. Для этого у трансгенных растений амаранта третьего поколения через 2 месяца в период цветения определяли длину стебля и длину трех самых крупных листьев. Также измеряли длину главного корня и определяли сырую массу всего растения. Выборка составила 15 растений для каждой линии. Статистический анализ проводили при помощи программ Statistica 6.0 и MS Excel 2003. Для оценки морфометрических различий между выборками контрольной и опытной групп растений использовали U-критерий Манна–Уитни (Кулуев и др., 2016).

## **2.23. Введение в культуру *in vitro* и микрочлониальное размножение *A. cruentus***

Семена *A. cruentus* сорта «Багряный» (Агросервер, Россия) предварительно стерилизовали при помощи этилового спирта (1 мин) и

белизны (8 мин), промывали стерильной дистиллированной водой 5–6 раз. Для работы использовалась белизна ООО «Башбытпром» (Стерлитамак, Россия), представляющая собой 15% раствор гипохлорита натрия. Семена проращивали на среде, содержащей половину солей МС, витамины Гамборга и 30 г/л сахаразы, при температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$  и интенсивности света  $35 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2\cdot\text{с})$ . Через 2 дня наблюдали прорастание семян. Затем их выращивали до появления эпикотилей примерно десять дней. Подготовленные в стерильных условиях экспланты из листовых дисков, эпикотилей и гипокотилей культивировали на регенерационной среде с добавлением регуляторов роста 13 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 1 мкМ нафтилуксусной кислоты (НУК). Укоренение регенерантов проводили на среде МС с добавлением 2 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК). Далее укоренившиеся побеги были использованы для оптимизации методов акклиматизации растений к условиям почвы и открытого воздуха. Для этого амаранты переносили в вегетационные сосуды объемом 450 мл, заполненные увлажненным универсальным грунтом Terra vita (Россия). Сверху растения накрывали прозрачными пластиковыми сосудами и выращивали растения в условиях отсутствия дополнительного освещения при комнатной температуре. Через неделю прозрачные пластиковые сосуды убрали и переносили растения в обычные условия световой комнаты (при температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$  и интенсивности света  $35 \text{ мкмоль}$  на кв. м в сек.) (Таипова, Кулуев, 2018).

## **2.24. Агробактериальная трансформация эксплантов эпикотилей**

### ***A. cruentus***

В работе использовали генно-инженерную конструкцию  $35S::ARL$ , содержащую целевой ген *ARGOS-LIKE* из *A. thaliana* (Кулуев и др., 2013). Для опытов по агробактериальной трансформации растений амаранта использовали семена *A. cruentus* сорта «Багряный» (Агросервер, Россия),

которые были подготовлены к этапу сокультивации агробактериями по вышеописанному методу стерилизации и культивирования на регенерационной среде. Для инокуляции эксплантов амаранта использовали культуру клеток штамма *A. tumefaciens* AGL0, несущую генно-инженерную конструкцию *35S::ARL* в векторе pCambia 1301 (Кулуев и др., 2013), которую культивировали в 15 мл жидкой среды LB, содержащей рифампицин и канамицин, на орбитальном шейкере при температуре 28°C и скорости вращения 180 об/мин. Нарращивание агробактерий продолжали до достижения оптической плотности, соответствующей концентрации  $2-3 \times 10^8$  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 MS. Затем сегменты, предварительно подвергнутые поранению, погружали в бактериальную суспензию 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 2 суток, по истечении которых их промывали раствором антибиотика цефотаксима (300 мг/л) и переносили на селективную среду MS с теми же регуляторами роста (БАП и НУК) с аналогичными концентрациями и антибиотиками цефотаксимом – 300 мг/л и гигромицином В (Gold Biotechnology, США) – 10 мг/л. Экспланты, на которых на селективной среде начинали регенерировать побеги, были пересажены на среду MS с 2 мкМ БАП и гигромицином В (10 мг/л). Укоренение полученных в ходе работы регенерантов проводили на среде MS с добавлением 2 мкМ 3-индолилуксусной кислоты (ИУК) и гигромицина В в концентрации 10 мг/л. Укоренившиеся растения были акклиматизированы к условиям почвы и открытого воздуха по вышеописанной методике (Таипова и др., 2020).

## 2.25. Полимеразная цепная реакция

Для молекулярно-генетического анализа мутантных линий и трансгенных форм *A. cruentus* ПЦР проводили в амплификаторе «Т-100» («Bio-Rad Laboratories», США). Конечный объем реакционной смеси составлял 30 мкл и содержал 1 мкл раствора тотальной ДНК, 1 мкл раствора DreamTaq™ PCRMasterMix («ThermoFisher Scientific», Литва), по 2 мкл каждого из пары праймеров («Евроген», Россия) и 20 мкл стерильной деионизированной воды. Также для ПЦР использовали Taq-полимеразу фирмы Евроген (Россия).

Условия амплификации с помощью микросателлитных маркеров по трем SSR-локусам были следующими: начальная денатурация при 94°C – 3 мин; 35 циклов: денатурация при 94°C – 40 с, отжиг праймеров при 50/55°C – 50 с, элонгация при 72°C – 50 с.; конечная элонгация при 72°C – 5 мин. Температуру плавления праймеров (T<sub>m</sub>) определяли с помощью программы Primer Select (DNAS<sub>t</sub>ar, США).

Характеристика микросателлитных маркеров, использованных для молекулярно-генетического анализа, представлена в таблице 1.

**Таблица 1. SSR-маркеры, использованные для молекулярно-генетического анализа линий *A. cruentus* (по Suresh et al., 2014)**

SSR-маркер	Последовательность праймера	Число аллелей*	Температура отжига, (°C)	Размер ампликона, пн
GB-АММ-099	F: 5'-AAATTGACAATGCGCAGC-3' R: 5'-TTCCTCACCAAATGCC-3'	18	50	125–161
GB-АММ-132	F: 5'-AACTTTTGCCCTCTGCAA-3' R: 5'-TCAAATGCTGATCCCAGG-3'	21	55	102–153
GB-АММ-137	F: 5'-CGAAGATCATGGGTTTGC-3' R: 5'-TTGAGAATAAGGCGTTGACA-3'	13	55	194–227

\*Согласно данным Suresh et al., 2014.

Для ПЦР-идентификации гена *ARL* использовали праймеры ARLPCRf 5'-TCTACAAAACGACATCATAAACAT-3' и ARLPCRr 5'-ACATAAAAGTGGAAGAAGAAGAAA-3'. Для поиска 35S промотора, содержащегося в Т-ДНК вектора pCambia 1301, применяли праймеры 35SF 5'-CCTAACAGAACTCGCCGTAAAGAC-3' и 35SR 5'-TTGCGAAGGATAGTGGGATTGTG-3'. Для определения качества выделенной ДНК проводили предварительный ПЦР-анализ с целью детекции гена ацетолактатсинтазы амаранта (AF363369) с использованием праймеров ALSF 5'-CTCCTCCGCTACTATAACTCAAT-3' и ALSR 5'-TCAGCAAGACCAGAAACAAGAT-3'. Для исключения возможной контаминации агробактериями анализируемых трансгенных растений дополнительно проводили ПЦР-анализ на наличие хромосомного гена *proA* *A. tumefaciens* (AF111855.1), при этом использовали праймеры AtumefF TTCTGTTGTCTTCTCTGCGTGGTG и AtumefR CGATTCTTCTTCTGCTTCSTTCTG.

ПЦР проводили по различным схемам, в зависимости от особенностей ДНК-матрицы. В целом, чаще всего использовали следующие параметры ПЦР: 94°C 30-50 сек; 48-60°C – 30-50 сек; 72°C 20 сек – 2,5 минут, 30-35 циклов. После завершения ПЦР проводили агарозный гель-электрофорез (Таипова и др., 2023).

## 2.26. Агарозный гель-электрофорез ДНК

Для электрофоретического фракционирования выделенного тотального ДНК использовали 0.8 % агарозный гель, для анализа размера ампликонов после ПЦР – 1 % агарозу. Анализы проводили в однократном трис-ацетатном (ТАЕ) буфере (Ogden, 1987). После окончания электрофореза гель выдерживали в растворе бромистого этидия (5 мг/л) в течении 8-10 минут, и

фотографировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 294 нм (Таипова Таипова и др., 2020).

### 2.27. Статистическая обработка полученных результатов

Для оценки морфометрических различий между выборками контрольной и опытной групп растений, а также разницы в уровнях экспрессии между разными частями растения или в ответ на внешнее воздействие, использовали U-критерий Манна – Уитни:

$$U = n_1 * n_2 + n_x * (n_x + 1) / 2 - T_x, \text{ где}$$

$n_1$  – количество элементов в первой выборке;

$n_2$  – количество элементов во второй выборке;

$T_x$  – большая из двух ранговых сумм;

$n_x$  – количество элементов в группе с большей ранговой суммой.

Полученное эмпирическое значение сравнивали с критическим значением U-критерия по таблице критических значений U-критерия Манна – Уитни. Если полученное значение  $U$  меньше табличного или равно ему, то признается наличие существенного различия между уровнем признака в рассматриваемых выборках. Достоверность различий тем выше, чем меньше значение  $U$  (Таипова и др., 2016; Таипова и др., 2023).

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из  $n$ -числа повторностей (где  $n \geq 10$ ) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения  $t$ -критерия находили для 95% уровня значимости. Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

Результаты обработаны с использованием стандартных пакетов программы Microsoft Excel 2010.

Результаты множественного сравнения средних сопоставлены с множественным сравнением средних по критерию LSD. Метод LSD - Метод группирования выборок с наименее значимой разницей - Least Significant Difference method (Закс, 1976).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Химический мутагенез *A. cruentus* при помощи азиды натрия

#### 3.1.1. Определение оптимальной концентрации азиды натрия для индукции мутагенеза *A. cruentus*

Отечественными учеными ведутся активные исследования в области селекции для выведения новых хозяйственно-ценных сортов амаранта. Тем не менее, увеличение генетического разнообразия амаранта для целей селекции остается достаточно актуальной задачей, решению которой может способствовать применение методов химически индуцированного мутагенеза (Рапопорт, 1993; Khan et al., 2009).

Для индуцированного мутагенеза сельскохозяйственных культур в качестве химического мутагена часто применяется азид натрия. Важным этапом при работе с мутагеном выступает подбор его оптимальной концентрации для каждой культуры. Так, экспериментальным путем оптимальная концентрация данного мутагена подобрана 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 исследований по увеличению генетической изменчивости амаранта с применением азиды натрия до наших исследований не проводилось. Исходя из этого, была поставлена задача определения оптимальной концентрации азиды натрия для индукции мутаций у *A. cruentus*. Для этого семена амаранта предварительно замачивали в растворе азиды натрия с фосфатным буфером pH 3 в соответствии с методом указанным у Adamu, Aliyu (2007) в течение 5 часов. В данном эксперименте концентрация мутагена имела следующий ряд значений: 40, 20, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 и 0.1 мМ. В качестве же контроля использовали семена, замоченные

только в фосфатном буфере со значением pH 3, и все подготовленные таким образом семена проращивали в чашках Петри (рис. 1а).



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

В ходе эксперимента у семян амаранта была замечена разная длительность времени формирования проростков, зависящая от примененных концентраций азиды натрия для обработки семян. Так, появление проростков у контрольной группы растений, обработанных только фосфатным буфером pH 3, наблюдали на второй день, на четвертые сутки активно проросли семена обработанные азидом натрия в концентрациях от 0.1 до 5 мМ, а на шестой день - обработанные 20 и 40 мМ азидом натрия.

Нами была определена лабораторная всхожесть анализируемых семян амаранта без обработки мутагеном. В целом процент проросших семян в пробе составил в среднем 86%. В то же время нами была предположена существующая вероятность в снижении процента всхожести семян за счет воздействия раствора с кислым фосфатным буфером. Так в данном варианте обработки семян раствором фосфатного буфера без добавления мутагена было показано уменьшение процента всхожести до 41%.

Поскольку все опытные варианты семян *A. cruentus* были замочены в растворе кислого фосфатного буфера, содержащего азид натрия разных концентраций, за контрольный вариант использовали семена выдержанные только в фосфатном буфере с pH 3. В результате проведенных опытов было выяснено, что лабораторная всхожесть зависит от концентрации примененного мутагена. Притом по данным процента всхожести семян прослеживается корреляция снижения образования проростков в зависимости от увеличения концентрации азидата натрия. Например, при обработке семян амаранта 1 мМ раствором азидата натрия процент всхожести составил 12%, а 5 мМ или 40 мМ – снизился до 6% и 1%, соответственно (табл. 2). В целом, по нашим наблюдениям представляется возможным сделать вывод о том, что достичь лучших показателей процента всхожести семян *A. cruentus* удастся при их обработке низкими концентрациями мутагена.

По полученным результатам процента всхожести семян амаранта наблюдается его снижение практически в 2 раза по сравнению с контрольным вариантом при применении мутагена в концентрации 0.5-1 мМ, что позволяет считать данную концентрацию раствора азидата натрия оптимальной для применения в целях индукции мутаций. Азид натрия в концентрации 0.5-1 мМ оказывает отрицательное токсическое и мутагенное воздействие, в то же время позволяет получить довольно значительное количество предположительно мутантных линий амаранта. Таким образом, для обработки семян *A. cruentus* нами установлена полуметальная концентрация азидата натрия, которая лежит в диапазоне 0.5-1 мМ (Таипова, Кулуев, 2021).

Таблица 2. Процент всхожести семян *A. cruentus* после обработки азидом натрия

Мутантная линия	Концентрация NaN <sub>3</sub> , мМ	Общий процент всхожести семян, (%)	Процент всхожести семян по отношению к контролю
	Контроль (фосфатный буфер, pH 3)	41	100
Линия № 1	0.1	24	58
Линия № 2	0.5	22	53
Линия № 3	1	20	49
Линия № 4	2	12	29
Линия № 5	3	8	20
Линия № 6	4	8	20
Линия № 7	5	6	14
Линия № 8	20	1	2
Линия № 9	40	1	2

Азид натрия обуславливает слабую всхожесть семян амаранта и низкую скорость их прорастания. Сходные результаты указаны в исследованиях с ячменем, урдом *Vigna tingo* (L.) Herper, мягкой пшеницей (Cheng, Gao, 1988; Lal et al., 2009; Srivastava et al., 2011), что главным образом связано с токсическим эффектом оказываемым азидом натрия. Действие мутагена проявляется в изменении соотношения фитогормонов, ингибировании процессов на биологическом и физиологическом уровне (Ananthaswamy et al., 1971) и ингибировании митотического процесса (Sato, Gaul, 1967), что безусловно ведет к снижению всхожести семян. Отмечена роль азид-аниона в возникновении мутаций по причине взаимодействия с ферментами и ДНК в клетке. Азид-анионы препятствуют подавлению процесса окислительного фосфорилирования за счет ингибирования активности цитохромоксидаз.

В нашем исследовании подмечено снижение скорости прорастания и процента всхожести, что является следствием ингибирующего действия

азид натрия на функции протонного насоса или же изменений происходящих в митохондриальном мембранном потенциале, в процессе которых утрачивается способность к физиологическому синтезу АТФ (Kleinhofs et al., 1978; Srivastava et al., 2011). Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что важным составляющим в исследованиях по химическому мутагенезу является  $LD_{50}$  – полумлетальная доза действующего вещества. По нашему убеждению, полумлетальная доза позволит соблюсти баланс между мутагенным и токсическим действием азид натрия. В ходе наших экспериментов для семян *A. cruentus* установлена полумлетальная концентрация азид натрия в диапазоне от 0.5 до 1 мМ. Стоит отметить, что при искусственном мутагенезе *Eruca sativa* (Al-Qurainy, 2009) и *Pisum sativum* сорта Pusa Harbhajan (Kumar, 1988) также применялся азид натрия от 0.5 до 1 мМ.

Таким образом, по результатам процента всхожести семян амаранта для целей индукции мутаций у *A. cruentus* нами определена оптимальная концентрация азид натрия, находящаяся в диапазоне от 0.5 до 1 мМ. Азид натрия в концентрации 1 мМ может быть предложена как более предпочтительная, позволяющая получить мутантные линии растения амаранта. Это связано с тем, что используется большая концентрация мутагена, но процент всхожести после не меняется (Таипова, Кулуев, 2021).

### **3.1.2. Морфометрические показатели линий амаранта поколения $M_2$ , полученных после обработки азидом натрия**

Распространенным способом улучшения потенциальных сельскохозяйственных показателей у культурных растений остается использование такого мутагена как азид натрия. Основная его функция связана со способностью вызывать точечные мутации в геноме, что может приводить, при использовании подобранной наиболее эффективной дозы азид натрия для конкретного вида растения, к увеличению урожая.

Некоторые линии, полученные после обработки семян мутагеном азидом натрия, могут характеризоваться повышенной стрессоустойчивостью, лучшими показателями урожая по сравнению с необработанными растениями (Ganesan et al., 2005; Muthusamy et al., 2005; Mensah et al., 2007). Поэтому большой интерес вызывает рассмотрение морфометрических параметров амаранта после обработки азидом натрия, так как изменения фенотипических характеристик могут быть обусловлены действием мутагенного фактора на растительный организм. Однако, чтобы исключить прямое токсическое влияние азидов натрия на растительный организм работы по изучению мутантных растений необходимо проводить во втором и последующем поколениях. Исходя из этих соображений все дальнейшие исследования мутантных растений проводились исключительно во 2 и 3 мутантных поколениях, обозначаемых как  $M_2$  и  $M_3$ .

В ходе работы нами была установлена высота стебля растений амаранта, полученных от семян обработанных азидом натрия в концентрации от 0.5 до 40 мМ, после их тридцатидневного роста на почве (табл. 3). Было отмечено, что проростки из семян после обработки мутагеном имели высоту стебля в среднем в 2 раза ниже по сравнению с контрольным вариантом (табл. 3, рис. 1б). Однако после воздействия 0.1 мМ азидов натрия достоверных различий по высоте стебля не наблюдалось как между проростками, полученными после инкубирования семян в азиде натрия, так и между проростками амаранта и контрольными вариантами проростков (табл. 3).

**Таблица 3. Высота стебля растений амаранта поколения M<sub>2</sub>, полученных после обработки азидом натрия через 30 дней**

<b>Мутантная линия</b>	<b>Концентрация NaN<sub>3</sub> (мМ)</b>	<b>Средняя высота стебля, см</b>
	Контроль (фосфатный буфер, рН 3)	3.5±0.3
Линия № 1	0.1	2.9±0.5
Линия № 2	0.5	1.7±0.4*
Линия № 3	1	1.6±0.1*
Линия № 4	2	1.6±0.2*
Линия № 5	3	1.3±0.2*
Линия № 6	4	1.2±0.3*
Линия № 7	5	1.1±0.1*
Линия № 8	20	1.5±0.2*
Линия № 9	40	1.9±0.3*

\* - p<0.01

Таким образом, полученные результаты исследования позволяют предположить, что для индуцированного мутагенеза *A. cruentus* возможно применение азида натрия в концентрациях превышающих 1 мМ.

После периода роста растений в полевых условиях дальнейшая работа заключалась в измерении с интервалом в 60, а затем 90 дней высоты стебля, ширины и длины трех самых крупных листьев амарантов, полученных при обработке оптимальными концентрациями мутагена, а затем была проведена статистическая обработка этих измерений (рис. 2).

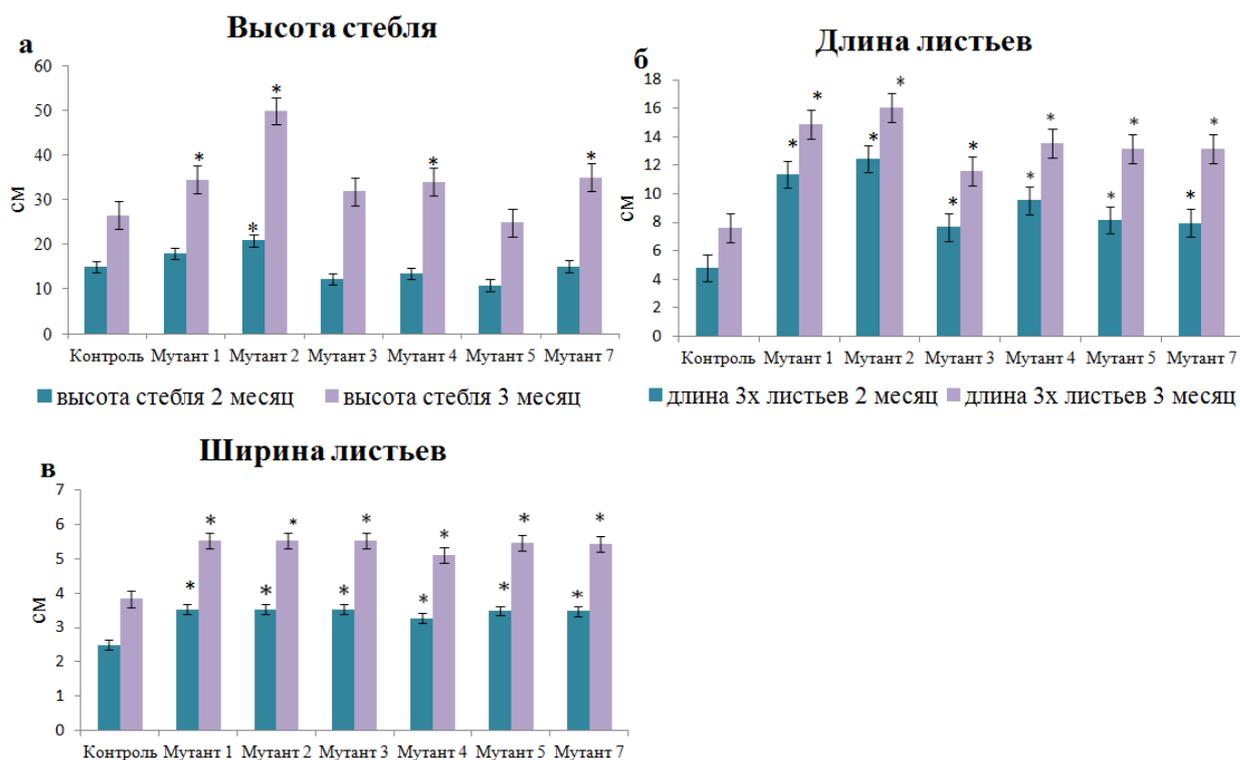


Рис. 2. Морфометрический анализ линий амаранта поколения  $M_2$ : а – высота стебля через 2 и 3 месяца после посева семян; б – длина 3-х листьев через 2 и 3 месяца после посева семян; в – ширина 3-х листьев через 2 и 3 месяца после посева семян. Зеленые столбцы – 2 мес., серые столбцы – 3 мес. Мутант 1 (0.1); мутант 2 (0.5); мутант 3 (1); мутант 4 (2); мутант 5 (3); мутант 7 (5) – линии и концентрации (мМ) азида натрия, использованные для обработки семян. \* -  $p < 0.01$ . У каждого из 15-ти растений ( $n=15$ ) измеряли длину и ширину трех самых крупных листьев.

Так, по результатам измерений высоты стебля и длины листьев линий амаранта после трех месяцев выращивания на открытом грунте, у линий полученных после обработки 0.5 мМ азидом натрия наблюдали наибольшее превышение по этим показателям, по сравнению с контролем. Например, средняя длина трех листьев составила 16 см, а средняя высота стебля - 50 см. В то время как, результаты морфометрического анализа растений, полученных при инкубировании другими концентрациями азида натрия, по сравнению с контролем тоже были лучше, однако в меньшей степени (рис. 2). В данной работе не анализировались растения *A. cruentus*, полученные обработкой мутагена в концентрациях 20 и 40 мМ, поскольку на начальных

стадиях развития растений наблюдали серьезные проявления негативного эффекта азидов натрия. При дальнейшем анализе морфометрических показателей был определен негативный эффект высоких концентраций мутагена (больше 5 мМ) на параметры роста последующих поколений амаранта, что свидетельствует о необходимости применения в работах по селекции амаранта более низких концентраций азидов натрия (Таипова, Кулуев, 2021). Похожие результаты представлены также в трудах авторов, работавших по мутагенезу мягкой пшеницы (Conger, 1973) и ячменя (Konzak et al., 1975).

Индукция искусственных мутаций посредством мутагенных веществ рассматривается как перспективный метод в растениеводстве, так как позволяет создать сорта культурных видов растений с улучшенными показателями урожайности и устойчивостью к абиотическим факторам. Поэтому представляет большой интерес дальнейший анализ полученных нами мутантных растений.

Adamu и Aliyu (2010) представили данные по химическому мутагенезу томатов азидом натрия. Экспериментальным путем была определена эффективная концентрация мутагена равная 4 мМ, позволившая добиться лучших показателей урожайности томата *Lycopersicon esculentum* Mill, не имея при этом отрицательного эффекта на процент всхожести, высоту ростков и длину корня (Adamu, Aliyu, 2010). Также повысить урожайность и не допустить морфологические недостатки удалось при индуцированном мутагенезе пшеницы *Triticum aestivum* 0.02% азидом натрия (Srivastava et al., 2011). При использовании мутагена в концентрации 3 мМ для *Eruca sativa* L. Al-Qurainy (2009) отметил увеличение биомассы и сухой массы, а концентрация равная 10 мМ для мутагенеза хлопчатника обладала ростстимулирующим эффектом для последующих поколений растений (Баймухаметова и др., 2017).

В нашей работе с *A. cruentus* были получены схожие результаты. На растениях второго поколения полученных при обработке семян азидом

натрия в концентрациях от 0.1 до 5 мМ наблюдали стимулирующее действие на формирование длинного стебля и листьев. Данный факт позволяет предположить, что практически применимая концентрация азидата натрия для мутагенеза амаранта лежит в диапазоне от 0.1 до 5 мМ, при котором можно ожидать полезные мутационные изменения в генетическом аппарате. Нами определены лучшие показатели по морфометрии на растениях, полученных при использовании концентрации мутагена 0.5 мМ, которая для амаранта к тому же является полулетальной дозой (Таипова, Кулуев, 2021). Данный отложенный эффект на последующие поколения растений не может объясняться прямым влиянием химического соединения на физиологию амаранта. Выявленные нами при морфометрическом анализе изменения могут быть связаны с мутагенным эффектом азидата натрия, как и показано в многочисленных исследованиях. Нельзя конечно полностью исключить влияние азидата натрия на наследуемую эпигенетику растений, однако в литературе такие данные не описаны.

Применяемыми в хозяйстве частями амаранта являются 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 (высокое содержание лизина и метионина) (Khandaker et al., 2010). Поэтому представлял интерес измерение массы семян. При этом эффекты от применения азидата натрия на массу семян могут быть различны. Имеются данные как о положительном (Animasaun et al., 2014), так и об отрицательном влиянии мутагена на этот показатель (Hussain et al., 2017). Нами также было рассмотрено мутагенное действие оказываемое азидом натрия на массу семян. Так, было проведено сравнение массы 1000 семян, полученных от растений первого и второго поколения после обработки разными концентрациями азидата натрия. Масса 1000 семян опытных растений первого поколения существенно не различалась по сравнению с контролем. Во втором поколении зафиксировано небольшое увеличение массы 1000 семян

амаранта после обработки 0.1 и 1 мМ азидом натрия, в то время как высокие концентрации мутагена привели к незначительному уменьшению массы семян в первом и во втором поколении (рис. 3).

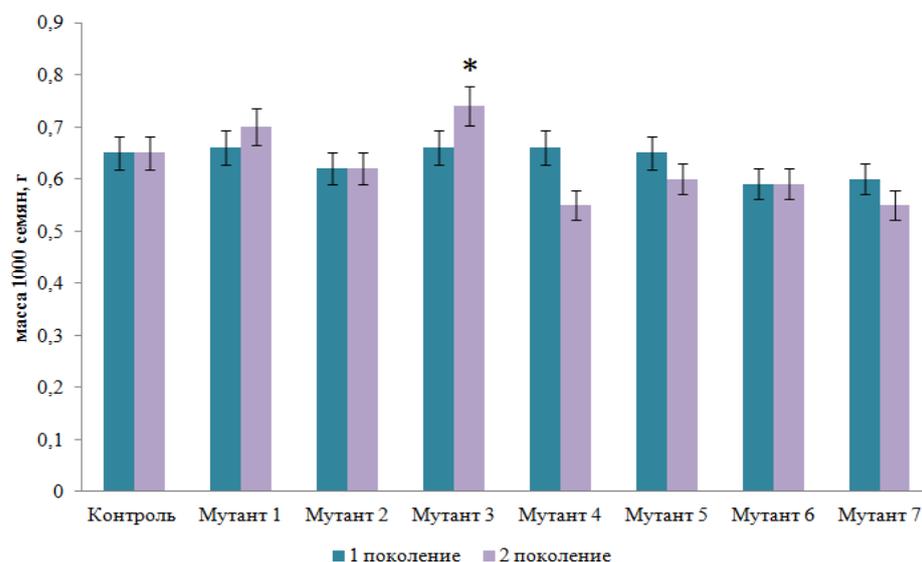


Рис. 3. Масса 1000 семян растений амаранта первого ( $M_1$ ) и второго ( $M_2$ ) поколений.

Таким образом, нами экспериментальным путем определена концентрация азидата натрия для эффективного индуцированного мутагенеза амаранта – от 0.5 до 5 мМ, при котором отмечено замедление роста проростков, но процент всхожести по отношению к контролю оставался выше 14%. Более высокие концентрации азидата натрия использовать не целесообразно. При условии, если считать эффективной концентрацией мутагена, ведущей к образованию всходов примерно у 50% семян, то оптимальная концентрация азидата натрия для индуцированного мутагенеза *A. cruentus* будет от 0.5 до 1 мМ. К тому же выявлено, что 0.5 мМ концентрация азидата натрия обладает ростстимулирующим эффектом на последующие мутантные поколения *A. cruentus*.

Учитывая полученные результаты, в работах по химическому мутагенезу можно рекомендовать проводить обработку семян амаранта в

течение пяти часов в фосфотном буфере (рН 3) с азидом натрия в концентрациях от 0.5 до 1 мМ (Таипова, Кулуев, 2021).

### **3.1.3. 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. Для решения этого вопроса наиболее подходящей является технология полногеномного секвенирования каждой мутантной линии. Однако это очень дорогостоящая процедура. Поэтому нами была поставлена задача доказать общие генетические изменения путем изучения ДНК-маркеров, основанных на технологии ПЦР. С целью общей оценки генетического полиморфизма амаранта был проведен анализ 7 линий с помощью микросателлитных маркеров по трем SSR-локусам (табл. 1) (Suresh et al., 2014). В целом было выявлено 3 разных аллеля и 3 их сочетания (рис. 4, табл. 4). По SSR-маркерам GB-AM-132 и GB-AM-137 растения амаранта 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 опытных линий были характерны следующие варианты: №1 – АІ, №2 – ІІ/АІ/АН, №3 – ІІ, №4 – АН, №5 – АІ/ІІ, №6 и №7 – АН (табл. 4).

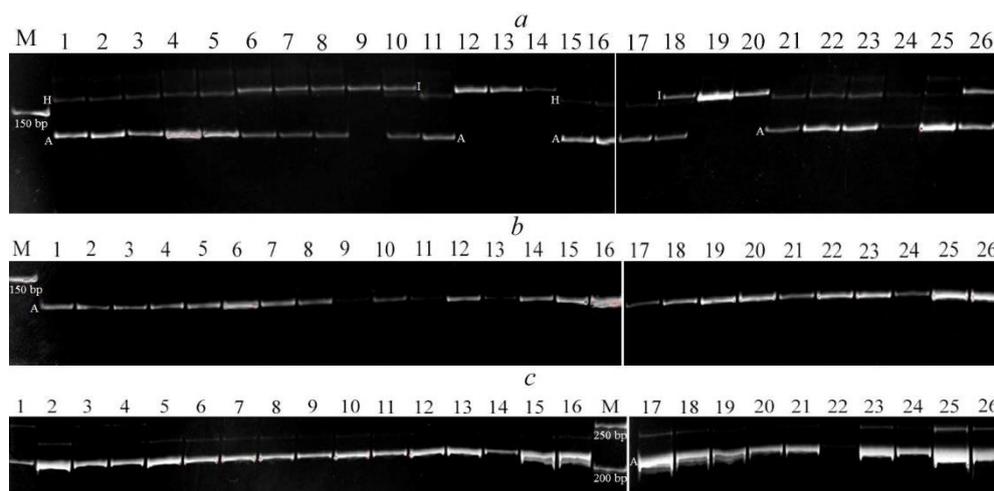


Рис. 4. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локусов. GB-AM-099 (a), GB-AM-132 (b), GB-AM-137 (c): 1-5 – растения дикого типа; 6-8 – линия №1; 9-11 – линия №2; 12-14 – линия №3; 15-17 – линия №4; 18-20 – линия №5; 21-23 – линия №6; 24-26 – линия №7; М – маркер Gene Ruler 50 bp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

Таблица 4. Результаты генотипирования линий *A. cruentus*

Концентрация $\text{NaN}_3$ (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	Линия № 1	АІ	АІ	АІ	АА	АА	АА	АА	АА	АА
0.5	Линия № 2	ІІ	АІ	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
1	Линия № 3	ІІ	ІІ	ІІ	АА	АА	АА	АА	АА	АА
2	Линия № 4	АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
3	Линия № 5	АІ	ІІ	ІІ	АА	АА	АА	АА	АА	АА
4	Линия № 6	АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА
5	Линия № 7	АН	АН	АН	АА	АА	АА	АА	АА	АА

Для характеристики генотипа амаранта применялись различные типы молекулярных маркеров, включающих в себя случайную амплифицированную полиморфную ДНК (RAPD) (Snezana et al. 2012), полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (AFLP) (Wassom, Tranel, 2005), полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (RFLP) (Park et al. 2012). Однако более часто используемыми маркерами для генотипирования культурных растений, не потерявшие актуальность и на сегодняшний день, являются 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 локус (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. 4). При этом было выявлено четыре варианта сочетания аллелей, что не позволяет проводить однозначную идентификацию всех полученных нами линий амаранта. Однако результаты нашего SSR-анализа позволяют нам говорить о доказанном мутагенном воздействии использованного нами азидата натрия на генетический аппарат исследуемых растений. Низкий уровень выявляемого полиморфизма очевидно связан с тем, что воздействие азидата натрия чаще всего приводит к заменам пар оснований (Till et al., 2007), которые тоже можно выявить, но дорогостоящим методом полногеномного секвенирования. Однако в результате обработки азидом натрия могут происходить и другие мутации, даже хромосомные aberrации, которые приводят к изменению длины нуклеотидной последовательности (Wannajindaporn et al., 2016) с чем, в том числе, могут быть связаны выявленные нами полиморфные участки (Таипова и др., 2023). Таким образом, метод SSR-анализа может быть использован для первичного доказательства генетических изменений после химического мутагенеза, причем метод SSR-анализа ранее уже применялся именно для этих целей (Pilu et al., 2003; Monteiro et al., 2009).

### 3.1.4. Анализ мутантных линий амаранта поколения $M_2$ на содержание общего растворимого белка и состава липидов

Важным аспектом в исследовании состава семян амаранта является определение их липидного состава, а также содержания белка.

По результатам экспериментов все мутантные линии амаранта по сравнению с контролем имели достоверно большую концентрацию белка (рис. 5). Наибольшее количество белка было зафиксировано для линии №5 и составила 13,78 мг/г, что на 52% выше, чем у контрольной группы растений (рис. 5).

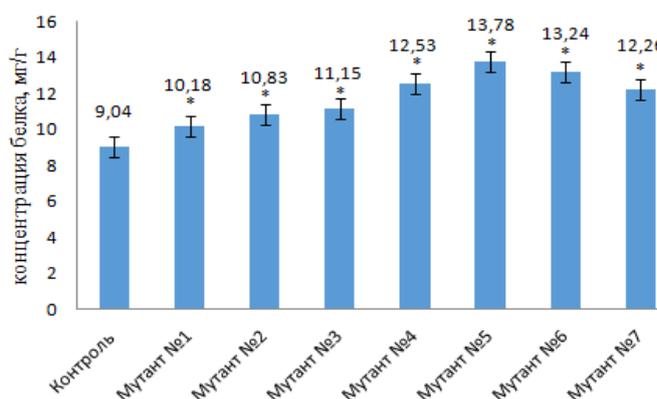


Рис. 5. Концентрация общего белка в семенах *A. cruentus*. Мутанты 1-7 соответствуют разным концентрациям использованного азида натрия согласно табл. 2 и 3.

Анализ состава нейтральных липидов семян амаранта показал высокое содержание жирных кислот и триацилглицеролов и незначительное количество стерина и их эфиров. Например, больше всего нейтральных липидов и триацилглицеролов содержалось у линии №1 и составили 40.8 мг/г и 36.1 мг/г, соответственно. Так, и другие линии №№ 3, 4, 7 по сравнению с контролем имели достоверно более высокие значения эфиров, нейтральных липидов и триацилглицеролов (табл. 5). Содержание стерина было очень низким, отметим лишь линию 4, у которой было их содержание в 2 раза больше, чем у контроля.

Таблица 5. Общее содержание нейтральных липидов в семенах амаранта, мг/г

Образец	Сумма НЛ, мг липидов/г семян	Триацилглице ролы	Эфиры	Стерины
Контроль	29.4±0.2	25.7±0.1	1.6±0.1	0.2±0.1
<b>Линия № 1</b>	<b>40.8±0.1</b>	<b>36.1±0.1</b>	<b>2.3±0.1</b>	0.3±0.1
Линия № 2	28.0±0.2	24.2±0.1	1.7±0.1	0.4±0.1
<b>Линия № 3</b>	<b>33.6±0.1</b>	<b>29.1±0.1</b>	<b>2.2±0.1</b>	0.3±0.1
<b>Линия № 4</b>	<b>36.2±0.2</b>	<b>30.9±0.1</b>	<b>2.4±0.1</b>	<b>0.5±0.1</b>
Линия № 5	26.6±0.1	23.4±0.1	1.4±0.1	0.2±0.1
Линия № 6	27.7±0.1	23.7±0.1	1.6±0.1	0.3±0.1
<b>Линия № 7</b>	<b>34.7±0.1</b>	<b>30.6±0.1</b>	<b>2.1±0.1</b>	0.3±0.1

Жирным обозначены результаты, достоверно превышающие показатели контроля.

После анализа семян линий амаранта на состав жирных кислот, было обнаружено 15 видов этих кислот. Среди них пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая кислоты присутствовали в повышенном количестве. Мутагенный эффект азидата натрия повлиял на все опытные линии, что привело к увеличению содержания линолевой кислоты. Например, линии №№1, 4, 6 и 7 имели больше линолевой кислоты по сравнению с контрольной группой. Кроме того, показатели содержания пальмитиновой кислоты у опытных вариантов также повышались до 19.9%. Однако, содержание стеариновой и олеиновой кислот у амаранта снизилось до 3.8 % и 21.6 % соответственно по сравнению с контролем (табл. 6). Таким образом, у мутантных линий амаранта было обнаружено увеличение содержания линолевой и пальмитиновой кислот при одновременном снижении содержания стеариновой и олеиновой кислот по сравнению с контролем.

В целом, результаты исследования показывают изменения в компонентном составе жирных кислот семян амаранта под воздействием мутагена - азидата натрия. Эти изменения могут влиять на биологическую активность и питательную ценность семян амаранта, что может быть важным фактором для использования этого растения в пищевой промышленности или селекции новых сортов.

Таблица 6. Состав и содержание жирных кислот в семенах амаранта (% от суммы)

Состав жирных кислот	Контроль	Линия №1	Линия №2	Линия №3	Линия №4
Насыщенные:					
Миристиновая	0.3±0.1	0	0	0.2±0.1	0.2±0.3
Пентадекановая	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
<b>Пальмитиновая</b>	<b>17.8±0.5</b>	<b>19.4±0.5</b>	<b>19.7±0.6</b>	<b>19.7±0.5</b>	<b>19.7±0.2</b>
Маргаритиновая	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
<b>Стеариновая</b>	<b>5.1±0.3</b>	<b>4.2±0.3</b>	<b>4.3±0.2</b>	<b>3.8±0.2</b>	<b>3.9±0.4</b>
Арахидиновая	0.9±0.1	0.9±0.2	1±0.1	0.8±0.1	0.9±0.3
Бегеновая	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.2
Лигноцериновая	0.3±0.2	0.2±0.2	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
Гептадеценивая	0.9±0.1	1±0.3	1.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.2
<b>Олеиновая</b>	<b>32.5±2.2</b>	<b>22.3±0.3</b>	<b>23.2±0.1</b>	<b>23.3±0.2</b>	<b>21.9±0.3</b>
Эйкозеновая	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
Полиненасыщенные:					
<b>Линолевая</b>	<b>40.4±1.5</b>	<b>50±0.9</b>	<b>48.5±0.6</b>	<b>49±1.1</b>	<b>50±1.3</b>
Линоленовая	0.6±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

Продолжение табл. 6

Состав жирных кислот	Контроль	Линия №5	Линия №6	Линия №7
Насыщенные:				
Миристиновая	0.3±0.1	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
<b>Пальмитиновая</b>	<b>17.8±0.5</b>	<b>19.6±0.7</b>	<b>19.6±0.6</b>	<b>19.9±0.8</b>
Маргаритиновая	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1	0.1±0.1
<b>Стеариновая</b>	<b>5.1±0.3</b>	<b>4.1±0.1</b>	<b>4.1±0.3</b>	<b>4.2±0.2</b>
Арахидиновая	0.9±0.1	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
Лигноцериновая	0.3±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
Гептадеценивая	0.9±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2
<b>Олеиновая</b>	<b>32.5±2.2</b>	<b>24.4±0.1</b>	<b>21.8±0.2</b>	<b>21.6±0.1</b>
Эйкозеновая	0.2±0.1	0	0.1±0.1	0.1±0.1
Полиненасыщенные:				
<b>Линолевая</b>	<b>40.4±1.5</b>	<b>47.9±1.2</b>	<b>50±1.6</b>	<b>50±1.6</b>
Линоленовая	0.6±0.1	0.7±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1
Гексадекадиеновая	0.3±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1

Жирным обозначены результаты, достоверно превышающие показатели контроля.

Для дальнейшего анализа семян на содержание фосфолипидов использовали линии 2 и 3. Сумма фосфолипидов в контрольном образце составила 8.3 мг липидов/г семян, а для линий №2 и №3 - 9 и 10.1 мг липидов/г семян, соответственно. Было идентифицировано четыре компонента в фосфолипидном составе, включающие в себя фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилинозитол и фосфатидилглицерол. Так, фосфатидилглицерол выявлялся исключительно только в мутантных линиях. Также, линия №3 содержала фосфолипиды 10.1 мг/г, фосфотидилхолин – 5 мг/г, фосфатидилэтанолламин – 2.5 мг/г, что достоверно больше по сравнению с контролем (табл. 7). В целом, у мутантных растений было выявлено увеличение содержания фосфотидилхолина и фосфатидилэтанолламина, а также уменьшение фосфатидилинозитола (Таипова и др., 2022).

**Таблица 7. Содержание фосфолипидов в семенах амаранта, мг/г**

Образец	Контроль	Линия 2	Линия 3
Сумма ФЛ, мг липидов /г семян	8.3±0.1	<b>9±0.1</b>	<b>10.1±0.1</b>
Фосфатидилхолин	4.1±0.1	<b>4.4±0.1</b>	<b>5.0±0.1</b>
Фосфатидилэтанолламин	1.6±0.1	<b>2.2±0.1</b>	<b>2.5±0.1</b>
Фосфатидилинозитол	2.6±0.1	2.2±0.1	2.4±0.1
Фосфатидилглицерол	0	<b>0.2±0.1</b>	<b>0.2±0.1</b>

Жирным обозначены результаты, достоверно превышающие показатели контроля.

Получение искусственных мутаций у хозяйственно-ценных видов растений в первую очередь направлена на создание культур с улучшенным качеством и количеством урожая. Неотъемлемо важными показателями питательной ценности остаются содержание белка, жирных кислот и их состав в семенах (Лось, 2014). Mlakar с соавт. (2009) подробно описали компонентный состав семян зернового амаранта и отметили содержание углеводов в пределах 61.3–76.5%, сырого белка 13.1–21.5%, жира 5.6–10.9%, клетчатки 2.7–5% (Mlakar et al., 2009).

В литературных источниках представлены несколько работ по мутагенезу амаранта. Исследования Keckesova и его коллег (2012) показали, что мутантные линии *A. cruentus* и *A. hypochondriacus*, полученные с помощью гамма-лучей, содержат на 2% больше белка в сравнении с диким типом. Это может указывать на возможность использования гамма-лучей для улучшения показателей питательности амаранта.

Однако исследование Гудым (2018) показало, что воздействие гамма-лучей на содержание масла, белка и состав жирных кислот в семенах амаранта может иметь как положительные, так и отрицательные последствия в зависимости от конкретного сорта амаранта. В частности, влияние гамма-излучения на сорта Сэм, Харьковский-1 и Студенческий у *A. hypochondriacus* варьировалось, что указывает на сложность процесса и необходимость его дальнейшего изучения.

Исходя из результатов проведенных нами экспериментов по определению содержания белка в семенах *A. cruentus* после индуцированного мутагенеза выявлена линия №5, содержащая белок на 52% больше по сравнению с диким типом. Данный показатель превосходит ранее описанные в литературе концентрации белка в семенах мутантных линий амаранта. Таким образом, в селекционных работах по выведению новых сортов амаранта с высоким содержанием белка может быть рекомендовано использование полученной нами линии №5 (Таипова и др., 2022). Однако сохранит ли такое же высокое содержание белка эта линия в последующих поколениях, пока неизвестно. Требуются дальнейшие исследования.

В своих исследованиях на *Brassica napus* Rücker, Röbbelen, (1997) установили возможность применения мутагенеза в целях изменения в содержании липидов и состава жирных кислот (Rücker, Röbbelen, 1997). Фракция липидов масла из семян амаранта содержит до 80% триацилглицеринов и меньшие концентрации каротиноидов, стерина, сквалена, токоферолов и фосфолипидов. Триацилглицерины служат хранилищем для жирных кислот, выполняют энергетическую роль, а

фосфолипидам относят функции в создании барьера проницаемости, в активации мембраносвязанных ферментов, служат молекулярными сигналами (Becker et al., 1981). Масло семян амаранта, содержащее до 10.2% фосфолипидов от общего объема липидов, считается ценным источником питательных веществ для поддержания здоровья человека (Gamel et al., 2007). Фосфолипиды играют важную роль в сборке и функции клеточных мембран, а также служат источником ацетилхолина, основного нейромедиатора в нервной системе.

В ходе проведенных исследований нами были выделены линии амаранта, характеризующиеся повышенным содержанием нейтральных липидов и линолевой кислоты по сравнению с контрольным вариантом. Например, у линии №1 было на 38% больше содержание нейтральных липидов, а у линий №№ 1, 4, 6, 7 зафиксировано увеличение линолевой кислоты на 23% по сравнению с ДТ. Данные линии амаранта могут быть предложены для селекции сортов с высоким содержанием линолевой кислоты в семенах (Таипова и др., 2022). Однако будут ли сохранять высокий уровень линолевой кислоты мутантные линии в последующих поколениях пока остается неизвестным. Требуются дальнейшие исследования.

Содержащиеся в амаранте полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) остаются важной функциональной составляющей пищевой отрасли. Масло амаранта находит применение при широком ряде заболеваний, особенно эффективно его применяют при атеросклерозе, сердечно-сосудистых заболеваниях. В целом амарантовое масло оказывает противовоспалительное, противоопухолевое действие, способствует регуляции уровня ненасыщенных жирных кислот в крови и липидного обмена (Высочина, 2013).

По составу семян линии амаранта второго поколения, полученные индуцированным мутагенезом с помощью азидата натрия, отличались от дикого типа высокой концентрацией белка (до 52%), фосфолипидов (до 22%)

и нейтральных липидов (до 38%), а также повышенным содержанием ненасыщенной жирной кислоты - линолевой (до 23%) (Таипова и др., 2022).

### **3.1.5. Определение морфометрических показателей и антиоксидантного статуса мутантных линий амаранта поколения М<sub>3</sub> в условиях засухи**

Морфометрические показатели и антиоксидантный статус определяли на линиях амаранта №4, 5 и 6 поколения М<sub>3</sub>. 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. 6а), также у нее были больше сырая и сухая масса побега на 16.9% и 10% соответственно (рис. 6в, г). По сравнению с ДТ в 1.1 раза было больше относительное содержание воды (рис. 6д), а вот суммарная площадь листьев достоверно не отличалась от ДТ (рис. 6б). С целью выяснения возможных механизмов осморегуляции в окислительно-восстановительной реакции, необходимой 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. 8в), в 1.1 раза - СОД и КАТ (рис. 7в, а), но в 1.3 раза выше содержание МДА (рис. 4 а) и в 1.1 и 1.4 раза выше активности АПО и GST (рис. 7б, г), соответственно, по сравнению с ДТ, а общая антиоксидантная способность была одним на уровне с показателями ДТ (рис. 8б).

У линии №5 в условиях засухи высота стебля не отличалась от ДТ (рис. 6а), суммарная площадь листовой пластины была в 1.2 раза (рис. 6б), сырая масса побега на 24,7%, а сухая масса – на 38,5% больше, а относительное содержание воды ниже в 1.1 раза (рис. 6д), по сравнению с ДТ (рис. 6в, г). Изучение активности ферментов у линии №5 показало активность КАТ и СОД ниже в 1.2 раза (рис. 7а, в), а GST и ОАС выше в 1.2 раза (рис. 7г, 8б). Активность АПО, содержание МДА, пролина находились на одном уровне с показателями ДТ (рис. 7б, 8а, в).

Линия №6 в условиях засухи не отличалась от ДТ по высоте стебля (рис. 6а). У данной линии в 1.3 раза была ниже суммарная площадь листа (рис. 6б), в 1.1 раза больше относительное содержание воды (рис. 6д), а также ниже на 59.3% сырая и на 32.3 % сухая масса побега, по сравнению с ДТ (рис. 6в, г). Для опытных растений были показаны более низкие уровни пролина - в 2.2 раза (рис. 8в), активности КАТ - в 1.3 раза (рис. 7а), СОД – в 1.8 раза по сравнению с ДТ (рис. 7в). Активность GST была выше в 1.1 раза, чем у ДТ (рис. 7г), а по ОАС и содержанию МДА и АПО линия №6 достоверно не отличалась от ДТ (рис. 7б, 8а, б).

Отбор устойчивых к дефициту воды культурных растений в селекции затруднен из-за того, что в разные годы выращивания могут очень сильно различаться погодные условия. 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, по сравнению с ДТ. 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 (Таипова и др., 2023).

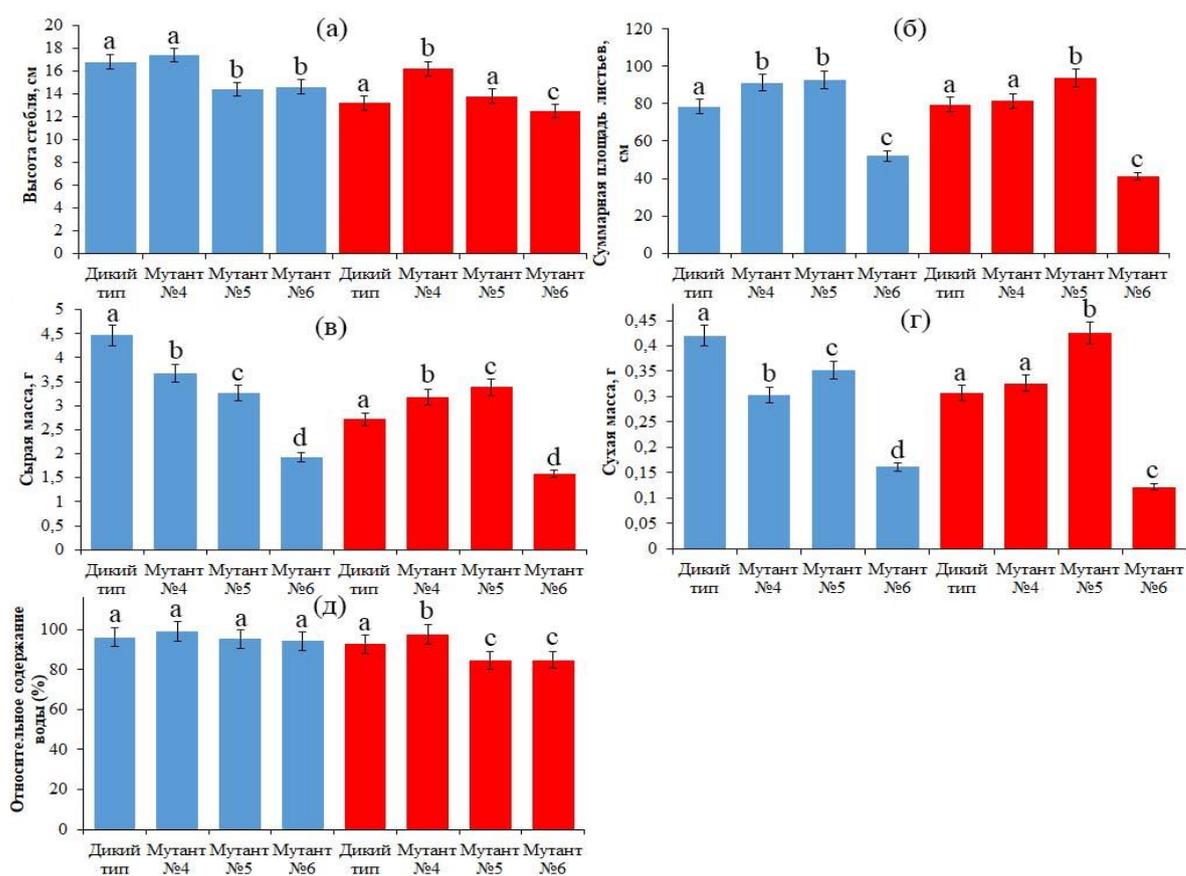


Рис. 6. Морфометрические параметры растений ( $n = 5$ ) амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и воздействии засухи (обозначено красным): (а) – высота стебля; (б) – суммарная площадь листьев; (в) – сырая масса побега; (г) – сухая масса побега; (д) – относительное содержание воды (RWC) в побегах после 10-дневной засухи. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

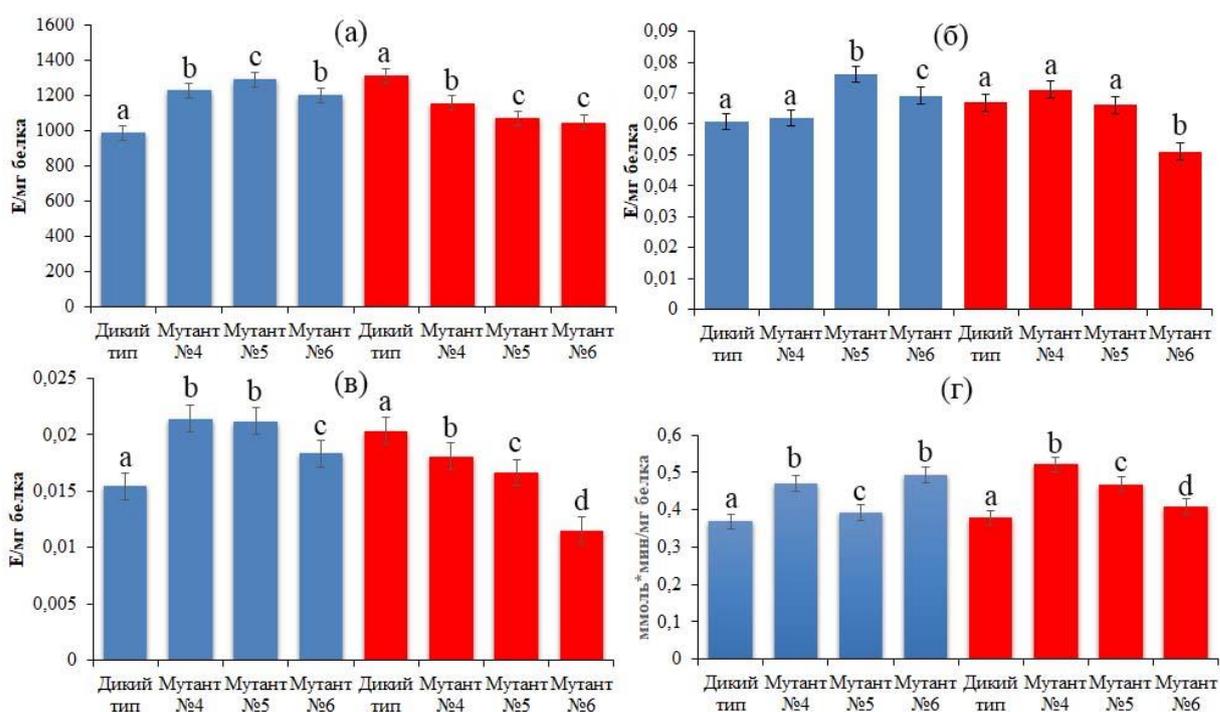


Рис. 7. Анализ активности ферментов антиоксидантной системы в листьях растений ( $n = 5$ ) дикого типа и опытных линий амаранта при нормальных условиях (обозначено синим) и воздействии засухи (обозначено красным): а – активность каталаз, б – активность аскорбатпероксидаз, в – активность супероксиддисмутаз, г – активность глутатион-S-трансфераз. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

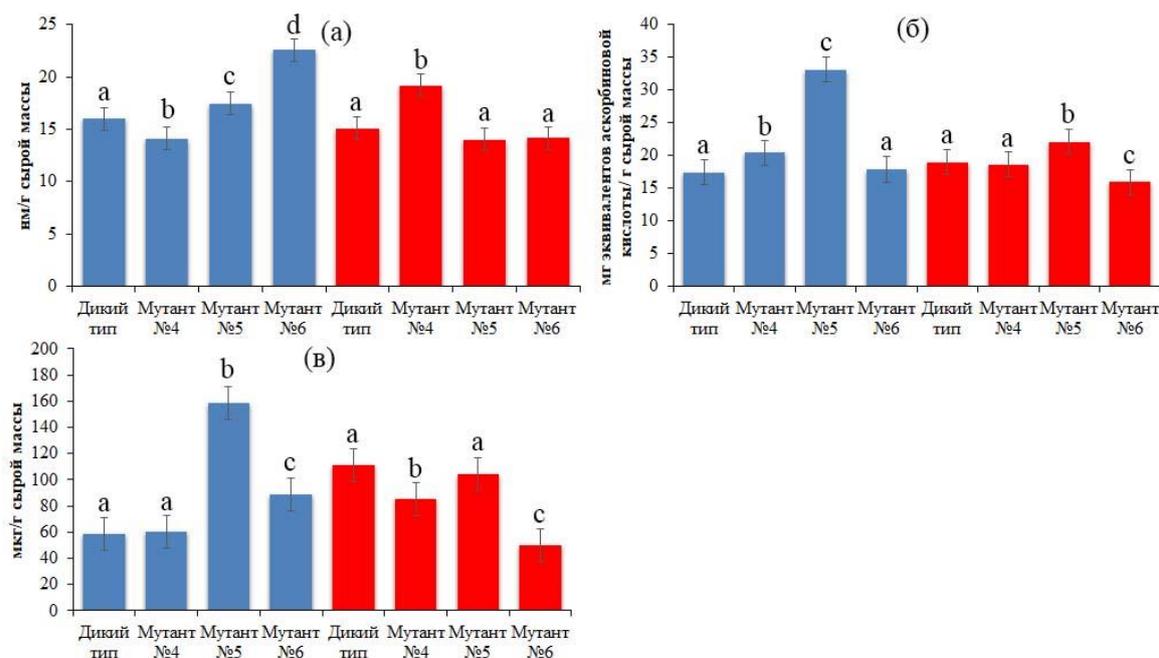


Рис. 8. Анализ компонентов антиоксидантной системы в листьях растений (n=5) дикого типа и опытных линий амаранта при нормальных условиях (обозначено синим) и воздействии засухи (обозначено красным): а – содержание малонового диальдегида, б – общая антиоксидантная способность, в – содержание пролина. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

### 3.1.6. Определение морфометрических параметров и антиоксидантного статуса мутантных линий амаранта М<sub>3</sub> 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. 9а), а по суммарной площади листовой пластины меньше в 1.3 раза по сравнению с ДТ (рис. 9б). 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. 10, 11в). В то же время содержание МДА у линии №4 было в 1.9 раза (рис. 11а), ОАС в 1.1 раза больше, по сравнению с ДТ (рис. 11б).

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. 9а, б). В ответ на засоление почвы у этой линии были ниже в 1.5 раза содержание пролина (рис. 11в), в 1.2 раза активности КАТ и СОД (рис. 10а, в), в то же время в 1.9 раза выше уровень накопления МДА, а содержание АПО достоверно не отличалось от значений у ДТ (рис. 11а, 10б). 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. 10г, 11б).

По данным морфометрического анализа растения линии №6 при действии стресса, вызванного солью, имели высоту стебля в 1.2 раза выше, а суммарная площадь листовой пластины была ниже в 1.1 раза, по сравнению с ДТ (рис. 9а, б). Линия №6 в условиях засоления характеризовалась количеством пролина ниже в 1.4 раза (рис. 11в), содержанием МДА выше в 3.4 раза (рис. 11а), активностью СОД и КАТ ниже в 2 и 1.3 раза (рис. 10в, а), соответственно, по сравнению с ДТ. При этом активность GST была выше в 1.1 раза (рис. 10г), а активность АПО и ОАС в 1.2 раза больше, чем у ДТ (рис. 10б, 11б).

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. Похожая корреляция между повышенной антиоксидантной способностью, уровнем активности АПО, GST и устойчивостью к солевому стрессу была обнаружена у многих других растений, например, таких как сахарная свекла (Vor et al., 2003), томат (Koca et al., 2006), кунжут (Koca et al., 2007), портулак (Yazici et al., 2007), табак (Ji et al., 2010). Полученные нами данные свидетельствуют о большей солеустойчивости линии №6, по сравнению с ДТ и линиями №4 и №5 (Таипова и др., 2023).

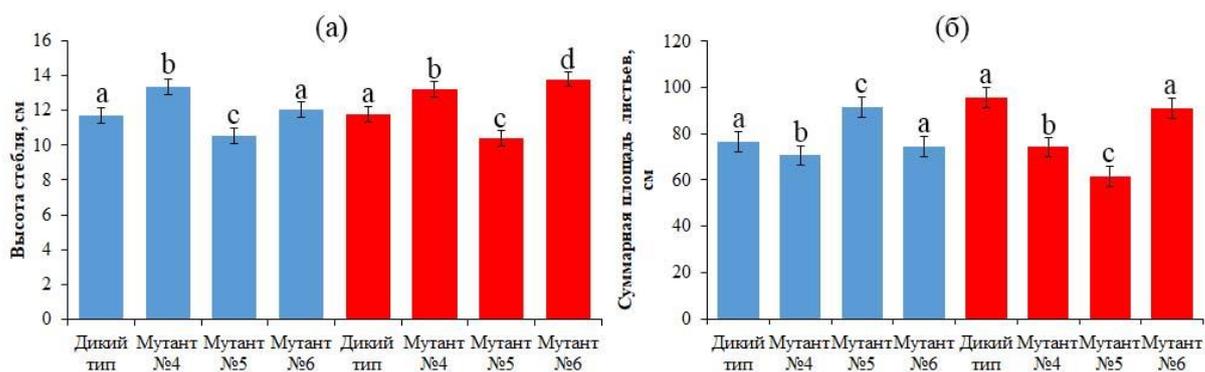


Рис. 9. Морфометрические показатели растений (n=5) дикого типа и опытных растений амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и при действии засоления (обозначено красным): (а) – высота стебля; (б) – суммарная площадь листьев. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

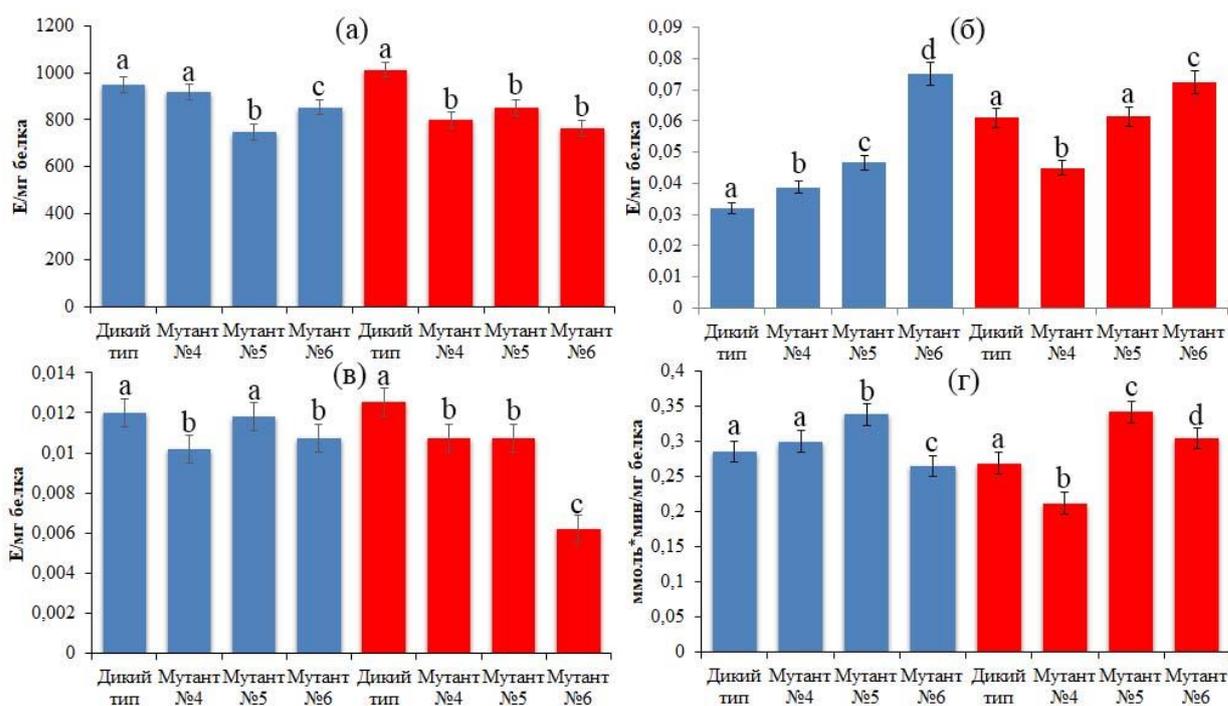


Рис. 10. Анализ активности ферментов антиоксидантной системы в листьях растений (n=5) дикого типа и опытных растений амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и при действии засоления (обозначено красным): а – активность каталаз, б – активность аскорбатпероксидаз, в – активность супероксиддисмутаза, г – активность глутатион-S-трансфераз. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест).

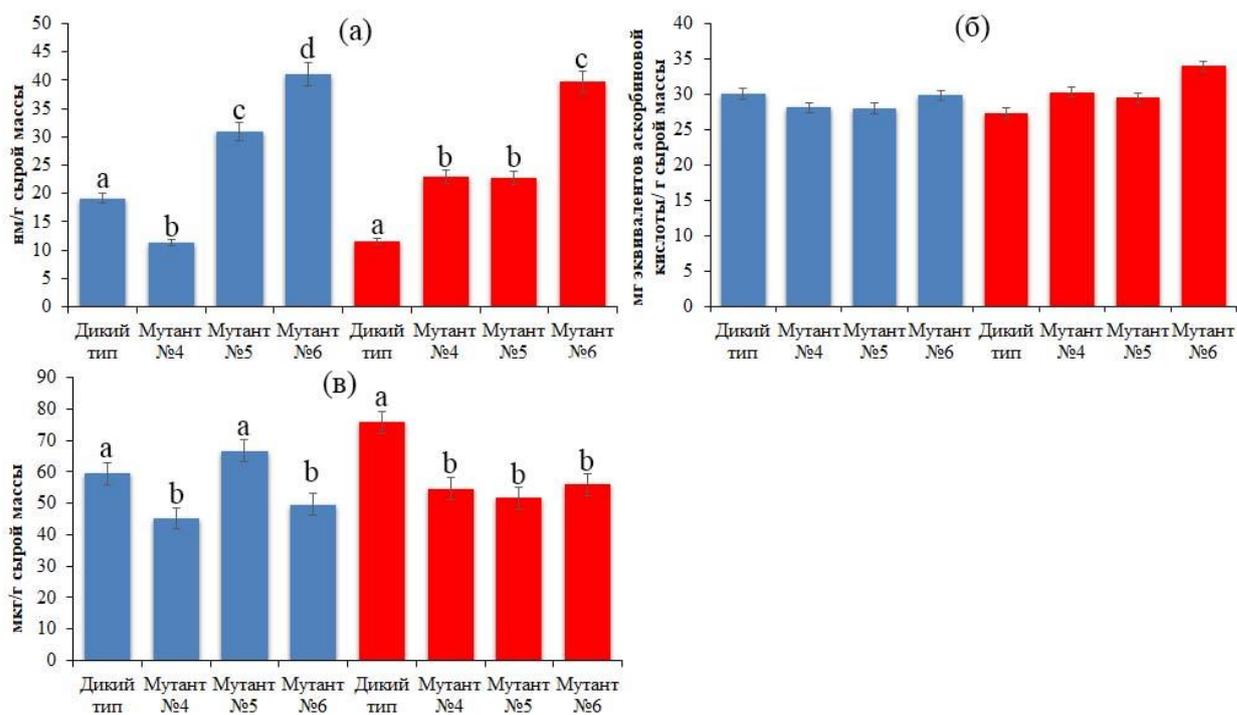


Рис. 11. Анализ компонентов антиоксидантной системы в листьях растений ( $n=5$ ) дикого типа и опытных растений амаранта в нормальных условиях произрастания (обозначено синим) и при действии засоления (обозначено красным): а – содержание малонового диальдегида, б – общая антиоксидантная способность, в – содержание пролина. Статистически различающиеся средние помечены разными буквами (LSD-тест)..

### Заключение к параграфу 3.1.

В результате химически индуцированного мутагенеза *A. cruentus* нами определена оптимальная концентрация мутагена азиды натрия 0.5-1 мМ, а концентрация 1 мМ отмечена как наиболее эффективная, позволяющая получить мутантные линии растения амаранта. Морфометрический анализ показал ростостимулирующее действие мутагена азиды натрия на формирование длинного стебля и листьев при использовании концентраций от 0.1 до 5 мМ, однако лучшие показатели по морфометрии отмечены для растений, полученных при использовании концентрации мутагена 0.5 мМ.

Мутагенное воздействие использованного нами азиды натрия на генетический аппарат *A. cruentus* было доказано с помощью SSR-анализа.

Оценка наличия генетических изменений, индуцируемых азидом натрия, показала четыре варианта сочетания аллелей. Полиморфизм удалось выявить при анализе локуса GB-AM-099. Другим обоснованием мутагенного действия азидата натрия являются многочисленные литературные данные о получении мутантных растений при помощи этого соединения.

Компонентный состав семян мутантных линий амаранта отличался от дикого типа большим содержанием белка и изменением состава липидов. Так, наибольшее количество белка было зафиксировано для растений линии №5 и составила 13.75 мг/г, что на 52% выше, чем у контрольной группы. Также зафиксировано повышение в содержании фосфолипидов у линии №3 (до 22%), нейтральных липидов у линии №1 (до 38%) и ненасыщенной жирной кислоты - линолевой у линий № 1,4,6,7 (до 23%).

В результате исследования антиоксидантного статуса и морфометрических изменений у линий № 4, 5, и 6 при засолении и недостатке влаги нами установлено, что растения линии №4 более устойчивы к засухе, а растения линии №6 обладают большей солеустойчивостью по сравнению с диким типом и другими мутантными линиями. Полученные нами мутантные линии амаранта могут быть рекомендованы для использования в селекции амаранта с целью получения его новых сортов (Таипова и др., 2023).

## 3.2. Получение трансгенных растений *A. retroflexus* и их морфометрическая характеристика

### 3.2.1. Трансформация *A. retroflexus* методом погружения цветков

Улучшения агрономических показателей культурных растений можно добиться не только с помощью мутагенеза и селекции, но и методами современной генетической инженерии. С этой целью активно используется метод трансформации, опосредованной агробактериями, в которой за основу взята природная способность агробактерий переносить свой генетический материал при инфицировании растений. Так, перенос одной или нескольких копий фрагментов вирулентной ДНК (Т-ДНК) в ядерный геном растения возможно осуществить при помощи *Agrobacterium tumefaciens* или *A. rhizogenes* (Ream, 2009). Доставка в клетку растения-хозяина Т-ДНК из клетки бактерии осуществляется через систему секреции IV типа (Gelvin, 2012). Прямая трансформация может быть произведена следующими методами: вакуумная инфильтрация тканей растений (Tague, Mantis, 2006), погружение цветков в специально подготовленный раствор с агробактерией (Yasmeen et al., 2009), а также трансформация в культуре *in vitro*, как представлено в опытах Jofre-Garfias с соавт. (1997) и Pal с соавт. (2013). Погружение цветков (floral dip) как метод получения трансгенных растений имеет некоторые преимущества перед методами культуры тканей, поскольку позволяет напрямую создать трансгенные семена, минуя достаточно длительный период работ связанных с культивированием ткани растения в асептических условиях *in vitro* (Yang et al., 2009).

Для получения трансгенных растений методом агробактериальной трансформации мы впервые использовали рудеральный вид *A. retroflexus*, находящая применение в сельском хозяйстве как кормовая культура и отличающейся коротким вегетационным периодом (до двух месяцев)

(Lawrence et al., 1989). В качестве генно-инженерной конструкции послужил ген *ARL A. thaliana* в бинарном векторе pCambia 1301 под контролем конститутивного промотора вируса мозаики георгина (Кулуев и др., 2016).

Погружение цветков как способ получения трансгенных форм растений является перспективным методом для многих видов, может успешно применяться для увеличения эффективности трансформации достигаемый по результатам уровень агробактериальной трансформации эксплантов гипокотилей, эпикотилей или эмбрионального листа или даже превзойти их при внедрении модификаций в состав с суспензией агробактерий.

Среди преимуществ метода погружения цветков стоит выделить его легкость и доступность в выполнении, так как не требует приемов связанных с вводом растения в стерильную культуру *in vitro*, наличия специального оборудования, высокого уровня квалификации, а также дорогостоящих реактивов. Кроме того, стоит отметить возможность использования данного метода для создания генетически модифицированных растений, не способных расти или плохо растущих в условиях лаборатории. Отметим, что амарант в лаборатории крайне требователен к интенсивности света и при его нехватке он не растет и не дает полноценных семян.

Способ получения трансгенных растений с помощью погружения цветков опробован на многих видах растений, к примеру известны исследования с растениями *A. thaliana* (Clough et al., 1998), хлопчатника (Zhang, Chen, 2012), льна (Bastaki, Cullis, 2014), пшеницы (Agarwal et al., 2009), кукурузы (Mu et al., 2012), риса (Ratanasut et al., 2017), амаранта (Munusamy et al., 2013) и т.д. Munusamy с соавторами (2013) сообщают о проведение работ по трансформации амаранта измененным способом погружения цветков, так, что суспензия агробактерий была нанесена в цветки капельным способом. При этом авторы указывают на эффективность трансформации штаммом AGL1 с рекомбинантными векторами p5d9 - 0.2%, p5b5 - 0.6%, p5f7 - 1.8% (Munusamy et al., 2013). А в работе с *A. thaliana*

Martinez-Trujillo с соавт., (2004) при использовании того же способа достигли 2-3% эффективности трансформации.

В работе по трансформации амаранта *A. retroflexus* опосредованной агробактериями был применен общепринятый метод floral dip, сводящийся к полному погружению соцветий на некоторое время в суспензию с агробактериями (Clough et al., 1998). При этом нами были внесены незначительные модификации в состав суспензии, заключающийся в добавлении ацетосирингона, 6-БАП, суперсмачивателя Silwet Gold с большей концентрацией. При выбранном подходе нам удалось достичь эффективности трансформации до 1.4%, что соотносится с результатами Munusamy et al. (2013) (Кулуев и др., 2016). Тем не менее, по сравнению с другими исследованиями такой процент эффективности относительно невысокий, например, имеются данные об эффективности агробактериальной трансформации методом floral dip рапса сортов “Hanna” и “Ратник” примерно 10% (Михайлова, Кулуев, 2015), а для льна до 60% (Zhang, Chen, 2012).

### **3.2.2. Отбор трансгенных растений амаранта *A. retroflexus* методом ПЦР-анализа**

В период активного цветения 18 растений амаранта были обработаны агробактериальной суспензией методом погружения цветков. После периода покоя, составлявшего не менее одного месяца, семена от этих растений предварительно вымачивали в селективном антибиотике и проращивали в климатической камере. Так, на почву было отдельно высажено по 100 семян из каждого трансформированного растения, что, в общем, составило 1800 семян. В последствие ряда проведенных отборов, включающих в себя первичный визуальный отбор, обработку раствором антибиотика гигромицина и повторный отбор, в каждой из восемнадцати емкостей оставалось не больше семи - восьми проростков растений амаранта (рис. 12а). Через один месяц выращивания (рис. 12б) из этих предположительно

трансгенных проростков 126 были использованы для проведения ПЦР-анализа.



Рис. 12. Визуальный отбор предположительно трансгенных растений амаранта первого поколения: а – проростки амаранта после опрыскивания их гигромицином, стрелками показаны наиболее крупные и здоровые проростки, которые отбирались для дальнейшей работы; б – отобранные для ПЦР-анализа предположительно трансгенные растения амаранта через 1 месяц выращивания.

В первую очередь с помощью метода ПЦР в исследуемых образцах выявляли наличие хозяйского гена ацетолактатсинтазы (рис. 13а), а затем с целью обеспечения достоверности результатов исследования определяли наличие специфичного агробактериального гена *rhoA* (рис. 13б).

Несмотря на данные, указывающие на срок выживания агробактерий в цветках после инокуляции не более чем 19 дней (Xu et al., 2008), нами был идентифицирован агробактериальный ген в четырех образцах ДНК. Эти растения были отбракованы и не использовались в дальнейшей работе.

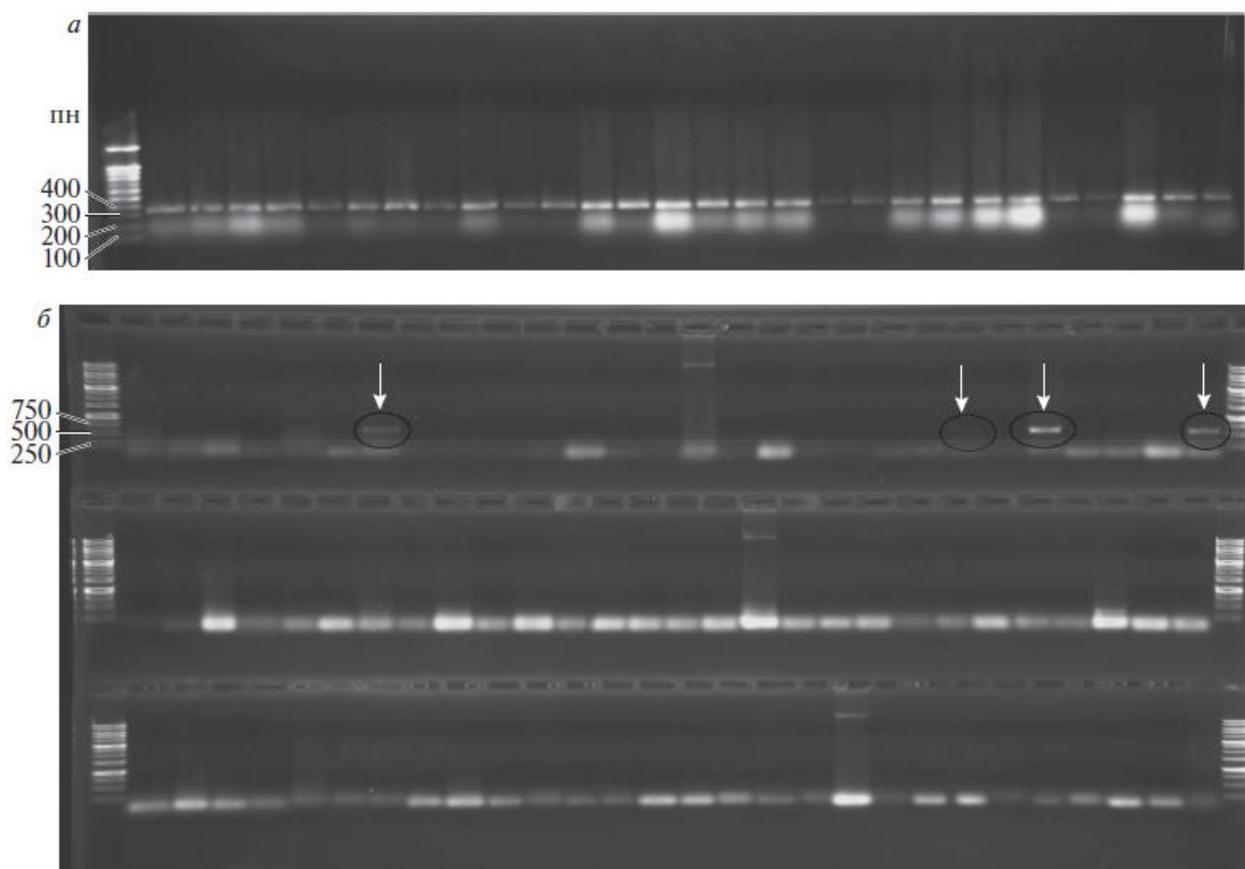


Рис. 13. Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК амаранта первого поколения на присутствие хозяйского гена ацетолактатсинтазы (а) (размер ампликона – 343 пн) и агробактериального гена *groA* (б) (размер ампликона – 587 пн). По краям электрофореграмм маркеры молекулярного веса 100 бр и 1 kb соответственно (Сибэнзим, Россия).

На первом этапе работы отобрали 122 растения, ДНК которых проанализировали методом ПЦР на наличие как целевого гена *ARL*, так и промотора вируса мозаики георгина (рис. 14). По результатам исследований у 46 растений были выявлены промотор и целевой ген, что указывает на эффективность визуального распознавания трансгенных проростков амаранта с точностью всего лишь в 36%.

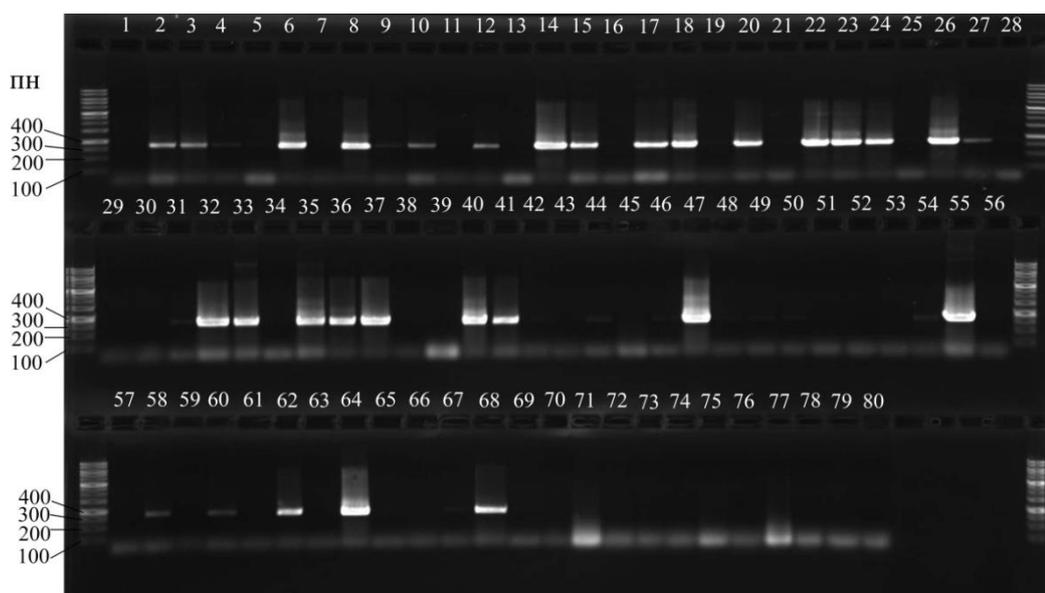


Рис. 14. Электрофореграмма результатов ПЦР-идентификации гена *ARL* в отобранных визуально растениях амаранта первого поколения. Размер ампликона составляет 386 пн, слева и справа – маркер молекулярного веса 100 бп (Сибэнзим, Россия). ПЦР-положительными по гену *ARL* считались образцы в дорожках 2, 3, 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.

В дальнейших исследованиях 46 растений амаранта, содержащие генно-инженерную конструкцию гена *ARL* с промотором вируса мозаики георгина, использовали для получения семян второго поколения. После проведенного отбора на наличие специфичного для амаранта гена ацетолактатсинтазы, целевого гена и промотора во втором поколении были отобраны только 26 растений амаранта.

Первичные визуальные отборы потенциально трансгенных проростков амаранта проводили после обработки семян антибиотиком гигромицином. Однако, отчетливых фенотипических различий трансгенных линий от нетрансгенных, как побледнение листьев при работе по получению трансгенного рапса, не было выявлено (Михайлова, Кулуев, 2015). Характерными изменениями у нетрансгенных проростков амаранта являлись зачастую отставание в росте побега и единичные хлоротичные пятна. В итоге

для амаранта точность визуального отбора трансгенных проростков составил 36%, а с учетом выявленного в третьем поколении небольшого числа трансгенных растений этот показатель снизился до 20%. В связи с этим, основными способами, выявляющими трансгенные формы растений амаранта, остаются молекулярно-генетические методы. Нами были проведены ПЦР-анализ на наличие гена ацетолактатсинтазы, целевого гена *ARL*, промотора вируса мозаики георгина и агробактериального гена *groA*. Таким образом, в результате проведенной работы удалось во втором поколении определить 46 трансгенных растений, а в третьем поколении – 26, половина из которых была использована для морфометрического анализа (Кулуев и др., 2016).

### **3.2.3. Морфометрический анализ трансгенных растений *A. retroflexus*, содержащих ген *ARL A. thaliana***

Для последующего морфометрического анализа с помощью качественной ОТ-ПЦР были отобраны растения амаранта 10 линий под номерами 11, 12, 45, 55, 58, 61, 84, 103, 104 и 112, у которых выявлялась экспрессия гена *ARL* (наличие транскриптов целевого гена). Также данные линии амаранта имели внешние отличия, заключающиеся в увеличении размеров листьев и их количества по сравнению с контролем (рис. 15).



Рис. 15. Внешний вид трансгенных растений амаранта третьего поколения дикого типа (а), линий 61 (б), 84 (в) и 104 (г). На всех четырех фотографиях для оценки масштаба приведен стандартный электронный пропуск ( $85 \times 55$  мм)

Подробный анализ трансгенных растений показал достоверное увеличение длины листьев от 30% до 140% по сравнению с контрольным вариантом (рис. 16а), а достоверное увеличение по высоте стебля отмечено у линий 11, 61, 84, 103, 104. При этом линия 104 характеризовалась высотой стебля в среднем на 69% больше по сравнению с контролем (рис. 16б).

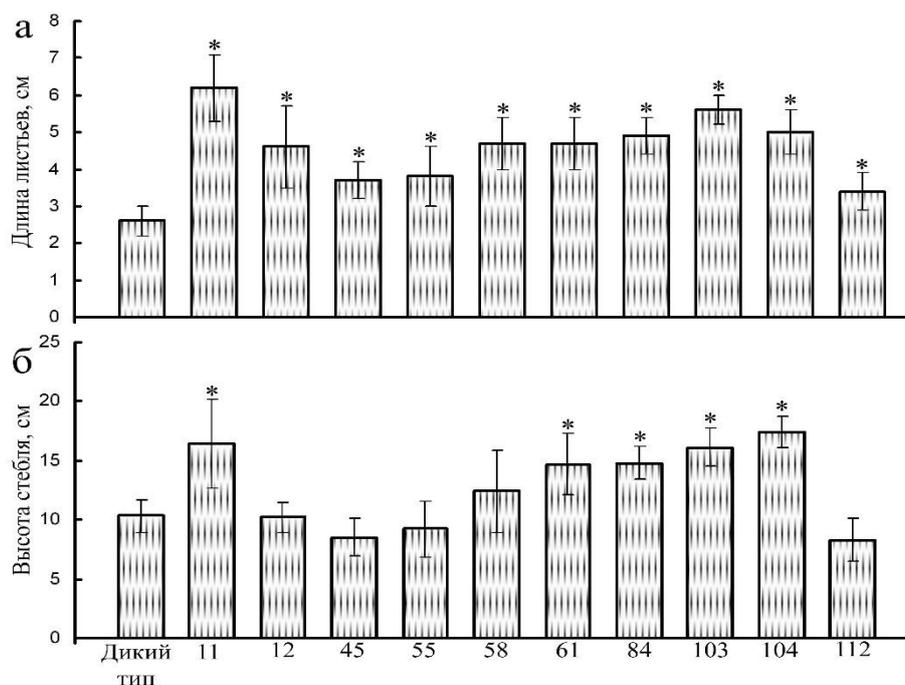


Рис. 16. Длина листьев (а) и высота стебля (б) амарантов дикого типа и трансгенных по гену *ARL* растений амаранта третьего поколения.  $n=15$ , \*  $P < 0.01$ .

Hu с соавт., (2003, 2006) в своих трудах отмечают положительный эффект экспрессии гомологов гена *ARL* на рост надземных органов растений (Hu et al., 2003; Hu et al., 2006). В тоже время гомологи гена *ARL*, например, ген *OsARGOS* риса у *A. thaliana* могут усиливать рост корней за счет увеличения числа и размера клеток (Wang et al., 2009). Однако на амаранте при работе гена *ARL* не наблюдалось изменение длины трансгенных корней по сравнению с контрольными растениями, также как и ранее в исследованиях с табаком (Кулуев и др., 2013). Исходя из проведенного анализа, можно сделать вывод о том, что у трансгенных амарантов нет статистически значимого увеличения длины корня по сравнению с амарантами дикого типа (рис. 17а). В связи с этим, основным фактором увеличения сырой массы являются изменения в развитии надземных частей растения (рис. 17б).

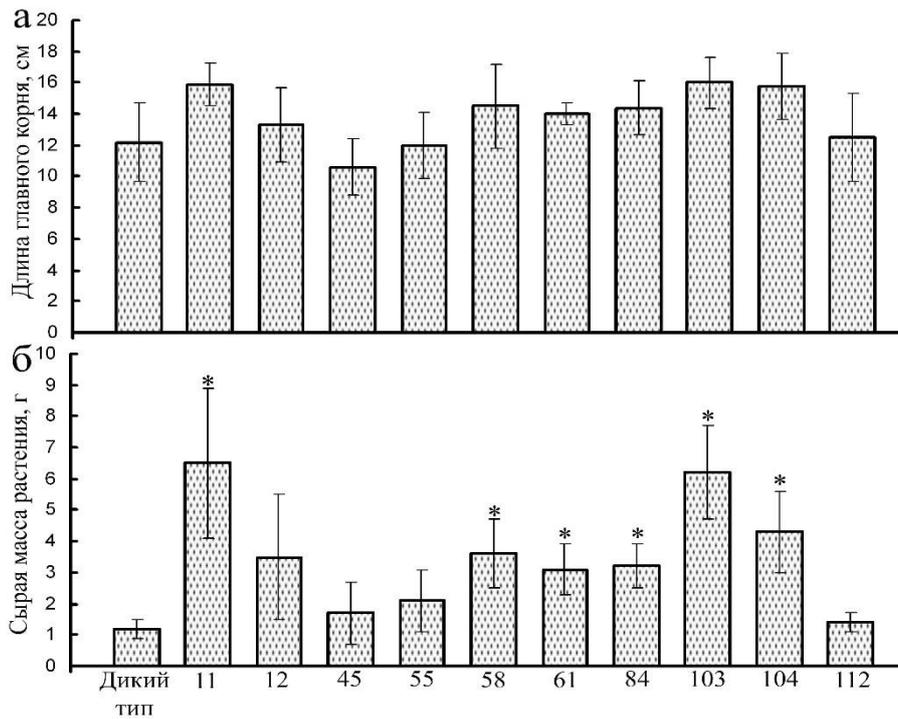


Рис. 17. Длина главного корня (а) и сырая масса (б) амарантов дикого типа и трансгенных по гену *ARL* растений амаранта третьего поколения.  $n=15$ , \*  $P < 0.01$ .

Стоит отметить, что ранее выявленные на *A. thaliana* (Hu et al., 2006), табаке (Кулуев и др., 2013) и рапсе (Михайлова, Кулуев, 2015) фенотипические изменения характерные для сверхэкспрессии гена *ARL*, были выявлены и у трансгенных растений амаранта.

Результаты наших исследований показывают, что методика *floral dip* применима для амаранта, но эффективность трансформации гораздо ниже, чем при работах с *A. thaliana*. Однако эта методика может быть рекомендована для применения в генной инженерии амаранта, так как позволяет получить достаточное число линий трансгенных растений за один эксперимент. Целевой ген *ARL* показывают свою универсальность и может быть рекомендован как для амаранта, так и других культурных растений (Кулуев и др., 2016).

### Заключение к параграфу 3.2.

Нами впервые были получены трансгенные растения *A. retroflexus*, при этом был использован метод погружения цветков, который до наших исследований лишь единожды применялся для представителей рода *Amaranthus* (Munusamy et al., 2013). При этом эффективность трансформации составила 1.4%. В качестве генно-инженерной конструкции применяли ген *ARL A. thaliana* в бинарном векторе pCambia 1301 под контролем промотора вируса мозаики георгина. Данный промотор довольно редко используется в генной инженерии, однако он не уступает в эффективности 35S CaMV промотору (Кулуев и др., 2010). Для морфометрического анализа применялись растения амаранта третьего поколения, содержащие целевой ген *ARL*, отобранные с помощью ПЦР и ОТ-ПЦР. Выбор вида *A. retroflexus* объясняется его коротким вегетационным периодом (не более 2 месяцев). В то время как вегетационный период культурных видов амаранта составляет не менее 3 месяцев. В ходе работы при помощи ПЦР-анализа были исключены растения, которые могли быть инфицированы агробактериями. Морфометрический анализ показал, что эффекты трансгена *ARL* были схожи с эффектами на других видах растений. Ввиду того, что полученные нами трансгенные растения относятся к сорному виду *A. retroflexus*, они не рекомендуются к дальнейшей селекции и практическому применению (Кулуев и др., 2016).

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

Наши работы по floral dip *A. retroflexus* показали относительно низкую эффективность генетической трансформации, поэтому при работах с *A. cruentus* была поставлена задача провести агробактериальную трансформацию его эксплантов в условиях *in vitro*. 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), регенерация из каллусной ткани зрелого эмбриона (Jofre-Garfias et al., 1997) и эпикотилей (Pal et al., 2013).

Прежде чем приступить к работам по трансформации эксплантов амаранта *A. cruentus* необходимо разработать метод введения в культуру *in vitro* и микрклонального размножения в асептических условиях для данной культуры с дальнейшей акклиматизацией регенерантов к условиям открытого воздуха и почвы.

С этой целью на первом этапе стерильные семена проращивали на питательной среде MS, при постоянной температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$  и интенсивности освещения  $35 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2*\text{с})$ . Прорастание семян было зафиксировано через два дня (рис. 18а). Дальнейшее культивирование в стерильных условиях осуществлялось до появления эпикотилей около десяти дней.

Для индукции регенерации у проростков амаранта использовали в качестве эксплантов листовые диски, эпикотили и гипокотили. В работе

использовали регуляторы роста – 13 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 1 мкМ нафтилуксусной кислоты (НУК) (рис. 18 б, в).

Нами было отмечено, что регенерация побега наблюдается преимущественно на сегментах эпикотилей, в то время как экспланты из листьев отмирали, а на сегментах гипокотилей на некоторое время образовывался каллус не способный регенерировать побеги (рис. 18б). В ходе экспериментов из эпикотильных сегментов было получено 14 растений-регенерантов.

Укоренение регенерантов осуществляли на питательной среде МС с добавлением 2 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК) (рис. 18 г). Далее нами проводились мероприятия с целью акклиматизации восьми укоренившихся побегов. Для этого их дальнейшее развитие в течение одной недели осуществлялось в вегетационной емкости с универсальным грунтом Terra vita (Россия) накрытых сверху прозрачным пластиковым сосудом (Таипова, Кулуев, 2018).



Рис. 18. 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 фитогормоны БАП и НУК; г – укоренение побегов амаранта *in vitro*.

Имеются литературные данные об успешной регенерации побегов амаранта на питательной среде МС при использовании в качестве первичного экспланта верхних частей растения с эпикотилем и несколькими настоящими листьями (Bennici et al., 1997). В предыдущих работах Bennici с соавторами (1992) указывают на различия в росте каллуса в зависимости от вида и сорта амаранта при условии применения одинаковых комбинаций регуляторов роста, также отмечается формирование побега только у двух видов амаранта: *A. caudatus* и *A. hypochondriacus* (Bennici et al., 1992).

Bennici с соавторами (1997) на *A. cruentus* линий 434 и 1034 наблюдали образование побегов из стеблевых эксплантатов. Так, для линии 1034 показано лучшее сочетание фитогормонов БАП в концентрации 4.4 мкМ и

НУК в концентрации 2.7 мкМ, стимулирующие образование побега (Bennici et al., 1997).

### **Заключение к параграфу 3.3.**

Для *A. cruentus* сорта Багряный впервые была отработана методика введения в культуру *in vitro*, при этом использовали семена, которые стерилизовали стандартным способом при помощи этилового спирта и раствора гипохлорита натрия. В отличие от единственного имеющегося сведения из литературы (Bennici et al., 1997), для регенерации побегов амаранта были использованы более высокие концентрации - БАП (13 мкМ), но меньшие концентрации НУК (1 мкМ). Такие концентрации были подобраны нами в ходе предварительных исследований. Таким образом, на регенерацию растений амаранта из адвентивных побегов в культуре *in vitro* влияют не только тип питательной среды и регуляторы роста, но и другие факторы, такие как генотип растения, возраст и тип экспланта. Поэтому для увеличения частоты регенерации растений необходимо оптимизировать условия культивирования эксплантов, что является важным шагом для разработки технологий агробактериальной трансформации (Кулуев и др., 2018).

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

При агробактериальной трансформации *A. cruentus* с помощью *A. tumefaciens* использовали только эпикотильные сегменты проростков амаранта, выращенных в асептических условиях. Решение применить эти экспланты было обусловлено результатом предыдущего нашего эксперимента, в котором было показано, что регенерация побега успешно осуществляется именно из эксплантов эпикотилей при использовании БАП и НУК, нежели чем из сегментов гипокотилей или семядольных листьев (рис. 18б, в, 19а). При этом на данных эксплантах наблюдали образование каллуса, однако эффективность морфогенеза *in vitro* и регенерации побегов была относительно низкой. В связи с этим для трансформации амаранта, опосредованной агробактериями, использовались сегменты эпикотилей в количестве 70 эксплантов, предварительно культивированные в течение 6 дней на среде МС с регуляторами роста с целью увеличения размеров исходных эксплантов. Подготовленные таким образом экспланты подвергались поранению для увеличения вероятности успешного проникновения агробактерий в клетки растения и интеграции целевого гена. В данном случае нами с целью получения трансгенных растений была использована генно-инженерная конструкция 35S::*ARL* в бинарном векторе pCambia1301.

В результате эксперимента на среде МС из эпикотильных эксплантов успешно регенерировали 18 растений (рис. 19б), из которых 14 укоренились при использовании среды МС с содержанием 2 мкМ ИУК (рис. 19в). На этапе акклиматизации к условиям почвы и открытого воздуха выжили 11 растений (рис. 19г). Таким образом, можно считать этот эксперимент довольно успешным, поскольку большая часть побегов укоренилась, а также прошла процесс акклиматизации.

Pal с соавт. (2013) используя бинарный вектор, кодирующий ген неомифосфотрансферазы, успешно провели работы по агробактериальной трансформации эпикотилей амаранта *A. tricolor* (Pal et al., 2013). Таким образом, наши и литературные данные говорят о том, что у многих видов амарантов для агробактериальной трансформации целесообразно использовать именно экспланты эпикотилей.

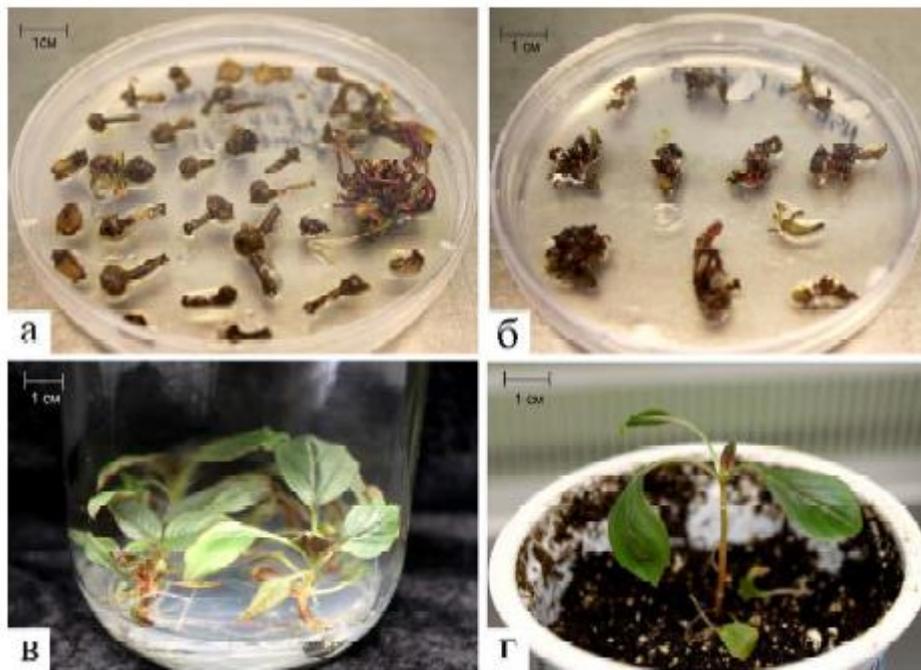


Рис. 19. Опыты по агробактериальной трансформации *A. cruentus*: а – образование каллуса на сегментах гипокотилей и регенерация побегов на сегментах эпикотилей на среде МС, содержащей 6-бензиламинопурин (БАП) и нафтилуксусную кислоту (НУК); б – регенерация побегов из сегментов эпикотилей после агробактериальной трансформации на селективной среде МС с БАП и НУК; в – укоренение на среде МС с индолилуксусной кислотой; г – акклиматизация амаранта к условиям почвы.

Поиск целевых и маркерных генов в полученных растениях осуществляли методом ПЦР-анализа (рис. 20).

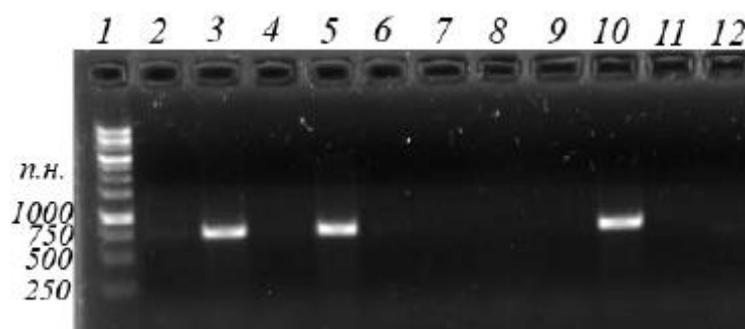


Рис. 20. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа *A. cruentus* на наличие гена гигромицинофосфотрансферазы (*HPT*). 1 – маркер молекулярного веса 1kb (Евроген, Россия), 2-12 – акклиматизированные растения амаранта. ПЦР-положительными оказались растения под номерами 2, 4 и 9 (дорожки 3, 5 и 10 соответственно). Размер ампликона – 786 п.н.

В целом, в ходе эксперимента нам удалось выявить три растения, в геноме которых идентифицировали целевой ген *ARL* и маркерные гены *HPT* и *uidA*. Маркерный ген гигромицинофосфотрансферазы (*HPT*) обуславливает устойчивость растений к антибиотику гигромицину. Поскольку в структуру генно-инженерной конструкции введен ген *HPT*, предусматривалось сохранение и укоренение на селективной среде исключительно трансгенных растений. Однако в нашем эксперименте по трансформации сегментов эпикотилей большинство регенерировавших растений были нетрансгенными. В связи с этим для оптимизации эксперимента существует необходимость в применении селективного антибиотика гигромицина в более высоких концентрациях. Нами впервые проводились работы по генетической трансформации амаранта с использованием гена *HPT*, поэтому оптимальные концентрации антибиотика должны быть подобраны в ходе специальных экспериментов, которые нами не проводились.

Для доказательства трансгенности полученных растений амаранта необходимо было исключить присутствие агробактериального гена *groA* *A. tumefaciens* в их геноме. Во всех анализируемых образцах ДНК регенерантов амаранта с помощью ПЦР анализа нам удалось доказать отсутствие гена

*proA*. В целом эффективность агробактериальной трансформации сегментов эпикотилей *A. cruentus* составила 4% (Таипова и др., 2020).

### **Заключение к параграфу 3.4.**

Нами впервые продемонстрирована возможность агробактериальной трансформации вида *A. cruentus* при использовании бинарного вектора с геном гигромицинофосфотрансферазы. Согласно полученным данным, использование сегментов эпикотилей в качестве исходного материала для агробактериальной трансформации действительно может эффективно применяться для получения генетически модифицированных растений амаранта. Эффективность трансформации *in vitro* была выше, чем при использовании метода *in planta*. Для регенерации следует использовать БАП и НУК, а для укоренения побегов – ИУК. Нерешенной проблемой остается определение оптимальной концентрации селективного агента гигромицина для успешной регенерации и укоренения трансгенных побегов *A. cruentus* (Таипова и др., 2020).

## ВЫВОДЫ

1. Наиболее оптимальная концентрация мутагена азидата натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* лежит в диапазоне от 0.5 до 1 мМ.
2. Методом химически индуцированного мутагенеза с использованием азидата 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 ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Баймухаметова Э.А., Лаштабова С.В., Головина В.Ю., Кимсанбаев О.Х., Кулуев Б.Р. Применение индуцированного мутагенеза для увеличения генетического полиморфизма хлопчатника // Биомика. – 2017. – Т.9, № 4. – С. 370-379.
2. Вавилов П.П., Грищенко В.В., Кузнецов В.С. Практикум по растениеводству. Москва: Колос – 1983.
3. Высочина Г.И. Амарант (*Amaranthus* L.): химический состав и перспективы использования (обзор) // Химия растительного сырья. – 2013. – Т.2. – С. 5-14.
4. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т.1. «Сорта растений» (официальное издание). М.: ФГБНУ «Росинформагротех». –2023. – С. 631.
5. Гудым Е.В. Характеристика мутантных форм амаранта по качеству зерна // Вестник белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 1. – С. 113-117.
6. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика. – 1976. – С. 600.
7. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: пер. с англ. В. Вавера. – 1975.
8. Кононков П.Ф., Гинс М.С. Интродукция амаранта в России // Научно-практический журнал "Овощи России". – 2008. – № 1-2. – С. 79-82.
9. 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.
10. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Конструирование гибридных промоторов каулимовирусов и анализ их активности в трансгенных растениях // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 623-632.

11. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Перенос трансгенов *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10* в нетрансгенные формы табака и фенотипические проявления их конститутивной экспрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 1. – Р. 81-88.
12. Лаштабова С.В., Головина В.Ю., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Применение азидата натрия для химического индуцированного мутагенеза культурных растений // Биомика. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 48-54.
13. Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир. – 2014.
14. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Создание трансгенного рапса (*Brassica napus* L.) с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana* методом погружения цветков // Биотехнология. – 2015. – № 5. – С. 49-58.
15. Михеева Л.А., Брынских Г.Т., Якубова А.Р. Экстракция амарантового масла и изучение его физико-химических свойств // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 129-134.
16. Полевой В.В., Максимов Г.Б. Методы биохимического анализа растений: Учебное пособие. Л.: изд-во Ленингр. Ун-та; 1978.
17. Рапопорт И.А., Открытие химического мутагенеза. Избранные труды. Москва: Наука. – 1993. – С. 304.
18. 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.
19. 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.
20. Таипова Р.М., Кулуев Б.Р. Определение оптимальной концентрации мутагена азидата натрия для обработки семян *Amaranthus cruentus* L // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2021. - № 3. - С. 34-41.

21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах // Лабораторное дело. – 1985. – Т. 11, № 678-681. – С. 316.
25. Южанинова Л. Амарант: все только начинается // Защита растений. – 2020. – № 5. – С. 2-5.
26. Adamu A.K., Aliyu H. Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) // Scientific World Journal. – 2007. V. 2. – № 4. – P. 9-12. [doi:10.4314/swj.v2i4.51755].
27. Agarwal S., Loar S., Steber C., Zale J. Floral transformation of wheat // Transgenic wheat, barley and oats: production and characterization protocols. – 2009. – P. 105-113. [doi: 10.1007/978-1-59745-379-0\_6].
28. Agata R., Mario R., Linda M., Cristiano P., Giuseppe N., Natale D.F., Enhanced osmotolerance of a wheat mutant selected for potassium accumulation // Plant science. – 2001. – V. 160. – № 3. – P. 441-448. [doi:10.1016/S0168-9452(00)00404-0].
29. Ahrar A., Paknejad F., Tabatabaei S.A., Aghayari F., Soltani E. Evaluation of forage Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) yield via comparing

- drought tolerance and susceptibility indices // Italian Journal of Agrometeorology. – 2020. – № 3. – P. 31-40. [doi:10.13128/ijam-868].
30. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. – 1997. – V. 25. – P. 4692-4693. [doi: 10.1093/nar/25.22.4692].
31. Al-Qurainy F., Effects of sodium azide on growth and yield traits of *Eruca sativa* (L.) // World Applied Sciences Journal. – 2009. – V. 7. – № 2. – P. 220-226.
32. Alvarez-Jubete L., Arendt E. K., Gallagher E. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2009. – V. 60. – № 4. – P. 240-257. [doi: 10.1080/09637480902950597].
33. Amanabo M., Ogbadoyi E. O., Johnson A. O., Mathew I. S., Akanya H. O. Effect of heading on some micronutrients, anti-nutrients and toxic substances in *Amaranthus cruentus* grown in Minna, Niger State, Nigeria // American Journal of Food and Nutrition. – 2011. – V. 1. – № 4. – P. 147 -154.
34. Amornrit W., Santiyanont R. Effect of Amaranthus on advanced glycation end-products induced cytotoxicity and proinflammatory cytokine gene expression in SH-SY5Y cells // Molecules. – 2015. – V. 20. – P. 17288-17308. [doi:10.3390/molecules200917288].
35. Amukali O., Obadoni B.O., Mensah J.K. Effects of different NaCl concentrations on germination and seedlings growth of *Amaranthus hybridus* and *Celosia argentea* // African Journal of Environmental Science and Technology. – 2015. – V. 9. – № 4. – P. 301-306. [doi:10.5897/AJEST2014.1819].
36. Ananthaswamy H.N., Vakil U.K., Sreenivasan A. Biochemical and physiological changes in gamma-irradiated wheat during germination // Radiation Botany. – 1971. – V. 11. – № 1. – P. 1-12. [doi: 10.1016/S0033-7560(71)91257-9].
37. Anastasiou E., Kenz S., Gerstung M., MacLean D., Timmer J., Fleck C., Lenhard M. Control of plant organ size by *KLUH/CYP78A5*-dependent intercellular signaling // Developmental Cell. – 2007. – V. 13. – № 6. – P. 843-856. [doi: 10.1016/j.devcel.2007.10.001].

38. Anastasiou E., Lenhard M. Growing up to one's standard // *Current Opinion in Plant Biology* – 2007. – V. 10. – № 1. – P. 63-69. [doi:10.1016/j.pbi.2006.11.002].
39. Animasaun D.A., Oyedeji S., Azeez M.A., Onasanya A.D. Evaluation of the vegetative and yield Performances of groundnut (*Arachis hypogaea*) varieties Samnut 10 and Samnut 20 treated with sodium azide // *International Journal of Scientific and Research Publications*. – 2014. – V. 4. – № 3. – P. 1-10.
40. Anjali K., Joshi A., Maloo S.R., Sharma R. Assessment of the morphological and molecular diversity in *Amaranthus* spp // *African Journal of Agricultural Research*. – 2013. – V. 8. – № 19. – P. 2307-2311. [doi:10.5897/AJAR12.1802].
41. Autran D., Jonak C., Belcram K., Beemster G.T, Kronenberger J., Grandjean O., Inzé D., Traas J. Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the *STRUWWELPETER* gene // *The EMBO journal*. – 2002. – V. 21. – № 22. – P. 6036-6049. [doi:10.1093/emboj/cdf614].
42. Ayo J.A. The effect of amaranth grain flour on the quality of bread // *International Journal of Food Properties*. – 2001. – V. 4. – № 2. – P. 341-351. [doi:10.1081/JFP-100105198].
43. Bagga S., Venkateswari K., Sopory S.K. *In vitro* regeneration of plants from hypocotyl segments of *Amaranthus paniculatus* // *Plant cell reports*. – 1987. – V. 6. – P. 183-184. [doi:10.1007/BF00268473].
44. Bala B.U., Yelwa S.I., Hassan F.S., Babangida S.M. Mutagenic effects of Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) on morphological characteristics on two varieties of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill) // *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. – 2018. – V. 11. – № 1. – P. 50-54.
45. Ballabio C., Uberti F., Di Lorenzo C., Brandolini A., Penas E., Restani P. Biochemical and immunochemical characterization of different varieties of amaranth (*Amaranthus* L. ssp.) as a safe ingredient for gluten-free products // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – V. 59. – № 24. – P. 12969-12974. [doi:10.1021/jf2041824].

46. Bansod, S. V., Gupta, J. P., Pandey, B. K., Awachar, S. R. Effect of Chemically induced Mutation on Yield Contributing and Seed quality Attribute in Pea (*Pisum sativum* L.) // Biological Forum – An International Journal. – 2022. – V. 14. – № 3. – P. 1497-1500.
47. Barba de la Rosa A.B., Fomsgaard I.S., Laursen B., Mortensen A. G., Olvera-Martínez L., Silva-Sánchez C., Mendoza-Herrera J., González-Castañeda De León-Rodríguez A. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality // Journal of Cereal Science. – 2009. – V. 49. – № 1. – P. 117-121. [doi:10.1016/j.jcs.2008.07.012].
48. Barrio DA, Añon MC. 2010. Potential antitumor properties of a protein ' isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus* // European journal of nutrition. – 2010. – V. 49. – P. 73-82. [doi:10.1007/s00394-009-0051-9].
49. Bastaki N.K., Cullis C.A. Floral-dip transformation of flax (*Linum usitatissimum*) to generate transgenic progenies with a high transformation rate // (Journal of Visualized Experiments). – 2014. – № 94. – P. 1-10. [doi: 10.3791/52189].
50. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – T.39. – P.205–207 [doi:10.1007/BF00018060].
51. Becker R., Wheeler E.L., Lorenz K., Stafford A.E., Grosjean O.K., Betschart A.A., Saunders R.M., Saunders R.M. A composition study of amaranth grain // Journal of food science. – 1981. – V. 46. – № 4. – P. 1175-1180. [doi:10.1111/j.1365-2621.1981.tb03018.x].
52. Bellache M., Allal Benfekih L., Torres-Pagan N., Mir R., Verdeguer M., Vicente O., Boscaiu M. Effects of four-week exposure to salt treatments on germination and growth of two *Amaranthus* species // Soil Systems. – 2022. – V. 6. – № 3. – P. 57. [doi: 10.3390/soilsystems6030057].

53. Bello Z.A., Walker S. Evaluating AquaCrop model for simulating production of amaranthus (*Amaranthus cruentus*) a leafy vegetable, under irrigation and rainfed conditions // *Agricultural and Forest Meteorology*. – 2017. – V. 247. – P. 300-310. [doi:10.1016/j.agrformet.2017.08.003].
54. Bennici A., Grifoni T., Schiff S., Bovelli R. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus* // *Plant cell, tissue and organ culture*. – 1997. – V. 49. – P. 29-33. [doi: 10.1023/A:1005882322044].
55. Bennici A., Schiff S., Bovelli R. *In vitro* culture of species and varieties of four *Amaranthus* L.species // *Euphytica*. – 1992. – V. 62. – P. 181-186. [doi: 10.1007/BF00041752].
56. Bodroza-Solarov M., Filipcev B., Kevresan Z., Mandic A., Simurina O. Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain // *Journal of food process engineering*. – 2008. – V. 31. – № 5. – P. 602-618. [doi:10.1111/j.1745-4530.2007.00177.x].
57. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., Papenbrock J. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // *AoB Plants*. – 2014. – № 13. – P. 6-12. [doi: 10.1093/aobpla/plu046].
58. Bor M., Özdemir F., Türkan I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L // *Plant science*. – 2003. – V. 164. – № 1. – P. 77-84. [doi: 10.1016/S0168-9452(02)00338-2].
59. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. – 1976. – V. 72. – P. 248-254. [doi:10.1006/abio.1976.9999].
60. Bressani R. Amaranth grain. It's Chemical Composition and Nutritive Value // *Fourth Amaranth Symposium. Minnesota*. – 1990. P. 123-179.
61. Bressani R. Composition and nutritional properties of amaranth // *Amaranth biology, chemistry, and technology*. – CRC Press, 2018. – P. 185-205.

62. Bressani R., González J.M., Zúñiga J., Breuner M., Elías L.G. Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1987. – V. 38. – № 4. – P. 347-356. [doi:10.1002/jsfa.2740380407].
63. Budin J.T., Breene W.M., Putnam D.H. Some compositional properties of seeds and oils of eight *Amaranthus* species // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1996. – V. 73. – P. 475-481. [doi: 10.1007/BF02523922].
64. Castellanos-Arévalo A.P., Estrada-Luna A. A., Cabrera-Ponce J.L., Valencia-Lozano E., Herrera-Ubaldo H., de Folter S., Blanco-Labra A., Délano-Frier J.P. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of grain (*Amaranthus hypochondriacus*) and leafy (*A. hybridus*) amaranths // *Plant Cell Reports*. – 2020. – V. 39. – № 9. – P. 1143-1160. [doi:10.1007/s00299-020-02553-9].
65. Cheng X., Gao M. Biological and genetic effects of combined treatments of sodium azide, gamma rays and EMS in barley // *Environmental and Experimental Botany*. – 1988. – V. 28. – № 4. – P. 281-288. [doi: 10.1016/0098-8472(88)90051-2].
66. Cia M.C., Guimaraes A.C.R., Medici L.O., Chabregas S.M., Azevedo R.A. Antioxidant responses to water deficit by drought tolerant and sensitive sugarcane varieties // *Annals of Applied Biology*. – 2012. – V. 161. – № 3. – P. 313-324. [doi: 10.1111/j.1744-7348.2012.00575.x].
67. Clay N.K., Nelson T. The recessive epigenetic swellmap mutation affects the expression of two step II splicing factors required for the transcription of the cell proliferation gene *STRUWWELPETER* and for the timing of cell cycle arrest in the *Arabidopsis* leaf // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17. – № 7. – P. 1994-2008. [doi:10.1105/tpc.105.032771].
68. Clough S.J., Bent A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // *The plant journal*. – 1998. – V. 16. – № 6. – P. 735-743. [doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x].

69. Conforti F., Giancarlo A., Statti A., Loizzo M.R., Gianni A., Sacchetti B., Poli F., Menichini F. *In vitro* antioxidant effect and inhibition of alpha-amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds // Biological and pharmaceutical bulletin. – 2005. – V. 28. – № 6. – P. 1098-1102. [doi: 10.1248/bpb.28.1098].
70. Conger B.V. The effects of ascorbic acid and sodium azide on seedling growth of irradiated and non-irradiated barley seeds // Radiation Botany. – 1973. – V. 13. – № 6. – P. 375-379. [doi: 10.1016/S0033-7560(73)90176-2].
71. Corke H., Wu H., Yue S., Sun H. Developing specialty starches from new crops // Cereals: Novel uses and processes. – 1997. – P. 91-102. [doi:10.1007/978-1-4757-2675-6\_12].
72. Costea M., Tardif F.J. The biology of Canadian weeds. 126. *Amaranthus albus* L., *A. blitoides* S. Watson and *A. blitum* L // Canadian Journal of Plant Science. – 2003. – V. 83. – № 4. – P. 1039-1066. [doi:10.4141/P02-056].
73. Dassharma K., Gavankar R., Mello B.D., Kesur P. Cytological effect of UV radiations and chemical mutagens on *Pisum sativum* L. and *Hordeum vulgare* L // International Journal of Bioassays. – 2015. – V. 4. – P. 4586-4589.
74. Dawood M.G., Taie H.A.A., Nassar M.R.A., Abdelhamid M.T., Schmidhalter U. The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress // South African Journal of Botany. – 2014. – V. 93. – P. 54-63. [doi: 10.1016/j.sajb.2014.03.002].
75. Dinneny J.R, Yadegari R., Fischer R.L., Yanofsky M.F., Weigel D. The role of *JAGGED* in shaping lateral organs // Development. – 2004. – V. 131. – № 5. – P. 1101–1110. [doi: 10.1242/dev.00949].
76. Disch S., Anastasiou E., Sharma V.K., Laux T., Fletcher J.C., Lenhard M. The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls *Arabidopsis* organ size in a dosage-dependent manner // Current Biology. – 2006. – V. 16. – № 3. – P. 272-279. [doi: 10.1016/j.cub.2005.12.026].
77. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – V.12. – P.13-15.

78. Doyle J.J., Doyle J.L., Rapid A. DNA Isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochemical Bulletin*. – 1987. – V. 19. – P. 1-11.
79. Dyulgerova B. Genetic diversity among induced mutants of winter barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Journal of Central European Agriculture*. –2012. – V. 13. – № 2. – P. 262–272. [doi: 10.5513 / JCEA01 / 13.2.1044].
80. Easlon H.M., Bloom A.J Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area // *Applications in plant sciences*. – 2014. – V. 2. – № 7. – P. 1400033. [doi: 10.3732/apps.1400033].
81. Fasano A., Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum // *Gastroenterology*. – 2001. – V. 120. – № 3. – P. 636-651. [doi: 10.1053/gast.2001.22123].
82. Fidantsi A., Doxastakis G. Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. – 2001. – V. 21. – № 1-3. – P. 119-124. [doi: 10.1016/S0927-7765(01)00165-5].
83. Flores H.E., Thier A., Galston A.W. *In vitro* culture of grain and vegetable amaranths (*Amaranthus* spp.) // *American Journal of Botany*. – 1982. – V. 69. – № 7. – P. 1049-1054. [doi: 10.1002/j.1537-2197.1982.tb13350.x].
84. Gamel T.H., Mesallam A.S., Damir A.A., Shekib L.A., Linssen J.P. Characterization of amaranth seed oils // *Journal of food lipids*. – 2007. – V. 14. – № 3. – P. 323-334. [doi:10.1111/j.1745-4522.2007.00089.x].
85. Ganesan M., Bhanumathi P., Jayabalan N. Mutagenic effect of sodium azide on somatic embryo regeneration and root growth of cotton (*Gossypium hirsutum* L. CV. SVPR2) // *Journal of Agricultural Technology*. – 2005. – V. 1. – P. 365–380.
86. Gardner F.P., Pearce R.B., Mitchell R.L. *Physiology of crop plants*. // Scientific publishers. – 2017.
87. Gelvin S.B. Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome // *Frontiers in plant science*. – 2012. – V. 3. – P. 52. [doi: 10.3389/fpls.2012.00052].

88. George G., Jorge L., Enrique M. Amaranth grain: Protein Value of Soft Endosperm Maize Alone and With Toasted Amaranth Flour // *Journal of Food Processing*. – 2006. – V. 19. – № 8. – P. 859-866.
89. Giami S.Y., Mepba H.D., Kiin-Kabari D.B. Achinewhu S.C. Evaluation of the nutritional quality of breads prepared from wheat-fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook) seed flour blends // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2003. – V. 58. – № 3. – P. 1-8. [doi: 10.1023/B:QUAL.0000041167.61992.4d].
90. Gonzalez N., Beemster G.T., Inzé D. 2009. David and Goliath: what can the tiny weed *Arabidopsis* teach us to improve biomass production in crops // *Current opinion in plant biology*. – 2009. – V. 12. – № 2. – P. 157-164. [doi: 10.1016/j.pbi.2008.11.003].
91. Gorinstein S., Medina-Vargas O.J., Jaramillo N.O., Arnao-Salas I., Martinez-Ayala A.L., Arancibia-Avila P., Toledo F., Katrich E., Trakhtenberg S. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals // *European Food Research and Technology*. – 2007. – V. 225. – P. 321-328. [doi: 10.1007/s00217-006-0417-7].
92. Gorinstein S., Pawelzik E., Delgado-Licon E., Haruenkit R., Weisz M., Trakhtenberg S. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2002. – V. 82. – № 8. – P. 886-891. [doi: 10.1002/jsfa.1120].
93. Grant W.F., Salamone M.F. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the international program on chemical safety collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens // *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1994. – V. 310. – № 2. – P. 187-209. [doi: 10.1016/0027-5107(94)90113-9].
94. Graziene D. Chemical composition and properties of oil from *Amaranthus* seed growing in Lithuania // *Veterinarija ir Zootechnika*. – 2007. – V. 39. – № 61. – P. 22-29.
95. Guillen-Portal F.R., Baltensperger D.D., Nelson L.A. Plant population influence on yield and agronomic traits in Plainsman grain amaranth //

Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. – 1999. – P. 190-193.

96. Guo M., Rupe M.A., Wei J., Winkler C., Goncalves-Butruille M., Weers B.P., Cerwick S.F., Dieter J.A., Duncan K.E., Howard R.J., Hou Z., Löffler C.M., Cooper M., Simmons C.R. Maize *ARGOS1* (*ZARI*) transgenic alleles increase hybrid maize yield // *Journal of experimental botany*. – 2014. – V. 65. – № 1. – P. 249-260. [doi: 10.1093/jxb/ert370].

97. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *Journal of Biological Chemistry*. – 1974. – V. 246. – P. 7130. [doi: 10.1016/S0021-9258(19)42083-8].

98. Haridy M.H., Ahmed H.A., Mahdy A.Y., El-Said A., Hemada S.S. Effect of Sodium Azide on Yield and its Components in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. – V. 25. – № 7. – P. 627-636. [doi: 10.3923/pjbs.2022.627.636].

99. He H.P., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. (2002). Extracion and purification of squalene from *Amaranthus* grain // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – V. 50. – № 2. – P. 368-372. [doi: 10.1021/jf010918p].

100. He H.P., Corke H. Oil and Squalene in *Amaranthus* grain and leaf // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – V. 51. – № 27. – P. 7913-7920. [doi: 10.1021/jf030489q].

101. Hoda E., Gehan G. Induction of mutations in *Browallia speciosa* using sodium azide and identification of the genetic variation by peroxidase isozyme // *African Journal of Biotechnology*. – 2014. – V. 13. – № 1. – P. 106. [doi: 10.5897/AJB2013.13302].

102. Horiguchi G., Kim G.T., Tsukaya H. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Journal*. – 2005. – V. 43. – № 1. – P. 68-78. [doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02429.x].

103. Hu Y., Poh H., Chua N. The *Arabidopsis ARGOSLIKE* gene regulates cell expansion during organ growth // *The Plant Journal*. – 2006. – V. 47. – № 1. – P. 1-9. [doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02750.x].
104. Hu Y., Xie Q., Chua N. The *Arabidopsis* auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size // *Plant Cell*. – 2003. – V. 15. – P. 1951-1961. [doi: 10.1105/tpc.013557].
105. Huerta-Ocampo J.A., Barrera-Pacheco A., Mendoza-Hernández C.S., Espitia-Rangel E., Mock H.P., Barba De La Rosa A.P. Salt stress-induced alterations in the root proteome of *Amaranthus cruentus* L // *Journal of proteome research*. – 2014. – V. 13. – № 8. – P. 3607-3627. [doi: 10.1021/pr500153m].
106. Huerta-Ocampo J.A., Briones-Cerecero E.P., Mendoza-Hernandez G., De Leon-Rodriguez A., Barba De La Rosa A.P. Proteomic Analysis of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Leaves under Drought Stress // *International journal of plant sciences*. – 2009. – V. 170. – № 8. – P. 990-998.
107. Huerta-Ocampo J.A., León-Galván M.F., Ortega-Cruz L.B., Barrera-Pacheco A., De León-Rodríguez A., Mendoza-Hernández G., Barba De La Rosa A.P. Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.) // *Plant Biology*. – 2011. – V. 13. – № 3. – P. 472-482. [doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00391.x].
108. Hussain S., Khan W.M., Khan M.S., Akhtar N., Umar N., Ali S., Shah S.S. Mutagenic effect of sodium azide (NaN<sub>3</sub>) on M<sub>2</sub> generation of *Brassica napus* L.(variety Dunkled) // *Pure and Applied Biology (PAB)*. – 2017. – V. 6. – № 1. – P. 226-236. [doi: 10.19045/bspab.2017.60018].
109. Jahaniaval F., Kakuda Y., Marccone M.F. Fatty acids and triglycerol compositions of seed oil of five *Amaranthus* accessions and their comparison ton other oils // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 2000. – V. 77. – P. 847-852. [doi: 10.1007/s11746-000-0135-0].

110. Jamrika P. The effect of the stand organisation on the yield of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) // Rostlina Vyroba. – 1990. – V. 36. – № 8. – P. 889-896.
111. Januszewska-Józwiak K, Synowiecki J. Characteristics and suitability of amaranth components in food biotechnology // Biotechnologia. – 2008. – V. 3. – P. 89-102.
112. Ji W., Zhu Y., Li Y., Yang L., Zhao X., Cai H., Bai X. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco // Biotechnology letters. – 2010. – V. 32. – P. 1173-1179. [doi: 10.1007/s10529-010-0269-x].
113. Jiménez-Aguilar D.M., Grusak M.A. Minerals, vitamin C, phenolics, flavonoids and antioxidant activity of *Amaranthus* leafy vegetables // Journal of Food Composition and Analysis. – 2017. – V. 58. – P. 33-39. [doi: 10.1016/j.jfca.2017.01.005].
114. Jofre-Garfias A.E., Villegas-Sepúlveda N., Cabrera-Ponce J.L., Adame-Alvarez R.M., Herrera-Estrella L., Simpson J. 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. – № 12. – P. 847-852. [doi: 10.1007/s002990050332].
115. Johnson B.L., Henderson T.L. Water use patterns of grain amaranth in the northern Great Plains // Agronomy Journal. – 2002. – V. 94. – № 6. – P. 1437-1443. [doi: 10.2134/agronj2002.1437].
116. Kabiri N., Asgary S., Madani H., Mahzouni P. Effects of *Amaranthus caudatus* L. extract and lovastatin on atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits // Journal of Medicinal Plants Research. – 2010. – V. 4. – № 5. – P. 355-361.
117. Kadereit G., Borsch T., Weising K., Freitag H. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C-4 photosynthesis // International journal of plant sciences. – 2003. – V. 164. – № 6. – P. 959-986.

118. Kalac P., Moudry J. Chemical composition and nutritional value of amaranth grains // Czech Journal of Food Sciences. – 2000. – V. 18. – P. 201-206.
119. Kato M., Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plants VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation // Plant and cell physiology. – 1985. – V. 26. – № 7. – P. 1291-1301. [doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a077029].
120. Kaul H., Aufhammer B.L., Nalborczyk E., Pirog S., Wasiak K. The suitability of amaranth genotypes for grain and fodder use in Central Europe // Die Bodenkultur. – 1996. – V. 173. – № 47. – P. 3.
121. Keckesova M., Galova Z., Hricova A. Changes in protein profile in amaranthus mutant line // Journal of microbiology, biotechnology and food sciences. – 2012. – V. 1. – P. 114-1135.
122. Khan S., Al-Qurainy F., Anwar F. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants // Environment & We an International Journal of Science & Technology – 2009. – V. 4. – P. 1-21.
123. Khandaker L., Akond A.M., Ali M.B., Oba S. Biomass yield and accumulations of bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) grown under different colored shade polyethylene in spring season // Scientia horticulturae. – 2010. – V. 123. – № 3. – P. 289-294. [doi: 10.1016/j.scienta.2009.09.012].
124. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Abdel W.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress // Journal of Experimental Botany. – 2003. – V. 54. – № 392. – P. 2553-2562. [doi: 10.1093/jxb/erg277].
125. Kim G.T., Tsukaya H., Uchimiya H. The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells // Genes & Development. – 1998. – V. 12. – № 15. – P. 2381-2391.
126. Kim J.H., Choi D., Kende H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis* // The Plant

- Journal. – 2003. – V. 36. – № 1. – P. 94-104. [doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01862.x].
127. Kleinhofs A., Owais W.M., Nilan R.A. Azide. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. – 1978. – V. 55. – №3-4. –P. 165-195.
128. Koca H., Bor M., Özdemir F., Türkan İ. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars // Environmental and experimental Botany. – 2007. – V. 60. – № 3. – P. 344-351. [doi: 10.1016/j.envexpbot.2006.12.005].
129. Koca H., Ozdemir F., Turkan I. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* // Biologia Plantarum. – 2006. – V. 50. – P. 745-748. [doi: 10.1007/s10535-006-0121-2].
130. Konzak C.F., Niknejad M., Wickhan I.M., Donaldson E. Mutagenic interaction of sodium azide on mutations induced in barley seeds treated with diethyl sulfate or N-methyl-nitrosourea // Mutation Research/Genetic Toxicology. – 1975. – V. 30. – № 1. – P. 55-61. [doi:10.1016/0027-5107(75)90252-3].
131. Krizek B.A. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs // Developmental Genetics. – 1999. – V. 25. – № 3. – P. 224-236. [doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1999)25:3<224::AID-DVG5>3.0.CO;2-Y];
132. Kumar R., Singh L., Ahmad T., Ahmed B. Mutagenic effect of hydroxyl amine and sodium azide on the performance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // Crop Research. – 2023. – V. 58. – № 3. – P. 184-188. [doi: 10.31830/2454-1761.2023.CR-900].
133. Kumar S. Recessive monogenic mutation in grain pea (*Pisum sativum*) that causes pyridoxine requirement for growth and seed production // Journal of Bioscience. – 1988. – V. 13. – № 4. – P. 415–418. [doi: 10.1007 / BF02703453].
134. Kushwaha S., Chawla P., Kochhar A. Effect of supplementation of drumstick (*Moringa oleifera*) and amaranth (*Amaranthus tricolor*) leaves powder on antioxidant profile and oxidative status among postmenopausal women //

- Journal of food science and technology. – 2014. – V. 51. – P. 3464-3469. [doi: 10.1007/s13197-012-0859-9].
135. Lal G.M., Toms B., Lal S.S. Mutagenic sensitivity in early generation in black gram // *Asian Journal of Agricultural Sciences*. – 2009. – V. 1. – № 1. – P. 9-11.
136. Lavini A., Pulvento C., d'Andria R., Riccardi M. Effects of saline irrigation on yield and qualitative characterization of seed of an amaranth accession grown under Mediterranean conditions // *The Journal of Agricultural Science*. – 2016. – V. 154. – № 5. – P. 858-869. [doi: 10.1017/S0021859615000659].
137. Lawrence B.K., Waller S.S., Moser L.E., Anderson B., Larson L.L. Forage value of weed species in a grass seeding. – 1989.
138. Lee B.H., Ko J.H., Lee S., Lee Y., Pak J.H., Kim J.H. The *Arabidopsis GRF-INTERACTING FACTOR* gene family performs an overlapping function in determining organ size as well as multiple developmental properties // *Plant Physiology*. – 2009. – V. 151. – № 2. – P. 655-668. [doi: 10.1104/pp.109.141838].
139. Lee J.R., Hong G.Y., Dixit A., Chung J.W., Ma K.H., Lee J.H., Kang H.K., Cho Y., Jae-Gyun G., Yong-Jin P. Characterization of microsatellite loci developed for *Amaranthus hypochondriacus* and their cross-amplification in wild species // *Conservation genetics*. – 2008. – V. 9. – P. 243-246. [doi: 10.1007/s10592-007-9323-1].
140. Leegood R.C., Edwards G.E. Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to other environmental factors // *Photosynthesis and the Environment*. – 1996. – P. 191-221. [doi: 10.1007/0-306-48135-9].
141. Li Y., Zheng L., Corke F., Smith C., Bevan M.W. Control of final seed and organ size by the *DA1* gene family in *Arabidopsis thaliana* // *Genes & Development*. – 2008. – V. 22. – № 10. – P. 1331-1336.
142. Lopez-Mejía OA, Lopez-Malo A, Palou E. 2014. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves //

- Industrial Crops and Products. – 2014. – V. 53. – P. 55-59. [doi: 10.1016/j.indcrop.2013.12.017].
143. Lü P., Kang M., Jiang X., Dai F., Gao J., Zhang C. RhEXPA4, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis* // *Planta*. – 2013. – V. 237. – P. 1547-1559. [doi: 10.1007/s00425-013-1867-3].
144. Makus D.J. Salinity and nitrogen level affect agronomic performance, leaf color and leaf mineral nutrients of vegetable Amaranth // *Subtropical Plant Science*. – 2003. – V. 55. – P. 1-6.
145. Maldonado-Cervantes E, Jeong H.J., Leon-Galv ´ an F., Barrera-Pacheco A., De ´ Leon-Rodr ´ ´iguez A., Gonzalez de Mej ´ ´ia E., De Lumen B.O., Barba de La Rosa A.P. Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells // *Peptides*. – 2010. – V. 31. – № 9. – P. 1635-1642. [doi: 10.1016/j.peptides.2010.06.014].
146. Mallory M.A., Hall R.V., McNabb A.R., Pratt D.B., Jellen E.N., Maughan P.J Development and characterization of microsatellite markers for the grain amaranths // *Crop science*. – 2008. – V. 48. – № 3. – P. 1098-1106. [doi: 10.2135/cropsci2007.08.0457].
147. Mao G., Xu X. Screening and physiological and biochemical analysis of *Lycium barbarum* mutant with salt tolerance // *Journal of Northwest Botanical Research*. – 2005. – V. 25. – № 2. – P. 6.
148. Martinez-Trujillo M., Limones-Briones V., Cabera-Ponce J.L., Herrera-Estrella L. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 2004. – V. 22. – P. 63-70. [doi: 10.1007/BF02773350].
149. Matzrafi M., Osipitan O.A., Ohadi S., Mesgaran M.B. Under pressure: maternal effects promote drought tolerance in progeny seed of Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) // *Weed Science*. – 2021. – V. 69. – № 1. – P. 31-38. [doi: 10.1017/wsc.2020.75].

150. Maughan P.J., Turner T.B., Coleman C.E., Elzinga D.B., Jellen E.N., Morales J.A., Udall J. A., Fairbanks D. J., Bonifacio A. Characterization of *Salt Overly Sensitive 1 (SOS1)* gene homologs in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) // *Genome*. – 2009. – V. 52. – № 7. – P. 647-657. [doi: 10.1139/G09-041].
151. Maxim E., Capraru G., Campeanu M.M. Some cytogenetic effects of sodium azide treatments in caraway root meristems // *Journal of Experimental and Molecular Biology*. – 2009. – V. 10. – № 1. – P. 9.
152. Mburu M.W., Gikonyo N.K., Kenji G.M., Mwasaru A.M. Nutritional and functional properties of a complementary food based on Kenyan amaranth grain (*Amaranthus cruentus*) // *African journal of food, agriculture, nutrition and development*. – 2012. – V. 12. – № 2. – P. 5959-5977. [doi: 10.18697/ajfand.50.9800].
153. Mburu M.W., Gikonyo N.K., Kenji G.M., Mwasaru A.M. Properties of a Complementary Food based on Amaranth Grain (*Amaranthus cruentus*) Grown in Kenya // *Journal of Agriculture and Food Technology*. – 2011. – V. 1. – № 9. – P. 153-178.
154. Mendonca S., Saldiva P.H., Cruz R.J., Gomez-Arceas J.A. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect // *Food chemistry*. – 2009. – V. 116. – № 3. – P. 738-742. [doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.021].
155. Mensah J.K., Obadoni B. Effects of sodium azide on yield parameters of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) // *African Journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 6. – № 6. – P. 668–671.
156. Mizukami Y., Fischer R.L. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – V. 97. – № 2. – P. 942-947. [doi: 10.1073/pnas.97.2.942].
157. Mlakar S.G., Turinek M., Jakop M., Bavec M., Bavec F. Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making // *Agricultura*. – 2009. – V. 6. – № 4. – P. 43-53.

158. Monteiro M.S., Lopes T., Mann R.M., Paiva C., Soares A.M.V.M., Santos C. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium // Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2009. – V. 672. – № 2. – P. 90-94. [doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.012].
159. Montoya-Rodríguez A., Gonzalez de Mejía E., Dia V.P., Reyes-Moreno C., Milan-Carrillo J. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF-κB signaling // Molecular Nutrition & Food Research. – 2014. – V. 58. – № 5. – P. 1028-1041. [doi: 10.1002/mnfr.201300764].
160. Mostafa G.G. Effect of Sodium Azide on the Growth and Variability Induction in *Helianthus annuus* L // International Journal of Plant Breeding and Genetics. – 2011. – V. 5. – P. 76-85.
161. Mu G., Chang N., Xiang K., Sheng Y., Zhang Z., Pan G. Genetic transformation of maize female inflorescence following floral dip method mediated by *Agrobacterium* // Biotechnology. – 2012. – V. 11. – № 3. – P. 178-183. [doi: 10.3923/biotech.2012.178.183].
162. Munusamy U., Abdullah S.A., Aziz M.A., Khazaai H. Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for *Agrobacterium*-mediated transformation // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2013. – V. 4. – № 2. – P. 188-192. [doi: 10.4236/abb.2013.42027].
163. Muthusamy A., Vasanth K., Jayabalan N. Induced High Yielding Mutants in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Mutation Breeding Newsletter and Reviews. – 2005. – № 1.
164. Niazian M., Sadat Noori S.A., Galuszka P., Mortazavian S.M.M. Tissue culture-based *Agrobacterium*- mediated and in planta transformation methods // Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2017. – V. 53. – № 4. – P. 133-143. [doi: 10.17221/177/2016-CJGPB].

165. Odjegba V.J., Chukwunwike I.C. Physiological responses of *Amaranthus hybridus* L. under salinity stress // Nigerian Journal of Life Sciences (ISSN: 2276-7029). – 2015. – V. 5. – № 2. – P. 242-252. [doi: 10.52417/njls.v5i2.258].
166. Ogden R.C., Adams D.A. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels // Methods Enzymol. – 1987. – T.152. – P. 61-87.
167. Ogrodowska D., Zadernowski R., Czaplicki S., Derewiaka D., Wronowska B. Amaranth seeds and products – the source of bioactive compounds // Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. – 2014. – V. 64. – № 3. – P. 165–170. [doi:10.2478/v10222-012-0095-z].
168. Ohno C.K., Reddy G.V., Heisler M.G., Meyerowitz E.M. The Arabidopsis *JAGGED* gene encodes a zinc finger protein that promotes leaf tissue development // Development. – 2004. – V. 131. – № 5. – P. 1111– 1122. [doi: 10.1242/dev.00991].
169. Omami E.N., Hammes P.S. Ameliorative effects of calcium on growth and mineral uptake of salt-stressed amaranth // South African Journal of Plant and Soil. – 2006. – V. 23. – № 3. – P. 197-202.
170. Omami E.N., Hammes P.S., Robbertse P.J. Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus* spp.) genotypes // New Zealand journal of crop and horticultural science. – 2006. – V. 34. – № 1. – P. 11-22. [doi: 10.1080/01140671.2006.9514382].
171. Omoregie U.E., Mensah J.K., Ikhajiagbe B. Sodium azide and hydroxyl ammonium hydrochloride show affinity for different *Oryza sativa* varieties in mutation studies // Sustainability, Agri, Food and Environmental Research. – 2023. – V. 11. – P. 1-10. [doi: 10.7770/safer-V11N1-art2814].
172. Osborn M., Weber K. Damage of cellular functions by trifluoperazine, a calmodulin-specific drug // Experimental cell research. 1980. – V. 130. – № 2. – P. 484-488.
173. Oseguera-Toledo M.E., Gonzalez de Mejia E., Dia V.P., Amaya-Llano S.L. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-

- induced macrophages through suppression of NF- $\kappa$ B pathways // *Food Chemistry*. – 2011. – V. 127. – № 3. – P. 1175-1185. [doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.121].
174. Owais W.M., Kleinhofs A. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 1988. – V. 197. – № 2. – P. 313-323. [doi: 10.1016/0027-5107(88)90101-7].
175. Pal A., Swain S. S., Das A.B., Mukherjee A.K., Chand P.K. Stable germ line transformation of a leafy vegetable crop amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. – 2013b. – V. 49. – P. 114-128. [doi: 10.1007/s11627-013-9489-9].
176. Pal A., Swain S.S., Mukherjee A.K., Chand P.K. *Agrobacterium* pRi TL-DNA rolB and TR-DNA opine genes transferred to the spiny amaranth (*Amaranthus spinosus* L.), a nutraceutical crop // *Food Technology and Biotechnology*. – 2013a. – V. 51. – № 1. – P. 26-35.
177. Palmeros-Suárez P.A., Casarrubias-Castillo K., Massange-Sánchez J.A. Amaranth Transcription Factors in Response to Biotic and Abiotic Stresses // *The Amaranth Genome*. – Cham : Springer International Publishing. 2021. – P. 167-181. [doi: 10.1007/978-3-030-72365-1\_10].
178. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schoff F. Heat stress and heat shock transcription factor-depend expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant physiology*. – 2002. – V. 129. – № 2. – P. 838-853. [doi: 10.1104/pp.001362].
179. Papadopoulou K., Melto R.E., Leggett M., Daniels M.J., Osbourn A.E., Compromised disease resistance in saponin-deficient plant // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – V. 96. – № 22. – P. 12923-12928. [doi: 10.1073 / pnas.96.22.12923].
180. Parida A.K., Das A.B., Sanada Y., Mohanty P. Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Aegiceras corniculatum* // *Aquatic botany*. – 2004. – V. 80. – № 2. – P. 77-87. [doi: 10.1016/j.aquabot.2004.07.005].

181. Park Y.J., Nemoto K., Nishikawa T., Matsushima K., Minami M., Kawase M. Origin and evolution of the waxy phenotype in *Amaranthus hypochondriacus*: evidence from the genetic diversity in the Waxy locus // Molecular breeding. – 2012. – V. 29. – P. 147-157. [doi: 10.1007/s11032-010-9533-y].
182. Pavlik V. The revival of amaranth as a third-millennium food // Neuroendocrinol. Lett. – 2012. – V. 33. – № 37. – P. 3-7.
183. Pilu R., Panzeri D., Gavazzi G., Rasmussen S. K., Consonni G., Nielsen E. Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (lpa241) // Theoretical and Applied Genetics. – 2003. – V. 107. – P. 980-987. [doi: 10.1007/s00122-003-1316-y].
184. Plate A.Y., Arêas J.A. Cholesterol-lowering effect of extruded ' amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits // Food Chemistry. – 2002. – V. 76. – № 1. – P. 1-6. [doi: 10.1016/S0308-8146(01)00238-2].
185. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E // Analytical Biochemistry. – 1999. – V. 269. – № 2. – P. 337-341. [doi: 10.1006/abio.1999.4019].
186. Qin L., Guo S., Ai W., Tang Y., Cheng Q., Chen G. Effect of salt stress on growth and physiology in amaranth and lettuce: Implications for bioregenerative life support system // Advances in Space Research. – 2013. – V. 51. – № 3. – P. 476-482. [doi: 10.1016/j.asr.2012.09.025].
187. Raina A., Wani M.R., Laskar R.A., Khan S. Chemical mutagenesis: role in breeding and biofortification of lentil (*Lens culinaris* Medik) mutant lines // Molecular Biology Reports. – 2022. – V. 49. – № 12. – P. 11313-11325. [doi: 10.1007/s11033-022-07678-6].
188. Rastogi A., Shukla S. *Amaranth*: a new millennium crop of nutraceutical values // Critical reviews in food science and nutrition. – 2013. – V. 53. – № 2. – P. 109-125. [doi: 10.1080/10408398.2010.517876].

189. Ratanasut K., Rod-In W., Sujipuli K. *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of rice // *Rice Science*. – 2017. – V. 24. – № 3. – P. 181-186. [doi: 10.1016/j.rsci.2016.11.001].
190. Ream W. *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* use different proteins to transport bacterial DNA into the plant cell nucleus // *Microbial biotechnology*. – 2009. – V. 2. – № 4. – P. 416-427. [doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00104.x].
191. Robertson K.R., Clemants S.E. *Amaranthaceae* // *Flora of North America*. – 2003. – V. 4. – P. 405-456.
192. Rodrigo L. Celiac disease // *World journal of gastroenterology: WJG*. – 2006. – V. 12. – № 41. – P. 6577-6584. [doi: 10.3748/wjg.v12.i41.6585].
193. Rücker B., Röbbelen G. Mutants of *Brassica Napus* with altered seed lipid fatty acid composition // *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*. – 1997. – P. 316-318. [doi: 10.1007/978-94-017-2662-7\_100].
194. Sabbione A.C., Ogutu F.O., Scilingo A., Zhang M., Añón M.C., Mu T.H. Antiproliferative effect of amaranth proteins and peptides on HT-29 human colon tumor cell line // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2019. – V. 74. – P. 107-114. [doi: 10.1007/s11130-018-0708-8].
195. Sarker U., Oba S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor* // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 16496. [doi: 10.1038/s41598-018-34944-0].
196. Sato M., Gaul H. Effect of EMS on fertility in barley // *Radiation Botany*. – 1967. – V. 7. – № 1. – P. 7-15. [doi: 10.1016/0033-7560(67)90028-2].
197. Schruff M.C., Spielman M., Tiwari S., Adams S., Fenby N., Scott R.J. The *AUXIN RESPONSE FACTOR 2* gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs // *Development*. – 2006. – V. 133. – P. 251-261. [doi: 10.1242/dev.02194].
198. Shi J., Drummond B., Wang H., Archibald R.L., Habben J.E. Maize and *Arabidopsis* ARGOS proteins interact with ethylene receptor signaling complex,

- supporting a regulatory role for *ARGOS* in ethylene signal transduction // *Plant physiology*. – 2016. – V. 171. – № 4. – P. 2783-2797 [doi: 10.1104/pp.16.00347].
199. Shi J., Habben J.E., Archibald R.L., Drummond B.J., Chamberlin M.A., Williams R.W. Overexpression of *ARGOS* genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved drought tolerance in both *Arabidopsis* and maize // *Plant physiology*. – 2015. – V. 169. – № 1. – P. 266-282. [doi: 10.1104/pp.15.00780].
200. Siddiqui S., Meghvansi M.K., Hasan Z. Cytogenetic changes induced by sodium azide (NaN<sub>3</sub>) on *Trigonella foenum-graecum* L. seeds // *South African Journal of Botany*. – 2007. – V. 73. – № 4. – P. 632-635. [doi: 10.1016/j.sajb.2007.06.005].
201. Silva-Sánchez C., de la Rosa A.B., León-Galván M.F., de Lumen B.O., de León-Rodríguez A., de Mejía E.G. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2008. – V. 56. – № 4. – P. 1233-1240. [doi:10.1021/jf072911z].
202. Sindhuja A., Sudha M.L., Rahim A. Effect of incorporation of amaranth flour on the quality of cookies // *European Food Research and Technology*. – 2005. – V. 221. – № 5. – P. 597-601. [doi: 10.1007/s00217-005-0039-5].
203. Skoric D., Jovic S., Sakac Z., Lecic N. Genetic possibilities for altering sunflower oil quality to obtain novel oils // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2008. – V. 86. – № 4. – P. 215-221. [doi: 10.1139/Y08-008].
204. Snezana D.M., Marija K., Danijela R., Milena S., Lidija, S. Assessment of genetic relatedness of the two *Amaranthus retroflexus* populations by protein and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers // *African Journal of Biotechnology*. – 2012. – V. 11. – № 29. [doi: 10.5897/AJB11.1254].
205. Spreeth M.H., Slabbert M.M., De Ronde J.A., Van Den Heever E., Ndou A. Screening of cowpea, bambara groundnut and *Amaranthus* germplasm for drought tolerance and testing of selected plant material in participation with targeted communities // Pretoria, South Africa: Water Research Commission. – 2004. – P. 150.

206. Srivastava P., Marker S., Pandey P., Tiwari D.K. Mutagenic Effects of Sodium Azide on the Growth and Yield Characteristics in Wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) // Asian Journal of Plant Sciences. – 2011. – V. 10. – № 3. – P. 190-201. [doi: 10.3923 / ajps.2011.190.201].
207. Stallknecht G.F., Schulz-Schaeffer J.R. Amaranth rediscovered // New crops. Wiley, New York. – 1993. – P. 211-218.
208. Suprasanna P., Mirajkar S.J., Bhagwat S.G. Induced mutations and crop improvement // Plant Biology and Biotechnology. – 2015. – P. 593–617. [doi: 10.1007/978-81-322-2286-6\_23].
209. Suresh S., Chung J.W., Cho G.T., Sung J.S., Park J.H., Gwag J.G., Baek H.J. Analysis of molecular genetic diversity and population structure in *Amaranthus* germplasm using SSR markers // Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. – 2014. – V. 148. – № 4. – P. 635-644. [doi: 10.1080/11263504.2013.788095].
210. Suzuki Y., Taguchi K., Hanyu S., Kure T., Enoki Y., Otagiri M., Sakai H., Matsumoto K. Oxidized liposomal artificial red blood cells rescue azide-poisoned mice from lethal toxidrome by recovering cytochrome c oxidase activity // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2022. – V. 71. – P. 103282. [doi: 10.1016/j.jddst.2022.103282].
211. Svirskis A. Investigation of amaranth cultivation and utilization in Lithuania // Agronomy research. – 2003. – V. 1. – № 2. – P. 253-264.
212. Swain S.S., Sahu L., Barik, D. P., Chand, P. K. *Agrobacterium* x plant factors influencing transformation of Joseph's coat (*Amaranthus tricolor* L.) // Scientia Horticulturae. – 2010. – V. 125. – № 3. – P. 461-468. [doi: 10.1016/j.scienta.2010.04.034].
213. Szécsi J., Joly C., Bordji K., Varaud E., Cock J.M., Dumas C., Bendahmane M. BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of *Arabidopsis* petal size // The EMBO journal. – 2006. – V. 25. – № 16. – P. 3912-3920. [doi: 10.1038/sj.emboj.7601270].

214. Tague B.W., Mantis J. *In planta Agrobacterium* mediated transformation by vacuum infiltration // *Arabidopsis protocols*. – 2006. – P. 215-223. [doi: 10.1385/1-59745-003-0:215].
215. Tate S. Oxidized low-density lipoprotein receptor, LOX-1, on the endothelial cell. The receptor structure and functions of LOX-1 in atherogenesis // *Journal of Biological Macromolecules*. – 2007. – V. 7. – № 2. – P. 11-22.
216. Tausz M., Grill D. The role of glutathione in stress adaptation of plants // *Phyton*. – 2000. – V. 40. – № 3. – P. 111-118.
217. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // *Nucleic acids research*. – 1989. – V. 17. – № 16. – P. 6463-6471. [doi: 10.1093/nar/17.16.6463].
218. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative stress and plant mitochondria // *Methods in molecular Biology*. – 2007. – P. 389-403. [doi: 10.1007/978-1-59745-365-3\_28].
219. Till B.J., Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikoff S., Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING // *BMC plant biology*. – 2007. – V. 7. – P. 1-12. [doi: 10.1186/1471-2229-7-19].
220. Tovar-Perez E.G., Guerrero-Legarreta I., Farr ´ es-Gonz ´ alez A., Soriano-Santos J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain // *Food Chemistry*. – 2009. – V. 116. – № 2. – P. 437-444. [doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.062].
221. Tsukaya H. Leaf shape: genetic controls and environmental factors // *The International journal of developmental biology*. – 2005. – V. 49. – № 5-6. – P. 547-555.
222. Tsukaya H. Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis // *Current opinion in plant biology*. – 2003. – V. 6. – № 1. – P. 57-62. [doi: 10.1016/S1369526602000055].
223. Türkan I., Bor M., Özdemir F., Koca H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated

- water stress // *Plant science*. – 2005. – V. 168. – № 1. – P. 223-231. [doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.032].
224. Valdayskikh V.V., Voronin P.Yu., Artemyeva E.P., Rymar V.P. Amaranth responses to experimental soil drought // *AIP Conference Proceedings*. – AIP Publishing LLC, 2019. – V. 2063. – № 1. – P. 030023. [doi: 10.1063/1.5087331].
225. Vecchi B., Añon M.C. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin // *Phytochemistry*. – 2009. – V. 70. – № 7. – P. 864-870. [doi: 10.1016/j.phytochem.2009.04.006].
226. Velarde-Salcedo A.J., Barrera-Pacheco A., Lara-Gonzalez S., Montero-Morán G.M., D'íaz-Gois A., Gonzalez de Mejia E., Barba de la Rosa A.P. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins // *Food chemistry*. – 2013. – V. 136. – № 2. – P. 758-764. [doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.032].
227. Venskutonis P. R., Kraujalis P. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2013. – V. 12. – № 4. – P. 381-412. [doi: 10.1111/1541-4337.12021].
228. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alter the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // *Plant science*. – 2003. – V. 164. – № 4. – P. 645-655. [doi:10.1016/S0168-9452(03)00022-0].
229. Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics // *Genetics selection evolution*. – 2002. – V. 34. – № 3. – P. 275-305. [doi: 10.1051/gse:2002009].
230. Vollmannová A., Margitanová E., Bystrická J., Bojňanská T., Urminská D., Čičová I., Benková M. Changes in Amaranth polyphenol content during the different vegetation phases // *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. – 2015. – V. 4. – P. 177-180.
231. Wang B., Sang Y., Song J., Gao X.Q., Zhang X. Expression of rice *OsARGOS* gene in *Arabidopsis* promotes cell division and expansion and increases

- organ size // *Journal of Genetics and Genomics*. – 2009. – V. 36. – № 1. – P. 31-40. [doi: 10.1016/S1673-8527(09)60004-7].
232. Wang C.S., Lo K.L., Wang A.Z. Sodium azide mutagenesis generated diverse and broad spectrum blast resistance mutants in rice // *Euphytica*. – 2019. – V. 215. – P. 1-11. [doi: 10.1007/s10681-019-2468-4].
233. Wang Y., Meng Y.L., Ishikawa H., Hibino T., Tanaka Y., Nii N., Takabe T. Photosynthetic adaptation to salt stress in three-color leaves of a C4 plant *Amaranthus tricolor* // *Plant and Cell Physiology*. – 1999. – V. 40. – № 7. – P. 668-674. [doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029591].
234. Wannajindaporn A., Kativat C., Tantasawat P.A. Mutation induction of *Dendrobium* ‘Earsakul’ using sodium azide // *American Society for Horticultural Science*. – 2016. – V. 51. – № 11. – P. 1363-1370. [doi: 10.21273/HORTSCI10860-16].
235. Wassom J.J., Tranel P.J. Amplified fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species // *Journal of Heredity*. – 2005. – V. 96. – № 4. – P. 410-416. [doi: 10.1093/jhered/esi065].
236. Weber L.E. *Amaranth: grain production guide*. – Rodale Press, 1990.
237. Weldemichael M.Y., Baryatsion Y.T., Sbhatu D.B., Gebresamuel Abraha G., Juhar H.M., Kassa A.B., Baraki Sibhatu F., Gebremedhn H.M., Gebrelibanos T.S., Mebrahtu Mossa M., Gebru M.M., Meresa B.K., Teklay M., Berhe B.D., Gebru H.A. Effect of Sodium Azide on Quantitative and Qualitative Stem Traits in the M<sub>2</sub> Generation of Ethiopian Sesame (*Sesamum indicum* L.) Genotypes // *The Scientific World Journal*. – 2021. – V. 2021. – P. 1-13. [doi:10.1155/2021/6660711].
238. White D.W. *PEAPOD* regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103. – № 35. – P. 13238-13243. [doi: 10.1073/pnas.0604349103].

239. Williams J.T., Brenner D. Grain amaranth (*Amaranthus* species) // Cereals and pseudocereals. – 1995.
240. Wołosik K., Knaś M., Zalewska A., Niczyporuk M., Przystupa A.W. Amaranth squalene-advantages for health // Szkie Humanistyczne. – 2012. – V. 12. – P. 49–56.
241. Xu H., Wang X., Zhao H., Liu F. An intensive understanding of vacuum infiltration transformation of pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) // Plant cell reports. – 2008. – V. 27. – № 8. – P. 1369-1376. [doi: 10.1007/s00299-008-0564-3].
242. Yang A., Su Q., An L. Ovary-drip transformation: A simple method for directly generating vector and marker free transgenic maize (*Zea mays* L.) with linear GFP cassette transformation // Planta. – 2009. – V. 229. – P. 793-801. [doi: 10.1007/s00425-008-0871-5].
243. Yaroshko O., Vasylenko M., Gajdošová A., Morgun B., Khrystan O., Velykozhon L., Kuchuk M. “Floral-dip” transformation of *Amaranthus caudatus* L. and hybrids *A. caudatus* x *A. paniculatus* L // Biologija. – 2018. – V. 64. – № 4. – P. 321–330. [doi: 10.6001/biologija.v64i4.3904].
244. 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. – № 4. – P. 312-318. [doi: 10.21448/ijsm.478267].
245. Yasmeen A., Mirza B., Inayatullah S., Safdar N., Jamil M., Ali S., Fayyaz C.M. *In planta* transformation of tomato // Plant molecular biology reporter. – 2009. – V. 27. – P. 20-28. [doi: 10.1007/s11105-008-0044-5].
246. Yazici I., Türkan I., Sekmen A.H., Demiral T. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation // Environmental and Experimental Botany. – 2007. – V. 61. – № 1. – P. 49-57. [doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.02.010].

247. Yu L.G., Milton J.D., Fernig D.G., Rhodes J.M. Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedenreich antigen-binding lectins // *Journal of Cellular Physiology*. – 2001. – V. 186. – № 2. – P. 282-287. [doi: 10.1002/1097-4652(200102)186:23.0.CO;2-2].
248. Zhang T., Chen T. Cotton pistil drip transformation method // *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. – 2012. – P. 237-243. [doi: 10.1007/978-1-61779-558-9\_20].
249. Zhao Y., Tian X., Li Y., Zhang L., Guan P., Kou X., Wang X. Xin M., Hu Z., Yao Y., Ni Z., Sun Q., Peng H. Molecular and functional characterization of wheat *ARGOS* genes influencing plant growth and stress tolerance // *Frontiers in plant science*. – 2017. – V. 8. – P. 170. [doi: 10.3389/fpls.2017.00170].