

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 581.143.6

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.249-262

## ИНДУКЦИЯ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ТАБАКА ШТАММОМ K599 *Agrobacterium rhizogenes*

Э.А. Баймухаметова, З.А. Бережнева, Х.Г. Мусин, Д.Ю. Швеи,  
А.В. Князев, Б.Р. Кулуев

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, 450054, Россия

### Аннотация

Кукумопиновый штамм K599 *Agrobacterium rhizogenes* чаще всего используется для получения волосовидных корней труднотрансформируемых растений семейства Бобовые, однако фенотипическое проявление трансформации этим штаммом у более чувствительных к агробактериям видов остается неизученным. В работе проведена генетическая трансформация листовых дисков табака *Nicotiana tabacum* L. штаммом K599 *A. rhizogenes*, результатом которой стало спонтанное каллусо- и побегообразование на безгормональных средах. В среднем на один листовой эксплант приходилось шесть побегов-регенерантов. Образовывались также волосовидные корни, но их было крайне мало – в среднем 0.77 корней на эксплант. Изолированные культуры волосовидных корней табака, полученные при помощи штамма K599, фенотипически не отличались от таковых, полученных с использованием штаммов A4 и 15834. ПЦР-анализ показал наличие *rol*-генов во всех трансгенных растениях, регенерировавших спонтанно или индуцированных на корнях регуляторами роста. На основе полученных данных сделан вывод, что штамм K599 в отличие от других штаммов *A. rhizogenes* может быть использован для получения трансгенных растений табака на безгормональных питательных средах путем прямой регенерации побегов на эксплантах.

**Ключевые слова:** агробактериальная трансформация, волосовидные корни, hairy roots, регенерация, каллусообразование, ризогенез, трансгенные растения

### Введение

*Agrobacterium rhizogenes*, также известный как *Rhizobium rhizogenes* [1, 2], – вид граммотрицательных, облигатно аэробных почвенных бактерий семейства *Rhizobiaceae*, способных заражать более 140 видов двудольных растений и вызывать у них образование на месте ранения так называемых волосовидных (косматых, бородатых) корней (англ. *hairy roots*, HRs) [3], что обусловлено наличием крупной Ri-плазмиды, размер которой у различных штаммов варьирует от 200 до 800 т.п.н. [4]. Ri-плазида агробактерий содержит генный локус *rol* (англ. *root locus*), включающий гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и иногда *rolD*. Данные гены в составе Т-ДНК Ri-плазмиды встраиваются в геном клетки-хозяина и являются главными генетическими детерминантами образования волосовидных корней, а также причиной такого заболевания растений, как “hairy root” [5].

Примечательно, что волосовидные корни продолжают свой рост и развитие после отделения от материнского экспланта. Изолированные культуры волосовидных корней характеризуются быстрым и неограниченным ростом, генетической и фенотипической однородностью, что делает их перспективными для использования в биотехнологических производствах для продукции различных ценных метаболитов [6–8]. Так, за последние 40 лет для генетической трансформации растений с целью получения волосовидных корней было использовано до 90 различных штаммов ризогенных агробактерий, причем наиболее популярными являются агропиновые штаммы А4 и 15834. Приблизительно в каждой шестой работе сообщается об использовании штамма LBA9402. Еще три штамма – R1000, K599 (также известный как штамм NCPPB2659) и NCIB8196 – применялись немногим чаще остальных [8]. Прочие штаммы использовались в основном в единичных случаях. Однако нет полной уверенности, что это именно разные штаммы, а не разные обозначения одних и тех же штаммов.

Стоит отметить, что различные штаммы агробактерий могут вызывать различные фенотипические изменения в результате генетической трансформации. Так, было показано, что волосовидные корни табака, полученные с помощью штамма А4 *A. rhizogenes*, являются более разветвленными, а образование новых волосовидных корней на семядольных эксплантах происходит в течение двух месяцев после трансформации, тогда как при использовании штамма 15834 новые корни способны формироваться только в течение первого месяца. Корням, полученным с помощью двух типов штаммов, помимо плагиотропного роста, присуще быстрое ветвление на фоне плохо выраженного апикального роста кончиков корней, что приводит к очень плотному переплетению образующихся боковых корней [8].

Менее изученным является штамм K599, на сегодняшний день он наиболее эффективен для получения волосовидных корней бобовых – культур трудно-трансформируемых ризогенными агробактериями. Так, с использованием этого штамма удалось получить волосовидные корни нута бараньего [9] и чечевицы обыкновенной [10]. Однако работ с подробным описанием фенотипических особенностей генетической трансформации этим штаммом небобовых растений мы не нашли. К примеру, в опытах с агробактериями часто используют модельный объект – табак *Nicotiana tabacum* L., у которого при агробактериальной трансформации листовых эксплантов штаммами А4 и 15834 уже через две недели индуцируется обильное корнеобразование на безгормональных питательных средах [11]. В случае изолированного культивирования эти корни сильно разрастаются и обладают довольно высокой способностью к регенерации побегов, но только при добавлении в питательную среду ауксинов (НУК) и цитокининов (6-БАП), что говорит о возможности регенерации трансгенных растений на волосовидных корнях под действием гормонов после трансформации ризогенными агробактериями [12]. Можно полагать, что эффект штамма K599 при агробактериальной трансформации табака будет несколько отличаться от такового при условии использования агропиновых штаммов. Поэтому цель настоящего исследования – выяснение особенностей генетической трансформации табака при помощи штамма K599 *A. rhizogenes* и определение эффективности регенерации трансгенных побегов из культур волосовидных корней.

## 1. Материалы и методы

В работе использовали кукумопиновый штамм K599 *A. rhizogenes* (NCPPB2659) с Ri-плазмидой *pRi2659* (185462 п.н.) с T-ДНК 14982 п.н. (номер доступа: EU186381). Культуры HRs были созданы из листовых эксплантов двухмесячных растений табака *N. tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1. Агробактерии предварительно выращивали при 28 °C в течение 15 ч в жидкой питательной среде LB (Lysogeny broth), содержащей в качестве селективного антибиотика стрептомицин (100 мг/л). Полученную агробактериальную суспензию центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин, осадок растворяли в 5 мл питательной среды minA (состав на 100 мл: 1.37 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.45 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05 г цитрат натрия, 0.025 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 г глюкоза) с добавлением ацетосирингона 100 мкМ и наращивали в течение 2 ч при 25 °C 180 об/мин. Экспланты листьев табака стерилизовали с использованием 70%-ного раствора этилового спирта (~1 мин) и 10%-ного раствора гипохлорита натрия (~10 мин). Затем экспланты нижней стороной листа вверх помещали на чашку Петри, содержащую 10 мл жидкой среды Мурасиге – Скуга (МС) и 1 мл агробактериальной суспензии, и инокулировали в течение 25–30 мин, после чего переносили на питательную среду для сокультивирования, предварительно подсушивая на стерильной фильтровальной бумаге. Совместное культивирование листовых эксплантов агробактериями проводили на твердой (7 г/л агара) среде МС [13] в течение 2 сут при температуре +26 °C, после чего листовые экспланты переносили на твердую среду МС, содержащую антибиотик цефотаксим (100 мг/л). Все образовавшиеся волосовидные корни и спонтанно-образующиеся побеги-регенеранты отделяли от эксплантов, помещали в отдельные чашки Петри со средой МС и содержали при температуре воздуха +24 ± 1 °C. Для укоренения побегов использовали среду МС, дополненную индолилуксусной кислотой (ИУК) (0.2 мг/л). Регенерацию побегов на волосовидных корнях индуцировали при помощи регуляторов роста 6-БАП (1 мг/л) и НУК (0.5 мг/л). Волосовидные корни держали в темноте, а побеги-регенеранты на свету (100 μмоль/м<sup>2</sup>·с, фотопериод 16 ч). Генетическую ДНК из волосовидных корней и побегов-регенерантов выделяли стандартным СТАВ-методом. С целью подтверждения трансгенности корней и побегов использовали классический метод ПЦР с универсальными праймерами

RolAB1F AATTGCTACGAGGGGACGCTTTGT/  
RolAB1R ACGCTCCGCCGGTGGTCATACTTA,  
RolAB2F TCGGCGGGCTAAGGTCAAGAA/  
RolAB2R CTCGCGAGAAGATGCAGAAAGTA,

подобранными нами в рамках настоящего исследования для одновременной детекции генов *rolA* и *rolB*. Для ПЦР-анализа использовали также универсальные праймеры *rolC1F* GGCGCACTCCTCACCAACCTTC и *rolC1R* CTCGCCATGCCTCACCAACTCA, подобранные для детекции гена *rolC* в различных штаммах *A. rhizogenes*.

Перед адаптацией растений к почвенным условиям побеги с хорошо сформированными корнями вынимали из питательной среды и тщательно очищали от ее остатков, аккуратно промывая корни под проточной водой. Затем растения высаживали на почвенный субстрат, покрывали пленками для сохранения влажных условий и выращивали при температуре 26 ± 1 °C на свету.

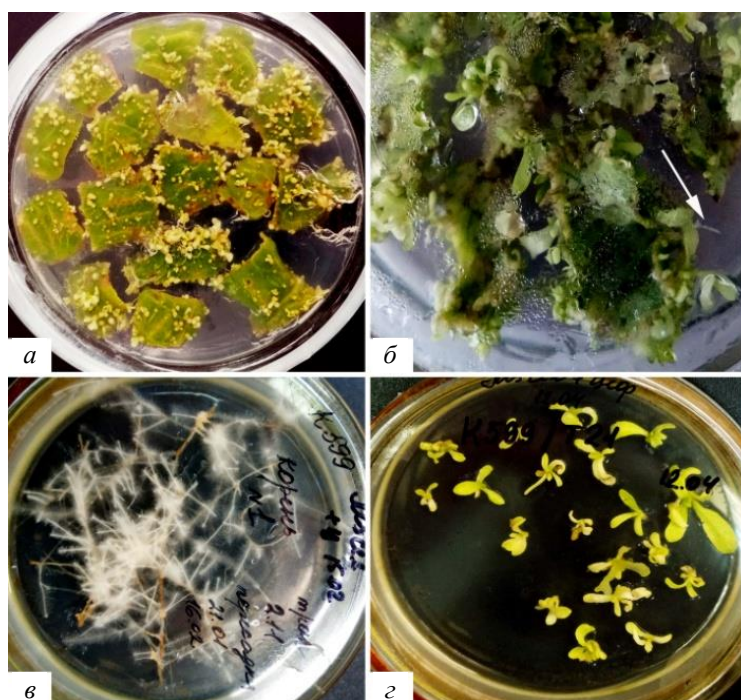


Рис. 1. Результаты трансформации листовых эксплантов табака штаммом K599 *A. rhizogenes*: *a* – начало регенерации побегов на листовых эксплантах через 17 дней после инокуляции агробактериями; *б* – волосовидный корень через 28 дней после инокуляции агробактериями (отмечен стрелкой); *в* – культуры волосовидных корней через 20 дней после изоляции от листовых эксплантов; *г* – побеги-регенеранты через 14 дней после изоляции от листовых эксплантов

## 2. Результаты и их обсуждение

После инокуляции табака с агробактериями штамма K599 на листовых эксплантах уже через 10–12 дней начинали появляться спонтанные точки регенерации (рис. 1, *a*). Побегообразование шло по всей поверхности листовых дисков. Появление волосовидных корней происходило лишь на 18-й день после трансформации, причем корней было крайне мало, и росли они медленнее побегов. В среднем, на один эксплант приходилось лишь 0.77 корней, в то время как число побегов-регенерантов составило примерно 6 (рис. 1).

Через 45 дней подросшие побеги отсоединяли от материнского экспланта и пересаживали на питательную среду МС стандартного состава. Так как индукция образования и регенерации побегов происходила на безгормональной среде, интересной представлялась дальнейшая возможность культивирования побегов на этих же средах. Успешное укоренение свидетельствовало бы о том, что с помощью штамма *A. rhizogenes* K599 можно получать трансгенные растения без использования каких-либо регуляторов роста. Всего на свежую питательную среду было пересажено 87 наиболее крупных здоровых побегов из 175, образовавшихся на 30 эксплантах, использованных в работе. Среди пересаженных побегов лишь 2 через 10 дней пустили корни, при этом 21 побег погиб во время культивирования от повышенной активности агробактерий. Оставшиеся 66 побегов через 2 недели

Табл. 1

Число индуцированных побегов-регенерантов, полученных в ходе работы

Прямые побеги-регенеранты	Количество
Всего прямых побегов-регенерантов	175
Изолированные от материнского экспланта	87
ПЦР-положительные побеги	64
Спонтанно укоренившиеся	2
Укоренившиеся при добавлении ИУК	53
Акклиматизированные к почвенным условиям	39

культивирования пересадили на среду с гормоном ИУК (0.2 мг/л), из них была выделена ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие генов *rolA*, *rolB*, *rolC*, который показал, что 64 растения, в том числе 2 растения, укоренившихся на безгормональной среде, то есть 96.97% всех прямых побегов-регенерантов, содержат *rol*-гены (рис. 2–4). Подростившие побеги с хорошей корневой системой в количестве 55 растений высаживали на почвенный субстрат, однако лишь 39 из них смогли адаптироваться к почвенным условиям. Полученные растения имели фенотип, характерный для растений, трансгенных по *rol*-генам: темно-зеленые морщинистые листья и укороченные междоузлия. Всего было укоренено 63.21% прямых побегов-регенерантов (от общего числа пересаженных побегов) и акклиматизированы к условиям почвы 44.83% побегов (табл. 1).

Таким образом, в отличие от трансформации штаммами А4 и 15834 *A. rhizogenes*, после которой на эксплантах табака уже через одну неделю на жилках листа начинают появляться исключительно волосовидные корни, не менее 8–10 на один эксплант, и совсем не происходит побегообразования [11], в данном эксперименте преимущественно идет именно прямая регенерация побегов, причем на безгормональных средах, а волосовидные корни образуются гораздо медленнее.

Образующиеся волосовидные корни высаживали на свежую питательную среду одновременно с побегами. После пересадки корни начинали расти гораздо более интенсивно, быстро ветвились и по основным фенотипическим характеристикам уже не отличались от волосовидных корней, образованных штаммами А4 и 15834 (рис. 1, в) [12]. ПЦР-анализ показал наличие *rol*-генов во всех 23 проанализированных линиях волосовидных корней К599. Интересно, что через две недели на изолированных культурах волосовидных корней спонтанно начинали регенерировать новые побеги (рис. 5, а), причем на безгормональной среде МС. В первую неделю роста эти новые побеги-регенеранты были почти белые, так как они помещались в темноту для стимуляции роста волосовидных корней. В ходе дальнейших этапов эксперимента побеги постепенно приобретали зеленую окраску на свету. Эти побеги отделяли от корней и пересаживали на новые среды без фитогормонов, и часть из них (3 побега) спонтанно образовали корни (рис. 5, б). Оставшиеся побеги пересаживали на среды с ИУК с целью укоренения и получения трансгенных растений. Однако все эти побеги демонстрировали плагиотропный рост корней (рис. 5, в, г). Более того, индукция корней на этих побегах шла не только на стеблях, но и на листьях. Такое повышенное корнеобразование у побегов-регенерантов было не характерно для растений, полученных с помощью

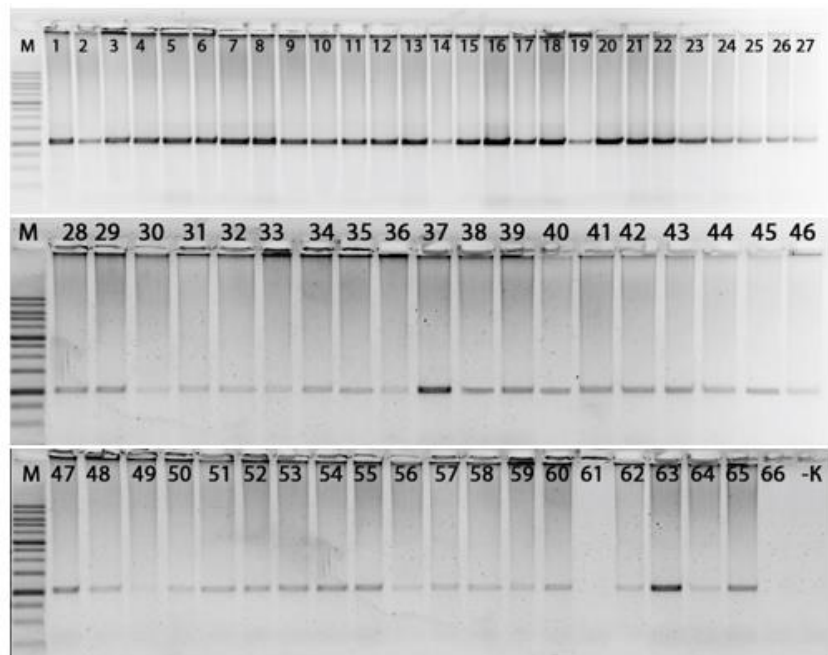


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа с праймером RoIAB1: 1–66 – прямые побеги-регенеранты; М – маркер длин ДНК 1kb DNA Ladder; -К – отрицательный контроль ПЦР. Размер ПЦР-продукта – 1112 п.н.

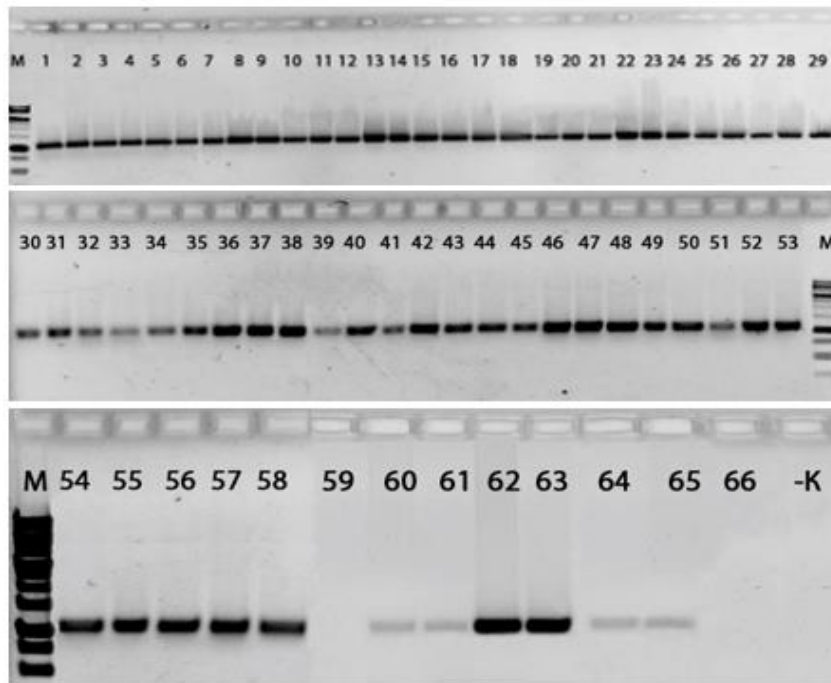


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа с праймером RoIAB2: М – маркер длин ДНК 1kb DNA Ladder; 1–66 – прямые побеги-регенеранты; -К – отрицательный контроль ПЦР. Размер ПЦР-продукта – 1127 п.н.

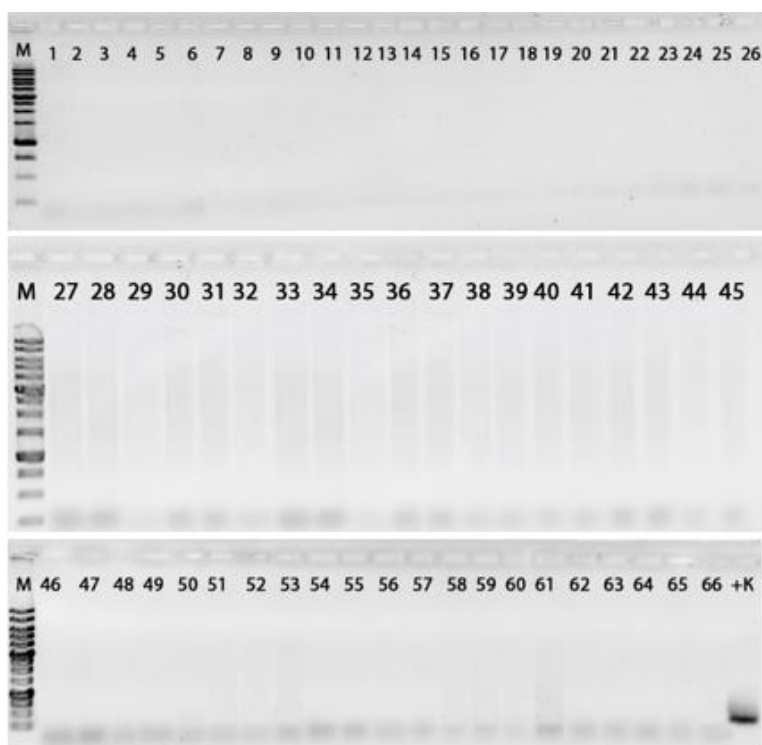


Рис. 4. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа с праймером RoIC1: М – маркер длин ДНК 1kb DNA Ladder; 1–66 – прямые побеги-регенеранты; +К – положительный контроль ПЦР. Размер ПЦР-продукта – 267 п.н.

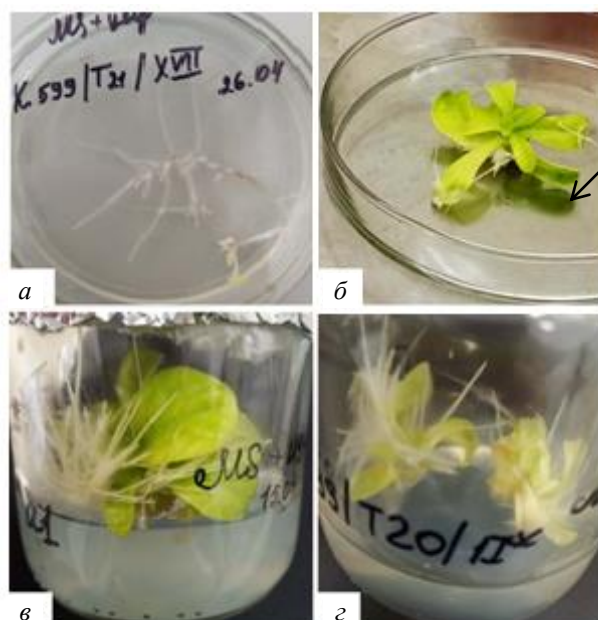


Рис. 5. Спонтанная регенерация побегов на изолированных культурах волосовидных корней: *а* – регенерация побегов на изолированных культурах волосовидных корней на среде без фитогормонов; *б* – ризогенез на побегах-регенерантах на среде без фитогормонов; *в, г* – плагиотропный рост корней на побегах-регенерантах на средах с ИУК

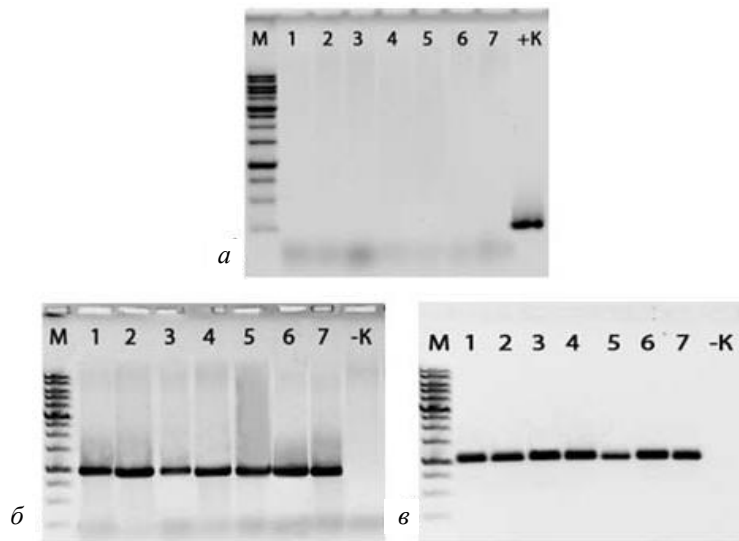


Рис. 6. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа с праймерами: *a* – RolC1, размер продукта 267 п.н.; *б* – RolAB1, размер продукта 1112 п.н.; *в* – RolAB2, размер продукта 1127 п.н.; М – маркер длин ДНК 1kb DNA Ladder; 1–7 – спонтанно регенерировавшие на корнях побеги; -К – отрицательный контроль ПЦР; +К – положительный контроль ПЦР

Табл. 2

## Получение трансгенных растений из побегов-регенерантов

	Спонтанно образовавшиеся побеги	Побеги, индуцированные с помощью гормонов
Всего	7	11
Укоренились	3 спонтанно 4 с помощью ИУК	10 с помощью ИУК
ПЦР-положительные	7	10
Акклиматизированные	5	8

штаммов А4 и 15834 [11, 12]. Далее все плагиотропно растущие корни с этих побегов удаляли, оставляли только корни, растущие геотропно. В итоге было получено 7 укоренившихся побегов, 5 из которых были акклиматизированы к условиям почвы. ПЦР-анализ показал наличие в них генов *rolA*, *rolB* и отсутствие гена *rolC* (рис. 6, табл. 2).

Стоит отметить, что в случае использования штаммов А4 и 15834 спонтанная регенерация побегов на изолированных культурах волосовидных корней не регистрировалась, а побегообразование индуцировалось исключительно при добавлении в питательные среды регуляторов роста 6-БАП и НУК [11]. Аналогичный результат наблюдался и в наших экспериментах при помещении корней после трансформации штаммом К599 на среду с данными гормонами. Через неделю культивирования начиналось интенсивное каллусообразование (рис. 7, *a*). Еще через 10 дней на каллусах начинался геммогенез (рис. 7, *б*). Однако в случае со штаммом К599 геммогенез шел менее эффективно, чем в случаях со штаммами А4 и 15834 [12]. Во-первых, образовывалось меньше побегов, во-вторых, часть из них была гидратирована (рис. 7, *б*). Путем индукции побегообразования комбинацией



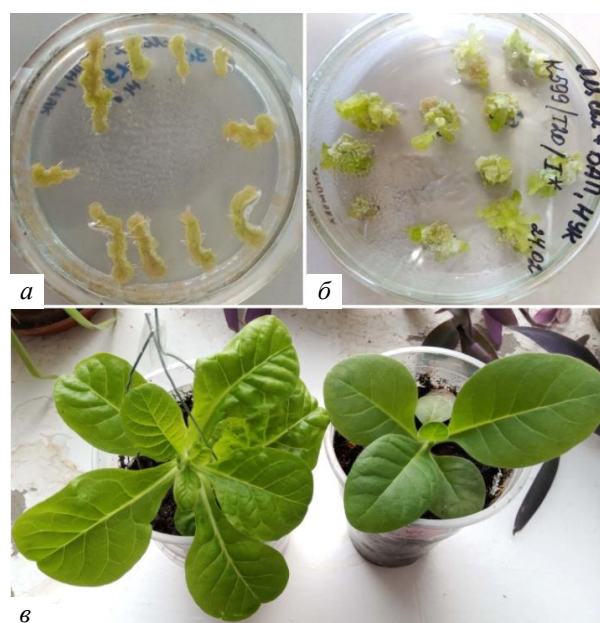


Рис. 7. Каллусо- и побегообразование на волосовидных корнях табака после помещения их на среды с гормонами 6-БАП и ИУК: *а* – каллусообразование на волосовидных корнях на средах с 6-БАП и ИУК; *б* – геммогенез на каллусах, полученных от волосовидных корней; *в* – акклиматизированное к условиям почвы растение-регенерант (слева) по сравнению с диким типом (справа)

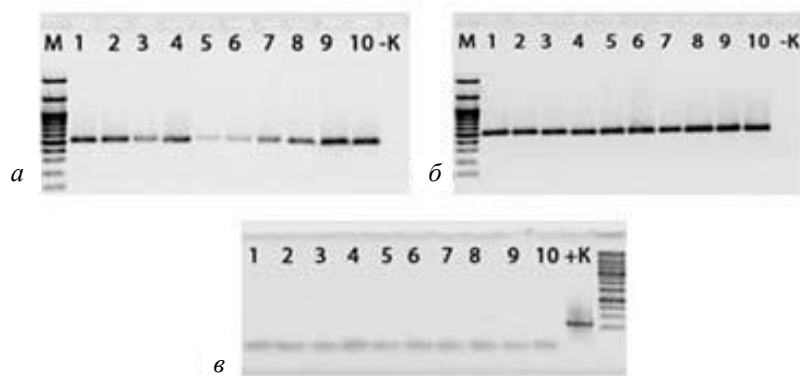


Рис. 8. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа с праймерами: *а* – RolAB1, размер продукта 1112 п.н.; *б* – RolAB2, размер продукта 1127 п.н.; *в* – RolC1, размер продукта 267 п.н.; М – маркер длин ДНК 1kb DNA Ladder; 1–10 – побеги, регенерировавшие на корнях с помощью гормонов; -К – отрицательный контроль ПЦР; +К – положительный контроль ПЦР

гормонов 6-БАП и ИУК нам удалось получить 10 побегов (рис. 7, *в*), трансгенных по *rol*-генам (рис. 8), 8 из которых в дальнейшем были укоренены и акклиматизированы к почвенным условиям (табл. 2).

Регенеранты, акклиматизированные к почвенным условиям, имели фенотип, характерный для растений, трансгенных по *rol*-генам. Например, они имели ярко выраженную кустистость, карликовость, темно-зеленые вытянутые морщинистые листья, короткие междоузлия (рис. 7, *в*).

На основе результатов, полученных в ходе экспериментов, можно сделать вывод, что уникальность штамма K599 *A. rhizogenes* заключается в способности при трансформации индуцировать прежде всего побегообразование. При этом возможно прямое получение трансгенных растений без длительного этапа каллусообразования из листовых эксплантов на безгормональных средах. Мы показали передачу *rol*-генов в эти растения, поэтому можно полагать, что при дополнительном использовании бинарных векторов вполне могут быть получены трансгенные растения, экспрессирующие другие целевые гены, внедренные в составе бинарных векторов в клетки *A. rhizogenes* с помощью метода электропорации [14]. Одним из препятствий для широкого использования данного подхода является то, что образующиеся трансгенные растения могут содержать *rol*-гены, со всеми нежелательными последствиями в виде фенотипа hairy root. Поэтому трансгенные побеги после трансформации должны быть проверены ПЦР-анализом на наличие целевого гена и *rol*-генов. При этом существует вероятность того, что трансгенное растение не будет содержать *rol*-гены, в противном случае следует отбирать трансформанты с наименьшим проявлением фенотипа hairy root [15].

Таким образом, при агробактериальной трансформации листовых эксплантов табака с помощью штамма K599 *A. rhizogenes* в отличие от штаммов A4 и 15834 активируется не только ризогенез, но прежде всего геммогенез. Из прямых регенерантов побегов, полученных при генетической трансформации штаммом K599, могут быть получены полноценные трансгенные растения, акклиматизированные к условиям почвы. Методом ПЦР-анализа доказано наличие трансгенов во всех волосовидных корнях большинства прямых регенерантов и растений, полученных при регенерации из волосовидных корней. Это означает, что штамм K599 *A. rhizogenes* может быть использован для быстрого создания трансгенных растений табака, минуя стадию каллусообразования на безгормональных питательных средах.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания № 122030200143-8 и при поддержке гранта Президента РФ МД-2304.2020.4.

#### Литература

1. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51, No 1. – P. 89–103. – doi: 10.1099/00207713-51-1-89.
2. Flores-Félix J.D., Menéndez E., Peix A., García-Fraile P., Velázquez E. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium* // Syst. Appl. Microbiol. – 2020. – V. 43, No 1. – P. 126046–126062. – doi: 10.1016/j.syapm.2019.126046.
3. Smith E.F., Townsend C.O. A plant-tumor of bacterial origin // Science. – 1907. – V. 25, No 643. – P. 671–673. – doi: 10.1126/science.25.643.671.
4. Costantino P., Mauro M.L., Micheli G., Risuleo G., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R. Fingerprinting and sequence homology of plasmids from different virulent strains of *Agrobacterium rhizogenes* // Plasmid. – 1981. – V. 5, No 2. – P. 170–182. – doi: 10.1016/0147-619x(81)90018-4.

5. *Levesque H., Delepelaire P., Rouzé P., Slightom J., Tepfer D.* Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Mol. Biol.* – 2009. – V. 11, No 6. – P. 731–744. – doi: 10.1007/BF00019514.
6. *Srivastava S., Srivastava A.K.* Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2007. – V. 27, No 1. – P. 29–43. – doi: 10.1080/07388550601173918.
7. *Stoger E., Fischer R., Moloney M., Ma J.K.-C.* Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2014. – V. 65. – P. 743–768. – doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035850.
8. *Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.* «Косматые» корни растений – важный инструментальный для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // *Биомика.* – 2015. – № 2. – С. 70–120.
9. *Aggarwal P.R., Nag P., Choudhary P., Chakraborty N., Chakraborty S.* Genotype-independent *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of chickpea: A rapid and efficient method for reverse genetics studies // *Plant Methods.* – 2018. – V. 14. – Art. 55, P. 1–13. – doi: 10.1186/s13007-018-0315-6.
10. *Foti C., Pavli O.I.* High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris* // *Agronomy.* – 2020. – V. 10, No 8. – Art. 1170, P. 1–11. – doi: 10.3390/agronomy10081170.
11. *Гумерова Г.Р., Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р.* Морфологический и молекулярный анализ изолированных культур адвентивных корней табака, полученных методами биобаллистической бомбардировки и агробактериальной трансформации // *Физиология растений.* – 2018. – Т. 65, № 5. – С. 376–387. – doi: 10.1134/S001533031805007X.
12. *Knyazev A.V., Kuluev B.R., Fateryga A.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V.* Aseptic Germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transformation of *Taraxacum hybernum* Steven // *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* – 2017. – V. 27, No 2. – P. 141–151. – doi: 10.3329/ptcb.v27i2.35019.
13. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Plant Physiol.* – 1962. – V. 15, No 3. – P. 473–497. – doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
14. *Knyazev A.V., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V.* *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in *Parasponia andersonii* Planch // *Asian J. Plant Sci.* – 2017. – V. 16, No 4. – P. 227–234. – doi: 10.3923/ajps.2017.227.234.
15. *Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V.* The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size // *Biol. Plant.* – 2016. – V. 60, No 3. – P. 513–522. – doi: 10.1007/s10535-016-0610-x.

Поступила в редакцию  
27.12.2021

---

**Баймухаметова Эльвина Ануровна**, младший научный сотрудник

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия  
E-mail: [elvina.baimuhametova@yandex.ru](mailto:elvina.baimuhametova@yandex.ru)

**Бережнева Зоя Александровна**, младший научный сотрудник

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия  
E-mail: [berezhneva-z@yandex.ru](mailto:berezhneva-z@yandex.ru)

**Мусин Халит Галеевич**, младший научный сотрудник

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия  
E-mail: [khalit.musin@yandex.ru](mailto:khalit.musin@yandex.ru)

**Швец Дарья Юрьевна**, аспирант

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия  
E-mail: [shvetsdasha99@yandex.ru](mailto:shvetsdasha99@yandex.ru)

**Князев Алексей Викторович**, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия  
E-mail: [knyazev@anrb.ru](mailto:knyazev@anrb.ru)

**Кулуев Булат Разяпович**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН  
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия  
E-mail: [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

ISSN 2542-064X (Print)  
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI  
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2022, vol. 164, no. 2, pp. 249–262

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.249-262

**Inducing Direct Shoot Regeneration during the Genetic Transformation  
of Tobacco with *Agrobacterium rhizogenes* Strain K599**

*E.A. Baimukhametova*<sup>\*</sup>, *Z.A. Berezhneva*<sup>\*\*</sup>, *Kh.G. Musin*<sup>\*\*\*</sup>, *D.Yu. Shvets*<sup>\*\*\*\*</sup>,  
*A.V. Knyazev*<sup>\*\*\*\*\*</sup>, *B.R. Kuluev*<sup>\*\*\*\*\*</sup>

*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre  
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

E-mail: <sup>\*</sup>[elvina.baimukhametova@yandex.ru](mailto:elvina.baimukhametova@yandex.ru), <sup>\*\*</sup>[berezhneva-z@yandex.ru](mailto:berezhneva-z@yandex.ru), <sup>\*\*\*</sup>[khalit.musin@yandex.ru](mailto:khalit.musin@yandex.ru),  
<sup>\*\*\*\*</sup>[shvetsdasha99@yandex.ru](mailto:shvetsdasha99@yandex.ru), <sup>\*\*\*\*\*</sup>[knyazev@anrb.ru](mailto:knyazev@anrb.ru), <sup>\*\*\*\*\*</sup>[kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

Received December 27, 2021

**Abstract**

This article is devoted to the study of the phenotypic manifestations of transformation induced by the *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 in *Nicotiana tabacum* L., a model plant sensitive to agrobacteria. For this purpose, we carried out a genetic transformation of tobacco leaf disks that resulted in spontaneous callus and shoot formation on hormone-free media. On average, 6 regenerated shoots per leaf explant were obtained. Overall, 2 out of 87 transplanted shoots spontaneously formed roots, and 21 shoots died. In the remaining shoots, rooting was observed only when the growth regulator IAA was added to the medium. Using the above protocol, a total of 39 transgenic plantlets adapted to the given soil conditions were produced from spontaneous points of regeneration. The transformation also initiated the formation of hairy roots, but there were very few of them – 0.77 roots per explant on average. The isolated cultures of tobacco hairy roots generated using strain K599 did not phenotypically differ from those induced by strains A4 and 15834. On the hairy roots, 10 shoots transgenic for *rol* genes were regenerated by the induction of shoots using growth regulators, 8 of them were later rooted and acclimated to the given soil conditions. The PCR analysis showed the presence of *rol* genes in all transgenic plants that regenerated spontaneously or were induced on roots by growth regulators. Thus, strain K599, unlike other strains of *A. rhizogenes*, has

a potential to be used to grow transgenic tobacco plants on hormone-free nutrient media by direct regeneration of shoots on explants.

**Keywords:** *Agrobacterium*-mediated transformation, hairy roots, regeneration, callus formation, rhizogenesis, transgenic plants

**Acknowledgements.** This study was performed as part of state assignment no. 122030200143-8 and supported by the grant of the President of the Russian Federation no. MD-2304.2020.

### Figure Captions

- Fig. 1. Results of the transformation of tobacco leaf explants with the *A. rhizogenes* strain K599: *a* – the beginning of shoot regeneration on leaf explants following 17 days of inoculation with agrobacteria; *b* – a hairy root following 28 days of inoculation with agrobacteria (marked with an arrow); *c* – the cultures of hairy roots following 20 days of isolation from leaf explants; *d* – the regenerated shoots following 14 days of isolation from leaf explants.
- Fig. 2. Electropherogram of the PCR results with the primer RolAB1: 1–66 – the regenerated shoots; M – the DNA size marker 1kb DNA Ladder; -K – negative PCR control. PCR product size – 1112 bps.
- Fig. 3. Electropherogram of the PCR results with the primer RolAB2: M – the DNA size marker 1kb DNA Ladder; 1–66 – the directly regenerated shoots; -K – negative PCR control. PCR product size – 1127 bps.
- Fig. 4. Electropherogram of the PCR results with the primer RolC1: M – the DNA size marker 1kb DNA Ladder; 1–66 – the directly regenerated shoots; +K – positive PCR control. PCR product size – 267 bps.
- Fig. 5. Spontaneous regeneration of the shoots on the isolated cultures of hairy roots: *a* – the regeneration of shoots on the isolated cultures of hairy roots on the medium without phytohormones; *b* – rhizogenesis on the regenerant shoots on the medium without phytohormones; *c*, *d* – the plagiotropic growth of roots on the regenerant shoots on the media with IAA.
- Fig. 6. Electropherogram of the PCR results with the following primers: *a* – RolC1, PCR product size 267 bps; *b* – RolAB1, PCR product size 1112 bps; *c* – RolAB2, PCR product size 1127 bps; M – the DNA size marker 1kb DNA Ladder; 1–7 – the shoots that spontaneously regenerated on the roots; -K – negative PCR control; +K – positive PCR control.
- Fig. 7. Callus and shoot formation on the hairy roots of the tobacco plants when they were transferred to the media containing 6-BAP and IAA: *a* – callus formation on hairy roots on the media with 6-BAP and NAA; *b* – hemmogenesis on the calluses obtained from hairy roots; *c* – regenerant plant acclimated to the given soil conditions (on the left) as compared with the wild type (on the right).
- Fig. 8. Electropherogram of the PCR results with the following primers: *a* – RolAB1, PCR product size 1112 bps; *b* – RolAB2, PCR product size 1127 bps; *c* – RolC1, PCR product size 267 bps; M – the DNA size marker 1kb DNA Ladder; 1–10 – the shoots that regenerated on the roots under the influence of hormones; K – negative PCR control; +K – positive PCR control.

### References

1. Young J.M., Kuykendall L.D., Martínez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, vol. 51, no. 1, pp. 89–103. doi: 10.1099/00207713-51-1-89.
2. Flores-Félix J.D., Menéndez E., Peix A., García-Fraile P., Velázquez E. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2020, vol. 43, no. 1, pp. 126046–126062. doi: 10.1016/j.syapm.2019.126046.
3. Smith E.F., Townsend C.O. A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 1907, vol. 25, no. 643, pp. 671–673. doi: 10.1126/science.25.643.671.
4. Costantino P., Mauro M.L., Micheli G., Risuleo G., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R. Fingerprinting and sequence homology of plasmids from different virulent strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid*, 1981, vol. 5, no. 2, pp. 170–182. doi: 10.1016/0147-619x(81)90018-4.
5. Levesque H., Delepelair P., Rouzé P., Slightom J., Tepfer D. Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, 2009, vol. 11, no. 6, pp. 731–744. doi: 10.1007/BF00019514.

6. Srivastava S., Srivastava A.K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007, vol. 27, no. 1, pp. 29–43. doi: 10.1080/07388550601173918.
7. Stoger E., Fischer R., Moloney M., Ma J.K.-C. Plant molecular pharming for the treatment of chronic and infectious diseases. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2014, vol. 65, pp. 743–768. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-035850.
8. Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A., Baimiev An.Kh., Chumakov M.I., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. “Hairy” plant roots – an important tool for researchers and a powerful phytochemical biofactory for industrial workers. *Biomika*, 2015, no. 2, pp. 70–120. (In Russian)
9. Aggarwal P.R., Nag P., Choudhary P., Chakraborty N., Chakraborty S. Genotype-independent *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of chickpea: A rapid and efficient method for reverse genetics studies. *Plant Methods*, 2018, vol. 14, art. 55, pp. 1–13. doi: 10.1186/s13007-018-0315-6.
10. Foti C., Pavli O.I. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy root induction of *Lens culinaris*. *Agronomy*, 2020, vol. 10, no. 8. doi: 10.3390/agronomy10081170.
11. Gumerova G.R., Chemeris A.V., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R. Morphological and molecular analysis of isolated cultures of tobacco adventitious roots obtained by the methods of biolistic bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Physiol.*, 2018, vol. 65, no. 5, pp. 740–749. doi: 10.1134/S1021443718050072.
12. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Fateryga A.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum hybernum* Steven. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, 2017, vol. 27, no. 2, pp. 141–151. doi: 10.3329/ptcb.v27i2.35019.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 1962, vol. 15, no. 3, pp. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
14. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in *Parasponia andersonii* Planch. *Asian J. Plant Sci.*, 2017, vol. 16, no. 4, pp. 227–234. doi: 10.3923/ajps.2017.227.234.
15. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size. *Biol. Plant.*, 2016, vol. 60, no. 3, pp. 513–522. doi: 10.1007/s10535-016-0610-x.

**Для цитирования:** Баймухаметова Э.А., Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Швец Д.Ю., Князев А.В., Кулуев Б.Р. Индукция прямой регенерации побегов при генетической трансформации табака штаммом K599 *Agrobacterium rhizogenes* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 2. – С. 249–262. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.249-262.

**For citation:** Baimukhametova E.A., Berezhneva Z.A., Musin Kh.G., Shvets D.Yu., Knyazev A.V., Kuluev B.R. Inducing of direct shoot regeneration during the genetic transformation of tobacco with *Agrobacterium rhizogenes* strain K599. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 2, pp. 249–262. doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.249-262. (In Russian)