



ВКЛАД ГЕНА *TROL C* В РЕГУЛЯЦИЮ РОСТА ТАБАКА ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ

Кулуев Б.Р., Мусин Х.Г., Баймухаметова Э.А.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054, Россия, Уфа, ул. пр. Октября 71. E-mail: kuluev@bk.ru

Резюме

Ген *trolC* относится к *plast* генам, которые, вероятнее всего, попали в геном табака *Nicotiana tabacum* в результате горизонтального переноса от *Agrobacterium rhizogenes*. Показано, что ген *trolC* экспрессируется в молодых тканях табака дикого типа, однако физиологические функции продукта этого гена остаются во многом неизвестными. Целью нашей работы было получение трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *trolC* под контролем 35SCaMV промотора в антисмысловой ориентации, и оценка параметров роста корней при действии абиотических стрессовых факторов. Для морфометрического анализа использовали 8 линий трансгенных растений, экспрессирующих фрагмент гена *trolC* в антисмысловой ориентации. Был проведен анализ роста корней полученных растений при действии хлорида натрия (100 мМ), ацетата кадмия (100 мкМ) и гипотермии (12°C). Полученные в ходе работы трансгенные растения характеризовались улучшением параметров роста побега при нормальных условиях. Корни трансгенных растений росли медленнее при нормальных условиях и при действии кадмия и гипотермии, чем у растений дикого типа. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что продукт гена *trolC* оказывает негативное влияние на рост побега, позитивное влияние на рост корней, а также участвует в регуляции и обеспечении роста корней при действии ионов кадмия и гипотермии.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, *trolC*, *rol*-гены, *rolC*, *Agrobacterium rhizogenes*, *plast* гены, стрессоустойчивость.

Цитирование: Кулуев Б.Р., Мусин Х.Г., Баймухаметова Э.А. Вклад гена *TROL C* в регуляцию роста табака при действии стрессовых факторов // *Biomics*. 2021. Т.13(3). С. 360-367. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-25

© Авторы

CONTRIBUTION OF THE *TROL C* GENE TO THE REGULATION OF TOBACCO GROWTH IN RESPONSE TO STRESS FACTORS

Kuluev B.R., Musin Kh.G., Baimuhametova E.A.

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71, Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russia. E-mail: kuluev@bk.ru

Resume

The *trolC* gene refers to *plast* genes that have entered the genome of *Nicotiana tabacum* as a probable result of horizontal transfer from *Agrobacterium rhizogenes*. It was shown that the *trolC* gene is expressed in young tissues of wild type tobacco; however, the physiological functions of the product of this gene remain largely unknown. The aim of our work was to obtain transgenic tobacco plants expressing a fragment of the *trolC* gene under the control of the 35SCaMV promoter in an antisense orientation and to assess the growth parameters of their roots under the action of abiotic stress factors. For morphometric

analysis, 8 lines of transgenic plants were used. The analysis of root growth under the action of sodium chloride (100 mM), cadmium acetate (100 μ M) and hypothermia (12°C) was conducted. Transgenic plants were characterized by improved shoot growth parameters under normal conditions. The roots of transgenic plants grew more slowly under normal conditions and under the action of cadmium and hypothermia than in wild type plants. The product of *rolC* gene has a negative effect on shoot growth, a positive effect on root growth, and also participates in the regulation and maintenance of root growth under the action of cadmium and hypothermia.

Key words: *Nicotiana tabacum*, *trolC*, *rol*-genes, *rolC*, *Agrobacterium rhizogenes*, plast genes, stress tolerance

Citation: Kuluev B.R., Musin Kh.G., Baimuhametova E.A. Contribution of the *TROLC* gene to the regulation of tobacco growth in response to stress factors. *Biomics*. 2021. V.13(3). P.360-367. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-25 (In Russian)

© The Authors

Введение

Способные к неограниченному росту на безгормональных питательных средах волосовидные (бородатые) корни растений (по англ. hairy roots) индуцируются агробактериями *Agrobacterium rhizogenes* благодаря переносу в геном и экспрессии в растительных тканях онкогенов *rolA*, *rolB* и *rolC* (от англ. “root locus”), которые вместе с некоторыми другими генами Т-ДНК агробактерий известны также под названием *plast* гены (от англ. phenotypic plasticity). Ген *rolC* является самым консервативным из *rol*-генов и присутствует во всех штаммах ризогенных агробактерий [Павлова и др. (Pavlova et al.), 2013]. Экспрессия гена *rolC* в растениях способствует уменьшению высоты стебля, укорочению междоузлий, снижению апикального доминирования, более быстрому переходу к цветению [Schmulling et al., 1988]. Наибольший уровень экспрессии гена *rolC* у трансгенных растений-регенерантов обнаруживается в корнях и стебле [Павлова и др. (Pavlova et al.), 2013]. Имеются сведения, что продукт гена *rolC* обладает β -глюколитической активностью и способен высвобождать активные цитокинины из конъюгатов с N- и O-глюкозидами, причем у растений-трансформантов наблюдается увеличение содержания свободных цитокининов [Estruch et al., 1991]. Также имеются предположения о том, что белок *rolC* может действовать через изменение чувствительности клеток растений к различным фитогормонам [Schmulling et al., 1993]. В промоторной области гена *rolC* обнаруживаются различные цис-регуляторные элементы, в том числе активируемые сахарозой [Hu et al., 2003].

Гомологичные генам Т-ДНК *A. rhizogenes* *plast* гены, содержатся также в нетрансформированных формах некоторых видов растений. Наиболее хорошо изучены такие участки ДНК у представителей родов *Nicotiana* [Intrieri, Buiatti, 2001], *Linaria* [Matveeva et al., 2012], а также у батата

Ipomoea batatas [Kyndt et al., 2015]. Предполагается, что эти *plast* гены попали в геномы некоторых растений в результате горизонтального переноса и закрепились в процессе эволюции, так как начали выполнять какие-то важные для этих растений физиологические функции [Кулаева и др. (Kulaeva et al.), 2006]. У табака *Nicotiana tabacum* эти гены получили название *trol*, в частности растительный гомолог онкогена *rolC*, стали называть *trolC*, который не только присутствует в геноме, но и экспрессируется, по крайней мере, в молодых тканях табака [Meyer et al., 1995]. В табаке накопление транскриптов *trolC* негативно регулируется ауксинами и индуцируется цитокининами [Кулаева и др. (Kulaeva et al.), 2006]. Нами ранее было показано наличие высокого уровня экспрессии гена *trolC* в ауксин-индуцированных адвентивных корнях табака [Gumerova et al., 2012]. В то же время в зрелых листьях и каллусах *N. tabacum* транскрипты гена *trolC* не обнаруживались [Intrieri, Buiatti, 2001]. Эволюционная и физиологическая роль гена *trolC* до сих пор остается не до конца ясной. Имеются лишь предположения, что увеличение корневой массы при экспрессии этого *plast* гена может способствовать повышению устойчивости к засухе [Кулаева и др. (Kulaeva et al.), 2006]. Таким образом, функции гена *trolC* в табаке остаются не до конца изученными. Одним из подходов по изучению функций генов в молекулярной биологии растений является индукция РНК-интерференции путем активации экспрессии фрагментов исследуемого гена в смысловой или антисмысловой ориентации [Kuluev et al., 2012]. Судя по всему, данный подход до наших исследований при изучении функций гена *trolC* табака не применялся. Исходя из этого, целью нашей работы было получение трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагмент гена *trolC* под контролем 35SCaMV промотора в антисмысловой ориентации, и оценка параметров их роста при действии абиотических стрессовых факторов.

Материалы и методы

Фрагмент гена *trolC* (X91881.1) *N. tabacum* сорта Petit Havana был амплифицирован из ДНК *N. tabacum* используя праймеры rolCF GGCGCACTCCTCACCAACCTTC, rolCR CTCGCCATGCCTCACCAACTCA и Pfu ДНК-полимеразу (New England Biolabs, США). Размер ампликона составил 267 п.н. (положение 242-508 п.н. открытой рамки считывания гена), который после этапа секвенирования клонировали в бинарном векторе pCambia 1301 (CAMBIA, Австралия) по сайту рестрикции *Sma*I. Для клонирования была взята консервативная часть гена *trolC*, чтобы полученная генно-инженерная конструкция была достаточно универсальной с учетом возможных мутаций в целевом гене у использованных нами сорта и линии табака. Направленность фрагмента гена *trolC* в векторе определяли при помощи праймеров AGAGGACSTAACAGAACTCG и TGCTCTAGCATTCGCCATTTC, подобранных к 35SCaMV промотору и сайту полиаденилирования 35SCaMV polyA, соответственно. Филогенетическое древо сходства ближайших гомологов гена *trolC* было построено при помощи программы MegAlign v. 7.1.0 используя принцип Clustal W в режиме “Slow-Accurate” при значениях “Gap Penalty” 15 и “Gap Length Penalty” 6,66 (DNASar, США). Бутстреп-анализ проводили при помощи той же компьютерной программы при значениях числа испытаний 1000 и распределения псевдослучайных чисел 111. Для генетической трансформации использовали растения табака *N. tabacum* сорта Petit Havana, линии SR1. При создании трансгенных растений использовали метод агробактериальной трансформации листовых дисков и бинарный вектор pCambia 1301, содержащий ген гигромицинофосфотрансферазы (*HPT*) и фрагмент целевого гена *trolC* в антисмысловой ориентации по отношению к 35SCaMV промотору. Создание аналогичных целевых генно-инженерных конструкций и трансгенных растений табака подробно описаны нами ранее [Kuluev et al., 2013]. Первоначальный отбор трансгенных растений проводился по результатам селекции на среде с антибиотиком и гистохимического анализа активности репортерного гена *uidA* (*GUS*). Трансгенность полученных растений была доказана при помощи ПЦР-анализа на наличие фрагмента 35S::*trolC*, а также селективного (*HPT*) и репортерного (*GUS*) генов с использованием пар праймеров GCTTCTGCGGGCGATTGTG, AGCTGCGCCGATGGTTTCTAC и CGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTG, CAGAACATTACATTGACGCAGGTGAT, соответственно. После получения семян трансгенных растений они высевались на селективную среду МС.

Через 3 недели производили подсчет устойчивых и неустойчивых к селективному антибиотику сеянцев и определяли расщепление при наследовании гена селективного маркера. Результаты обрабатывали методом χ -квадрат по стандартной методике и выделяли для дальнейшей работы линии растений с классическим расщеплением 3:1. Далее проводили анализ содержания транскриптов гена *trolC* методом полуколичественной ОТ-ПЦР в молодых корнях 20-дневных проростков табака при помощи тех же праймеров, что были использованы для амплификации фрагмента исследуемого гена. В качестве референсного использовали ген фактора элонгации *EF-1 α* (AF120093.1), для ОТ-ПЦР которой применяли праймеры GAATGGTACTGTCCCTGTT и TTGCCAATCTGTCCCTGAAT. Выбор данного референсного гена объясняется высоким уровнем стабильности его экспрессии [Kuluev et al., 2019]. Фотографии агарозных гелей обрабатывали при помощи компьютерной программы TotalLab (<http://totalab.com>).

Проростки контрольных и трансгенных растений выращивали в климатостатах Binder (Германия) при температуре +25°C, освещенности около 140 мкмоль/(м² с) и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота) (нормальные условия) на питательной среде МС. В качестве контроля использовали нетрансгенные растения *N. tabacum* сорта Petit Havana, линии SR1 (дикий тип). Через 10 дней выращивания на селективной среде проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС и по прошествии 10 дней определяли прирост корней (изменение длины) при норме (контроль) и действии стрессовых факторов: засоление (100 мМ NaCl), кадмий (100 мкМ CdAc), гипотермия +12°C. Выбор таких параметров стрессового воздействия объясняется тем, что именно с этих показателей начиналось резкое торможение роста корней табака дикого типа. Выборка составила 15 растений для каждой линии.

20-дневные трансгенные проростки продолжавшие расти на горизонтально-ориентированных чашках Петри переносили на почву и выращивали их в теплице. Трансгенные растения выращивали в вегетационных сосудах с почвой объемом 450 мл до стадии цветения и проводили их морфометрический анализ, заключающийся в определении высоты стебля, сырой и сухой массы побега. Опыты проводили на растениях второго поколения, выборка составила 5 растений для каждой линии. Для элиминации нетрансгенных форм посев семян и выращивание сеянцев проводили на селективной среде с гигромицином в течение 20 дней. Результаты исследований представляли в виде

гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

Результаты

При поиске гомологов гена *rolC* в GenBank при помощи ресурса Blast выявляется большое количество нуклеотидных последовательностей, многие из которых, однако, принадлежит растениям-трансформантам, полученным из волосовидных корней (на рис. 1 отмечены звездочкой). Наиболее близкими по нуклеотидной последовательности к гену *rolC* *N. tabacum* сорта Petit Havana (X91881.1) являются гомологичные гены из *N. tabacum* сорта

Samsun (FN667969), *Nicotiana tomentosiformis* (KJ599826) и *Nicotiana otophora* (AF281250) (рис. 1). Ген *rolC* табака находится в более далеком родстве от последовательностей Т-ДНК *A. rhizogenes*, чем гомологичные гены *rolC* представителей рода *Linaria*, которые оказались ближе к агробактериальному штамму 15834 (рис. 1). Нуклеотидная последовательность гена *rolC* батата не включена в филогенетическое древо на рис. 1, так как уровень сходства с геном табака оказался гораздо меньше, чем между генами *rolC* и гомологами из агробактериальных штаммов, а на рис. 1 представлены лишь ближайшие гомологи гена *rolC*.

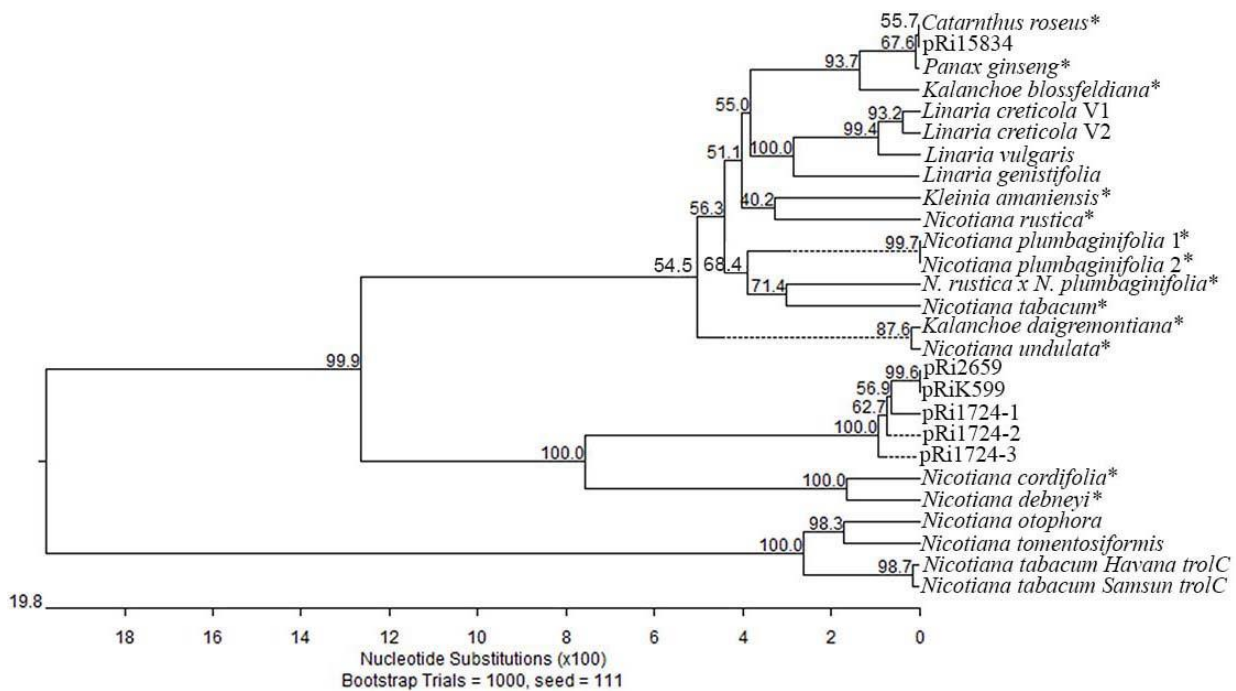


Рис. 1. Филогенетическое древо сходства ближайших гомологов гена *rolC* *N. tabacum*. Звездочками отмечены онкогены *rolC* растений-трансформантов полученных при помощи различных штаммов *A. rhizogenes*.
 Fig. 1. Phylogenetic tree of similarity of the closest homologues of the *N. tabacum rolC* gene. Asterisks mark the *rolC* oncogenes of transgenic plants obtained using various *A. rhizogenes* strains.

После этапа агробактериальной трансформации путем расчета соотношения устойчивых и неустойчивых семян к гигромицину были выявлены 23 линии трансгенных растений табака с предположительно единичной копией целевого трансгена (*35S::rolC*), то есть характеризующихся стандартным расщеплением 3:1. Для дальнейшего морфометрического анализа были отобраны следующие 8 линий трансгенных растений табака: 6, 8, 17, 19, 30, 31, 63, 71, в которых экспрессия целевого гена вообще не выявлялась, тогда как в остальных 15 линиях трансгенных растений удавалось выявлять транскрипты гена *rolC* в молодых корнях.

Относительный уровень экспрессии гена *rolC* в этих 15 линиях составил от 2,3 до 17,7% по отношению к уровню экспрессии референсного гена *EF-1a*. Исходя из того, что относительный уровень экспрессии гена *rolC* в молодых корнях табака дикого типа составил в среднем 21,5%, мы предположили, что снижение содержания транскриптов исследуемого гена в большинстве линий (в 19 линиях из 26) трансгенных растений может быть связано с индукцией РНК-интерференции. По крайней мере, мы полагаем, что в линиях 6, 8, 17, 19, 30, 31, 63, 71 могла произойти индукция РНК-интерференции, так как в этих растениях мРНК гена *rolC* вовсе не выявлялась.

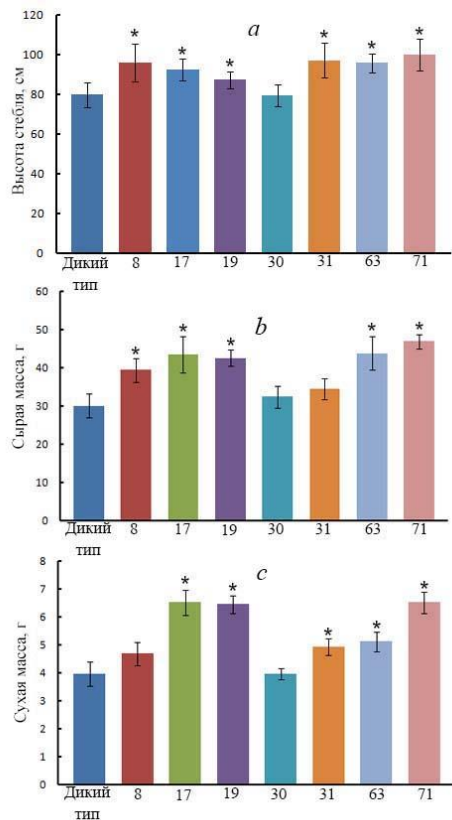


Рис. 2. Морфометрический анализ побега трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией фрагмента гена *trolC* в антисмысловой ориентации в нормальных условиях. а – высота стебля, см; б – сырая масса побега, г; в – сухая масса побега, г. n = 5. * - p<0.01. Fig. 2. Morphometric analysis of the shoot of transgenic tobacco plants with constitutive expression of the *trolC* gene fragment in antisense orientation under normal conditions. a - stem height, cm; b - fresh mass of the shoot, g; c - dry mass of the shoot, g. n = 5. * - p < 0.01.

Почти все отобранные для анализа линии трансгенных растений второго поколения с конститутивной экспрессией фрагмента гена *trolC* в антисмысловой ориентации достоверно отличались от дикого типа большей высотой стебля (рис. 2а). Линии 8, 17, 19, 63 и 71 характеризовались также увеличением сырой массы побега (рис. 2б). По сухой массе изменения в сторону увеличения были характерны для линий 17, 19, 31, 63 и 71 (рис. 2с). Три растения линии 6 погибли во время проведения экспериментов и поэтому данные по этой линии не приведены на рис. 2.

Для анализа роста корней случайным образом были выбраны линии 6, 8, 17 и 71. При нормальных условиях роста у трансгенных растений было выявлено снижение темпов роста корней по сравнению с диким типом (рис. 3а). Степень снижения роста при этом

составила в среднем 15% для всех линий, по сравнению с диким типом. В условиях засоления достоверная разница в сторону уменьшения была показана только для линии 17 (рис. 3б). При действии кадмия уменьшение длины корней было зафиксировано для линий 6, 8 и 17 (рис. 3с). В среднем степень уменьшения длины корней при кадмиевом стрессе для всех четырех линий трансгенных растений составила 27% по сравнению с диким типом. При гипотермии большее уменьшение длины корней по сравнению с диким типом было характерно для всех четырех проанализированных линий трансгенных растений (рис. 3д). Степень уменьшения длины корней у всех линий трансгенных растений по сравнению с контролем при гипотермии составила в среднем 35%.

Обсуждение результатов

Ген *trolC* в процессе эволюции претерпел множество изменений, однако уровень сходства нуклеотидных последовательностей остался относительно высоким и при сравнении с геном *rolC* штамма 15834 *A. rhizogenes* составляет около 74%. Предполагается, что горизонтальный перенос и закрепление агробактериального гена *rolC* в геноме табака произошли не менее 6 млн. лет назад еще до возникновения *N. tabacum* путем гибридизации *N. tomentosiformis* и *N. sylvestris* [Кулаева и др. (Kulaeva et al.), 2006]. Это может говорить о том, что ген *trolC*, вероятнее всего, продолжает выполнять схожие с онкогеном *rolC* функции, но уже в растительном организме дикого типа. В литературе имеются сведения о важной роли *plast* генов в эволюции рода *Nicotiana* [Intrieri, Buiatti, 2001], однако информации о конкретных физиологических функциях этих генов пока очень мало.

Нами были получены трансгенные растения табака экспрессирующие фрагмент гена *trolC* в антисмысловой ориентации. Тот факт, что во многих линиях трансгенных растений транскрипты исследуемого гена не выявлялись, а во всех исследованных растениях дикого типа они были идентифицированы, говорит о том, что вероятнее всего происходила ожидаемая индукция РНК-интерференции. Полученные нами морфометрические данные могли быть обусловлены также эффектом положения трансгена. Однако получение при этом довольно схожих данных по морфометрии для большинства анализируемых линий весьма маловероятно. Результаты исследования вероятнее всего связаны с уменьшением уровня экспрессии гена *trolC*, так как во многих линиях трансгенных растений нами это было доказано при помощи полуколичественной ОТ-ПЦР, а также в трансгенных растениях были получены вполне ожидаемые от снижения уровня экспрессии гомологов гена *rolC* морфологические эффекты.

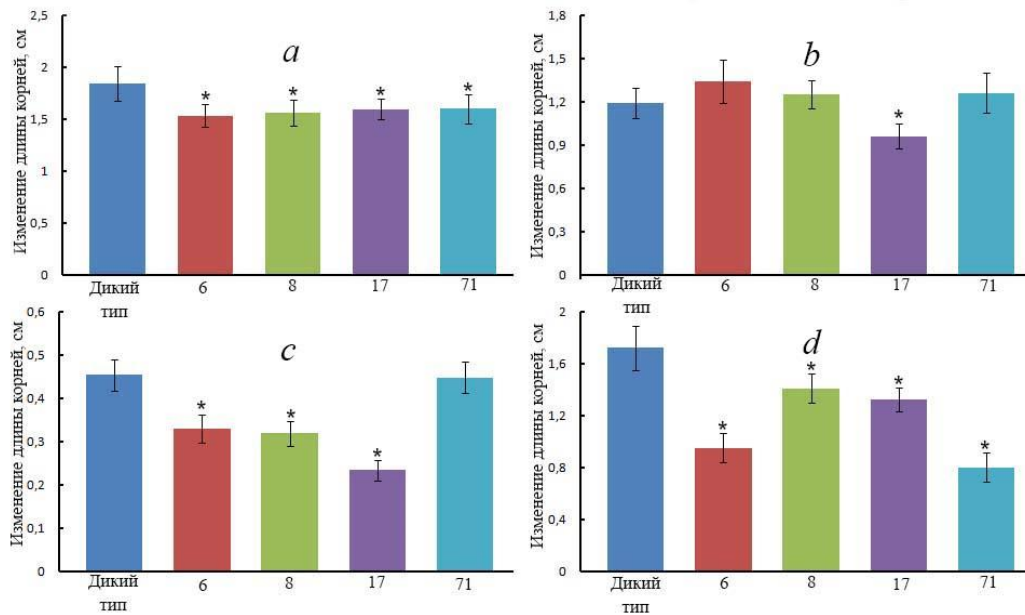


Рис. 3. Анализ изменений длины корней табака при нормальных условиях (a) и при действии стрессовых факторов: 100 mM NaCl (b), 100 мкМ CdAc (c), +12°C (d). n = 15. * - p < 0.01.

Fig. 3. Analysis of changes in the length of tobacco roots under normal conditions (a) and under the action of stress factors: 100 mM NaCl (b), 100 μM CdAc (c), + 12°C (d). n = 15. * - p < 0.01.

Итак, методом индукции РНК-интерференции нами было показано, что продукт гена *trolC*, вероятнее всего, оказывает негативное влияние на рост побега и позитивное влияние на рост корней, что может быть связано с изменениями в активностях ауксинового и цитокининового сигналингов [Павлова и др. (Pavlova et al.), 2013]. Интересно отметить, что морфологическим эффектом экспрессии онкогена *rolC* также является укорочение высоты стебля [Павлова и др. (Pavlova et al.), 2013]. Это может говорить о том, что ген *trolC* и онкоген *rolC* продолжают оставаться функционально схожими. Механизм же действия продукта гена *trolC*, как и гена *rolC* скорее всего связан с изменением чувствительности растительных клеток к действию фитогормонов [Павлова и др. (Pavlova et al.), 2013]. Нами ранее показана индукция экспрессии гена *trolC* в корнях под влиянием ауксина [Gumerova et al., 2018], то есть исследуемый нами ген является корнеспецифичным и ауксин-индуцибельным. Так как ген *trolC* не экспрессируется в органах побега [Intrieri, Vuiatti, 2001; Gumerova et al., 2018], то вероятно на надземную часть растения он оказывает лишь косвенное влияние, возможно способствуя перераспределению ресурсов от побега в корни.

Конститутивная экспрессия фрагмента гена *trolC* в антисмысловой ориентации способствовала уменьшению темпов роста корней (рис. 3a). Это может говорить о том, что продукт гена *trolC* является

позитивным регулятором роста корней. Корни при росте в грунте сталкиваются с множеством абиотических стрессовых факторов, прежде всего с засолением, гипотермией и тяжелыми металлами. При засолении корни трансгенных растений почти не отличались от корней дикого типа. Это может означать, что продукт гена *trolC* не принимает участие в регуляции роста корней при действии NaCl. Однако при действии кадмия и особенно гипотермии у трансгенных растений обнаруживалось более существенное, чем при нормальных условиях, уменьшение длины корней (рис. 3c, d). Это может говорить о важной позитивной роли продукта гена *trolC* при росте корней в условиях гипотермии и загрязнения тяжелыми металлами. Наибольшая разница в длине корней была зафиксирована при действии +12°C. Причем такая гипотермия для табака является серьезным препятствием для роста и поглощения воды, так как это растение является теплолюбивым [Kuluev et al., 2019]. Интересно отметить, что в промоторной области онкогена *rolC* обнаруживаются цис-регуляторные элементы, активируемые холодом [Hu et al., 2003], что также подтверждает наши данные об участии продукта гена *trolC* в ответе на холодовой стресс.

Таким образом, судя по нашим данным можно полагать, что продукт гена *trolC* *N. tabacum* участвует в регуляции и обеспечении роста корней

при нормальных условиях и при действии ионов кадмия и гипотермии.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119021190011-0 при поддержке гранта Президента РФ МД-2304.2020.4.

Литература

1. Кулаева О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Горизонтальный перенос генов от агробактерий к растениям // *Экологическая генетика*. 2006. Т. 4. С. 10–19.
2. Павлова О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. *rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes* // *Экологическая генетика*. 2013. V. 11. С. 59–68.
3. Estruch J.J., Chriqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates // *The EMBO Journal*. 1991. V. 10. P. 2889–2895.
4. 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 // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018. V. 65. P. 740–749. doi:10.1134/S1021443718050072
5. Hu Y., Chen B., Ni T., Li N., Lin Z. Promoter of the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* can be strongly regulated in glandular cell of transgenic tobacco // *Molecular Biotechnology*. 2003. V. 24: P. 121–125. doi: 10.1385/MB:24:2:121
6. Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana* // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001. V. 20. P. 100–110. doi: 0.1006/mpev.2001.0927
7. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Lebedev Ya.P., Postrikan B.N., Chemeris A.V. Obtaining transgenic tobacco plants expressing conserved regions of the *AINTEGUMENTA* gene in antisense orientation // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012. V. 59. P. 307–317. doi: 10.1134/S1021443712030107
8. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Morphological features of transgenic tobacco plants expressing the *AINTEGUMENTA* gene of rape under control of the dahlia mosaic virus promoter // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2013. V. 44. P. 86–89. doi: 10.1134/S1062360413020070
9. Kuluev B., Mikhaylova E., Ermoshin A., Veselova S., Tugbaeva A., Gumerova G., Gainullina K., Zaikina E. The *ARGOS-LIKE* genes of Arabidopsis and tobacco as targets for improving plant productivity and stress tolerance // *Journal of Plant Physiology*. 2019. V. 242. 153033. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153033
10. Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F. The genome of cultivated

sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2015. V. 112. P. 5844–5849. doi: 10.1073/pnas.1419685112

11. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012. V. 25. P. 1542–1551. doi: 10.1094/MPMI-07-12-0169-R

12. Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene // *Molecular Genetics and Genomics*. 1995. V. 249. P. 265–273. doi: 10.1007/BF00290526

13. Schmulling T., Schell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development // *The EMBO Journal*. 1988. V. 7. P. 2621–2629. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03114.x

14. Schmulling T., Fladung M., Grossmann K., Schell J. Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA // *The Plant Journal*. 1993. V. 3. P. 371–382. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.t01-20-00999.x

References

1. Estruch J.J., Chriqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *The EMBO Journal*. 1991. V. 10. P. 2889–2895.
2. 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. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018. V. 65. P. 740–749. doi:10.1134/S1021443718050072
3. Hu Y., Chen B., Ni T., Li N., Lin Z. Promoter of the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* can be strongly regulated in glandular cell of transgenic tobacco. *Molecular Biotechnology*. 2003. V. 24: P. 121–125. doi: 10.1385/MB:24:2:121
4. Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001. V. 20. P. 100–110. doi: 0.1006/mpev.2001.0927
5. Kulaeva O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from agrobacteria to plants. *Ecological genetics*. 2006. V. 4. P. 10–19. doi: 10.17816/ecogen4410-19
6. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Lebedev Ya.P., Postrikan B.N., Chemeris A.V. Obtaining transgenic tobacco plants expressing conserved regions of the *AINTEGUMENTA* gene in antisense orientation. *Russian Journal of Plant*

- Physiology*. 2012. V. 59. P. 307–317. doi: 10.1134/S1021443712030107
7. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Morphological features of transgenic tobacco plants expressing the *AINTEGUMENTA* gene of rape under control of the dahlia mosaic virus promoter. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2013. V. 44. P. 86–89. doi: 10.1134/S1062360413020070
8. Kuluev B., Mikhaylova E., Ermoshin A., Veselova S., Tugbaeva A., Gumerova G., Gainullina K., Zaikina E. The *ARGOS-LIKE* genes of *Arabidopsis* and tobacco as targets for improving plant productivity and stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 2019. V. 242. 153033. doi: 10.1016/j.jplph.2019.153033
9. Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2015. V. 112. P. 5844–5849. doi: 10.1073/pnas.1419685112
10. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012. V. 25. P. 1542–1551. doi: 10.1094/MPMI-07-12-0169-R
11. Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. *Molecular Genetics and Genomics*. 1995. V. 249. P. 265–273. doi: 10.1007/BF00290526
12. Pavlova O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. *Rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Ecological genetics*. 2013. V. 11. P. 59–68. doi: 10.17816/ecogen11159-68
13. Schmulling T., Schell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *The EMBO Journal*. 1988. V. 7. P. 2621–2629. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03114.x
14. Schmulling T., Fladung M., Grossmann K., Schell J. Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *The Plant Journal*. 1993. V. 3. P. 371–382. doi: 10.1046/j.1365-313X.1993.t01-20-00999.x