



**БИОМИКА/BIOMICS**

<http://biomics.ru>



**БИОБАЛЛИСТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ *TRITICUM AESTIVUM*  
*ROL*-ГЕНАМИ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES***

<sup>1</sup>Гумерова Г.Р., <sup>1,2</sup>Кулуев Б.Р., <sup>2</sup>Кагирова А.С., <sup>1</sup>Вершинина З.Р., <sup>1</sup>Чемерис А.В.

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, Россия, e-mail: gulnar.yas@mail.ru

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет, 450076, Уфа, Россия, e-mail: kuluev@bk.ru

**Резюме**

Культура hairy roots или косматых корней является одним из наиболее востребованных биотехнологических объектов для получения ценных вторичных метаболитов растений. Главными недостатками существующих методик получения hairy roots является достаточно трудоемкий и долгий процесс избавления от агробактерий и большая зависимость эффективности трансформации от штамма *Agrobacterium rhizogenes* и вида инфицируемого растения. Еще одним значительным недостатком этих методов является то, что они в основном подходят для трансформации двудольных растений, тогда как у однодольных и голосеменных растений такими способами получить косматые корни весьма затруднительно. Для преодоления существующих трудностей нами был предложен прямой метод биобаллистической трансформации каллусов растений *rol*-генами. В представленной работе для генетической трансформации были использованы каллусы мягкой пшеницы *Triticum aestivum*. В результате бомбардировки было получено 3 различных морфотипа адвентивных корней пшеницы: морфотип 1 - короткие неветвящиеся корни, морфотип 2 - длинные ветвящиеся корни; морфотип 3 - корни с многочисленными очагами каллусообразования. ПЦР-анализ адвентивных корней морфотипа 2, которые по фенотипическим признакам напоминали истинные косматые корни, на присутствие *rol*-генов оказался отрицательным. Несмотря на отсутствие в их геномах *rol*-генов, адвентивные корни пшеницы характеризовались способностью к длительному росту в изолированных культурах. При дальнейшем культивировании у некоторых линий адвентивных корней пшеницы, характеризующихся неограниченным ростом, наблюдали спонтанное позеленение, что возможно способствовало долгому росту этих корней на безгормональной среде. Изолированно растущие культуры зеленых адвентивных корней однодольных могут стать альтернативой истинным hairy roots, которые довольно трудно получить у представителей этого класса растений.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, hairy roots, косматые корни, адвентивные корни, биобаллистика, *rol*-гены, культура зеленых корней

**BIOLISTIC TRANSFORMATION OF *TRITICUM AESTIVUM*  
WITH *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* *ROL*-GENES**

<sup>1</sup>Gumerova G.R., <sup>1,2</sup>Kuluev B.R., <sup>2</sup>Kagirova A.S., <sup>1</sup>Vershinina Z.R., <sup>1</sup>Chemeris A.V.

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, e-mail: gulnar.yas@mail.ru

<sup>2</sup>Bashkir State University, Ufa, Russia, e-mail: kuluev@bk.ru

**Resume**

The hairy roots culture is one of the most perspective biotechnological objects for production valuable secondary plant metabolites. The main drawbacks of the existing methods of generating hairy roots is laborious and long process of agrobacteria elimination and high dependence of the transformation efficiency on the strain of *A. rhizogenes* and species of infected plant. Another significant drawback of these methods is

that they are mainly suitable only for the transformation of dicotyledons, whereas it is very laborious to generate hairy roots in monocotyledons and gymnosperms. We proposed a direct method of biolistic transformation of plants calli with *rol*-genes to overcome existing difficulties. Wheat calli was used for genetic transformation in this work. Three different morphotypes of the adventitious roots of wheat were obtained as a result of the bombardment. Morphotype 1 - short unbranched roots; morphotype 2 - long branching roots; morphotype 3 - roots with abundant calli formation. Adventitious roots of morphotype 2 are similar to true hairy roots. PCR analysis for the presence of *rol*-genes of these putative hairy roots was negative. However these wheat adventitious roots were characterized by their ability to long-term growth. Some lines of wheat adventitious roots were observed spontaneous greening that possibly contributed to the unlimited growth of these roots on hormone-free medium. Separately growing cultures of monocots green adventitious roots can become an alternative to hairy roots of monocots.

**Key words:** *Triticum aestivum*, hairy roots, adventitious roots, biolistics, *rol*-genes, green root culture

### Введение

Культура hairy roots или косматых корней является одним из наиболее востребованных альтернативных источников ценных вторичных метаболитов растений [Кулуев и др., 2015a]. Поиски новых биотехнологических подходов в продукции полезных соединений во многом обусловлены ограниченностью запасов лекарственного сырья, невозможностью выращивания многих видов растений с помощью плантационного метода, а также трудностями разработки путей химического синтеза многих природных соединений [Михайлова и др., 2017]. Существует большое количество исследований, в которых показано, что содержание вторичных метаболитов в культуре косматых корней может значительно превышать их концентрацию в интактных растениях [Murthy, 2008; Esam, 2011; Jeeshna, Paulsamy, 2011]. Полученные культуры корней могут использоваться для наработки различных вторичных метаболитов – алкалоидов, терпеноидов, фенолов, гликозидов и др. [Sharifi et al., 2013], часть из которых служит сырьем для получения лекарственных препаратов или относится к другим хозяйственно-ценным соединениям, например, инулин, полиизопрен [Кулуев и др., 2015b] и др.

Культуру hairy roots получают в результате инфицирования растительной ткани почвенной фитопатогенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, которая переносит в геном растений особые онкогены, называемые *rol*-генами (*A*, *B*, *C* и *D*), что в свою очередь вызывает образование генетически трансформированных косматых корней преимущественно у двудольных растений. Главными недостатками существующих методик получения hairy roots является довольно трудоемкий и долгий процесс избавления от агробактерий и большая зависимость эффективности трансформации от штамма *A. rhizogenes*, вида и даже сорта (разновидности, подвида) инфицируемого растения. Более того, эти методы в основном подходят только

для трансформации двудольных растений, тогда как у однодольных и голосеменных растений такими способами получить косматые корни весьма затруднительно. Однако известны единичные работы по успешной трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, несущей конструкции с *rol*-генами, некоторых представителей голосеменных [McAfee et al., 1993; Magnussen et al., 1994; Mihaljevic et al., 1996; Yibrah et al., 1995; Xu et al., 2006] и злаковых, таких как рис [Lee et al., 2001] и бизонья трава [Aguado-Santacruz et al., 2009]. Это говорит о принципиальной возможности получения косматых корней у однодольных, однако проблема заключается в отсутствии эффективных методов доставки и встройки *rol*-генов в геномы этой группы растений.

В настоящее время в биотехнологии растений довольно часто появляются задачи по получению косматых корней однодольных растений, например, для получения важных фармакологических стероидов из *Dioscorea deltoidea* [Avula et al., 2014]. Более того и при работе со многими двудольными растениями также возникают проблемы и их довольно часто не удается трансформировать при помощи агробактерий. Например, у такого лекарственного растения как *Tribulus terrestris* L. до сих пор не удается индуцировать косматые корни для получения β-карболиновых алкалоидов [Sharifi et al., 2014].

В связи с существующими ограничениями агробактериальной трансформации однодольных и некоторых двудольных растений возникает необходимость использования других более универсальных подходов, подразумевающих прямой перенос агробактериальных онкогенов без участия *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Одним из таких перспективных методов генетической модификации без участия агробактерий может стать биобаллистическая трансформация *rol*-генами, которая позволяет обходить зависимость эффективности трансформации от штамма *A. rhizogenes* и вида инфицируемого растения

[Ясыбаева и др., 2016]. Для преодоления этих трудностей нами ранее был предложен метод безбактериального получения косматых корней. Сущность данного подхода заключается в биобаллистической трансформации стерильных растительных эксплантов микрочастицами золота, покрытых ампликоном, содержащим все четыре *rol*-гена и ограниченного с двух сторон Т-границами Т-ДНК *A. rhizogenes*. Ранее данная технология нами была испытана на модельном объекте табаке, и была показана принципиальная возможность переноса *rol*-генов в геном растений при использовании данного подхода [Yasybaeva et al., 2017]. Можно предположить, что разработанный нами безбактериальный метод создания косматых корней может оказаться эффективным и при трансформации клеток однодольных. Для проверки этой гипотезы в представленной работе нами в качестве объекта трансформации была выбрана мягкая пшеница *T. aestivum* как представитель класса однодольных. Основной целью работы было испытание разработанного нами безбактериального и безплазмидного метода трансформации *rol*-генами на одном из представителей класса однодольных – мягкой пшенице.

#### Материалы и методы

В качестве объекта трансформации был использован семенной материал мягкой пшеницы *T. aestivum* сорта «Радуга». Для выделения зародышей незрелые семена пшеницы (на 14-е сутки после опыления) стерилизовали 70% этиловым спиртом в течение 2 минут, затем 15 мин раствором 15%-ной белизны с добавлением 1 мкл 100% Tween 20, отмывали 5 раз стерильной дистиллированной водой. Для индукции каллусов изолированные из семян незрелые зародыши высаживали щитком вниз в чашки с агаризованной питательной средой МС с добавлением 375 мг/л L-глутамин, 75 мг/л L-пролина и 5 мг/л L-аспарагина и 0,5 мг/л 2,4-Д [Sparks, Jones 2009]. Экспланты незрелых зародышей пшеницы культивировали при 25°C и фотопериоде 16/8 часов. Пассирование культур осуществляли каждые 2 недели. Проростки на каллусах удаляли по мере их возникновения. После месяца культивирования каллусы переносились на среду с высоким осмотическим давлением (концентрация сахарозы 90 г/л) на 2 дня для повышения выживаемости трансформируемой ткани. После чего была проведена биобаллистическая трансформация каллусов пшеницы с использованием генетического материала бактерии *A. rhizogenes* штамма A4 (ампликон с четырьмя *rol*-генами или вектор pAL-TA с клонированным в нем четырьмя *rol*-генами). Тотальную ДНК бактерий выделяли с помощью

набора ДНК-Сорб (ИнтерЛабСервис, Россия). Фрагмент ДНК агробактерии размером 5401 п.н., содержащий гены *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD* (со всеми необходимыми регуляторными участками), был амплифицирован из тотальной ДНК *A. rhizogenes* при помощи LR Plus полимеразы (Силекс, Россия). Для добавления в ампликон последовательностей правой и левой границ Т-ДНК *A. rhizogenes*, участвующих в интеграции в растительный геном, проводили реамплификацию при помощи модифицированных прямого и обратного праймеров [Yasybaeva et al., 2017]. Полученный ампликон использовали для биобаллистической трансформации или клонировали в векторе pAL-TA для возможности наработки (клонирования) целевого участка Т-ДНК в необходимом количестве.

Биобаллистическая трансформация проводилась с использованием “генной пушки” Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad, США), где в качестве микроносителя были использованы микрочастицы золота Bio-Rad, средний размер которых составлял 1 мкм. Преципитацию ДНК на микроносители проводили кальций-спермидиновым способом [Finer et al., 1992]. Для повышения выживаемости трансформируемой ткани каллусы культивировали на среде МС с повышенным осмотическим давлением (с содержанием сахарозы 90 г/л в течение 48 часов до трансформации). Параметры биобаллистической трансформации: дистанция до мишени – 6 см, давление гелия – 900 PSI, давление вакуума – 0,9 bar, количество ДНК-пробы на выстрел – 10 мкл (1 мкг/мкл), количество выстрелов на чашку – 1. После выстрела каллусы помещали на агаризованную безгормональную среду МС, рН 5,7-5,8. Чашки выдерживались при 25°C и 16-часовом фотопериоде.

Отбор предполагаемых косматых корней пшеницы, образующихся на каллусной ткани, осуществляли визуально по характерным фенотипическим особенностям (разветвленность, опушенность, способность к росту на безгормональной среде после отделения от каллуса). Тотальную ДНК из предполагаемых косматых корней выделяли с помощью СТАВ-метода. Для идентификации присутствия *rol*-генов проводили ПЦР-анализ на наличие фрагмента гена *rolB* с использованием прямого 5'-CGAGAGCCGCAGGGTGAG-3' и обратного 5'-AGGCGTGCTTGATTTGGAGG-3' праймеров. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с добавлением этидиум бромид. Размеры амплифицированных фрагментов определяли, используя в качестве маркера GeneRulerTM100 bp Plus DNA ladder (Fermentas).

**Результаты исследования и их обсуждение**

Семенной материал мягкой пшеницы (рис. 1а) был собран из средней части колосков и простерилизован согласно стандартной методике. Незрелые зародыши (рис. 1б) изолировали из семян на 14-й день после опыления. Подходящие по размеру (2-3 мм) и стадии развития зародыши отбирали визуально и выкладывали на среду МС с добавлением 375 мг/л L-глутамина, 75 мг/л L-пролина и 5 мг/л L-аспарагина и 0,5 мг/л 2,4-Д для индукции каллуса. Всего было выделено около 500 незрелых зародышей.

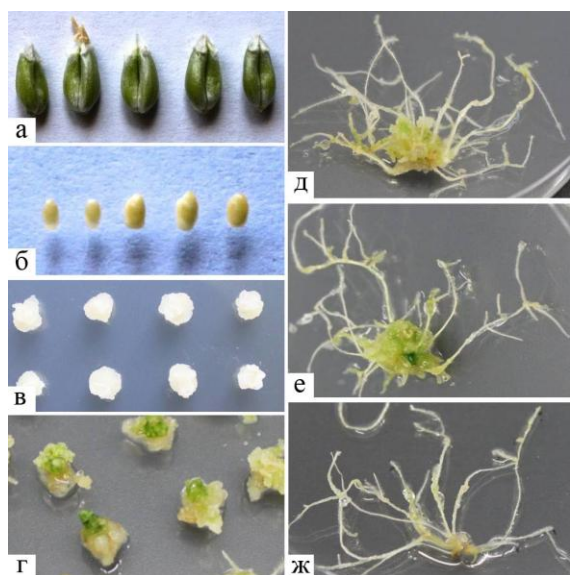


Рис. 1. Семенной материал мягкой пшеницы (а); незрелые зародыши на 14 день после опыления (б); недельные каллусы пшеницы (в); побегообразование на каллусах (г); предполагаемые косматые корни пшеницы на безгормональной среде после биобаллистической трансформации (д-ж).  
Fig. 1. Wheat seed material (a); immature embryos on 14 day after pollination (b); weekly wheat calli (c); shooting on calli (d); putative wheat hairy roots on hormone-free medium after biolistic transformation (e-g).

Спустя неделю культивирования наблюдали активное каллусообразование (рис. 1в) и начальные стадии прямого органогенеза практически на всех образцах. Каллусная ткань имела светло-зеленый цвет и структуру средней плотности с хорошо выраженными меристематическими очагами. Проростки, достигшие 1 см в длину, удалялись в стерильных условиях по мере их возникновения (рис. 1г). После месяца культивирования каллусы с наиболее хорошими показателями роста переносились на среду с высоким осмотическим давлением (концентрация сахарозы 90 г/л) на 2 дня. В каждую чашку помещали по 30 каллусов. После чего была проведена биобаллистическая трансформация

кallусов пшеницы векторной конструкцией pAL-TA/*rolA,B,C,D*, схема создания которой представлена на рис. 2 и рис. 4. Из тотальной ДНК *A. rhizogenes* был амплифицирован участок ДНК размером 5401 пн, который был обозначен как ампликон А (рис. 2).

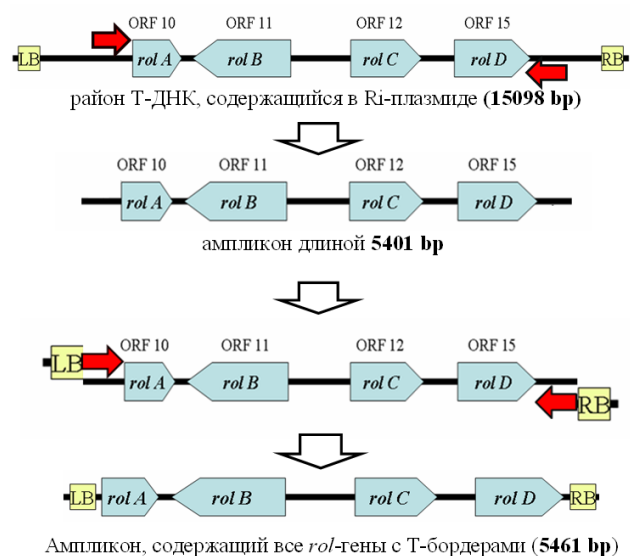


Рис. 2. Схема создания целевого ампликона, содержащего все четыре *rol*-гена с Т-бордерами.  
Fig. 2. Scheme create target amplicon, containing all four *rol*-genes with T-borders.

Электрофоретический анализ показал, что размер ампликона А совпадает с теоретически ожидаемым. Секвенирование фланкирующих участков ампликона А показало, что этот участок действительно соответствует Т-ДНК *A. rhizogenes*. Затем при помощи специальных праймеров была проведена реамплификация и таким образом получен ампликон Б, содержащий все 4 *rol*-гена и фланкированный с двух сторон Т-границами (рис. 2). Размер ампликона Б также совпал с теоретически ожидаемым и действительно оказался немного больше ампликона А (рис. 3).

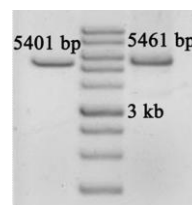


Рис. 3. Электрофоретический анализ целевых ПЦР-продуктов: 1- ампликон А, размером 5401 п.н.; 2- маркер молекулярной длины; 3- ампликон Б, размером 5461 п.н.  
Fig. 3. Electrophoretic analysis of generated PCR products: 1- amplicon A (5401 bp); 3 - amplicon B (5461 bp).

Далее было проведено секвенирование ампликона Б и было показано, что его фланкирующие участки размером по 500 пн с каждой стороны не содержат нуклеотидных замен.

Полученный ампликон клонировали в векторе pAL-TA согласно схеме, приведенной на рисунке 4, для возможности наработки целевого участка Т-ДНК в необходимом количестве.

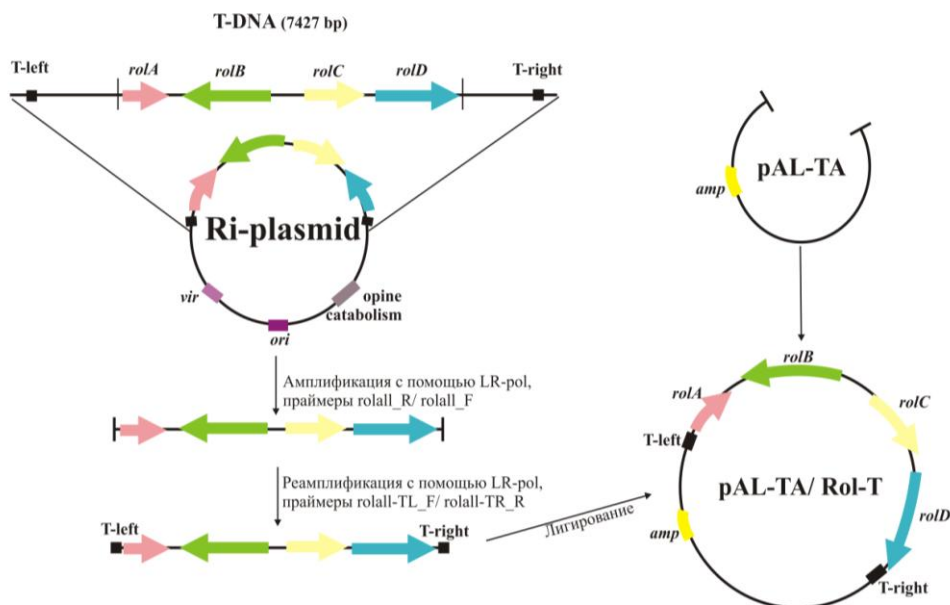


Рис. 4. Схема клонирования ампликона Б, содержащего все четыре *rol*-гена в векторе pAL-TA.  
Fig. 4. Scheme of cloning of the amplicon B containing all four *rol*-genes in the pAL-TA vector.

Биобаллистическая трансформация каллусов мягкой пшеницы проводилась с использованием “генной пушки” Biolistic PDS-1000/He. Параметры эксперимента были описаны в разделе «Материалы и методы». Перед каждым выстрелом каллусы плотно размещали на центральной части чашки Петри с целью увеличения вероятности попадания золотых частиц с ДНК. Всего для трансформации было отобрано около 300 каллусов, 60 (2 чашки) из которых являлись контрольными образцами. Эти образцы подвергались такой же бомбардировке, но без добавления ДНК. После проведения всех процедур биобаллистической трансформации каллусы оставляли на той же среде МС с высоким осмотическим давлением (трехкратное содержание сахарозы) для обеспечения выживаемости трансформируемой ткани. Через 2 дня после бомбардировки каллусы перенесли на безгормональную среду МС и культивировали при 25°C и 16-часовом фотопериоде.

После 10-15 дней культивирования на бомбардированных каллусах пшеницы наблюдали начало ризогенеза. Полученные корни можно было разделить на три морфотипа: морфотип 1 - короткие неветвящиеся адвентивные корни на каллусах, которые появились на наибольшем количестве образцов, в том числе и на контрольных чашках Петри без добавления ДНК (рис. 5а, б); морфотип 2 -

длинные ветвящиеся адвентивные корни, которые отсутствовали на контрольных образцах (рис. 5в); морфотип 3 - корни с многочисленными очагами каллусообразования (рис. 5г).

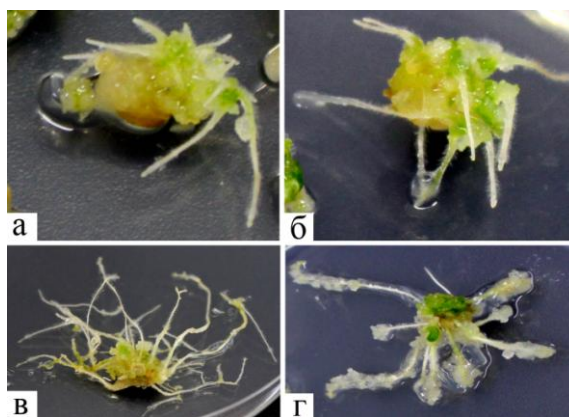


Рис. 5. Корни морфотипа 1 на контрольных каллусах после биобаллистической трансформации без добавления ДНК (а); корни морфотипа 1, образованные после бомбардировки с добавлением ДНК (б); корни морфотипа 2 (в); корни морфотипа 3 (г).  
Fig. 5. Morphotype 1 roots on control wheat calli after biolistic transformation without addition of DNA (a); morphotype 1 roots obtained after biolistics with DNA (b); morphotype 2 roots (c); morphotype 3 roots (d).



Количество корней морфотипа 1 значительно превышало количество корней других морфотипов. Наибольший интерес вызывали корни морфотипа 2, так как по внешним признакам они напоминали истинные косматые корни. С целью проверить данное предположение мы отделили адвентивные корни морфотипа 1 из контрольного и опытного образцов, а также корни морфотипа 2 из каллусной ткани и перенесли на безгормональную среду МС для оценки их способности к росту в изолированных культурах. Уже спустя одну неделю культивирования наблюдали умеренный рост корней морфотипа 2, а корни первого морфотипа признаков роста не проявляли. В течение месяца культивирования корни морфотипа 2 продолжали расти, а корни первого морфотипа (как из контрольного, так и из опытного образцов) погибали в результате развития некротических процессов. Интересно отметить, что при длительном культивировании на некоторых линиях корней морфотипа 2 наблюдали позеленение (рис. 6), что может быть связано с накоплением фотосинтезирующих хлоропластов в корневых клетках.

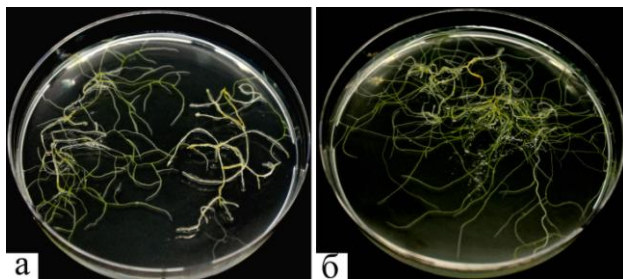


Рис. 6. Зеленые адвентивные корни пшеницы, полученные в результате опытов по биобаллистической трансформации.

Fig. 6. Wheat green adventitious roots obtained after biolistic transformation.

Среди корней морфотипа 2 были отобраны 10 наиболее активно растущих предполагаемых косматых корней и перенесены в жидкую безгормональную среду. Корневые инокуляты (около 50 мг) культивировали на орбитальном шейкере при 80 об/мин в колбах емкостью 100 мл с 2 мл жидкой среды МС на свету в течение месяца. Подсушенные на фильтровальной бумаге корневые культуры взвешивали перед началом эксперимента и в конце. В качестве отрицательного контроля послужили корни морфотипа 1, а в качестве положительного – истинные косматые корни табака. Сырая масса корней морфотипа 1 в течение месяца не изменилась, даже в некоторых случаях уменьшилась, а корней морфотипа 2 увеличилась незначительно на 44,46%. В случае с зелеными адвентивными корнями пшеницы морфотипа 2 наблюдали активное

наращивание сырой массы - на 485,64%, значение которой даже превышало скорость роста истинных hairy roots табака (360,49%). Таким образом, спонтанно позеленевшие корни мягкой пшеницы были способны к активному росту на безгормональной среде МС, что возможно связано с активацией фотосинтетической системы. Существует несколько исследований, в которых ранее были получены зеленые культуры hairy roots, например, у *Ipomoea aquatica* [Taya et al, 1994], *Solanum khasianum Clarke* [Jacob and Malpathak, 2004], *Daucus carota* [Mukherjee et al, 2014] и др. В основном эти зеленые косматые корни были получены за счет длительного культивирования на свету и воздействия цитокининами. В нашем же случае адвентивные корни пшеницы зеленели без дополнительной стимуляции светом или фитогормонами. В этих же условиях косматые корни табака никогда не приобретали зеленую окраску.

Следует отметить, что эти культуры адвентивных корней пшеницы продолжали свой рост и не имели склонности к коричневению в течение длительного культивирования (2 года). Однако ПЦР-анализ со специфическими праймерами к гену *rolB* показал отсутствие последнего в тотальной ДНК адвентивных корней пшеницы всех трех морфотипов, в том числе и у зеленых корней. В то же время ген *rolB* нами всегда обнаруживался в истинных hairy roots табака. Это означает, что при биобаллистической трансформации каллусов пшеницы *rol*-генами они не встраивались в геном. Появление адвентивных корней пшеницы морфотипа 2 может быть связано как с транзитной экспрессией агробактериальных онкогенов, так и опосредованным влиянием механического стресса, вызванного бомбардировкой золотыми частицами. Существует несколько гипотез по поводу спонтанного позеленения культур корней, так, например, на экспериментах на арабидопсисе показано, что корни способны развивать хлоропласты при отделении их от побега за счет превращения зародышевых пропластид в хлоропласты [Kobayashi et al., 2017]. Этими же авторами установлено, что развитие хлоропластов подавляется ауксином, а цитокинины наоборот способствуют развитию фотосинтезирующего аппарата в корнях.

Спонтанное позеленение некоторых линий изолированно растущих адвентивных корней пшеницы видимо является особенностью этого вида растения (возможно и всего семейства злаков), так как на hairy roots табака нам не удалось индуцировать такое позеленение даже при использовании интенсивного света (до 7 клк),

цитокининов и введения в состав среды дополнительного магния.

Таким образом, нами показано, что на каллусах пшеницы путем механического воздействия при бомбардировке золотыми частицами с добавлением *rol*-генов могут быть индуцированы адвентивные корни, способные к длительному росту на безгормональных питательных средах. При этом может спонтанно происходить позеленение этих адвентивных корней. Мы предполагаем, что изолированно растущие культуры зеленых адвентивных корней однодольных могут стать альтернативой истинным hairy roots, которые довольно трудно получить у представителей этого класса растений.

### Литература

1. 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 инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // Биомика. 2015а. Т. 2. С. 70-120. [Kuluev B.R., Verшинina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A., Baymiev An.K., Chumakov M.I., Baymiev Al.K., Chemeris A.V. The plants hairy roots are an important tool for researchers and a powerful phytobiochemical factory for industrialists // Biomics. 2015a. V. 2. P. 70-120. In Russian].
2. Кулуев Б.Р., Гарафутдинов Р.Р., Максимов И.В., Сагитов А.М., Чемерис Д.А., Князев А.В., Вершинина З.Р., Баймиев Ан.Х., Мулдашев А.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Натуральный каучук, его источники и составные части // Биомика. 2015б. Т. 4. С. 224-283. [Kuluev B.R., Garafutdinov R.R., Maksimov I.V., Sagitov A.M., Chemeris D.A., Knyazev A.V., Verшинina Z.R., Baymiev An.K., Muldashev A.A., Baymiev Al.K., Chemeris A.V. Natural rubber, its sources and compounds // Biomics. 2015b. V. 4. P. 224-283. In Russian].
3. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородатых 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., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Creation of *Withania somnifera* hairy roots cultures and an estimation of their growth parameters at cultivation on solid and liquid nutritious mediums // Bulletin of biotechnology and physico-chemical biology of them. Y.A. Ovchinnikov. 2017. V. 13(2). P. 40-45. In Russian].
4. 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. [Yasybaeva G.R., Verшинina Z.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. Induction of hairy roots without *Agrobacterium* transformation // Plant Protection News. 2016. T. 89. № 3. P. 187–188. In Russian].
5. Aguado-Santacruz G.A., Rascon-Cruz Q., Moreno-Gomez B., Guevara-Gonzalez R.G., Guevara-Olvera L., Jimenez-Bremont J.F., Arevalo-Gallegos S., Garcia-Moya E. Genetic transformation of blue grama grass with the *rolA* gene from *Agrobacterium rhizogenes*: regeneration of transgenic plants involves a “hairy embryo” stage // In Vitro Cell Dev Biol Plant. 2009. V. 45(6). P. 681–692. doi: 10.1007/s11627-009-9233-7
6. Avula B., Wang Y.H., Ali Z., Smillie T.J., Khan I.A. Chemical fingerprint analysis and quantitative determination of steroidal compounds from *Dioscorea villosa*, *Dioscorea* species and dietary supplements using UHPLC-ELSD // Biomed Chromatogr. 2014. V. 28. P. 281–294. doi: 10.1002/bmc.3019
7. Esam A.H. *In vitro* versus *in vivo*: A comparative study of *Solanum villosum* (Mill.) plant leaves // Int. J. Integrat. Biol. 2011. V. 11(3). P. 140–144.
8. Jacob A., Malpathak N. Green hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke - a new route to *in vitro* solasodine production // Curr. Sci. 2004. V. 87. P. 1442–1447.
9. Jeeshna M.V., Paulsamy S. Evaluation of certain flavonoids of medicinal importance in the wild and micropropagated plants of the endangered medicinal species, *Exacum bicolor* Roxb. // J. Appl. Pharm. Sci. 2011. V. 1(5). P. 99–102.
10. Kobayashi K., Ohnishi A., Sasaki D., Fujii S., Iwase A., Sugimoto K., Masuda T., Wada H. Shoot removal induces chloroplast development in roots via cytokinin signaling // Plant Physiol. 2017. V. 173(4). P. 2340–2355. doi: 10.1104/pp.16.01368
11. Lee S.H., Blackhall N.W., Power J.B., Cocking E.C., Tepfer D., Davey M.R. Genetic and morphological transformation of rice with the *rolA* gene from the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* // Plant Sci. 2001. V. 161. P. 917–925. doi: org/10.1016/S0168-9452(01)00488-5
12. Magnussen D., Clapham D., Gronroos R., von Arnold S. Induction of hairy and normal roots on *Picea abies*, *Pinus sylvestris* and *Pinus cortorta* by *Agrobacterium rhizogenes* // Scand. J. Forest Res. 1994. V. 9(1-4). P. 46–51. doi: org/10.1080/02827589409382811
13. McAfee B.J., White E.E., Pelcher L.E., Lapp M.S. Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes* // Plant Cell Tissue Organ Cult. 1993. V. 34(1). P. 53–62. doi: org/10.1007/BF00048463
14. Mihaljevic S., Stipkovic S., Jelaska S. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using

- agrobacteria // Plant Cell Rep. 1996. V. 15(8). P. 610–614. doi: org/10.1007/BF00232463
15. Mukherjee C., Sircar D., Chatterjee M., Das S., Mitra A. Combating photooxidative stress in green hairy roots of *Daucus carota* cultivated under light irradiation // J. Plant Physiol. 2014. V. 171(2). P. 179–187. doi: org/10.1016/j.jplph.2013.10.013
16. Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Paek K.Y. Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A // J. Integr. Plant Biol. 2008. V. 50(8). P. 975–981. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00680.x
17. Sharifi S., Sattari T.N., Zebarjadi A., Majd A., Ghasempour H. The influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and  $\beta$ -carboline alkaloids production in *Tribulus terrestris* L // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2014. V. 20(1). P. 69–80. doi: org/10.1007/s12298-013-0208-0.
18. Sparks C., Jones H. Biolistics transformation of wheat / In: Transgenic Wheat, Barley and Oats. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). (Eds. H. Jones, P. Shewry). Humana Press. USA (2009). P.71-92. doi: org/10.1007/978-1-59745-379-0\_4.
19. Taya M., Sato H., Kino-Oka M., Tone S. Characterization of pak-bung green hairy roots cultivated under light irradiation // J. Ferment. Bioeng. 1994. V. 78(1). P. 42–48. doi: org/10.1016/0922-338X(94)90176-7
20. Xu H., Zhou X., Lu J., Wang J., Wang X. Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* and production of regenerative plants in hairy root cultures in maize // 2006. Sci. China S. Life Sci. V. 49(4). P. 305–310. doi: org/10.1007/s11427-006-0305-1
21. Yasybaeva G.R., Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Baymiev A.H., Chemeris A.V. Biolistic-mediated plasmid-free transformation for induction of hairy roots in tobacco plants // Plant Root. 2017. V. 11. P. 33–39. doi: org/10.3117/plantroot.11.33
22. Yibrah H.S., Gronroos R., Lindroth A., Franzen H., Clapham D., von Arnold S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated induction of adventitious rooting from *Pinus contorta* hypocotyls and the effect of 5-azacytidine on transgene activity // Transgenic Res. 1996. V. 5(2). P. 75–85. doi: org/10.1007/BF01969425