



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ГЕНАМИ *ROL AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

¹Кагирова А.С., ²Гумерова Г.Р., ¹Кашапова Г.М., ^{1,2}Кулуев Б.Р.

¹Башкирский государственный университет, adel-ru@mail.ru

²Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, kuluev@bk.ru

Резюме

Гены *rol Agrobacterium rhizogenes* играют ключевую роль в формировании hairy roots (косматых корней), и их встраивание в растительный геном нарушает нормальное развитие растения вследствие гормональных изменений, что в свою очередь приводит к различным фенотипическим отклонениям от нормы. Изолированные от побега культуры hairy roots имеют специфические особенности, такие как высокая скорость и неограниченность роста на питательной среде без фитогормонов, способность активно формировать боковые корни из-за отсутствия апикального доминирования и потери геотропной ориентации. Существует большое количество исследований, в которых показано, что содержание вторичных метаболитов в культуре hairy roots может намного превышать их концентрацию в растениях дикого типа, что связывают со стимулирующим влиянием продуктов *rol*-генов. В качестве перспективных продуцентов биоактивных молекул, таких как вторичные метаболиты и рекомбинантные белки кроме hairy roots рассматриваются также трансгенные растения. Благодаря высокой регенерационной способности из культуры hairy roots можно получать целые трансгенные растения, без потери приобретенных *rol*-генов. Такие растения могут потенциально обладать хозяйственно ценными признаками, также они могут быть использованы в качестве продуцентов первичных и вторичных метаболитов. Целью нашей работы была оптимизация основных этапов биотехнологического получения растений-регенерантов табака *Nicotiana tabacum* L из культуры hairy roots. В ходе работы нами были получены косматые корни табака путем инокуляции листовых эксплантов штаммом A4 *A. rhizogenes*. Каллусообразование в культурах hairy roots индуцировали на среде МС с добавлением нафтилуксусной кислоты и кинетина. Для регенерации побегов образующийся каллус пересаживали на среду МС с 6-бензиламинопурином и индоллил-3-уксусной кислотой. Укоренение регенерировавших побегов проводили на безгормональной среде МС. В ходе работы было акклиматизировано к условиям почвы 15 трансгенных по *rol*-генам растений табака, которые планируется использовать для изучения влияния продуктов этих онкогенов на рост и стрессоустойчивость, а также на содержание вторичных метаболитов по сравнению с растениями дикого типа.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, hairy roots, косматые корни, *Agrobacterium rhizogenes*, *rol*-гены, регенерация, побегообразование, трансгенные растения

DEVELOPMENT OF TRANSGENIC TOBACCO PLANTS WITH *ROL* GENES OF *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*

Kagirova A.S.¹, Gumerova G.R., Kashapova G.M.¹, Kuluev B.R.^{1,2}

¹Bashkir State University, Ufa, Russia, adel-ru@mail.ru

²Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, Russia, kuluev@bk.ru

Resume

The *rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes* play a key role in the formation of hairy roots but their integration into the plant genome disrupts the normal development of the plant due to hormonal changes, which in turn leads to various phenotypic abnormalities. Hairy roots culture have specific characteristics such as unlimited and high speed growth on a medium without phytohormones, the ability to actively form lateral roots due to lack of apical dominance and loss of a geotropic orientation. There are a large number of studies showing that the content of secondary metabolites in hairy roots culture can far exceed their concentration in wild-type plants, which is associated with the stimulating effect of *rol*-gene products. In addition to hairy roots as prospective producers of bioactive molecules, such as secondary metabolites and recombinant proteins transgenic plants are also considered. Thanks to the high regenerative ability of the hairy roots culture, whole *rol*-genes expressed plants can be generated. Such plants can potentially possess economically valuable traits, or these plants can be used as producers of primary and secondary metabolites. The purpose of our work was to refine the main stages of the biotechnology of regenerated transgenic plants of tobacco *Nicotiana tabacum* L. from the hairy roots culture. Hairy roots of tobacco were made by inoculating leaf explants. Callus formation in hairy roots cultures was induced on MS medium supplemented with naphthaleneacetic acid and kinetin. For the shoot regeneration, the calluses were transplanted into MS medium with 6- benzylaminopurine and indole-3-acetic acid. Rooting of regenerated shoots was carried out on the hormone-free MS medium. 15 transgenic tobacco plants were transplanted into the soil conditions, which will be used to study the effect of the products of these genes on growth and stress resistance, and also on the content of secondary metabolites compared to wild-type plants.

Key words: *Nicotiana tabacum*, hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, *rol*-genes, shoot regeneration, transgenic plants

Введение

Ri плаزمид фитопатогенной грамотрицательной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* несет в своей Т-ДНК генетическую информацию, реализация которой приводит к перепрограммированию дифференциации растительных клеток и индуцированию синдрома «hairy root disease». Образующиеся при этом заболевании быстро растущие адвентивные корни в русскоязычной литературе известны под названием косматые [Ясыбаева и др., 2016], бородатые [Михайлова и др., 2017; Мусин и др., 2017] и генетически трансформированные pRi корни [Кузовкина и др., 2012; Эрст и др., 2017]. Онкогены *A. rhizogenes* представлены четырьмя *rol*-генами, расположенными в TL-фрагменте Т-ДНК, тогда как гены синтеза опинов (источников питания агробактерий) входят в состав области TR-ДНК. Встраивание в растительный геном *rol*-генов (*rolA*, *B*, *C* и *D*) нарушает нормальное развитие растения вследствие гормональных изменений, что в свою очередь приводит к различным фенотипическим отклонениям от нормы [Srepa et al., 1987; Павлова и др., 2013]. Так, *rolA* увеличивает чувствительность к ауксину в период цветения, стимулирует корнеобразование и рост корней [Кулаева и др., 2006]. Растения, содержащие в своем геноме данный онкоген, отличаются морщинистыми листьями, короткими междоузлиями. В тканях стебля экспрессия онкогена имеет более высокий уровень, чем в корнях и листьях [Carneiro et al., 1993]. Такие фенотипические проявления трансгенных по гену *rolA* растений часто связаны с изменениями концентрации гибберелловой кислоты [Mauro et al., 2017].

RolB считается самым важным онкогеном, так как только его инактивация в составе Т-ДНК приводит к полному подавлению индукции косматых корней [Nilsson et al., 1997]. *RolB* экспрессируется во всех меристематических тканях и в проводящей системе [Altamura, 2004], способен активировать защитные системы растения в ответ на появление активных форм кислорода, предотвращать гибель некротических клеток и уменьшать апоптотические симптомы [Bulgakov et al., 2013]. Трансформанты характеризуются повышенным образованием придаточных корней, формированием случайных почек и увеличением размеров цветков [Schmülling et al., 1988]. Морфологические аномалии этих трансгенных растений наиболее ярко проявлялись в ответ на гормон ауксин [Кулаева и др., 2006].

RolC стимулирует образование более разветвленных корней на листьях табака, чем корни, индуцированные при помощи генов *rolA* или *rolB* [Mohajjel-Shoja, 2010]. У трансформированных геном *rolC* растений отмечается карликовый фенотип, короткие междоузлия, ланцетовидные листья, раннее цветение, уменьшение размера цветка и количества пыльцы [Srepa et al., 1987]. Некоторые трансгенные по гену *rolC* растения обладали более тяжелыми плодами и повышенной толерантностью по отношению к паразитам [Mohajjel-Shoja, 2010]. Ген *rolC* может быть индуцирован в любой клетке, при условии культивирования в среде богатой сахарозой [Nilsson et al., 1997]. Предполагается, что многие эффекты, вызванные *rolC*, могут быть связаны с увеличением активности гормона цитокинина [Mauro et al., 2017].

Активность экспрессии *rolD* значительно изменяется в течение цикла развития. Так, наибольший уровень обнаруживается в растущих органах, но никогда – в апикальной меристеме, и снижается с возрастом [Mohajjel-Shoja, 2010]. Среди всех представителей генов *rol*, только ген *rolD* не способен самостоятельно индуцировать косматые корни [Mauro et al., 1996; Авраменко, 2015]. Высота *rolD*-трансформантов меньше, чем растений дикого типа, так же им присущи следующие морфологические аномалии: ранний переход от вегетативного роста к репродуктивному, уменьшение укоренения, явление гетеростилии и формирование меристем в постэмбриональный период [Mauro et al., 1996; Павлова и др., 2013]. Промоторы генов *rolD* и *rolB* имеют Dof-связывающий элемент, участвующий в индукции ауксина [Trovato et al., 1997].

Параллельно с этими проявлениями трансгенные по *rol*-генам растения сохраняют в условиях *in vitro* генетическую стабильность и способность к синтезу корнеспецифических для данного растения вторичных метаболитов [Bulgakov et al., 2013], которые могут служить сырьем в различных областях промышленности и фармакологии. К наиболее эффективным индукторам вторичного метаболизма относят два гена - *rolB* и *rolC*. Первый увеличивает биосинтез антрахинонов [Авраменко, 2015] и противоопухолевого агента – ресвератрола [Kiselev et al., 2007], активирует экспрессию *PR*-генов, а также генов, кодирующих пероксидазы третьего класса, антиоксидантных ферментов: аскорбатпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы [Bulgakov et al., 2013; Mauro et al., 2017] и ферментов синтеза фитоалексинов [Veremeichik et al., 2012]. Ген *rolC* оказывает влияние на продукцию тропановых, пиридиновых и индольных алкалоидов [Palazon et al., 1998; Bonhomme et al., 2000], гинсенозидов [Bulgakov et al., 2002] и антрахиноновых фитоалексинов [Shkryl et al., 2008], к тому же специфическая экспрессия гена *rolC* во флоэме делает его полезным инструментом при создании трансгенных растений устойчивых к патогенам [Mohajjel-Shoja, 2010].

Полученные трансгенные по генам *rol* растения могут быть использованы в качестве модельных объектов для изучения биосинтеза первичных и вторичных метаболитов. Представляет большой интерес отбор трансгенных по генам *rol* растений-суперпродуцентов ценных вторичных метаболитов. Изучение продуктивности и стрессоустойчивости трансгенных растений, экспрессирующих все 4 *rol*-гена также является актуальным, так как большинство таких работ проведено лишь на отдельных *rol*-генах. Можно предполагать, что трансгенные по всем четырем *rol*-генам растения будут иметь различные фенотипические

отклонения, причем некоторые из этих морфофизиологических особенностей могут оказаться весьма полезными при создании новых форм и сортов декоративных и сельскохозяйственных растений. В связи с этим целью нашей работы стала разработка методов получения трансгенных растений-регенерантов из культуры hairy roots без потери приобретенных *rol*-генов и акклиматизация этих растений к условиям почвы на примере модельного объекта табака.

Материалы и методы

Для получения стерильных листовых эксплантов свежесобранные листья *Nicotiana tabacum* L, выдерживали в растворе 70% этанола в течение 1 мин и в 10% растворе белизны с добавлением 5 мкл Tween 20 в течение 10 мин. Затем листья промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой и нарезали их на отдельные экспланты размером 0,5 x 0,5 см. Для трансформации стерильных листовых эксплантов табака использовали штамм *A. rhizogenes* A4, который предварительно культивировали в жидкой среде LB с добавлением 100 мг/л рифампицина в течение суток. Затем культуры агробактерий центрифугировали при 4 тыс. об./мин в течение 10 минут при температуре 18°C, и осадок растворяли в 20 мл жидкой среды MC с добавлением 100 мкМ ацетосирингона. Суспензию агробактерий культивировали на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение получаса, после чего проводили инокуляцию листовых эксплантов совместно с *A. rhizogenes* по стандартной методике [Дрейпер и др., 1991]. Затем экспланты подсушивали на фильтровальной бумаге и в течение двух суток сокультивировали с агробактериями (при 23°C) на агаризованной среде MC без добавления антибиотиков; после этого экспланты пересаживали на среду, содержащую дополнительно 300 мг/л цефотаксима для избавления от агробактерий (табл. 1). Культуры корней культивировали на безгормональной твердой среде MC при температуре 25°C на свету. Далее для получения каллусов косматые корни пересаживали на среду MC с добавлением нафтилуксусной кислоты (НУК) (2 мг/л) и кинетина (0,2 мг/л). Для индукции побегообразования полученные каллусные культуры пересаживали на чашки Петри со средой MC с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) (0,5 мг/л) и индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) (0,17 мг/л). Укоренение регенерировавших побегов проводили на безгормональной среде MC. Для ПЦР-анализа косматых корней на наличие гена *rolA* использовали праймеры GTTAGGCGTGCAAAGGCCAAG и TGCATTAATCCCGTAGGTC, а для поиска гена *rolC* применялись праймеры GATGATGCGATGCTTTTATG и CAGAGACTTCCCTTTGTTGA.

Таблица 1.

Фитогормоны и антибиотики, добавленные в среду МС [по Hatamoto et al., 1990].

Вещество, мг/л	Индукция hairy roots	Индукция каллусов	Индукция побегообразования
Нафтилуксусная кислота	-	2	-
Индолил-3-уксусная кислота	-	-	0,17
6-бензиламинопурин	-	-	0,5
Кинетин	-	0,2	-
Цефотаксим	300	300	-

Результаты и обсуждение

Методом инокуляции в суспензии *A. rhizogenes* штамма А4 было трансформировано 20 листовых эксплантов (рис. 1а). Через 10 дней после этапа сокультивирования эксплантов с почвенной агробактерией наблюдали появление адвентивных корней на всех образцах, причем эти корни имели характерный для hairy roots фенотип. У них отмечалась высокая скорость развития, активное образование боковых корней, быстрый и аgravитропный рост (рис. 1б). Для получения каллусной культуры наиболее активно растущие корни пересаживали на среду МС с добавлением НУК и кинетина. Спустя 10 дней наблюдали образование светло-зеленой каллусной ткани средней плотности (рис. 1в). Далее культуры полученных каллусов пересаживали на среду МС с добавлением БАП и ИУК с целью индуцирования регенерации побегов. Спустя две недели наблюдали появление многочисленных точек регенерации (рис. 1г).

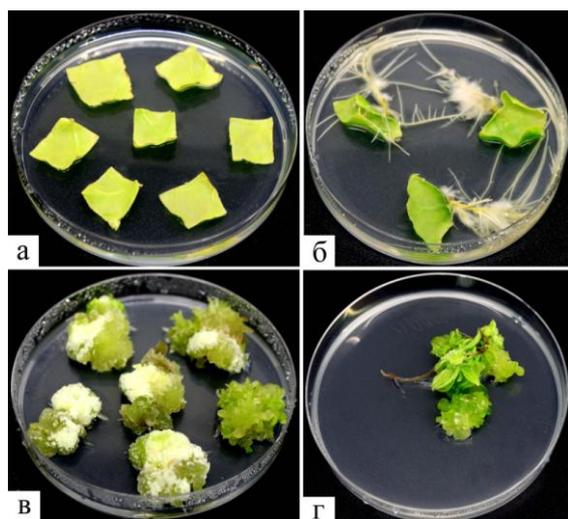


Рис.1. Получение hairy roots, индукция каллусообразования и побегообразования: а – листовые экспланты после двухсуточного сокультивирования с *A. rhizogenes*; б - образовавшиеся на трансформированных листовых эксплантах адвентивные корни с фенотипом hairy root; в – образование морфогенного каллуса на hairy roots; г - появление многочисленных точек регенерации побегов на каллусах.

Культивирование развивающихся регенерантов проводили в сосудах со средой МС без добавления фитогормонов (рис. 2а, б). Все регенеранты хорошо укоренялись на среде МС, после чего их пересаживали на почвенную смесь, накрывали прозрачными сосудами и выращивали при температуре $26\pm 1^\circ\text{C}$ на свету (рис. 2в). Акклиматизированные к условиям почвы регенеранты имели признаки, типичные для трансгенных по *rol*-генам растений. Например, они имели выраженную кустистость, небольшой размер (карликовость), темно-зеленые ланцетовидные морщинистые листья и короткие междоузлия (рис. 2г). В целом в ходе работы было получено 15 трансгенных по *rol*-генам растений табака.

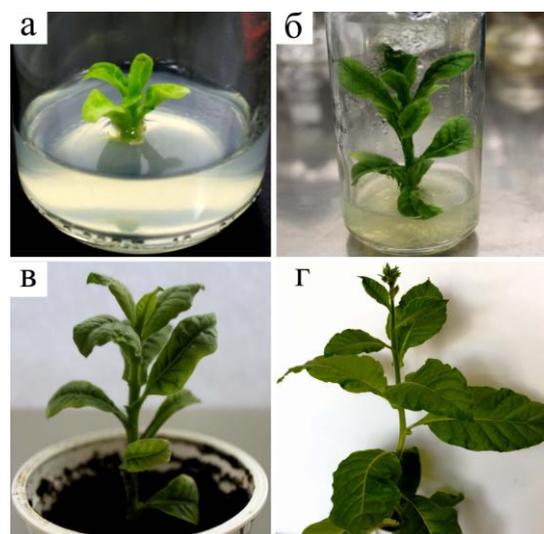


Рис. 2. Укоренение и акклиматизация регенерантов к условиям почвы: а – культивирование регенерантов в сосудах со средой МС; б – укоренение регенеранта через 10 дней выращивания; в – регенерант, пересаженный на почвенную смесь для акклиматизации; г – взрослое трансгенное по генам *rol* растение

После этапа акклиматизации растений-регенерантов к условиям почвы нами была поставлена задача выяснить, сохраняются ли *rol*-гены в этих растениях и можно ли получить на их листьях косматые корни на безгормональных средах без дополнительных процедур индукции

корнеобразования. Для этого производили стерилизацию листьев акклиматизированных регенерантов по стандартной методике (70% спирт и 10% белизна). Далее листовые экспланты культивировали в чашках Петри на безгормональной среде МС. Через несколько дней на эксплантах наблюдали начало появления адвентивных корней по фенотипу похожих на hairy roots. Так, через шесть дней появились первые корни в количестве 4 шт. Максимальное количество корней (14 шт.) отмечалось на восьмой день культивирования. Всего

за 15 дней выросло 63 адвентивных корней, далее появление новых корней прекратилось. Необходимо отметить, что на эксплантах табака дикого типа при этих же условиях адвентивные корни вовсе не появлялись. Через две недели после изолированного культивирования полученных адвентивных корней из них были отобраны 20 наиболее активно растущих линий. ПЦР-анализ с праймерами на гены *rolA* и *rolC* показал наличие этих онкогенов в ДНК всех исследуемых двадцати линий корней (рис. 3).

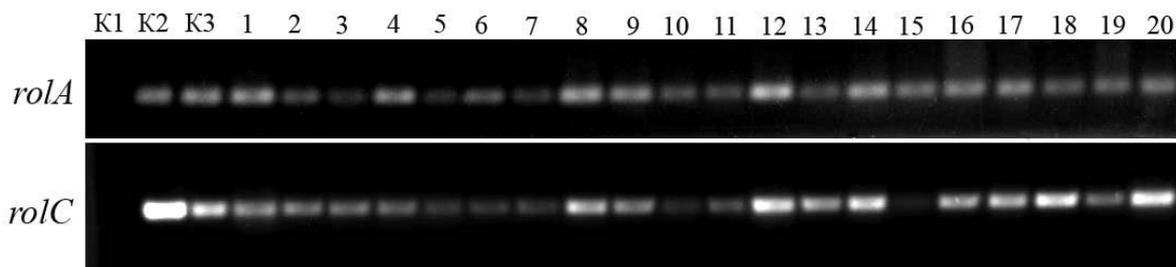


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа полученных корней на наличие генов *rolA* и *rolC*. K1 – отрицательный контроль (ДНК табака дикого типа); K2 – положительный контроль (ДНК *A. rhizogenes*); K3 – положительный контроль (ДНК hairy roots); 1-20 – образцы ДНК двадцати анализируемых адвентивных корней, спонтанно образующихся на эксплантах растений-регенерантов

Таким образом, в ходе проведённых экспериментов нами получены взрослые трансгенные по *rol*-генам растения табака. На эксплантах листьев этих трансгенных растений на безгормональных питательных средах индуцировалось образование косматых корней. Это позволяет сделать заключение о том, что регенерирующая способность *N. tabacum* достаточно высока, что дает возможность использование такого способа для устойчивого сохранения культур hairy roots с полезными признаками в течение длительного времени. Также нами получены семена у трансгенных растений и планируются работы по получению растений с *rol*-генами второго поколения и проведению их морфофизиологического анализа при нормальных и стрессовых условиях.

Литература

1. Авраменко Т.В. Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*: автореф. дис. канд. биол. наук / Т. В. Авраменко; Биол.-почв. ин-т ДВО РАН. Владивосток, 2015. 24 с. [Avramenko T.V Activity and production of Class III peroxidases in cell cultures of plants transformed with *rolB* and *rolC* genes: Abstract. dis. cand. biol. sciences / T.V Avramenko; Biol.-soil. institute of Far Eastern Branch of RAS. Vladivostok, 2015. 24 P. In Russian].

2. Дрейпер Д.С., Армитидж Ф., Дьюри Г., Джэкоб Л., Уолден Р., Кумар А., Джефферсон Р., Хэмил Д. Генная инженерия растений. - М.: Мир, 1991. С. 408. [Draper J., Armitage F., Dury G., Jacob L., Walden R., Kumar A., Jefferson R., Hamil D. Plant genetic transformation and gene expression. A laboratory manual. Oxford; Boston: Blackwell Scientific Publications 1988. 366 p].

3. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модельная система для изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения / В кн.: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. Под ред. Кузнецова Вл. В., Кузнецова В.В., Романова Г.А. Москва, 2012. БИНОМ, Лаборатория знаний, С. 137–153. [Kuzovkina I.N., Vdovitchenko M.Yu. Genetically transformed roots as a model system for studying the physiological and biochemical processes of the root system of an entire plant / In: Molecular genetic and biochemical methods in modern plant biology. Kuznetsov V.I.V., Kuznetsov V.V., Romanov G.A. (eds.) Moscow, 2012. BINOM, Laboratory of Knowledge, P. 137–153. In Russian].

4. Кулаева О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Горизонтальный перенос генов от агрообактерий к растениям // Экологическая генетика. 2006. Т. IV. № 4. С. 10–19. [Kulaeva O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal transfer of genes from agroobacteria to plants

- // Ecological Genetics. 2006. V. IV. № 4. P. 10–19. In Russian].
5. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородачатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 40–45. [Mikhailova E.V., Kuluev B.R., Yasibaeva G.R., Chemeris A.V. Creation of cultures of hairy roots *Withania somnifera* and assessment of parameters of their growth at cultivation on firm and liquid nutritious environments // Journal “Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology”. 2017. V. 13. № 2. P. 40–45. In Russian].
 6. Мусин Х.Г., Якупова А.Б., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Особенности роста культур генетически трансформированных (бородачатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 46–50. [Musin Kh.G., Yakupova A.B., Mikhailova E.V., Kuluyev B.R. Peculiarities of the growth of cultures of genetically transformed (hairy) roots of tobacco and vitania with a change in the volume of nutrient medium // Journal “Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology”. 2017. V. 13. № 2. P. 46–50. In Russian].
 7. Павлова О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. *Rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes* // Экологическая генетика. 2013. Т. XI. №1. С. 59–68. [Pavlova O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. *Rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes* // Ecological Genetics. 2013. V. XI. №1. P. 59–68. In Russian].
 8. Эрст А.А., Зибарева Л.Н., Железниченко Т.В., Ковзунова О.В. Культура генетически трансформированных корней (hairy roots) *Silene roemerii* Friv. – источник получения фитоэкдистероидов // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2017. № 37. С. 17–30. [Erst A.A., Zibareva L.N., Zheleznichenko T.V., Kovzunova O.V. Culture of genetically transformed roots (hairy roots) *Silene roemerii* Friv is source of phytoecdysteroids production // Tomsk State University Journal of Biology. 2017. №. 37. P. 17–30. In Russian].
 9. Ясыбаева Г.Р., Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Безбактериальное получение косматых корней // Вестник защиты растений. 2016. Т. 89. № 3. С. 187–188. [Yasibaeva G.R., Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. Induction of hairy roots without *Agrobacterium* transformation // Plant Protection News. 2016. Т. 89. № 3. P. 187–188. In Russian].
 10. Altamura M.M. *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. V. 77. P. 89–101. doi:10.1023/B:TICU.0000016609.22655.33
 11. Bonhomme V., Laurain Mattar D., Fliniaux M.A. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* // J. Nat. Prod. 2000. V. 63. P. 1249–1252. doi:10.1021/np990614l
 12. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes // Biotechnol. 2002. V. 97. P. 213–221. doi:10.1016/S0168-1656(02)00067-6
 13. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpenchenko T.Y., Vereshchagina Y.V. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2013. V. 134. P. 11–22. doi:10.1007/10_2013_179
 14. Carneiro M., Vilaine F. Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development // Plant J. 1993. V. 3. P. 785–792. doi:10.1111/j.1365-313X.1993.00785.x
 15. Hatamoto H., Boulter M.E. Shirsat A.H., Croy E.J., Ellis J.R. Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with *Agrobacterium rhizogenes* and a binary vector plasmid // Plant Cell Reports. 1990. V. 9. P. 88–92. doi:10.1007/BF00231556
 16. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // J. Biotechnol. 2007. V. 128. P. 681–692. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.11.008
 17. Mauro M.L., Trovato M., Paolis A.D., Gallelli A., Costantino P., Altamura M.M. The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants // Dev. Biol. 1996. V. 180. P. 693–700. doi:10.1006/dbio.1996.0338
 18. Mauro M.L., Costantino P.P., Bettini P. The never ending story of *rol* genes: a century after // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2017. V. 131. P. 201–212. doi:10.1007/s11240-017-1277-5
 19. Mohajjel-Shoja H. Contribution to the study of the *Agrobacterium rhizogenes* plast genes, *rolB* and *rolC*, and their homologs in *Nicotiana tabacum*. Thesis of University of Strasbourg. 2010.
 20. Nilsson O., Tumineh H., Sundberg B., Olsson O. The *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolC*

- promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen // *Physiologia Plantarum*. 1997. V. 100. P. 456–462. doi:10.1111/j.1399-3054.1997.tb03050.x
21. Palazon J., Cusido R.M., Roig C., Piñol M.T. Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants // *Plant Cell Rep.* 1998. V. 17. P. 384–390. doi:10.1007/s002990050411
22. Trovato M., Mauro M.L., Costantino P., Altamura M.M. The *rolD* gene from *Agrobacterium rhizogenes* is developmentally regulated in transgenic tobacco // *Protoplasma*. 1997. V. 197. P. 111–120. doi:10.1007/BF01279889
23. Schmülling T., Schell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development // *EMBO J.* 1988. V. 7. P. 2621–2629.
24. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravle Y.N. Individual and combined effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 1. P. 118–125. doi:10.1002/bit.21727
25. Spena A., Schmülling T., Koncz C., Shell J.S. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3891–3899.
26. Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Zhuravlev Y.N. Molecular cloning and characterization of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures // *Plant Cell Rep.* 2012. V.6. P.1009–1019. doi:10.1007/s00299-011-1219-3