



«КОСМАТЫЕ» КОРНИ РАСТЕНИЙ – ВАЖНЫЙ ИНСТРУМЕНТАРИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ И МОЩНАЯ ФИТОХИМБИОФАБРИКА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВЕННИКОВ

Кулуев Б.Р.^{*}, Вершинина З.Р.^{*}, Князев А.В., Чемерис Д.А.,
Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И.¹, Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра Российской академии наук, Россия, Уфа, chemeris@anrb.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов Саратовского научного центра Российской академии наук, Россия, Саратов

Резюме

В обзоре освещается история изучения феномена косматых корней и биоразнообразия используемых для их создания штаммов *Agrobacterium rhizogenes*. Кратко рассматриваются особенности взаимодействия *A. rhizogenes* с растениями и процесс образования косматых корней. Значительное внимание в данном обзоре уделено практическому использованию косматых корней в качестве продуцентов биологически активных веществ, в том числе в качестве продуцентов первичного сырья для дальнейшего химического синтеза. Косматые корни в последние годы получают все большее коммерческое применение, поэтому часть обзора посвящена также описанию специальных биореакторов для выращивания таких корней в промышленных масштабах и вопросов разработки методов долгосрочного сохранения таких культур. В то же время косматые корни остаются одним из важнейших модельных объектов в молекулярной биологии и физиологии растений, но их потенциал для фундаментальных исследований используется не в полной мере. Цитированная литература составила более 450 публикаций, охватывающих 115-ти летний период.

Ключевые слова: корень, «косматые» корни, культура косматых корней, *Agrobacterium rhizogenes*, генетическая трансформация, композитные растения, первичные метаболиты, вторичные метаболиты, биореактор

Сокращения: КК – косматые корни
ККК – культура косматых корней

Оглавление

	Стр.
Введение	71
Краткая давняя история изучения косматых корней	72
Краткая недавняя история изучения косматых корней	73
Ризогенные бактерии	74
Штаммы <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , используемые для получения косматых корней	76
Образование косматых корней	80
Косматые корни – продуценты различных веществ вторичного происхождения	82
Косматые корни – продуценты различных веществ первичного метаболизма	84
Способы повышения продукции целевых продуктов метаболизма косматыми корнями	85
Косматые корни как инструмент в руках биологов	87
<i>Композитные растения</i>	87
<i>Иные примеры применения косматых корней в биологических исследованиях</i>	89
Косматые корни как сырье для химика-синтетика	91
Масштабирование культуры косматых корней для производителей	92
Поддержание и сохранение статуса культуры косматых корней растений как продуцентов целевых продуктов метаболизма	95
Коммерческое применение культур косматых корней	96
Заключение	97
Использованная литература	98

* Два первых автора внесли равный вклад в написание данной статьи.

Введение

Корень представляет собой важный вегетативный орган, присущий почти всем высшим сосудистым растениям за исключением некоторых видов, ведущих паразитический образ жизни. В отличие от надземных органов растений, имеющих более или менее детерминированные форму и размеры, корень характеризуется свободной формой (в рамках стержневого или мочковатого типов) и практически неограниченным ростом в длину, в пределах «определяемых» как самим растением, в том числе его «гидравликой», задаваемой видовой принадлежностью, так и локально типом грунта и глубиной залегания влаги. Так, известен факт проникновения корня бобового растения прозописа сережкоцветного *Prosopis juliflora* или кустарника мескито на более чем 53-х метровую глубину [Phillips, 1963; Рейвн и др., 1990]. Обнаружено, что на 60 м и 68 м вглубь земли проникают соответственно корни обитателей африканских пустынь - верблюжьей акации *Acacia erioloba* также из семейства бобовых и дерева Шеферда *Boscia albitrunca* из семейства каперовых [Canadell et al., 1996]. И это только зафиксированные горизонты, поскольку вполне вероятно, что корни у этих или других растений проникают еще глубже. При этом подобные растения с «глубокоземной» корневой системой должны развивать мощное гидравлическое давление для подъема воды с таких глубин. И за счет чего она им становится доступна представляет отдельный научный, а возможно и практический интерес. Такие глубины корнями растений были достигнуты, в том числе, потому, что корень обладает положительным геотропизмом и должен постоянно расти по направлению к центру земного шара. Корень служит для закрепления растения в почве, обеспечивая поглощение и проведение воды с растворенными минеральными веществами к стеблю, листьям и прочим надземным органам. Другие типы корней выполняют иные функции, например, дыхательные и тогда геотропизм у части из них становится отрицательным. Для корней характерна способность к метаморфозу, известны, например, такие видоизменения корней, как корнеплоды, корневища, микоризы, ризобиальные клубеньки, актиноризные клубеньки, косматые корни (КК), индуцируемые почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes* и другие.

Целью данного обзора является исключительно рассмотрение вызванных инфекцией почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes* особых, косматых корней, продуцирующих различные метаболиты вторичного происхождения, служащих модельными объектами для отдельных исследований, и некоторых других связанных с

такими корнями вопросов. Несмотря на то, что при введении в культуру *in vitro* косматые корни часто теряют некоторые свои изначальные фенотипические признаки, они сохраняют основное свое свойство, а именно способность неограниченно расти в/на безгормональных питательных средах, что обуславливается экспрессией генов *rol*. Таким образом, введенные в культуру косматые корни генотипически чаще всего не отличаются от косматых корней *in vivo*. Отдельное внимание уделено масштабированию процесса роста косматых корней и их долговременному хранению.

В мировой литературе имеется около двух тысяч экспериментальных работ, посвященных косматым корням, среди которых присутствуют и работы отечественных авторов или выполненные с их участием [Хадеева и др., 1993; Babakov et al., 1995; Мантрова и др., 1999; Кузовкина и др., 2001; 2003; 2004; 2005; 2009; Kovacs et al., 2004; Banyai et al., 2006 и др.], а также большое количество обзорных статей [Терфер, 1983; Flores et al., 1987; Hamill et al., 1987; Canto-Canche, Loyola-Vargas, 1999; Shanks, Morgan, 1999; Giri, Narasu, 2000; Uozumi, 2004; Guillon et al., 2006; Georgiev et al., 2007; Srivastava, Srivastava, 2007; Pistelli et al., 2010; Ono, Tian, 2011; Cai et al., 2012; Makhzoum et al., 2013; Marchev et al., 2014; Matvieieva, 2015; Mehrotra et al., 2015; Tian, 2015 и др.], включая и труды российских ученых [Кузовкина, 1992; Носов, 2010; Кузовкина, Вдовитченко, 2011; 2012; Владимиров и др., 2015], подготовленные в том числе в соавторстве с зарубежными коллегами [Kuzovkina, Schneider, 2006]. Однако, часть из них написана относительно давно и не в полной мере охватывает все вопросы по косматым корням, которые мы почему и решились здесь затронуть.

Главную задачу данной статьи, не претендующей на исчерпывающую полноту, мы видим в том, чтобы дать возможность читателю составить всестороннее представление о косматых корнях, о методах их получения с использованием штаммов *A. rhizogenes* (преимущественно диких) и технологиях их использования и крупномасштабного выращивания. При этом выбору используемых питательных сред, лабораторному инструментарию, прочим техническим моментам внимание уделяться не будет. Также за рамками рассмотрения останется создание полноценных трансгенных растений через инфекцию *A. rhizogenes*, исторически даже опередившей подходы, осуществляемые с помощью другой родственной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*.

Прежде чем перейти к изложению основного материала стоит немного остановиться на русскоязычных терминах. Так, в отечественной

литературе можно встретить информацию о «hairу roots» как о «косматых» корнях, «волосатых» корнях, «волосяных» корнях, «бородатых» корнях. Предлагается также называть их «генетически трансформированные корни» [Кузовкина, Вдовитченко, 2012] или просто «трансформированные» [Носов, 2010]. В этой связи стоит заметить, что последние определения, возможно, правильное распространять только на часть таких корней, поскольку в подавляющем большинстве случаев hairу roots образуются под действием диких штаммов *A. rhizogenes*, и, несмотря на действительно имеющий место в этом случае перенос некоторой части генетического материала агробактерий, подобные процессы пусть и для ограниченного ряда видов, но вполне обыденно происходят и в природе, в том числе и без участия человека, тогда как под генетической трансформацией в научных исследованиях принято понимать некий искусственный процесс по внедрению конкретных генов или иных фрагментов ДНК в геном другого организма, что, впрочем, тоже проводится над корнями, но уже с помощью рекомбинантных штаммов *A. rhizogenes*, несущих специальный бинарный вектор со вставкой, чему в нашем обзоре будет уделено некоторое внимание. Однако получение таких трансформированных какими-либо дополнительными последовательностями ДНК косматых корней для увеличения продукции веществ вторичного или первичного происхождения пока производится заметно реже. Также мы не принимаем здесь во внимание работы по созданию полноценных трансгенных растений с помощью *A. rhizogenes*.

В русскоязычном издании лабораторного руководства под редакцией Дж.Драйпера и соавт. «Генетическая инженерия растений. Лабораторное руководство» [Дрейпер и др., 1991] в переводе Г.И.Эйснер и В.М.Андрианова такие корни названы «косматыми» и мы и здесь и впредь будем придерживаться именно этого варианта перевода понятия «hairу roots», считая, что такие возникшие в результате инфекции *A. rhizogenes* волосатые корни как бы «торчат» космами (что и имеет место на самом деле), хотя наиболее правильным переводом слова «hairу» на русский будет действительно «волосатый», что, впрочем, не очень благозвучно и используется потому довольно редко.

Краткая давняя история изучения косматых корней

Впервые словосочетание «hairу root» было использовано еще в 1900 г. при описании феномена в виде косматых корней у яблони [Stewart et al., 1900]. При этом было отмечено, что приблизительно

каждое пятисотое наблюдаемое этими авторами дерево яблони в плодпитомнике подвержено подобному разрастанию корней, но причина этого явления неизвестна. Хотя в литературе встречаются упоминания, что еще за полвека до этого в отдельных странах наблюдались называемые по-разному подобные заболевания у растений нескольких видов семейства розоцветных [Hedgcock, 1910].

В ноябре 1908 г. из косматых корней яблони удалось выделить культуры бактерий, способные заражать новые растения, что детально описано в масштабном 215-ти страничном труде американских авторов [Smith et al., 1911], сопровождаемом множеством высококачественных фотографий для документального подтверждения полученного экспериментального материала. В той работе описаны многочисленные эксперименты, в которых бактерии, выделенные из одного вида растений, успешно инфицировали другой и формировали у того аналогичные косматые корни. Однако первопричины видоизменения растительных организмов в виде возникновения под действием бактерий корончатых галлов у одних и косматых корней у других оставались неясными. В 1928 г. была опубликована статья в журнале Science, в которой говорилось, что бактерии, вызывающие косматые корни, все же отличаются от микроорганизмов, названных к тому времени *Bacterium tumefaciens*¹, ответственных за возникновение корончатых галлов [Riker et al., 1928]. Причем в этой статье авторы отметили, что пока остается невыясненным вопрос - вредны ли такие корни растению или же они приносят ему пользу? Забегая вперед и нарушая хронологию изложения событий, все же можно сказать, что результаты 25-ти летних наблюдений за этими яблонями, еще в 1930 г. зараженных болезнью косматых корней, были опубликованы в 1959 г. [Riker et al., 1959], где говорилось, что зараженные растения уступали здоровым в росте и толщине стволов. Однако еще через четверть века были выданы патенты США на способы получения косматых корней как средства улучшения питания растений за счет возникающей более мощной корневой системы [Strobel et al., 1984; Strobel, 1986].

Исследования данных бактерий А.Дж.Рикер с соавторами были продолжены, и в 1930 г. в одном номере журнала Journal of Agricultural Research были опубликованы сразу две их статьи, в которых было

¹ Другие названия этой бактерии того периода (первых десятилетий XX-го века) – *Pseudomonas tumefaciens*, *Phytomonas tumefaciens*, *Polymonas tumefaciens* [De Cleene, De Ley, 1981].

показано, что за развитие корончатых галлов и косматых корней ответственны разные бактерии, получившие названия *Phytomonas tumefaciens* и *P. rhizogenes* соответственно [Riker et al., 1930; Wright et al., 1930]. Хотя в исследованиях этих и других авторов были вовлечены разные растения из многих семейств, но наибольшее внимание уделялось в те годы косматым корням яблонь [Hildenbrand, 1934; Riker, Hildenbrand, 1934], главным образом потому, что данное заболевание в природе встречается наиболее часто у вида *Malus sylvestris* отчасти в силу более массового выращивания этого вида плодовых деревьев. В том же 1934 г. последовало физиологическое описание штаммов *P. tumefaciens*, *P. rhizogenes*, а также близкого им микроорганизма *Bacillus radiobacter* [Hendrickson et al., 1934; Sagen et al., 1934].

Необходимо заметить, что все описанные выше исследования с косматыми корнями велись на целых растениях и культурой косматых корней считаться не могут. В 20-х гг. прошлого столетия в США W.J.Robbins и соавторами была опубликована серия статей, посвященных попыткам культивирования *in vitro* обычных корневых кончиков растений в стерильных условиях [Robbins, 1922; Robbins, Maneval, 1923 и др.]. Независимо от них в Германии W.Kotte [1922] также сумел культивировать кончики корней гороха и кукурузы. При этом он являлся студентом G.Haberlandt, считающегося пионером в культивировании растительных тканей, впервые осуществившим такую попытку еще в 1902 г. [Gautheret, 2003]. Несколько позже в 1934 г. была опубликована ставшая пионерной эпохальная работа, в которой было продемонстрировано, что культура отсеченных корней томатов в стерильных условиях поддерживалась более года и выдержала 52 пассажира [White, 1934]. За это время исходный 10 мм кусочек корня увеличился так, что общая длина корней превысила 4 метра. Доказательство того, что, в том числе, и в корнях происходит синтез вторичных метаболитов, пришло из сообщения другого американского автора, в котором путем прививок надземной части табака на томат и наоборот было обнаружено, что синтез никотина осуществляется именно в корнях (табака) [Dawson, 1941]. Спустя четверть века были опубликованы статьи, в которых было показано, что в культуре отсеченных корней табака в ходе культивирования накопление никотина происходит в заметных количествах [Solt, 1957; 1957a]. После этого потребовалась еще больше четверти столетия, чтобы произошло объединение технологий выращивания культуры отсеченных корней с их инфицированием бактериями, вызывающими неограниченный рост косматых

корней, что в итоге вылилось в культуру косматых корней (ККК).

Краткая недавняя история изучения косматых корней

Изучение как самих косматых корней, так и вызывающих их появление микроорганизмов *A. rhizogenes* продолжалось и в 60-ые и 70-ые годы прошлого века. Так, в 1961 г. была опубликована статья, в которой было предложено использовать мясистые корни (точнее корнеплоды) ряда растений для оценки инфекционности выделяемых штаммов *A. rhizogenes* [Ark, Thompson, 1961], что получило дальнейшее развитие [Lippincott, Lippincott, 1969]. К сожалению, на основе стандартного теста с морковными дисками об уровне наработки вторичных метаболитов вывод сделать невозможно, хотя это часто даже более важно.

В 1971 г. последовала публикация, описывающая эксперименты по ускорению роста корней бесклеточными экстрактами *A. rhizogenes* [Hopkins, Durbin, 1971]. Причем даже использование ультразвука для разрушения клеток не влияло на проявление данного эффекта. При анализе этого экстракта в нем было обнаружено наличие индолилуксусной кислоты, на самом деле и оказывающей такое воздействие. В середине 70-х гг. A.R.Anderson провел серьезное исследование хозяйской специфичности различных штаммов ряда видов агробактерий, вылившееся для него в диссертацию на степень доктора философии [Anderson, 1977], где он проанализировал 176 штаммов, из которых 19 были отнесены к виду *A. rhizogenes*. Из них только 8 формировали косматые корни на дисках корнеплодов моркови. Позже полученные результаты в кратком виде были опубликованы в журнале *Phytopathology* [Anderson, Moore, 1979].

Первое сообщение о регенерации косматых корней табака в полноценное растение датировано 1977 г. [Ackermann, 1977]. Опубликованное на немецком языке оно осталось тогда почти незамеченным, хотя сама эта работа была проделана еще в 1973 г., о чем сообщается в одной обзорной статье [Tepfer, 1990]. Лишь почти десятилетие спустя аналогичные эксперименты были выполнены несколькими группами ученых из разных стран [Tepfer, Tempe, 1981; Spano et al., 1981; Chilton et al., 1982; Willmitzer et al., 1982], причем три последних коллектива не процитировали работу С. Ackermann. Этим статьям предшествовали и сопровождали работы, при выполнении которых пришло понимание, что за вирулентность штаммов *A. rhizogenes* отвечает особая плаزمиды [Moore et al., 1979; White, Nester, 1980; 1980a; White et al., 1982],

названная Ri (root-induced) [Tepfer, Temple, 1981] по аналогии с Ti-плазмидой (tumor-induced) *A. tumefaciens*, получившей такое обозначение ранее [Van Larebeke et al., 1974; Engler et al., 1975].

К началу 80-х гг. прошлого столетия было известно, что, помимо ряда видов растений из семейства розоцветных, подверженных в природных условиях заболеванию, проявляющемуся в виде косматых корней, еще 33 вида из разных семейств были инфицированы искусственно. В 1981 г. бельгийскими авторами была проделана работа по инфицированию считавшимся довольно вирулентным штаммом TR7 бактерии *A. rhizogenes* из международной коллекции фитопатогенных бактерий Калифорнийского университета в Дэвисе очень большого числа видов растений (192 вида), относящихся к 83 семействам [De Cleene, De Ley, 1981]. В итоге они сумели добавить 11 новых видов, инфицирующихся *A. rhizogenes*, из родов и семейств, входящих в группы *Asteridae* и *Rosidae*, показав также, что исследованные ими в рамках данной работы 16 видов однодольных, один вид голосеменных, а также три вида папоротников оказались устойчивыми к заражению. Опять несколько нарушая хронологию, можно заметить, что в одном из обзоров 1990 г. приведен список из более чем 150 видов двудольных растений, на которых получены косматые корни и соответственно подавленных инфекции [Tepfer, 1990], где есть виды, не инфицировавшиеся ранее [De Cleene, De Ley, 1981]. Также сообщим, что в настоящее время косматые корни получены на ряде злаков и хвойных [McAfee et al., 1993; Magnussen et al., 1994; Mihaljevic et al., 1996; Yibrah et al., 1995; Xu et al., 2006 и др.].

Впервые о возможности использовании ККК для наработки веществ вторичного происхождения было сообщено только летом 1984 г. на конференции в Германии, организаторы которой заявили, что имели целью соединить людей, занимающихся как первичными, так и вторичными метаболитами растений. По материалам данной конференции был издан сборник трудов «Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures», в котором появилось сообщение американских авторов Н.Е.Флорес и Р.Филнер [1985], посвященное продукции путресцина и его производных, а также никотину и прочим тропановым алкалоидам, нарабатываемых в косматых корнях белены *Hyoscyamus muticus*, а также некоторых других представителей семейства пасленовых из родов *Hyoscyamus*, *Brugmansia*, *Datura*, *Atropa*. Затем, в начале 1986 г. японские авторы [Kamada et al., 1986] подготовили статью, посвященную продукции алкалоидов косматыми

корнями белладонны, в конце которой в разделе *Note added in proof* указали, что после того как их статья была приготовлена им стало известно, что сходную работу выполнили в США как раз Н.Е.Флорес и Р.Филнер. Другими японскими авторами в то же время была выполнена работа, в которой они показали продукцию тропановых алкалоидов в косматых корнях другого представителя пасленовых – *Scopolia japonica* [Mano et al., 1986]. В том же 1986 г. английские авторы опубликовали статью, где описывалось использование косматых корней махорки *Nicotiana rustica* для продукции никотина, при этом им удалось даже масштабировать процесс, применив небольшой биореактор [Rhodes et al., 1986]. Очередной статьей, посвященной использованию ККК *Atropa belladonna* и *Calystegia sepium* для наработки вторичных метаболитов, стал труд французских авторов [Jung, Tepfer, 1987]. Причем в данной работе было отмечено, что косматые корни *Calystegia sepium* поддерживались ими с 1980 г. и за прошедшие 6 лет нарабаталось свыше 20 кг данных корней. В разделе *Note added in proof* этой статьи французские авторы отметили, что по завершению их работы им стало известно о выходе статьи японских авторов (уже упомянутой нами выше), в которой описано использование косматых корней белладонны с целью наработки алкалоидов [Kamada et al., 1986].

Таким образом, можно считать, что ККК как продуцентов вторичных метаболитов применяется с середины и даже с начала 1980-х гг. После выхода цитированных выше статей по продукции различных веществ многие ученые из разных стран обратили внимание на данный способ наработки вторичных метаболитов с помощью культуры косматых корней и, учитывая относительную простоту этой технологии, начался настоящий вал подобных работ, лишь малой части которых мы коснемся ниже.

Ризогенные бактерии

Как можно видеть из предыдущих глав, на то, чтобы понять какой организм ответственен за возникновение болезненного состояния корней у растений в виде их косматости ушло несколько десятилетий. В данной главе мы кратко рассмотрим генетические особенности данной бактерии и вклад ряда генов в процесс инфицирования растений и поддержания неограниченного роста корней, имеющих за редким исключением вид корней ювенильного растения.

Итак, вызывающей неопластический рост корней у различных растений является грамтрицательная палочковидная почвенная фитопатогенная бактерия, называемая *Agrobacterium rhizogenes*. В 30-ые гг. XX-го века эту бактерию

называли *Phytomonas rhizogenes*. Сейчас наиболее часто используется название *Agrobacterium rhizogenes*, хотя некоторое время назад проведенная с помощью молекулярно-биологических методов ревизия семейства *Rhizobiaceae*, к которому этот вид относится, позволила систематикам микроорганизмов посчитать, что данный вид более соответствует роду *Rhizobium* [Young et al., 2001], в связи с чем эти бактерии теперь также обозначают как *Rhizobium rhizogenes*. Однако в подавляющем большинстве статей биотехнологического плана до сих пор по старинке используется видовое название *Agrobacterium rhizogenes* и мы также будем здесь преимущественно его придерживаться. Тем более, что в литературе имеются возражения по поводу отнесения агробактерий к роду *Rhizobium* [Farrand et al., 2003]. Хотя с учетом того, что клубеньковые бактерии из группы ризобий, ранее все относившиеся к одному роду *Rhizobium*, но ныне распределенные по целому ряду родов - *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* и др., вызывают именно разрастание корней, а не опухолообразный рост надземной части, то возможно и бывшую *Agrobacterium rhizogenes* действительно стоит отнести к новому роду, добавив к «-rhizobium» какую-либо приставку, например «agro», тем самым подчеркнув связь со старым обозначением. Таким образом, наиболее оптимальным лично нам представляется назвать данную бактерию, сохранив видовое название, как *Agrorhizobium rhizogenes*. По-русски кратко будет агроризобия.

Здесь можно еще заметить, что методы молекулярной биологии безусловно вносят свой вклад в установление видовой принадлежности тех или иных штаммов. Так, например, в результате секвенирования гена 16S рРНК штаммы K84 *Agrobacterium radiobacter* и АКЕ10 *A. tumefaciens* реклассифицированы в вид *Rhizobium rhizogenes* [Velazquez et al., 2010] и подобные уточнения могут иметь место и впредь. Не так давно завершено полногеномное секвенирование, осуществленное с 400-кратным покрытием, одного из часто используемых для создания косматых корней штаммов этой бактерии позволило подготовить черновой вариант генома *Rhizobium rhizogenes* штамма ATCC15834 и определить, что его размер составляет чуть более 7 миллионов пар нуклеотидов при содержании GC-пар около 60% [Kajala et al., 2014]. Это событие, несомненно, окажет серьезное влияние на дальнейшее изучение этого вида агробактерий.

В ряде генетических коллекций микроорганизмов эти агробактерии теперь приводятся как *Rhizobium rhizogenes*. Так, в крупнейшем американском ресурсном центре American Type

Culture Collection (ATCC) хранится около десятка штаммов *Rhizobium rhizogenes*. В Германии в коллекции микроорганизмов Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures хранятся два штамма *Rhizobium rhizogenes*. Обе коллекции предоставляют возможность приобретения имеющихся у них штаммов *Rhizobium rhizogenes* по ценам от 75 ЕВРО до почти 300 долларов за штамм. В то же время в Англии в National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPFB), где хранится около двух десятков штаммов, для них используется остающееся классическим наименование *Agrobacterium rhizogenes*. В индийской коллекции Microbial Type Culture Collection and Gene Bank имеется два штамма, но оба этих штамма оригинальными не являются и получены из ATCC и DSMZ, где имеют свои обозначения. К сожалению, в каталогах крупных российских коллекций (Всероссийская коллекция микроорганизмов, Всероссийской коллекции непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения) штаммов этой почвенной бактерии ни под какими названиями не имеется.

Если стадии инфекции растительных тканей агробактерией *A. tumefaciens* изучены довольно неплохо и выяснена роль многих белков вирулентности (для обзора см., например [Constantino et al., 1994; Чумаков, 2013; Matthyse, 2014]), то механизм формирования косматых корней у растений при их инфицировании *A. rhizogenes* не до конца понятен. Весь процесс можно разделить на четыре стадии, при этом первые три можно считать общими с другой агробактерией *A. tumefaciens* при активации взаимодействия с растением, ходе этого процесса и движения части бактериальной ДНК в ядро клетки и поэтому они не вызывают особых вопросов, хотя между ними есть и серьезные различия. Так, в ряде штаммов *A. rhizogenes* отсутствует важный для переноса T-ДНК белок VirE2, а его функцию выполняет не имеющий с ним сколько-нибудь заметной гомологии белок GALLS [Ream, 2009]. Однако почему инфекция *A. rhizogenes* приводит именно к разрастанию корней остается во многом загадкой.

Одной из генетических особенностей Ri-плазмид является наличие в них нескольких *rol*-генов (от англ. root locus) – *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*. Недавно отечественными авторами был опубликован обзор, в котором детально рассмотрены каждый из этих генов и высказаны предположения относительно роли каждого из них в формировании косматых корней [Pavlova et al., 2014]. Ранее другими отечественными учеными *rol*-гены *A. rhizogenes* рассматривались на предмет их влияния на синтез вторичных метаболитов у растений [Bulgakov, 2008; Shkryl et al., 2008; Bulgakov et al.,

2011]. Ими было выдвинуто предположение, что некоторые из *rol*-генов могут супрессировать иммунный ответ, тем самым позволяя этой фитопатогенной бактерии заражать инфицированное растение [Shkryl et al., 2010; Bulgakov et al., 2013].

Штаммы *Agrobacterium rhizogenes*, используемые для получения косматых корней

В предыдущей главе мы уже упомянули о том, что под различными инвентарными номерами в коллекциях могут скрываться одинаковые штаммы агробактерий. Конечно же, эта проблема не ограничивается семейством *Rhizobiaceae*.

В работах по формированию косматых корней у различных растений в силу ряда причин, среди которых одной из главных является высокая вирулентность неких штаммов, чаще других используется определенный их круг. Другой причиной применения в опытах разных авторов конкретных штаммов является нахождение таковых в локальных институтских коллекциях.

Разноопиновые штаммы *A. rhizogenes*

Агропин	Маннопин	Кукумопин	Микимопин
ATCC15834	LMG63	K599*	MAFF30 1724
A4	LMG150	NCPPB2588	MAFF02-10266
LBA9402	NCIB8196	NCPPB2659	A13**
HRI	TR7	NCPPB2657	A5
NCPPB1855	TR101		A6
R1601	TR105		

* K599 и NCPPB2659 являются одним и тем же штаммом, причем исходное обозначение этого штамма K599 встречается в статьях значительно чаще, однако в немалом числе работ для обозначения используемого штамма вместо K599 указывается его коллекционный номер NCPPB2659.

** то же самое надо сказать и про агробактерии A13 и MAFF02-10266, акцентируя внимание лишь на том, что, как правило, в работах японских авторов при обозначении данного штамма указывается его инвентарный номер коллекции японского министерства MAFF.

Все штаммы *A. rhizogenes* по типу присутствующих в них Ri-плазмид, кодирующих соответствующие опины, можно подразделить на четыре группы: агропиновые, маннопиновые, кукумопиновые и микимопиновые. В таблице мы привели ряд «популярных» и не очень штаммов, для которых известны типы синтезируемых ими опинов. Недавно Л.А.Лутовой с соавторами опубликована обзорная статья, в которой довольно детально в сравнительном плане рассмотрены многие вопросы опинового метаболизма как у *A. tumefaciens*, так и для *A. rhizogenes* [Владимиров и др., 2015].

Вирулентность штаммов *A. rhizogenes* принято оценивать с помощью корневых дисков моркови, дающих достаточно быстрый и точный ответ в виде образования в зоне перидикла с разной интенсивностью косматых корней при размещении таких дисков толщиной 5 мм на питательном агаре [Ark, Thompson, 1961; Lippincott, Lippincott, 1969; Moore et al., 1979; Ryder et al., 1985]. Причем ряд штаммов проявляют активность в зависимости от того какой стороной к агару (апикальной или базальной) помещены диски морковного корня. Несмотря на, что такой тест дает лишь первичную информацию о заражении и скорости роста косматых корней, он также позволяет разделить штаммы *A. rhizogenes* на так называемые полярные и неполярные. Агропиновые штаммы относятся к неполярным и считается, что, в целом, они более вирулентны и способны заражать большее число видов, однако есть виды растений, которые легче поддаются воздействию, например, кукумопиновых или каких других типов агробактерий.

К сожалению, не для всех используемых разными авторами штаммов *A. rhizogenes* в статьях приводится информация о типе синтезируемых этими бактериями опинов. При этом в ряде случаев приводятся ссылки на предыдущие собственные работы или на статьи других авторов, которые по логике должны были бы содержать о них больше сведений, но на проверку чаще всего оказывается, что это не так. Во многих статьях авторы, указывая происхождение штаммов, благодарят своих коллег, приславших им их, однако те часто шлют не найденные ими самими штаммы, а те, что оказались у них под рукой. Все это создает довольно серьезную путаницу, в том числе при попытках сравнительной оценки эффективности инфицирования растений теми или иными использованными в каких-либо статьях штаммами.

Тем не менее, в дополнение к таблице 1 мы все же решили привести информацию о применяемых для генерации косматых корней штаммах *A. rhizogenes*, не ссылаясь на конкретные работы, поскольку и так довольно приличный список использованной литературы станет просто неприличным. Ранее до некоторой степени сходный анализ провел J.R.Porter [1991] однако им были подсчитаны попытки (как успешные, так и неуспешные, причем последние надо понимать, что считались только опубликованные) образования косматых корней для разных видов растений, в том числе в рамках одной работы. Поэтому, например, со штаммом TR7 осуществлено по его данным 216 попыток образования КК у разных растений, но из них 192 попытки (192 вида растений) были произведены в одной работе, в которой других штаммов *A. rhizogenes* не использовалось [De Cleene,

De Ley, 1981]. Мы же решили провести некий анализ «популярности» / распространенности в мире штаммов *A. rhizogenes* для получения косматых корней, ознакомившись с 424 экспериментальными работами, охватывающими период с середины 1970-х годов по настоящее время, что позволяет говорить о достаточности нашей выборки, которая носила довольно случайный характер, поскольку в ней представлены публикации разных авторов из разных стран, опубликованных во множестве журналов, принадлежащих большому числу издательств.

Значительная часть анализированных статей опубликована в «растительных» журналах,

нереферируемых в PubMed. Так, если в PubMed задать поиск по ключевым словам с булевыми операторами «hairy AND root AND rhizogenes» сервер «возвращает» список из 465 работ, из которых 18 приходится на обзорные статьи. Аналогичные поисковые запросы в Web of Science и Scopus по состоянию также на начало августа 2015 г. выдают 748 и 1129 статей соответственно. Так что 424 экспериментальных статьи в целом отражают общемировое состояние дел в области получения косматых корней. Но из этих 424 публикаций процитированы в этой нашей статье только 196 работ.

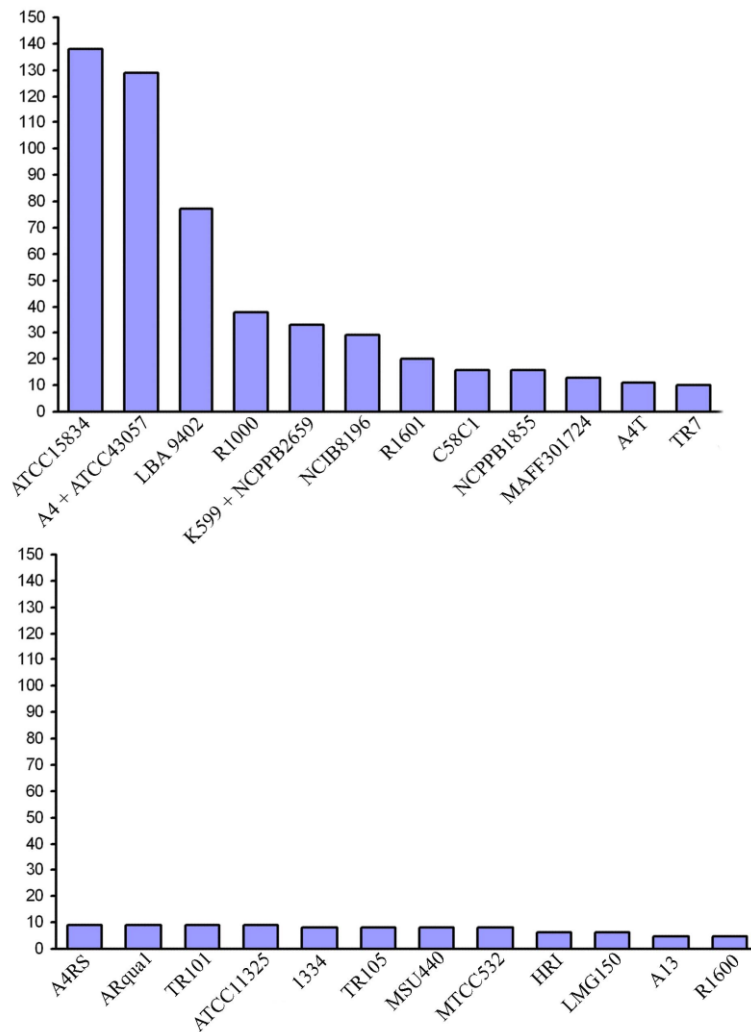


Рис. 1. Частота использования штаммов *A. rhizogenes* в мире, подсчитанная по 424 проанализированным экспериментальным статьям, опубликованных разными авторами за сорокалетний период.

Поскольку в значительном числе работ авторы использовали более одного штамма, то общее их число заметно превышает число проанализированных работ. «Частота» использования

штаммов представлена на диаграмме, из которой видно, что в подавляющем большинстве случаев применялись штаммы ATCC15834, A4 (другое более редкое написание - A₄, также в некоторых статьях его

иногда указывают как ATCC43057). Так, штамм ATCC15834 использовался практически в каждой третьей работе. Чуть реже упоминается штамм A4. Приблизительно в каждой шестой статье сообщается об использовании штамма LBA 9402. Еще три штамма R1000, K599 и NCIB8196 применялись немногим чаще остальных. Помимо штаммов, упомянутых на рис. 1, приведем здесь наименования и других штаммов *A. rhizogenes*, используемых для образования косматых корней. Так, при выполнении 12 работ, были использованы агробактерии AR10, DC-AR2 и TR104/ATCC13333 (по 4 статьи на штамм). Также в 12 статьях упоминаются штаммы AR12, A4RSII, R1200 и TR102/ATCC13332 (по три на штамм). Штаммы A5, A7, TR107, LBA920, LBA9435, AR25, A4PC, LMG63, AM8703, A2/83, A20/83, AR1193, NIAES1724, MTCC2364, использовались в двух работах каждый. И наконец, очень большое число штаммов в проанализированных нами работах применялось авторами лишь единожды. Это штаммы SV2, SV4, R1500, NCPPB2588, NCPPB2657, A1, A2, A3, A8, A28, MAFF02-10266, LBA301, LBA509, LBA510, LBA9365, LBA9340, LBA9402/12, ATCC31798, R1236, NRRL B193, D6, GMI9534, YMB072001, 163C, CFBP2519, TISTR1450, MCIM5140, 03-01725, LMG63, MSU-1, ACCC10060, 9360, KCTC2703, KCTC2744, MT232, 0210266, AR1193, VIGG15834, A41027, YMB072001, A4R, K45, K46, K47, K48. Всего нам удалось насчитать 90 штаммов, использованных разными авторами для получения косматых корней.

Конечно, отдельный или даже еще больший интерес представляют сведения об использовании конкретных штаммов в разные годы, но в рамках данной статьи мы такой анализ проводить не стали.

При этом используемые в статьях отдельными авторами обозначения штаммов *A. rhizogenes* могут быть как первоначальными названиями штаммов, так и присвоенными им разными коллекциями инвентарными номерами, что затрудняют сопоставление применяемых разными авторами агробактерий. Также далеко не всегда номера сопровождаются буквенными индексами, которые могли бы служить для лучшего понимания, с каким штаммом работали те или иные экспериментаторы. При этом мы отдаем себе отчет, что часть из упомянутых выше штаммов могут быть одинаковыми, но получившими в силу различных причин новые наименования. Также хотим заметить, что одинаковые буквенные индексы далеко не всегда свидетельствуют о родстве и общности происхождения штаммов. Так, например, штамм A4 выделил P.Ark в США, а штаммы A5 и A13 выделены в Японии профессором M.Mii.

Тем не менее, общее представление о биоразнообразии используемых при создании косматых корней штаммов *A. rhizogenes* у читателя, надеемся, составилось. При этом не берем на себя ответственность сказать, что перечислили буквально все используемые кем-либо для получения косматых корней штаммы *A. rhizogenes*. Для одинаковых штаммов, «родословную» которых удалось восстановить, их тождество мы указали.

Отдельный интерес представляют дериваты различных штаммов, в некоторых статьях не расшифрованные, что мы тоже, как смогли, восстановили. Штаммы A4T и LBA1334 представляют собой дериваты штамма C58 (A136), в которых геномная ДНК принадлежит *A. tumefaciens*, а Ri-плазмиды pRiA4b и pRi1855 происходят соответственно от штаммов *A. rhizogenes* A4 и LBA9402. Штамм R1000 *A. rhizogenes* в свою очередь является производным штамма A4T. Штамм R1500, несущий ген неомидинфосфотрансферазы образован от штамма R1000. Также дериватом штамма R1000 является штамм ARqua1, несущий ген устойчивости к стрептомицину. Штаммы 4AR и 4RS являются производными дикого штамма A4, в который привнесены гены устойчивости в первый только к рифампицину и во второй к рифампицину и спектиномицину. A4-R5 представляет собой бесплазмидный штамм, используемый в качестве отрицательного контроля. Использованный в одной работе штамм VIGG15834 представляет собой неохарактеризованный дериват штамма ATCC15834, что отмечают сами авторы. Сходное происхождение имеет штамм MT232, который в виде отдельного клона выделен из штамма TR105, и теперь внесен в коллекцию ATCC под номером 39207.

В интернет-ресурсе <http://www.straininfo.net> содержится информация о значительном количестве штаммов *A. rhizogenes*, для части которых приведена история (их родословная).

Целый ряд работ посвящен исследованию степени вирулентности разных штаммов при индукции роста косматых корней у различных растений [Vanhala et al., 1995; Giri et al., 2001; Ionkova, Fuss, 2009]. Три штамма (15834, A4 и K599) были испытаны на предмет их эффективности для образования косматых корней у 14 видов винограда [Jittayasothorn et al., 2011]. Полученные результаты свидетельствовали, что два первых штамма оказались одинаково эффективными, тогда как штамм K599 показал худшие результаты. Корейские авторы при генерации косматых корней у одного из видов марен *Rubia akane* использовали несколько штаммов *A. rhizogenes* – 13333, 15834, R1000, R1200, R1601, из которых последний показал наилучшие результаты по вирулентности и по продуктивности роста таких

корней [Lee et al., 2010]. При индукции косматых корней у считающегося трудным для трансформации мака опиумного было использовано два штамма *A. rhizogenes* – 15834 и LBA 9402 [Le Flem-Bonhomme et al., 2004]. Спустя 5 недель штамм LBA 9402 в 80% случаев дал косматые корни. Ранее канадские авторы исследовали 5 штаммов *A. rhizogenes* – 13333, 15834, C58C1, R1000 и R1200 на предмет их эффективности генерации косматых корней у того же опиумного мака и у Эшшольции калифорнийской, называемой также калифорнийским маком [Park, Facchini, 2000]. Наиболее эффективным оказался штамм R1000. Пять различных штаммов *A. rhizogenes* (31978, AR12, 43057, A4² и A13) было испытано для получения косматых корней у паслена сосочкового [Ooi et al., 2013]. Штаммы AR12 и A13 показали очень быстрое в течение всего 6 дней образование у данного вида растений косматых корней, тогда как штамм 31978 обеспечил самое заметное увеличение биомассы корней. В работе иранских авторов штамм A13 вообще не образовал косматых корней на валериане, тогда как остальные использованные штаммы A4, 11325 и 15834 проявили различную эффективность корнеобразования на разных средах, где наименее активным оказался 11325 [Pakdin et al., 2013].

При получении ККК у полыни однолетней с помощью целого ряда штаммов *A. rhizogenes* – A4, 15834, K599, LBA9402, 9365, 9340 оказалось, что наибольший выход такого вторичного метаболита как артемизинин наблюдался в культуре косматых корней, полученных с участием штамма LBA 9365 [Giri et al., 2001]. В одной из работ получение косматых корней у двух видов белены осуществлялось с помощью штаммов A4 и LBA 9402 [Zehra et al., 1999]. Первый штамм обеспечил более

чем трехкратное превышение наработки атропина по сравнению со штаммом A4.

Приведенная выше информация наглядно свидетельствует, что на одних растениях наименьшую эффективность проявляют одни штаммы, при том, что они же могут быть крайне агрессивными на других видах. Таким образом, для успешного формирования КК на любых видах растений экспериментатору желательно иметь в своем распоряжении множество штаммов *A. rhizogenes*, к тому же отличающихся опиновых типов. При выборе штамма для инициации роста косматых корней у тех растений, что еще не были вовлечены в подобные эксперименты до некоторой степени можно ориентироваться на обзорную статью американского автора [Porter, 1991], который обобщил как собственные результаты, так и данные многих экспериментаторов, что позволило ему выстроить из диких штаммов *A. rhizogenes* некий ряд по эффективности образования косматых корней у 463 видов растений, который считаем возможным здесь привести, сохранив авторское написание штаммов: K47 = K599 = HRI > TR105 > ATCC15834 > A4³ > NCPPB1855 > NCPPB2655 > TR101 > NCPPB8196 > 232 > ATCC11325 > ATCC43057 > TR7 > TR107 = ATCC13332 = ATCC13333. Аналогичный ряд выстроен им и для генетически измененных штаммов: A4/ARCx > C58C1(pRiA4) > C58C1(pRi15834) > C58C1(pRiTR105) > BL3 >> C58C1(pRi8196). Менее масштабные эксперименты по получению косматых корней дурмана, в которых анализировалась эффективность трансформации различными штаммами *A. rhizogenes*, провели другие авторы [Maldonado-Mendoza et al., 1993], которые также смогли ранжировать штаммы следующим образом - TR 105 > ATCC15834 > A4 > 1855 > A41027 > ATCC13333 > AR-10.

² На первый взгляд авторы в цитируемой работе использовали один и тот же штамм под разными обозначениями, поскольку штамм 43057 не что иное как A4. Но чтобы разобраться так или это на самом деле нам пришлось провести некое расследование. Так, при внимательном прочтении этой статьи [Ooi et al., 2013] можно увидеть, что штаммы A4 и A13 авторы получили из Японии от проф. М.Мii из Chiba University, которым еще в 1990 г. с коллегами была опубликована статья, где они сообщили об обнаружении новых штаммов *A. rhizogenes*, выделенных из косматых корней арбуза. К сожалению, статья на японском языке и недоступна в полнотекстовой версии, но в англоязычном абстракте упоминаются только два штамма – A5 и A13. Из этого можно сделать вывод, что скорее всего малазийские авторы имели дело со штаммами A5 и A13, но, ошибочно указали первый как A4, видимо отчасти потому, что настоящий A4 очень часто используется.

³ Здесь также упоминается штамм A4 и его инвентарный номер, показавшие к тому же серьезные отличия по эффективности образования косматых корней. Но в этом случае J.R.Porter [1991] приводил не только собственные результаты, а привлекал данные и других авторов, указывая те наименования штаммов, что были в оригинальных статьях. А различия в эффективности можно легко объяснить, что этот штамм в двух его ипостасях использовался на разных культурах, а как можно видеть даже из краткого анализа ряда работ, некоторые штаммы вполне эффективны на одних видах растений и совсем могут не приводить к образованию косматых корней на других. Так что в таком внутриштаммовом различии в статье J.R.Porter нет ничего удивительного.

Образование косматых корней

Искусственное индуцирование образования косматых корней у растений является технически относительно не сложным. При этом данный этап является ключевым для формирования затем самой ККК. Однако не все растения легко заражаются *A. rhizogenes* и есть так называемые «трудные» виды, для которых необходимо прибегать к определенным ухищрениям, в том числе, используя более вирулентные штаммы. Поэтому, как уже говорилось выше, общей рекомендацией может стать совет - для впервые трансформируемых видов растений, по которым еще нет информации по успешно использованным штаммам, пробовать различные штаммы *A. rhizogenes*.

В природных условиях почвенные бактерии *A. rhizogenes* заражают здоровые растения, проникая через повреждения корней, образованные личинками майских жуков, проволочниками, другими насекомыми, а также из-за нарушенной целостности корней человеком при агротехнических процедурах. В лабораторных условиях необходимо так или иначе имитировать природные процессы, позволяя агробактериям проникать внутрь корней. Все используемые подходы для получения косматых корней можно подразделить на проводящиеся в системах *in vivo* и *in vitro*. В системе *in vivo* в условиях относительной стерильности проводится трансформация семян, цельных растений или почти цельных, растущих на подходящем субстрате. В системе *in vitro* в качестве заражаемого материала служат различные части растений, помещаемые, например, на чашки Петри в полностью стерильных условиях.

Самым простым способом образования косматых корней у растений является проращивание семян, предобработанных подходящим штаммом *A. rhizogenes*, подобно тому, как это описано [Strobel et al., 1984] при получении косматых корней у гороха, семена которого перед тем как проращивать обрабатывали измельченным торфом, содержащим агробактериальные клетки в нужной концентрации, заменяющие в этом случае клетки ризобий, обычно используемые для инокуляции для образования азотфиксирующих клубеньков.

Также довольно простым способом является обработка надрезанных скальпелем или проколотых иглой растительных эксплантов с суспензией агробактерий [van de Velde et al., 2003]. В одной из работ [Marchev et al., 2011] в среду для сокультивирования в разных вариантах была добавлена ионообменная смола амберлит, которая сорбировала выделяющиеся из мест поранения фенольные соединения и флавоноиды, выполняющие в норме защитную функцию, в том числе способствуя

омертвлению поврежденной ткани, сдерживая тем самым развитие косматых корней, а так как эти вещества фактически исключались из среды с помощью амберлита, то эффективность агробактериального заражения увеличилась.

Другим часто используемым способом образования косматых корней служит укол тонкой иглой, на которую нанесена бактериальная «паста» или шприц, на который насажена данная игла, содержит суспензию агробактерий, часть которой необходимо ввести внутрь растительной ткани. В литературе имеются весьма подробно описанные протоколы действий экспериментатора при шприцевой инъекции [Kereszt et al., 2007; Estrada-Navarrete et al., 2007], поэтому ограничимся здесь лишь краткими комментариями. Рекомендуемое место инъекции – подсемядольное колено или гипокотиль в непосредственной близости от семядолей, поскольку считается, что при большем удалении от них эффективность заражения снижается. Важно убедиться, что игла достигла центральной части гипокотыля. В отечественной литературе также имеются детальные описания действий при заражении гипокотилей, самих семядолей или первых листочков с выраженным жилкованием с помощью продающегося в аптеках стерильного инсулинового шприца [Кузовкина, Вдовитченко, 2012]. Для появления косматых корней у сосны *Pinus contorta* шведскими авторами в место разреза гипокотыля помещался кусочек питательного агара с бактериальным газоном, видимо для более продолжительного поддержания культуры *A. rhizogenes* в жизнеспособном состоянии [Yibrah et al., 1996].

Однако могут трансформироваться и другие ткани растений. Так, для одного из видов одуванчиков *Taraxacum platycarpum* показано, что при использовании в качестве эксплантов кусочков корней эффективность образования у него косматых корней превысила 70% по сравнению с эксплантами в виде стеблей (около 30%) и семядолей (10-20%) [Lee et al., 2004]. При попытке вызвать рост косматых корней у лекарственного растения *Andrographis paniculata* в качестве эксплантов брались листья и апикальная меристема, показавшая лучшие результаты [Mahobia, Jha, 2015]. Другой особенностью данной работы было то, что они использовали не обычное длительное сокультивирование растительных эксплантов и бактериальных клеток в относительно больших объемах среды, а применяли или краткое (на 2 мин) погружение тканей в суспензию бактерий или помещали каплю такой суспензии на место укола или надреза жилки листа, например. Множественные и при этом более мелкие поранения можно нанести с

помощью игольчатых кристаллов карбида кремния, что нашло применение и с *A. rhizogenes* [Kuluev et al., 2016].

Известным индуктором генов вирулентности у *A. rhizogenes* служит ацетосирингон, заметно повышающий эффективность заражения у одних растений и принципиально обеспечивающий появление косматых корней у других, являющихся «трудными» объектами. Обнаружено, что другим индуктором вирулентности может служить кониферилловый спирт [4-(3-гидроокси-1-пропенил)-2-метоксифенол], являющийся одним из предшественников при биосинтезе лигнина [Gafni, Levy, 2005]. Оказалось, что и температура может сильно влиять на эффективность образования косматых корней. Так, например, при попытках заражения древесного растения жарких тропиков - параспонии при оптимуме ее роста при 28°C эффективность трансформации составила всего 3,6%, тогда как при 21°C она достигла 70,3% [Cao et al., 2012].

С целью повышения эффективности образования косматых корней было предложено использовать кратковременные воздействия ультразвуком, нарушающие целостность растительной ткани, образуя «ранки», куда проникали бактерии. Впервые этот метод, названный SAAT (Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation), был разработан для повышения эффективности трансформации нескольких видов как двудольных, так и однодольных растений с помощью *A. tumefaciens* [Trick, Finer, 1997]. Спустя почти десятилетие этот способ был перенесен и на *A. rhizogenes* для образования косматых корней у табака [Kumar et al., 2006]. В этой работе было опробовано целое сочетание факторов, влияющих на эффективность проникновения агробактерий в ткань корней, в виде воздействия ультразвуком, ацетосирингоном, целлюлазой, пектиназой, хлористым кальцием в различных комбинациях. При этом обработка ультразвуком во всех комбинациях обеспечивала увеличенную эффективность трансформации. Позже были описаны успешные случаи применения ультразвуковой обработки для трансформации с помощью *A. rhizogenes* эксплантов коровяка жёлто-фиолетового, свеклы [Georgiev et al., 2011; Klimek-Chodacka, Baranski, 2014].

Недавно австралийские авторы предложили свой способ получения косматых корней [Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2014]. Они использовали (по их выражению) комбинацию двух подходов в виде *semi-in vitro* и *in vivo* процедур. Главной особенностью стало то, что их полу-*in vitro* вариант заключался в том, что после шприцевой инъекции агробактерий растение помещали в

пробирки типа «эппендорф» с отрезанным дном, которые, в свою очередь, по несколько штук размещали в пробирках большего размера со стерильным песком, смоченным питательным раствором. Собственно пробирки с отрезанным дном служили в качестве подставок-фиксаторов трансформированных растений. В результате таких манипуляций им удалось получить 88%-ную и даже 100%-ную эффективность образования косматых корней у растений сои *Glycine max* и *G. canescens* соответственно. Схожий с этим методом способ образования косматых корней предложен уже достаточно давно и в нем проростки с удаленной корневой частью помещались в пропитанные суспензией агробактерий специальные кубики из минеральной ваты размером около 1 см³ [Collier et al., 2005; Taylor et al., 2006]. После суточной инкубации растение оставляли без влаги, вызывая некоторую потерю тургора, после чего им вновь «давали» воду, дожидаясь появления через разные отрезки времени в зависимости от вида трансформируемых растений косматых корней.

Установление природы корней на предмет их возникновения именно в результате инфицирования (*A. rhizogenes*) может быть произведено сначала визуально, поскольку такие корни имеют характерный тип роста. Для подтверждения косматости корней необходимо проводить ПЦР с праймерами к *rol*-генам [Christey, Braun, 2005]. При этом для убеждения в отсутствии загрязняющих агробактерий (которые могут привести к ложнопозитивному результату при ПЦР⁴) необходимо в качестве контроля проводить амплификацию *vir*-генов, которые не встраиваются в ДНК растений. Однако в случае наработки ампликона с *vir*-генов этот результат еще не будет свидетельствовать о неудачной попытке получения косматых корней. В литературе предложены универсальные праймеры, рассчитанные на обнаружение штаммов агробактерий [Haas et al., 1995]. Другим способом для подтверждения трансформированной природы корней может служить анализ опинов высоковольтным гель-электрофорезом [Van de Velde et al., 2003]. Однако проще и быстрее различить трансформированные (косматые) корни от обычных можно с помощью разработанного австралийскими учеными специального бинарного вектора pHairyRed, который позволяет при соответствующей длине волны детектировать свечение красного флуоресцентного белка визуально *in planta* [Lin et al., 2011]. Данный вектор имеет также полилинкерный участок, в

⁴ Проблемы ложно-позитивной ПЦР, а также ложно-негативной ПЦР и как с ними бороться детально рассмотрены нами ранее [Чемерис и др., 2012; 2012a].

который дополнительно могут быть клонированы прочие целевые гены для агробактериальной трансформации растений.

Косматые корни – продуценты различных веществ вторичного происхождения

Считается, что в царстве растений синтезируется свыше 200 тысяч различных веществ вторичного происхождения [Hartman, 2007], относящихся к разным классам химических соединений – алкалоидам, терпеноидам, фенолам, гликозидам и др. Многие из этих веществ синтезируются и накапливаются именно в корнях. В литературе имеется огромное количество публикаций, посвященных этим соединениям растений, включая рассмотрение эволюционных аспектов метаболических путей синтеза веществ вторичного происхождения. Как и в случае обращения первичных метаболитов, имеющих единый принцип их синтеза, для вторичных также существует много общих метаболических путей, в том числе у организмов, находящихся на разных ступенях эволюционной лестницы, поскольку эти химические реакции, катализируемые ферментами, возникли в глубокой древности.

Среди вторичных метаболитов растений немало продуцентов препаратов фармакологического значения. Неудивительно, что среди первых культур косматых корней были именно таковые. Однако еще до появления технологии косматых корней такие соединения, помимо того, что добывались из природного растительного сырья, нарабатывались и с помощью прочих культур тканей соответствующих растений, включая суспензионную. Но поскольку анализ этих подходов не входит в задачи данной статьи, касаться их мы практически не будем.

Рассмотрению различных вопросов продукции косматыми корнями вторичных метаболитов посвящено немало обзорных статей [Toivonen, 1993; Canto-Canche, Loyola-Vargas, 1999; Georgiev et al., 2007; Pistelli et al., 2010; Sheludko, Gerasymenko, 2013; Tian, 2015 и др.]. Экспериментальных же работ – более тысячи и делать их детальный обзор здесь считаем излишним, поскольку, еще раз повторим, основная задача данной статьи – дать общее представление о косматых корнях растений и их различном использовании. Но чтобы показать практически безграничные возможности использования ККК для наработки разнообразных вторичных метаболитов приведем несколько примеров как одно и то же соединение может быть получено из косматых корней разных растений и наоборот укажем случаи использования косматых корней одного вида растений для продукции разных метаболитов., а также разную эффективность

наработки одного и того же вещества из ККК растений одного или близких видов, полученных разными авторами с помощью различных штаммов *A. rhizogenes*. Упомянем также и некоторые другие (по нашему выбору, в том числе представляющих для нас особый интерес, а также немногочисленные работы отечественных авторов и авторов из ближнего зарубежья) работы по использованию косматых корней для наработки вторичных метаболитов.

К находящим широкое применение вторичным растительным метаболитам можно отнести розмариновую кислоту [Bulgakov et al., 2012; Petersen, 2013; Khojasteh et al., 2015]. Считается, что она обладает антивирусной, антибактериальной, антиоксидантной, противовоспалительной и противоаллергической активностями. Впервые эта кислота была выделена из розмарина *Rosmarinus officinalis* в 1958 г., получив соответствующее название [Scarpati, Oriente, 1958, цит. по Petersen, 2013]. Розмариновая кислота присутствует во многих растениях, но для ее выделения обычно используются *in vitro* культуры растительных тканей, поскольку содержание данной кислоты в них значительно выше, чем в природных растениях [Park et al., 2008]. Соблюдая хронологию, приведем несколько примеров наработки розмариновой кислоты в косматых корнях разных видов растений преимущественно семейства губоцветных или яснотковых. Японскими авторами [Tada et al., 1996] с использованием разных штаммов *A. rhizogenes* были созданы ККК базилика душистого с максимальной продукцией розмариновой кислоты, достигшей 14,1% от сухого веса. Спустя два года они создали культуру косматых корней Иссопа лекарственного, где выход розмариновой кислоты составил 8% от сухого веса [Murakami et al., 1998]. Польские авторы также использовали Иссоп лекарственный для получения ККК, в которой продемонстрировали наработку розмариновой кислоты в количестве 6% по сухому весу [Kochan et al., 1999]. Другие польские авторы для наработки розмариновой кислоты косматыми корнями использовали другой вид губоцветных – Шалфей лекарственный, показав, что выход целевого продукта по сравнению с обычными корнями увеличился более чем в два раза [Grzegorzczuk et al., 2006]. Для наработки розмариновой кислоты в культуре косматых корней авторами из Гонконга был взят Шалфей краснокорневищный [Yan et al., 2006]. Корейскими авторами была использована Корейская мята для продукции в ККК розмариновой кислоты [Lee et al., 2007]. Они добились выхода этой кислоты по сухому весу в количестве 14,1 г на литр культуры. Другое растение - Колеус Блюме *Solenostemon scutellarioides* взяли хорватские ученые [Bauer et al., 2009], показав значительно лучшее накопление

розмариновой кислоты в КК по сравнению с обычными. Культура косматых корней Кошачьей мяты или Котовника кошачьего также с успехом использовалась для продукции розмариновой кислоты [Lee et al., 2010]. Разными авторами использовались ККК двух видов змееголовников *Dracocephalum kotschyi* и *D. moldavica* из семейства губоцветных или яснотковых [Fattahi et al., 2013; Weremczuk-Jezyna et al., 2013]. Относительно недавно было показано, что содержание розмариновой кислоты в ККК многоколосника фенхельного в 4 раза выше, чем в нетрансформированных корнях [Nourozi et al., 2014].

Приведенная выше подборка видов растений, для которых были созданы ККК для продукции розмариновой кислоты, наглядно показывает, что такой способ может быть гораздо перспективнее, чем экстракция этой кислоты из самих растений. Аналогичная ситуация имеет место и со многими другими вторичными метаболитами растений.

Такой сесквитерпен растительного происхождения как артемизинин еще в 1994 г. был рекомендован Всемирной организацией здравоохранения в качестве высокоэффективного препарата для борьбы с малярией, которая является весьма распространенным и опасным заболеванием. Так, по данным ВОЗ⁵, например в 2010 г. число заболевших малярией в мире превысило 200 млн. человек и смертельных исходов зафиксировано более 655 тысяч, в связи с чем, крайне необходимо иметь действенное средство от этой болезни. Однако содержание артемизинина в полыни однолетней невелико, варьируя от 0,01 до 0,42%, что делает его экстракцию нерентабельной. Химический синтез артемизинина весьма сложен, многостадийен и характеризуется крайне низким выходом [Abdin et al., 2003]. Попытки увеличить содержание природного артемизинина в культурах тканей, в том числе каллусных особого успеха не имели. Косматые же корни обеспечили повышенный выход данного вторичного метаболита – лекарственного препарата, в связи с чем разными авторами из многих стран с помощью разных штаммов *A. rhizogenes* созданы подобные многочисленным культуры *Artemisia annua* [Weathers et al., 1994; Jaziri et al., 1995; Smith et al., 1997; Xie et al., 2000; 2001; Giri et al., 2001; Ahlawat et al., 2012; 2014; Patra, Srivastava, 2014; Shaneeja et al., 2014 и др.], несколько отличающиеся по эффективности накопления целевого продукта. В ряде работ отмечается увеличение выхода артемизинина под действием различных индукторов, среди которых олигосахаридная фракция фузариума, окись азота,

брассинолид, а также световая иррадиация [Liu et al., 2002; Wang et al., 2002; Zheng et al., 2008]. Недавно украинскими авторами для продукции артемизинина была использована ККК другого вида полыни *Artemisia tilesii* [Matvieieva et al., 2015a]. Ранее индийские авторы показали продукцию артемизинина в косматых корнях полыни веничной *Artemisia scoparia* [Singh, Sarin, 2010].

Значительный интерес вызывают вторичные метаболиты такого растения как шлемник байкальский *Scutellaria baicalensis*. С целью продукции байкалина и прочих флавоноидов, в количествах превышающих содержание таковых в нативных растениях, рядом авторов созданы ККК шлемника байкальского [Kovacs et al., 2004; Кузовкина и др., 2005; Hwang, 2006; Tiwari et al., 2008; Park et al., 2011] и близких к нему видов *S. lateriflora* и *S. andrachnoides* [Wilczanska-Barska et al., 2012; Кузовкина и др., 2014]. Здесь стоит отдельно отметить, что, помимо КК у шлемников, сотрудниками группы специализированного метаболизма корней Института физиологии растений РАН, руководимой к.б.н. И.Н.Кузовкиной, создана целая коллекция культивируемых *in vitro* косматых корней, полученных от 26 видов растений, относящихся к 17 семействам (http://www.ippras.ru/structure/gsmk/root_cllc_ru.pdf; <http://www.ippras.ru/structure/gsmk/Root-collection-eng.pdf>).

На протяжении многих лет уделяется внимание ККК ряда видов барвинков для наработки находящихся применение в фармакологии различных алкалоидов индольной природы [Davioud et al., 1989; Toivonen et al., 1990; Ciau-Uitz et al., 1994; Bhadra et al., 1997; Rijhwani, Shanks, 1998; Verma et al., 2012 и др.]. Из косматых корней горца многоцветкового *Polygonum multiflorum* экстрагируют антрахиноны, различные фенольные соединения, кумариновые гликозиды [Zhou et al., 2012; Huang et al., 2014; Thiruvengadam et al., 2014]. Косматые корни горца красильного *Polygonum tinctorium* служат сырьем для получения широко используемого красителя индиго [Young-Am et al., 2000]. Из косматых корней аконита *Aconitum heterophyllum* получают различные аконитины, присутствующие в них в заметно больших количествах, по сравнению с корнями обычных растений этого вида [Giri et al., 1997].

Косматые корни цикория обыкновенного используют для продукции различных сесквитерпенов, кумарина [Bais et al., 2000; 2001; 2003; Malarz et al., 2002; 2007]. Также повышенный уровень сесквитерпенов по сравнению с обычным растением удалось получить в косматых корнях одуванчика лекарственного [Mahesh, Jeyachdran, 2011]. Украинские ученые использовали ККК двух видов лакриц для наработки фенольных соединений и тритерпенового сапонина – глициризина [Kovalenko, Maliuta, 2003]. Позже культуры косматых корней

⁵ World Malaria Report 2011
<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564403/en/index.html>

лакрицы и лапчатки ими были использованы как продуценты радиопротекторных соединений [Kovalenko et al., 2004]. Недавно сообщено о создании ККК для довольно экзотических растений - шести видов кактусов из четырех родов *Escobaria*, *Ferocactus*, *Mamillaria* и *Turbinicarpus* [Carlin et al., 2015]. Целый спектр важных для фармацевтики соединений терпеноидного ряда получают из косматых корней редкого растения раувольфии *Rauwolfia serpentina* [Mehrotra et al., 2015].

Помимо того, что КК способны нарабатывать различные вещества вторичного происхождения, они обладают еще и биотрансформационным потенциалом, под которым понимается осуществление продуцируемыми косматыми корнями ферментами таких реакций как: гидроксирование, гликозилирование, оксидоредукция, метилирование, ацетилирование, этерификация и др. над различными экзогенными субстратами, добавленными в культуральную среду, что довольно подробно рассмотрено в обзоре индийских авторов [Banerjee et al., 2012]. В результате такой инкубации возникают новые вещества, которые также могут иметь коммерческую ценность. Польские авторы [Grech-Baran et al., 2014] биотрансформацией посчитали превращение косматыми корнями родиолы добавленного в питательную среду циннамилового спирта, являющегося предшественником ряда циннамиловых гликозидов, объединяемых термином розавины, присущие данному роду растений семейства толстянковых, в результате чего продукция данных гликозидов заметно увеличилась. Такие предшественники салидрозида – одного из наиболее важных вторичных метаболитов родиолы сахалинской – как аминокислоты тирозин и фенилаланин заметно повысили выход этого вещества в культуре косматых корней данного вида [Zhou et al., 2007]. Есть и другие примеры превращения различных веществ, добавляемых в ККК [Kanho et al., 2005; Faria et al., 2009]. Биотрансформация различных веществ может быть придана КК за счет внедрения в них определенного гена. Так, например, гиосциамин-6 β -гидроксилаза в ККК трансгенного по данному гену табака превращала добавленный в среду гиосциамин в более ценный скополамин [Moitano et al., 2007].

Косматые корни – продуценты различных веществ первичного метаболизма

Помимо вторичных метаболитов, представляющих в связи с КК наибольший интерес, такие культуры корней *in vitro* могут служить продуцентами веществ первичного метаболизма,

например в виде различных белков, включая антитела. В этих случаях для наработки подобных препаратов косматые корни должны быть или рекомбинантными со встроенными в их ДНК чужеродными генами, находящимися под контролем конститутивных либо индуцибельных промоторов (что зависит от свойств конкретных белков) или допускать транзистентную экспрессию целевых продуктов.

Продукцию рекомбинантных белков в растениях называют «Зеленой фабрикой», чему посвящен специальный обзор, в котором имеется и раздел, описывающий использование ККК [Xu et al., 2012]. Другой обзор, подготовленный международным коллективом авторов [Georgiev et al., 2012], напротив целиком посвящен наработке в ККК различных белковых продуктов. В нем подробно рассмотрены многие вопросы продукции различных белков, включая описания преимуществ и недостатков такой производственной платформы. Приведен перечень нарабатываемых в КК рекомбинантных белков, сгруппированных по типам, с указанием масштаба используемой культуры в виде колб или реакторов разных типов и литературными ссылками, с которыми интересующиеся этой стороной использования КК могут ознакомиться самостоятельно. Более узконаправленные обзорные статьи посвящены, например, выработке вакцин косматыми корнями разных видов растений [Hakkinen et al., 2013; Skarjinskaia et al., 2013].

Для примера мы здесь ограничимся упоминанием всего лишь нескольких работ по наработке рекомбинантных белков в ККК за разные годы. Так, впервые о продукции косматыми корнями табака рекомбинантных белков, которыми явились мышинные моноклональные антитела IgG₁, было сообщено в 1997 г. [Wongsamuth, Doran, 1997], после чего последовало немало как аналогичных сообщений, так и публикаций о других типах белков, экспрессируемых в ККК разных растений. Продемонстрировано, что ККК успешно выполняют роль продуцентов различных белков человека: ацетилхолинэстеразы, эпидермального фактора роста, активатора плазминогена, проинсулина, гормона роста [Woods et al., 2008; Parsons et al., 2010; Kim et al., 2012; Lopez et al., 2013; Tavizi et al., 2015]. ККК ряда видов семейства пасленовых оказались способны продуцировать В-субъединицу термостабильного токсина *E. coli* [De Guzman et al., 2011]. Совместная трансформация *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* винограда привела к продукции поверхностного белка неповируса цветной мозаики винограда [Torregrosa, Vouquet, 1997]. Сообщается, в том числе и отечественными учеными, о наработке косматыми корнями антигена

к поверхностному белку гепатита В [Kumar et al., 2006; Рукавцова и др., 2007]. Показано, что экстракты ККК алтея со встроенным геном интерферона человека обладают высокой активностью против везикулярного стоматита [Матвеева и др., 2009; 2013]. Наблюдалась повышенная секреция косматыми корнями рекомбинантного белка – щелочной фосфатазы человека в ККК табака [Gaume et al., 2003].

Для культуры КК табака создана генно-инженерная конструкция, несущая ген сладкого белка тауматина, который в три тысячи раз (по весу) слаще сахара [Pham et al., 2012]. За счет внедрения специального лидерного пептида, способствующего секреции этого рекомбинантного белка в апопласт корней и затем в культуральную среду, содержание тауматина в растворе достигало после определенной индукции через месяц культивирования 2,63 мг/л, что заметно превышало содержание этого белка в тканях обычных трансгенных растений.

Помимо рекомбинантных белков, КК могут накапливать вирусы. Отдельный цикл работ по косматым корням одного из видов табака *Nicotiana benthamiana* в связи с их инфекцией вирусом табачной мозаики (ВТМ) проведен австралийскими авторами [Shadwick, Doran, 2007; 2007a; Shih, Doran, 2009]. Заражение ВТМ корней табака производилось одновременно с их инфекцией *A. rhizogenes*. Было обнаружено, что количество частиц вируса в образовавшихся косматых корнях превышает таковое в суспензионной культуре клеток этого вида табака на 1-2 порядка. Интерес к продукции частиц ВТМ в косматых корнях вызван тем, что данный вирус может быть рекомбинантным и нести ген, кодирующий некий целевой белок, который от общего белка вируса может составлять 10 - 40%. Таким образом, рекомбинантный ВТМ может опосредованно через косматые корни продуцировать рекомбинантный белок. Еще одной причиной использования косматых корней для наработки ВТМ является, то, что данный процесс может производиться в биореакторах, находящихся в закрытом помещении, а не на плантациях табака на открытом воздухе.

Индийские авторы продемонстрировали, что ККК свеклы красной способна наращивать в довольно больших количествах нереккомбинантную, а собственную пероксидазу, причем выход данного фермента заметно отличался в разных клонах, полученных с помощью различных штаммов *A. rhizogenes* [Thimmaraju et al., 2005; 2008]. Ранее испанские авторы показали, что косматые корни рапса наращивают пероксидазу, которая может применяться в диагностических наборах с не меньшим успехом, чем стандартная пероксидаза

хрена [Agostini et al., 2002]. Благодаря индукции хитозаном в косматых корнях одного из видов хрена наблюдался повышенный синтез собственной пероксидазы [Flocso, Giuletti, 2003].

Кроме белков косматые корни могут быть источником других первичных метаболитов, например различных полисахаридов. В этом случае желаемый полисахарид должен быть изначально присущ культивируемым корням исходного растения. Так, опубликована статья [Du et al., 2003], где говорится, что в культуре косматых корней одного из видов астрагала *Astragalus membranaceus* в 30-ти литровом биореакторе шло накопление неназываемого полисахарида. В косматых корнях цикория исследовали накопление инулина [Kusch et al., 2009]. Авторы сообщили, что косматые корни цикория служат удобной экспериментальной системой для изучения регуляции работы ферментов синтеза фруктанов. В ККК цикория, полученной украинскими авторами, содержание инулина оказалось выше в 1,7 раза по сравнению с корнями обычного растения [Матвеева и др., 2011]. Специальную статью они посвятили оптимизации экстракции инулина из косматых корней цикория [Мазник, Матвеева, 2013]. Эти же авторы наблюдали значительное накопление фруктанов в ККК алтея [Матвеева и др., 2013].

Способы повышения продукции целевых продуктов метаболизма косматыми корнями

Одно из главных предназначений ККК в настоящее время это наработка различных как первичных, так и вторичных метаболитов. Для увеличения их продукции используются разные подходы, при реализации которых выход целевых продуктов значительно возрастает. Так, индукторами синтеза тех или иных метаболитов могут служить факторы биотической и абиотической природы [Goel et al., 2011; Ramakrishna, Ravishankar, 2011; Wang, Wu, 2013]. К первым можно причислить экстракты различных живых организмов: полисахаридные элиситоры из эндофитных грибов [Kovalenko, Maliuta, 2003; Zheng et al., 2008; Zhao et al., 2014], элиситоры из экстрактов фитопатогенных грибов [Ahlawat et al., 2014], дрожжевой экстракт [Kovalenko, Maliuta, 2003; Bauer et al., 2009; Sun et al., 2012], лизат бактерии *Pectobacterium carotovorum* [Wilczanska-Barska et al., 2012], элиситоры из зеленых микроводорослей [Rao et al., 2001], экстракты из морских водорослей [Sivanandhan et al., 2015] и др.

Химические соединения, оказывающие положительный эффект на наработку вторичных метаболитов, можно подразделить на органические и неорганические. Серьезное влияние на синтез целевых продуктов способны оказывать фитогормоны

и гормон-подобные вещества. Среди них, наиболее часто, и с большим успехом используется жасмоновая кислота и метилжасмонат [Мантрова и др., 1999; Rijhwani, Shanks, 1998; Malarz et al., 2007; Bauer et al., 2009; Xiao et al., 2009; Wongwicha et al., 2011; Pirian, Piri, 2012; Rahimi et al., 2012; Kastell et al., 2013; Nopo-Olazabal et al., 2013; Patra, Srivastava, 2014 и др.], гибберелловая кислота, абсцизовая кислота, салициловая кислота, кинетин, брассинолид [Pitta-Alvarez, Giulietti, 1997; Smith et al., 1997; Wang et al., 2002; Hao et al., 2012; Kastell et al., 2013; Srivastava, Srivastava, 2014 и др.]. Сообщается об использовании в качестве индуктора синтеза вторичных метаболитов хитозана [Sauerwein et al., 1991; Flocco, Giulietti, 2003; Gangopadhyay et al., 2011; Sun et al., 2012], пектиназы [Rijhwani, Shanks, 1998], путресцина [Bais et al., 2001], циклодекстрина [Marsh et al., 2014].

Определенное влияние на синтез вторичных метаболитов оказывали различные неорганические соли магния и кальция, нитраты, а также ионы серебра [Oksman-Caldentey et al., 1994; Yaoya et al., 2004; Yan et al., 2006; Chashmi et al., 2010; Torkamani et al., 2014; Xing et al., 2014]. Отдельное внимание читателя стоит обратить на неионный детергент Tween 80, который не просто вызывал индукцию синтеза ликохалькона и общих флавоноидов косматыми корнями солодки уральской, но и способствовал секреции до 98% и 94% этих соединений соответственно в культуральную среду, из которой их было легко выделять [Zhang et al., 2011]. Сходный эффект Tween 80 оказал и на ККК женьшеня, увеличив выработку гинсенозидов в 3 раза и сопроводив это увеличение выходом до 76% данных вторичных метаболитов в среду культивирования [Liang et al., 2015]. Ранее было исследовано влияние Tween 80, Triton X-100 и СТАВ (цетилтриметил аммоний бромид) на синтез беталаинов в культуре КК красной свеклы, показавшее заметное увеличение количества целевого продукта, к тому же секретировавшегося под их влиянием в количестве 45, 70 и 90% соответственно [Thimmaraju et al., 2003]. Причем все эти соединения не оказывали отрицательного влияния на сам рост косматых корней.

Серьезный эффект на повышение продукции различных вторичных метаболитов растений оказывают и некоторые физические факторы. Так, позитивное воздействие на синтез вторичных метаболитов произвело механическое поранение корней [Sun et al., 2012]. В ККК гороха отмечено 10-ти кратное увеличение биосинтеза изофлавоноида пизатина в ответ на индукцию сублетальными уровнями электрического тока [Kaimojo et al., 2008].

Исследование воздействия света на культуру корней (не косматых) было проведено еще в 1924 г.

при выращивании кукурузных корней, в результате чего было обнаружено, что некоторые образцы накапливали на свету антоциан, тогда как в темноте ни одна из культур антоциан не вырабатывала [Robbins, Maneval, 1924]. Сейчас значительное внимание при культивировании КК оказывается влиянию действия света [Liu et al., 2002]. Адаптированная к свету ККК барвинка *Catharanthus roseus* привела к позеленению и утолщению корней и у некоторых образцов вела к увеличенному накоплению алкалоидов индольного ряда [Bhadra et al., 1998]. Воздействие на ККК барвинка ультрафиолетом в течение 20 мин привело как к накоплению, так и к снижению содержания разных терпеноидных алкалоидов [Binder et al., 2009]. Рост косматых корней зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* осуществляли как в полной темноте, так и с экспозицией на свету от чего фенольный профиль культуры менялся довольно значительно, приводя к снижению выработки одних и увеличению выработки других компонентов [Tusevski et al., 2013].

Освещение культуры косматых корней *Solanum aculeatissimum* привело к их позеленению и выработке стероидных сапонинов, которые в темноте не вырабатывались [Ikenaga et al., 1995]. В становящихся под действием света зелеными косматыми корнях растения *Lippia dulcis* увеличивался синтез хернандульцина [Sauerwein et al., 1991]. В то же время показано, что у одного из видов золотарника *Solidago altissima* при выдерживании культуры косматых корней на свету выход полиацетилена резко снижался [Inoguchi et al., 2003]. Другими авторами, напротив, показано, что под действием света происходило накопление полиацетилена в ККК другого растения *Acmella oppositifolia* [Flores et al., 1993]. В данной работе косматые корни под действием света и при уменьшении углеводного питания в среде и одновременном повышении содержания углекислого газа в инкубационном сосуде приобрели способность к фотоавтотрофному питанию, которое поддерживалось ими в системе *in vitro* свыше двух лет. Кроме акмеллы в этой же работе фотоавтотрофность была придана еще косматым корням целого ряда видов из семейств сложноцветных и пасленовых. Японские авторы также смогли добиться не просто позеленения косматых корней ипомеи водяной, но и их перехода на фотоавтотрофное питание [Nagatome et al., 2000; Kino-oka et al., 2001]. Уже достаточно давно одним из «отцов-зачинателей» использования ККК для продукции вторичных метаболитов Н.Е. Flores вместе с соавторами [1987] было отмечено, что косматые корни под действием света развивают выглядящие нормальными хлоропласты, характеризуются уровнем

рубиско, типичным для листьев, фиксируют на свету углекислый газ, что дает некую надежду на более полную реализацию этого их потенциала, чего пока все же в полной мере не произошло.

Увеличение продукции вторичных метаболитов в КК растений может быть достигнуто не только воздействием физическими, химическими или биологическими факторами, но и внесением с помощью генной инженерии некоторых изменений в существующие пути синтеза таких соединений, в виде внедрения различных генов, кодирующих ферменты, ответственные за разные стадии метаболических путей. Так, например, увеличенный уровень экспрессии гена салутаридинол-7-о-ацетилтрансферазы в одном из видов маков обеспечил увеличение в 1,5 раза синтеза тебаина – алкалоида морфинового ряда [Sharafi et al., 2013]. ККК солодки уральской за счет сверхэкспрессии гена халконизомеразы стала характеризоваться заметно увеличенным синтезом общих флавоноидов [Zhang et al., 2009]. Попытка повлиять на метаболический путь синтеза 4-гидроксибензоата – предшественника шиконина за счет внедрения в геном воробейника бактериального гена *ubiC*, кодирующего хоризматпируватлиазу и не содержащегося в растениях, привело к тому, что синтез шиконина изменился мало, зато в 5 раз вырос синтез другого вторичного метаболита менисдаурина [Sommer et al., 1999].

Ген гиосциамин-6β-гидроксилазы из белены черной был внедрен в геном другого вида из семейства пасленовых – дубоизию, в результате чего КК последнего вида стали в три раза больше по сравнению с исходными корнями продуцировать важный алкалоид скополамин [Palazon et al., 2003]. За счет внедрения трех генов – 3-гидрокси-3-метилглутарил Коэнзим А редуктазы, 1-дезоксид-Д-ксилозу-5-фосфат синтазы и геранилгеранилдифосфатсинтазы в сальвию *Salvia miltiorrhiza* удалось почти в 5 раз повысить выход дитерпена таншинона, используемого при лечении сердечных заболеваний [Kai et al., 2011].

Было также сообщено, что искусственное повышение плоидности КК полыни однолетней *Artemisia annua* заметно увеличило продукцию артемизинина [De Jesus-Gonzalez, Weathers, 2003]. Для этого авторами 2-х см кусочки косматых корней диплоидной полыни помещались на 1-7 дней в раствор колхицина, после чего выжившие подвергались определению числа хромосом. Отобранные тетраплоидные линии косматых корней полыни продуцировали в 6 раз больше артемизинина, чем родительская форма.

В литературе есть примеры не просто усиления синтеза присущих конкретному растению

вторичных метаболитов, но и синтез новых, не свойственных этому виду. Так, внедрив три гена бактериальных ферментов, отвечающих за синтез полигидроксибутирата, в геном сахарной свеклы, удалось получить косматые корни, в которых стал синтезироваться этот биоразлагаемый полимер [Menzel et al., 2003].

Отдельным направлением в достижении увеличенного выхода целевых продуктов в КК является их совместное культивирование с другими биологическими объектами. Так, например, показано, что сокультивирование косматых корней *Salvia miltiorrhiza* на определенных стадиях с бактерией *Bacillus cereus* способствовало увеличению продукции таншинона [Wu et al., 2007]. Ранее было предложено использовать сокультивирование на безгормональной среде косматых корней белладонны с порослевыми тератомами этого же вида, образованными под действием *A. tumefaciens*, что значительно повысило выход скополамина и гиосциамина, к тому же сильно изменив соотношение в пользу первого метаболита [Subroto et al., 1996]. Еще более оригинальный вариант сокультивирования был описан в другой статье [Lin et al., 2003]. В этом случае вместе с косматыми корнями льна желтого *Linum flavum*, служащими продуцентом кониферина, являющегося индуктором накопления в суспензионной культуре *Podophyllum hexandrum* противоракового препарата подофиллотоксина, выход последнего возрос на 240%.

В последние годы во всем мире вопросам повышения выхода целевых метаболитов за счет индукции их синтеза уделяется все большее внимание и в литературе имеется немало специальных обзоров на эту тему [Mehrorra et al., 2010; Chandra, Chandra, 2011; Zhou et al., 2011; Ludwig-Muller et al., 2014; Gandhi et al., 2015 и др.].

Косматые корни как инструмент в руках биологов Композитные растения

Учитывая, что создание полноценных трансгенных растений занимает немало времени и требует серьезных усилий, то в тех случаях, когда основной научный интерес представляет изучение реакции корней в ответ на то или иное воздействие, можно вполне обойтись созданием, так называемых, композитных растений, у которых надземная часть остается исходной, а корни приобретают трансгенный статус. Причем, под ним в данном случае понимается как внедрение в геном растения только Т-ДНК дикого штамма, так и вкуче с ними перенос какого-либо чужеродного гена из рекомбинантных штаммов *A. rhizogenes* или ранее произведенный трансгенез неких генов с помощью *A. tumefaciens*.

Впервые такое растение из семейства бобовых - лядвенец рогатый (*Lotus corniculatus*) было создано в 1989 г. датчанами [Hansen et al., 1989]. Они путем поранения молодых проростков инфицировали их как диким, так и рекомбинантными штаммами *A. rhizogenes* после чего дождались появления косматых корней и тщательно удалили исходные. Главной целью той работы было провести фактически модельный эксперимент, чтобы убедиться, что трансгенные (косматые) корни этого бобового растения будут способны вступать в азотфиксирующий симбиоз с соответствующим штаммом ризобий. Главным итогом той работы стало доказательство формирования косматыми корнями полноценного симбиоза с клубеньковыми бактериями *Rhizobium loti*. Трансгенность корней подтверждалась функционированием репортных генов, коими служили CAT, GUS и LUC, помещенные в разные векторные бинарные конструкции под контролем 35S промотора. Позже аналогичные работы были проведены с другими бобовыми растениями – арахисом [Akasaka et al., 1998; Sinharoy et al., 2009], с одним из видов люцерн *Medicago truncatula* [Deng et al., 2011], с горохом [Clemow et al., 2011]. Ранее для того же вида люцерны было создано комбинированное растение, вступающее в азотфиксирующий симбиоз с бактерией *Sinorhizobium meliloti*, способное колонизироваться также эндомикоризным грибом *Glomus intraradices* [Boisson-Dernier et al., 2001]. Формирование нормальной арбускулярной микоризы наблюдали и на косматых корнях комбинированного растения люцерны *Medicago truncatula* [Mrosk et al., 2009]. С аналогичной целью изучения особенностей протекания азотфиксирующих симбиозов были созданы комбинированные растения для ряда видов фасолей и других бобовых растений [Quandt et al., 1993; Stiller et al., 1997; Estrada-Navarrete et al., 2006; Colpaert et al., 2008; Bonaldi et al., 2010]. Интересная работа проведена с комбинированной соей [Dolatabadian et al., 2013]. В качестве исходного растения был взят ненодулируемый мутант с нарушенным геном GmNFR5 и после образования косматых корней, несущих комплементирующую копию данного нормального гена, на корнях этого комбинированного растения сформировались азотфиксирующие клубеньки. Недавно сообщено об успешном использовании при изучении бобового-ризобиального симбиоза в комбинированном растении люцерны *Medicago truncatula* технологии РНК-интерференции [Sinharoy et al., 2015].

Помимо бобово-ризобиального симбиоза, активно ведется создание комбинированных растений из группы актиноризных, вступающих в симбиоз с микроорганизмами рода *Frankia*. Учитывая, что эти виды в большинстве своем являются деревьями и

кустарниками⁶, создание таких комбинированных растений [Phelep et al., 1991; Diouf et al., 1995; Imanishi et al., 2011 и др.] для изучения симбиотических отношений весьма актуально. Авторским коллективом из разных стран подготовлен специальный обзор, посвященный комбинированным растениям и актиноризному типу симбиоза [Benabdoun et al., 2011]. С помощью технологии комбинированных растений отдельное внимание уделено анализу роли гена SymRK у ряда актиноризных, а также бобовых растений [Gherbi et al., 2008; Markmann et al., 2008]. Показана возможность получения клубенок-подобных структур, содержащих ризобии гороха посевного *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, на трансгенных по гену лектина гороха посевного *psl* корнях комбинированной облепихи, которая в природе обычно вступает в симбиоз с актиномицетами *Frankia* [Вершинина и др., 2010]. Комбинированные проростки другого актиноризного растения *Datisca glomerata* были созданы для того, чтобы изучить активность промотора гена металлотионеина CgMT1, принимающего непосредственное участие в функционировании актиноризного симбиоза у *Casuarina glauca* [Rashidi et al., 2010].

Анализ химерной яблони с трансгенными косматыми корнями позволил обнаружить, что в плодах содержатся продукты генов, отсутствующих в надземной части и присутствующие только в корнях [Lambert, Tepfer, 1991]. Получены комбинированные растения эвкалипта для дальнейшего исследования работы генов, участвующих в ионном транспорте и развитии корневой системы [Balasubramanian et al., 2011]. Другое применение древесные комбинированные растения с косматыми корнями нашли при обнаружении линий кофе и сливы, устойчивых к таким опасным вредителям как почвенные нематоды [Alpizar et al., 2006; Bosselut et al., 2011]. Устойчивость к нематодам изучалась с помощью косматых корней у ряда видов комбинированных травянистых растений [Narayanan et al., 1999; Collier et al., 2005; Taylor et al., 2006]. Также с целью дальнейшего изучения нематодных инфекций были получены комбинированные растения картофеля [Horn et al., 2014].

З.Р. Вершининой с соавторами было показано, что комбинированные растения томата и рапса могут быть модельными объектами для создания новых ассоциативных симбиотических систем [Вершинина и др., 2011; Verшинina et al., 2012]. При этом для комбинированных растений томата возможно формирование подобных ассоциаций, обладающих

⁶ Как известно создание трансгенных растений из древесных и кустарниковых форм представляет определенные трудности.

фунгистатической активностью [Благова и др., 2013]. Позднее аналогичные результаты были получены для рапса [Вершинина и др., 2013], перца [Оркодашвили и др., 2013] и огурца [Лавина и др., 2014].

Композитные растения вигны и кукурузы были созданы для того, чтобы изучить особенности биологии опасного паразитического растения стрига [Mellor et al., 2012; Runo et al., 2012], различные виды которой поражают многие сельскохозяйственные растения, главным образом на африканском континенте. Созданные растения несли косматые корни, позволявшие стригам формировать гаустории и проникать внутрь корней растений-жертв. Иной подход был предложен в другой работе [Tomilov et al., 2007]. В этом случае полупаразитическое растение *Triphysaria versicolor* делали композитным с корнями, мечеными репортерным геном *GUS*, что позволяло следить за проникновением гаусторий в корни салата. В работе японских авторов за проникновением гаусторий факультативного паразита *Phtheirospermum japonicum* в корни риса и кукурузы также наблюдали во время протекания клеточных делений, получив композитное растение с репортерным геном зеленого флуоресцентного белка под контролем промотора гена циклина B1 [Ishida et al., 2011]. Созданное композитное растение тыквы использовалось для изучения развития апикальной меристемы и ветвления корней [Irina et al., 2012]. Композитное растение сои, для создания которого использовался рекомбинантный штамм *A. rhizogenes* K599, несущий также бинарный вектор с геном мягкой пшеницы *TaNHX2*, отвечающим за вакуольный транспорт Na^+/H^+ , проявило повышенную устойчивость к засолению по сравнению с контролем [Cao et al., 2011].

Иные примеры применения косматых корней в биологических исследованиях

Изучение устойчивости разных культур к нематодам велось и без получения композитных растений, в том числе на косматых корнях сои [Savka et al., 1990] и хлопчатника [Wubben et al., 2009], как модельных объектах. Культуры косматых корней сои, томатов, картофеля, моркови и других растений использовали как среду для размножения и выращивания соответствующих нематод [Verdejo et al., 1988; Savka et al., 1990]. В литературе также описан способ борьбы с нематодами при помощи косматых корней томата [Ashikawa et al., 1991]. Биология нематод такова, что их цисты могут находиться в почве длительное время в состоянии покоя, из которого их выводят экссудаты корней растений, к паразитированию на которых они приспособились. Если нарабатанный в культуре косматых корней томата индуктор цист нематод

Globodera rostochiensis, поражающих кроме томатов также картофель и баклажаны, внести в почву, то нематоды выйдут из покоя, но не найдя растения-хозяина быстро погибнут. Недавно индийские авторы продемонстрировали, что фенольные соединения из косматых корней томатов обладают инсектицидной и антиоксидантной активностями [Singh et al., 2014]. Ранее инсектицидную активность против личинок комаров у косматых корней бархатца отклоненного обнаружили другие индийские авторы [Rajasekaran et al., 2004].

Двойная культура косматых корней сахарной свеклы и ее облигатного паразита простейшего *Polymyxa betae* была создана, в результате чего через 10 недель сформировались типичные структуры образуемые данным паразитом, что дало возможность дальнейшего изучения биологии этого простейшего [Desoignies, Legreve, 2011]. Образование косматых корней у дикого и окультуренного арбузов привело к созданию удобной системы, позволившей изучать стрессовые воздействия на корневой тонус при недостатке влаги [Kajikawa et al., 2010]. Показано, что косматые корни у томата и хлопчатника служат модельными системами при изучении тканеспецифичной экспрессии генов и в целом для исследования вопросов функциональной геномики [Kim, 2013; Ron et al., 2014]. Для проведения количественной ПЦР для оценки экспрессии отдельных генов в культуре косматых корней арахиса другими авторами ранее была осуществлена селекция референсных генов [Condoni et al., 2011]. Из 21 кандидатного гена они остановили свой выбор на двух – *TBP2* (ТАТА-бокс-связывающий белок) и *RPL8C* (один из рибосомных белков), а обычно используемый референсный ген *GAPDH* показал в их экспериментах меньшую стабильность экспрессии.

Косматые корни женьшеня были использованы китайскими авторами для того, чтобы оценить вклад цитоплазматического (ядерного или эукариотического) мевалонатного и пластидного (прокариотического) метилэритритолфосфатного путей в синтезе гинсенозидов – тритерпеновых сапонинов женьшеня, являющихся главными компонентами, оказывающими различные лекарственные воздействия [Zhao et al., 2014]. Предшественником данных сапонинов является изопентенилпирофосфат, который может нарабатываться в обоих метаболических путях. Культивируя косматые корни женьшеня в присутствии по отдельности ингибиторов ферментов обоих путей, этими авторами было показано, что как мевалонатный, так и немевалонатный пути вносят существенный вклад в накопление гинсенозидов в корнях женьшеня.

Учитывая отсутствие у косматых корней геотропизма, на борту космического челнока Columbia был проведен оригинальный эксперимент, в котором сравнивался рост косматых и обычных корней у рапса, показавший, что последние имели тенденцию к искривлению, а трансформированные ее фактически не проявляли, при этом косматые корни имели более ярко выраженную V-форму корневого чехлика [Odegaard et al., 1997]. Здесь можно заметить, что как известно грависенсорным механизмом у корней служат крахмальные зерна в корневом чехлике, называемые статолитами или стаатоцитами. Они выполняют и питательную функцию, а также отвечают за формирование гелевой смазки для лучшего проникновения корней между частицами почвы. Обнаружено, что в косматых корнях увеличена активность альфа-амилазы, снижающей количество амилопластов в корневом чехлике [Young-Soon, Soh, 1996]. Подобный эффект вызывает также экзогенное добавление некоторых фитогормонов, что фактически имеет место на эндогенном уровне при образовании косматых корней. Вероятно, именно это обстоятельство также способствует неограниченному росту косматых корней.

Показано применение косматых корней белладонны для фиторемедиации, в ходе которой культура корней в присутствии перекиси водорода очищала воду от фенола, находящегося в ней в концентрации до 500 мг/л [Mazaheri, Piri, 2015]. В одной из работ рассмотрена роль пероксидазы и перекиси водорода в удалении из жидкой среды фенола с помощью косматых корней ряда видов семейства крестоцветных, при этом КК *Brassica juncea* добавлялись в среду, как в живом виде, так и в лиофилизированном виде [Singh et al., 2006]. Экстракты косматых корней табака, как дикого типа, так и содержащие трансгены, кодирующие пероксидазы томата, использовались для успешного разрушения 2,4-дихлорфенола [Angelini et al., 2014]. Косматые корни моркови, батата и паслена птичьего накапливали в себе большие количества фенола и хлорфенола, очищая от них культуральную среду [de Araujo et al., 2002; De Araujo et al., 2006]. Косматые корни паслена черного разрушали полихлорбифенилы, превращая их в целый ряд менее опасных соединений [Rezek et al., 2007]. Недавно сообщено о разрушении косматыми корнями физалиса азокрасителя Reactive Black 8 до нетоксичных метаболитов [Jha et al., 2015].

Известно свыше 300 видов растений, в основном из семейства крестоцветных – гипераккумуляторов тяжелых металлов, преимущественно никеля. Австралийскими авторами были созданы ККК ряда видов бурачка или алиссумов, показавшие по сравнению с косматыми

корнями табака заметное накопление никеля, однако не превышающее таковое для цельных растений [Nedelkoska, Doran, 2001]. Косматые корни другого вида семейства крестоцветных *Thlaspi caerulescens* оказались способны накапливать кадмий [Nedelkoska, Doran, 2000]. Помимо кадмия и никеля, КК хрена накапливали и уран [Soudek et al., 2011]. Ранее было показано, что уран удаляли из растворов косматые корни и индийской горчицы *Brassica juncea* и мари красной *Chenopodium amaranticolor* [Eapen et al., 2003]. С другими работами по использованию косматых корней целого ряда растений для фиторемедиации различных поллютантов можно ознакомиться по обзорам индийских и китайских авторов [Majumder, Jha, 2012; Agostini et al., 2013; Zhou et al., 2013].

Для изучения роли пероксидазы в синтезе различных вторичных метаболитов барвинка розового создавались трансгенные косматые корни, характеризующиеся как сверхэкспрессией, так супрессией работы данного гена [Jaggi et al. 2011].

Путем трансформации сахарной свеклы рекомбинантным штаммом *A. rhizogenes*, несущим генно-инженерные конструкции, продуцирующие двуцепочечные РНК, представляющие собой различные участки гена репликазы вируса Beet necrotic yellow vein virus, вызывающего такую серьезную болезнь сахарной свеклы как ризомания, удалось в трансформированных растениях справиться с этим заболеванием при том, что в надземных частях таких растений вирус присутствовал [Pavli et al., 2010]. Статья китайских авторов посвящена применению технологии микроРНК в косматых корнях, где они наблюдали за счет РНК-интерференции репрессию работы гена одной из синтаз, влияющей на синтез терпеноида таншинона [Cheng et al., 2014]. Недавно российскими авторами опубликована обзорная статья, в которой на многочисленных примерах рассмотрены возможности распространения технологии микроРНК применительно к метаболизму веществ вторичного происхождения [Bulgakov, Avramenko, 2015].

Такая передовая технология редактирования эукариотических геномов как CRISPR/Cas9 недавно применена к ряду видов растений, в которых в косматых корнях исследовалось влияние различных мутаций отдельных генов [Ron et al., 2014; Jacobs et al., 2015; Sun et al., 2015]. В культуру косматых корней проникла и нанотехнология. Так, описано использование ККК табака и льнянки для создания наночастиц в виде квантовых точек на основе кадмия [Al-Shalabi, Doran, 2013; Borovaya et al., 2014].

Косматые корни как сырье для химика-синтетика

Растения являются источником множества лекарственных соединений, которыми служат главным образом вещества вторичного происхождения. Но многие из них, к сожалению, ограниченно доступны даже с использованием биотехнологических приемов. К тому же, несмотря на все многообразие натуральных веществ, Природа «ограничилась»⁷ для ряда соединений лишь малым числом их производных, тогда как потенциально иные варианты могут иметь даже больший терапевтический эффект. В этом случае на помощь приходит синтетическая химия, точнее полусинтетическая, называемая так потому, что стартовыми молекулами для нее служат естественного происхождения большие и сложные биомолекулы, обычный химический синтез которых занял бы очень много стадий и сопровождался бы низким выходом целевого продукта, тогда как при полусинтезе может быть достаточно одной-двух реакций для превращения некоего промежуточного продукта в ценное лекарство. В качестве примера можно привести коммерческий синтез паклитаксела, известного также как лекарственный препарат Таксол, довольно широко используемый для лечения онкологических заболеваний. Это вещество терпеноидной природы содержится в крайне малых количествах в коре ряда видов тиса – медленно растущего дерева. Но, если бы паклитаксел для фармакологических целей добывали из коры тиса, то его стоимость была бы просто заоблачной при том, что с помощью биотехнологического производства его предшественников в суспензионной культуре клеток тиса ягодного, стоимость конечного продукта удалось снизить только до 600 тыс. долларов за 1 кг. Создана и ККК тиса [Syklovska-Baranek et al., 2009], которая также может служить источником нужных соединений – предшественников паклитаксела. Так, в настоящее время производство таксола представляет собой наработку в культуре растительных клеток его предшественника – 10-деацетилбаккатина III, который затем методом полусинтеза превращают в паклитаксел [Xiao et al., 1997; Jennewein, Croteau, 2001]. Также имеются сообщения о создании трансгенных растений арабидопсиса и томата, в которых добавленные гены несколько изменили пути метаболизма изопреноидов, приведшие к наработке различных таксадиенов – предшественников паклитаксела [Besumbes et al., 2004; Kovacs et al., 2007].

⁷ Хотя нельзя исключать и того факта, что пока в Природе возможно просто не найдены те или иные соединения.

В литературе немало обзоров, посвященных химическому полусинтезу и комбинаторной химии, направленным на модификацию природных вторичных метаболитов, главным образом растительного происхождения [Canto-Canche, Loyola-Vargas, 1999; Abel et al., 2002; Rao, Ravishankar, 2002; Du, 2003; Ortholand, Ganesan, 2004; Roberts, 2007; Newman, Cragg, 2010; Cragg, Newman, 2013; Cragg et al., 2014 и др.]. Прежде чем привести в качестве примеров химического полусинтеза ряд экспериментальных работ, отметим, что первый полусинтез медицинского препарата был произведен еще в 1899 г., результатом которого стал всем известный аспирин.

Выделенное из Раувольфии змеиной вещество резерпин с конца 1950-х гг. стало лекарственным средством, используемым при гипертензии, но в корнях близкого вида *Rauwolfia canescens* содержится также дезерпидин, отличающийся отсутствием одной метокси-группы, и проявляющий, помимо сходной лекарственной активности еще и транквилизаторные свойства. Однако содержание дезерпидина значительно ниже, в связи с чем был осуществлен полусинтез этого вещества из более доступного резерпина [Varchi et al., 2005]. Скополамин, входящий в ту же группу алкалоидов, что атропин и кокаин, был подвергнут параллельной химической модификации, следствием которой стало его превращение в целый ряд алкалоидов тропанового ряда [Aberle et al., 2001]. С участием отечественных авторов были получены различные производные вазицина [Shevyakov et al., 2006], выделяемого из растений юстиции сосудистой или васаки, - одного из самых известных средств, используемых при любых расстройствах, связанных с дыхательными путями.

Еще одним примером полусинтеза важного лекарственного соединения является превращение алкалоида камптотецина, найденного в камптотеке остроконечной *Camptotheca acuminata*, называемой китайцами деревом жизни и счастья, в его синтетические производные, в частности в 10-гидроокси-камптотетин [Kingsbury et al., 1991; Du, 2003]. Причиной такого полусинтеза является то, что камптотетин вызывает серьезные побочные эффекты, а это его производное, сохранив все нужные свойства, побочных практически лишено. Для этого процесса камптотетин необходимо выделить из растительного сырья, которым часто служит именно культура косматых корней, потому что в них содержание этого алкалоида индольной природы доходит до 0,1 – 0,3% от сухого веса, тогда как в суспензионной культуре клеток этого дерева его ничтожно мало – 0,0003 – 0,001% [Wink et al., 2005].

Завершая данную главу, хотим также заметить, что химические вещества, служащие предшественниками готовых лекарств, могут добываться как из нативных растений, так и из трансгенных, а также экстрагироваться из различных культур растительных тканей, клеток, органов, включая КК. Фактически ККК снимает многие ограничения по использованию в дальнейшем полусинтезе растительных соединений, малодоступных из природного сырья, ввиду произрастания некоторых растений в небольших масштабах или произрастания их на ограниченной территории, расположенной к тому же вдали от мест, где сырье из таких растений могло бы быть востребовано. Другими словами - или занесенных в Красные книги разных уровней или являющихся эндемиками, либо вместе и то и другое. Благодаря биотехнологическим процессам в виде ККК химикам для полусинтеза можно использовать даже растения, находящиеся на грани исчезновения. Конечно, иногда подчеркивается, что те или иные вторичные метаболиты вырабатываются в таких растениях (в ощутимых количествах) только при произрастании последних в своих исконных местообитаниях, где влияние может оказывать и состав почвы и уровень атмосферного давления и прочие факторы. Однако в ККК все эти абиотические факторы могут быть вполне успешно заменены индукцией подходящими агентами химической или биологической природы, о которых говорилось выше.

Масштабирование культуры косматых корней для производственников в биореакторах⁸ разного типа

Растительный нафтохиноновый пигмент лилово-красного цвета под названием шиконин стал первым вторичным метаболитом растений, который стал нарабатываться в культуре *in vitro* в промышленных масштабах [Tabata, Fujita, 1985].

⁸ К сожалению, довольно часто термином ферментер называют биореактор, хотя между ними имеется принципиальная разница. Так, устройство, называемое ферментером, предназначено для ферментации в виде брожения, сбраживания и прочих сходных процессов, изначально биореактором не считалось, под каковым всегда понималась некая емкость, где, в первую очередь, происходит наработка биомассы, которая, впрочем, тоже может служить источником каких-либо ферментов, но ферментация, как правило, ведется раздельно. Здесь биореактором мы будем называть устройство, предназначенное для наработки массы косматых корней растений, ферментером в классическом понимании этого термина не являющееся.

Шиконин находит широкое применение в фармацевтической промышленности, являясь, в том числе, антибактериальным агентом. Используется шиконин и в косметической промышленности, где входит в состав губных помад. Вообще этот пигмент ранее добывался из нативного растения, а именно из корней воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon* из семейства Бурачниковых, известного как красильное и медицинское растение еще с незапамятных времен. Точнее, имеются сведения, что о нем упоминается в китайской медицинской литературе двухтысячелетней давности [Fujita, 1988]. Однако содержание шиконина в корнях данного растения относительно невелико и составляет около 1-2%. К тому же требуется не менее 3-4 лет роста растения, чтобы сами корни и содержание шиконина в них достигли товарных значений. Для химического же синтеза шиконина требуется 12 стадий, а выход целевого продукта составляет всего 0,7% [Terada et al., 1983], что также не может служить основой для его промышленного производства. Учитывая важность данного вещества для человечества, были предприняты попытки продукции шиконина в культуре растительных клеток. Так, в 1974 г. было впервые сообщено о наработке шиконина в каллусной ткани воробейника [Tabata et al., 1974]. Спустя несколько лет этой же группе японских авторов удалось добиться увеличенного выхода данного соединения [Mizukami et al., 1978]. Позже другие японские авторы попытались создать суспензионную культуру воробейника, однако она или плохо росла или выход целевого продукта был весьма низок [Fujita et al., 1981]. Использование при культивировании последовательно двух питательных сред решило данную проблему, обеспечив при масштабировании наработку шиконина в количествах, намного превосходящих таковые, доступные из нативных растений. Так, в 750 литровом биореакторе в 600 л рабочего объема всего за две недели нарабатывалось шиконина столько сколько его можно было экстрагировать из плотно посаженных произраставших четыре года растений воробейника с площади почти 18 га [Tabata, Fujita, 1985]. На каллусной и суспензионной культурах ученые не остановились и в 1991 г. появилось первое сообщение о создании другими японскими авторами ККК воробейника [Shimomura et al., 1991]. Причем было показано, что шиконин, не просто образовывался в больших количествах, но и секретировался в культуральную среду, что значительно облегчало его сбор. Спустя год, корейскими авторами также была создана собственная культура косматых корней *Lithospermum erythrorhizon* с относительно высоким выходом шиконина [Seo et al., 1992]. Чуть позже другими корейскими авторами был использован

небольшой двухфазный биореактор, где шла постоянная экстракция шиконина в гексадекан, обеспечивая наработку 10,6 мг целевого продукта на 1 л ККК за день [Sim, Chang, 1993].

В целом ряде работ подчеркивается, что при масштабировании ККК выход целевых продуктов резко увеличивался, что до некоторой степени противоречит устоявшемуся мнению, что при переходе от колб к пилотным установкам эффективность наработки обычно снижается. Причинами улучшенного роста косматых корней и увеличенной продукции целевых метаболитов в биореакторах в отличие от обычных колб являются лучше контролируемые разнообразные составляющие условий выращивания, среди которых – контроль за температурой, поддержание оптимального рН, своевременное обеспечение органическим питанием, неорганическими солями, кислородом, удаление целевых и побочных продуктов, которые часто тормозят дальнейший рост культуры. Поэтому именно в программируемых биореакторах возможно обеспечение наиболее оптимальных условий роста косматых корней.

Главными же условиями интенсивного роста косматых корней при непременном поддержании стерильности всего процесса являются обеспечение корней непрерывным питанием и предоставление им возможности постоянного дыхания. При попытке максимального обеспечения одного из этих параметров, второй резко ухудшается. Таким образом, максимальные питание и дыхание корней по сути являются двумя крайностями и их одновременное выполнение представляет собой противоречивые требования. Для оптимального решения этой проблемы составляются специальные математические модели транспорта кислорода в ККК [Palavalli et al., 2012]. Оценивался также вклад скорости тока жидкости на обеспечение косматых корней кислородом, в том числе с учетом корней с уменьшенным числом корневых волосков, где уже возникает другой ток жидкости [Shiao, Doran, 2000].

Для ряда культур было показано, что удвоение массы косматых корней в зависимости от вида растений и условий выращивания происходит за 1 - 9 суток и даже 33 суток у наиболее медленно растущих видов [Loyla-Vargas, de Lourdes Miranda-Nam, 1995]. При этом вполне естественно, что имеются и межклональные различия. Так, при создании культуры косматых корней дурмана было отобрано несколько наиболее быстро растущих линий со временем удвоения массы корней от 0,95 до 3,89 суток [Maldonado-Mendoza et al., 1993]. В отечественной литературе по косматым корням используется понятие ростовой индекс (РИ),

представляющий собой соотношение конечного веса сырых корней к исходному. Для некоторых ККК РИ может достигать за месяц значения 80 за счет удвоения массы корней в течение 24-48 часов [Кузовкина, Вдовитченко, 2012].

Все биореакторы для ККК можно разделить на три основных типа – жидкофазные, газофазные и гибридные. Жидкофазные биореакторы предполагают рост косматых корней в погруженном состоянии, где питательные вещества максимально доступны всей поверхности корней, но при этом дыхание корней затруднено ввиду относительно плохой растворимости газов (кислорода) в жидкостях. Обогащение питательной среды воздухом или подаваемой газовой смесью в одном из вариантов подобных биореакторов, называемых *Stirred*, осуществляется путем размешивания всей жидкости с помощью расположенного около дна биореакционной колонны некоего пропеллера. Собственно такие биореакторы «пришли» из суспензионной культуры клеток, а еще ранее из микробиологического производства, где их применение не вызывает поранения биологических объектов ввиду мелких размеров таковых. Однако подобные биореакторы не соответствуют всем требованиям, предъявляемым при культивировании косматых корней. Главным недостатком является имеющее место повреждение длинных и при этом сильно разветвленных довольно нежных корней, сопровождающееся в таких местах возникновением нежелательных каллусных структур, ухудшающим рост корней. Для исключения этого явления были применены модифицированные биореакторы, в которых зона вращения лопастей пропеллера и роста корней пространственно разделены. К неликвидируемым недостаткам *Stirred* биореакторов следует отнести сложность их конструкции, высокое потребление энергии, большой расход питательной среды, в которой постоянно находятся корни, что к тому же повышает риск развития контаминации. В качестве некоторых примеров использования *Stirred* биореакторов разных объемов для ККК можно привести ряд статей, в которых велась успешная наработка вторичных метаболитов из разных видов растений [Hilton, Rhodes, 1990; Kim, Yoo, 1993; Jeong et al., 2002; Srivastava, Srivastava, 2012 и др.].

Большой расход питательной среды присущ и другим вариантам жидкофазных биореакторов, также имеющих формы колонн, среди которых наиболее часто используемыми являются имеющие много общего, но несколько отличающиеся траекториями движения пузырьков воздуха *Bubble* и *Air-Lift* биореакторы, в которых, по сути,

происходит барботирование водной питательной среды пробулькиванием стерильных воздуха или газовой смеси, подаваемых снизу. Такие биореакторы не имеют движущихся частей и относительно дешевы в изготовлении. К их недостаткам следует отнести вспенивание, неоднородный рост корней в разных частях реактора, необходимость значительно увеличения объема подаваемого воздуха по мере разрастания корней. В целом ряде работ для наработки целевых продуктов в ККК разных растений с успехом использованы Bubble- и Air-Lift биореакторы [Kwok, Doran, 1995; Mukundan et al., 1998; Jolicoeur et al., 1999; Peraza-Luna et al., 2001; Kintzios et al., 2004; Caspeta et al., 2005 и др.].

Еще одним вариантом жидкофазного биореактора, также нашедшего применение в ККК является Wave-биореактор, представляющий собой емкость горизонтального типа, частично занятую питательной средой и имеющую воздушную полость. Периодическое покачивание краев такого биореактора обеспечивает перетекание слоя жидкости и, тем самым, давая возможность корням дышать. Сходный способ снабжения корней кислородом достигается за счет обогащения верхнего слоя жидкости во время вращения вокруг горизонтальной оси частично заполненного питательной средой биореактора барабанного (Drum) типа. Их недостатками являются все же довольно плохое снабжение корней кислородом и относительная сложность конструкций, предполагающих механические движения, что при масштабировании объемов таких биореакторов может вызывать дополнительные трудности. Тем не менее, испанские авторы успешно применили Wave-биореактор для культивирования косматых корней женьшеня [Palazon et al., 2003]. В биореакторах жидкофазного типа в целом ряде случаев для увеличения выхода целевых продуктов целесообразно использовать двухфазные системы, где одна фаза является органической, способствующей удалению растворяющихся в подобранном растворителе вторичных метаболитов из водной фазы [Buitelaar et al., 1991; Sim, Chang, 1993; Tikhomiroff et al., 2002; Srivastava, Srivastava, 2013 и др.].

Рост косматых корней в газовой фазе представляет собой вариант аэропной культуры, которая, впрочем, распространяется и на интактные растения [Weather, Zobel, 1992]. Косматые корни выращиваются в специальных в газифазных биореакторах, где их обеспечение кислородом близко к оптимальному. Основные различия между газифазными биореакторами заключаются в способах формирования и доставки к корням питательной

среды в мелкодисперсном виде, что достигается или с помощью ультразвука, и тогда это биореакторы туманного (Mist) типа, в котором диаметр капель обычно от 0,5 до 30 мкм, либо разбрызгиванием жидкости через мелкокапельные форсунки, генерирующие капли от 50 до 1000 мкм в диаметре. Последние модели носят наименование биореакторов дождевального (Spray; Sprinkle; Droplet) типа. Косматые корни в газифазных биореакторах размещаются на специальных сетках, расположенных вертикально или горизонтально, и такой способ загрузки стартового количества корней считается трудоемкой процедурой и отмечается в виде недостатка биореакторов подобного типа. Поскольку Mist-биореакторы обеспечивают эффективный рост косматых корней, то они довольно широко используются для многих видов растений [DiIorio et al., 1992; Chatterjee et al., 1997; Wyslouzil et al., 1997; 2000; Ranjan et al., 2009; Wang, Qi, 2010 и др.]. Уже упоминавшаяся возможность улучшения роста косматых корней за счет удаления из среды культивирования целевых продуктов в биореакторах преимущественно газифазных типов заключается в пропускании отработанной культуральной среды через ионообменные колонки, сорбирующие вторичные метаболиты [Shimomura et al., 1991; Muranaka et al., 1993; Суслов и др., 2010 и др.]. Отечественными учеными [Суслов и др., 2010] получен патент РФ на полезную модель в виде устройства для выращивания косматых корней, представляющего собой герметичную камеру типа шкафа с полками вместо которых имеются горизонтально расположенные рамки из натянутого перфорированного полипропилена, над каждой из которых размещено распылительное устройство, с резервуаром для питательной среды, системой трубопроводов со стерилизующими фильтрами, с помпой для откачки стекающей отработанной среды, прогоняющей эту жидкость через ионообменные колонки для извлечения из нее синтезированных вторичных метаболитов.

Гибридными биореакторами предлагают считать конструкции, которые до определенного этапа функционируют как жидкофазные, а затем их превращают в газифазные, извлекая максимум преимуществ из каждого варианта культивирования косматых корней. Так, например, в одной работе сначала в течение двух недель ККК дурмана выращивалась в жидкофазном Bubble-биореакторе колонного типа объемом 400 литров, затем в нем же был реализован вариант дождевального биореактора, что позволило увеличить продукцию косматых корней [Ramakrishana et al., 1994]. Недавно польскими авторами для культивирования косматых корней белены черной использован аналогичный

гибридный Bubble/Spray-биореактор, позволивший наработать целый спектр веществ вторичного происхождения [Jaremicz et al., 2014]. Также до некоторой степени гибридным биореактором можно считать конструкцию, в которой происходит попеременное временное погружение корней в жидкую фазу и затем нахождение их в газовой фазе [Afreeen, 2008]. Считается, что одним из положительных моментов использования таких биореакторов служит то, что в них исключается излишнее обводнение корней.

Отдельным направлением в «биореакторном движении» при культивировании косматых корней является использование биореакторов однократного применения. В таких реакторах для роста корней используются пластиковые емкости, изготавливаемые из полиэтилена, полипропилена, поликарбоната, полистирола, полиуретана, хлорвинила и других пластиков. Причем объемы таких емкостей могут варьировать от одного литра до, по крайней мере, 400 литров. Важным преимуществом использования биореакторов однократного применения является отсутствие необходимости проводить стерилизационные мероприятия. Фактически большинство основных типов биореакторов (имеется ввиду - принципов обеспечения питания корней и их дыхания) пригодно для однократного использования. Заинтересовавшемуся читателю можем порекомендовать недавний весьма детальный обзор по биореакторам однократного применения для культивирования клеток и тканей растений, включая косматые корни [Lehmann et al., 2014].

Здесь мы упомянули только основные типы биореакторов, используемых для культивирования косматых корней, однако многие из них имеют различные модификации, направленные на улучшение роста корней и повышение выхода целевых продуктов, ознакомиться с ними можно в огромном числе экспериментальных, а также обзорных статей. Часть этих работ, посвященных сравнительному анализу эффективности использования разных типов биореакторов для ККК различных растений, мы посчитали возможным здесь привести [Wilson et al., 1990; McKelvey et al., 1993; Nuutila et al., 1994; 1997; Kim et al., 2001; 2002; 2003; Jeong et al., 2003; Uozumi, 2004; Eibl, Eibl, 2008; Towler et al., 2008; Sharma, Shahzad, 2013; Stiles, Liu, 2013; Georgiev, 2014 и др.].

Поддержание и сохранение статуса культур косматых корней растений как продуцентов целевых продуктов метаболизма

Для выращивания косматых корней в промышленных масштабах крайне важно сохранение статуса изначально созданной культуры в плане

продукции целевых метаболитов в максимально достигнутых на научно-исследовательском этапе количествах. Для этого необходимо обеспечивать такие условия постоянного поддержания культуры косматых корней (роста корней) или ее длительного хранения (нахождения корней в анабиотическом состоянии), что основные характеристики по содержанию вторичных метаболитов должны оставаться неизменными, для чего существует несколько способов. При этом в литературе имеются сведения об успешном сохранении свойств косматых корней и при их обычном длительном выращивании и многочисленных пассажах. Так, сообщается, что культура косматых корней белены *Hyoscyamus muticus* [Flores, Filner 1985], ранее всех других использованная для наработки веществ вторичного происхождения, на протяжении 15 лет выдержала множество ежемесячных пассажей, сохранив все свои свойства, о чем было спустя полтора десятилетия сообщено одним из тех авторов [Flores et al., 1999]. Также сохранила стабильность ККК женьшеня, культивируемая в биореакторе жидкостного типа в течение 4-х лет с постоянными пересевами через 4-х недельные интервалы времени [Yoshikawa et al., 1993]. Более 5 лет поддерживалась мексиканскими авторами ККК дурмана, не потерявшая своих свойств [Maldonado-Mendoza et al., 1993].

Учитывая, что для роста косматых корней они сами обеспечивают себя нужными фитогормонами в соответствующих концентрациях, и не требуют их добавления извне, то, по всей видимости, это также служит дополнительным фактором уверенного поддержания их исходного или точнее приданного им статуса. И вообще, корни в целом более стабильны в своем росте, нежели наземные органы и производные последних – каллусы, суспензионные культуры. Здесь будет уместно напомнить, что еще в середине 30-х гг. прошлого столетия было показано, что культура отсеченных обычных корней томатов в стерильных условиях без каких-либо проблем поддерживалась более года и выдержала свыше полусотни пассажей [White, 1934]. Простой способ довольно длительного поддержания жизнеспособности косматых корней предложили японские авторы [Nagatome et al., 2000], затормозив их рост путем снижения содержания сахарозы в питательной среде с 3 до 0,25%, в результате чего через 600 дней корни сохранили свой ростовой потенциал и способность интенсивного ветвления, при возвращении их к нормальным условиям роста.

Альтернативой такому поддержанию ККК в постоянно растущем состоянии служит длительное хранение кусочков косматых корней при температуре жидкого азота, переход к которой осуществляется

различными способами, рассмотренными в ряде обзоров [Sakai, Engelmann, 2007; Kaczmarczyk et al., 2012]. Главный принцип обеспечения жизнеспособности растительных тканей в таких условиях это предотвращения льдообразования, способного повредить клетки, что достигается частичной заменой воды на различные осмопротектанты.

Наиболее часто для косматых корней применяется витрификация или стеклование, заключающаяся в быстром замораживании предварительно подготовленного (пропитанного осмопротектантами) растительного материала в виде 5-10 мм кусочков корней непосредственно в жидком азоте. В качестве осмопротектанта чаще всего служит смесь PVS2 (30% глицерин, 15% этиленгликоль, 15% диметилсульфоксид в питательной среде с 0,15 М сахарозой), предложенная еще в 1990 г. японскими авторами [Sakai et al., 1990]. С помощью такого подхода осуществлена успешная криоконсервация косматых корней целого ряда видов растений – васабии японской, женьшеня, белладонны, мезы *Maesa lanceolata*, марены, люцерны [Matsumoto et al., 1994; Yoshimatsu et al., 1996; Touno et al., 2006; Lambert, Geelen, 2007; Lambert et al., 2009; Park et al., 2014]. Процент выживших косматых корней для разных видов достигал 60, 83 и даже 90%. Используются также различные модификации метода витрификации, в одном из которых, названному витрификацией в каплях, подготовленные кусочки корня раскладывают на алюминиевой фольге и покрывают каплями той же осмопротекторной среды и в таком виде погружают в жидкий азот. Подобный подход применен для марены и для гибридов розоцветных косточковых [Kim et al., 2010; 2012; Ruzic et al., 2013].

Другим способом криоконсервации растительных тканей служит инкапсуляция в альгинате натрия, сопровождаемая его желированием под действием хлористого кальция и дегидратацией в эксикаторе над слоем силикагеля. С помощью этого метода законсервированы КК хрена, одного из видов барвинка, полыни, мезы и люцерны [Hirata et al., 1998; 2002; 2002a; Lambert et al., 2009; Sharaf et al., 2011]. Комбинация инкапсуляции и дегидратации вкупе с витрификацией, используемая для криоконсервации косматых корней достаточно широко, позволила хранить КК следующих видов растений – хрена, астрагала, рукколы, горечавки, полыни, марены [Hirata et al., 2002a; Xue et al., 2008; Sharaf et al., 2011; Shin et al., 2014].

Помимо способов быстрого замораживания косматых корней в жидком азоте в литературе описаны подходы, где с помощью специальных программируемых криостатов производится понижение температуры в заданном режиме и только

после плавного достижения, например температуры -30°C следует перевод на -196°C , путем погружения в жидкий азот. Таким способом сохранены КК свеклы, махорки и полыни [Benson, Hamill, 1991; Teoh et al., 1996].

Не столько для длительного хранения культур растительных тканей, сколько для их размножения предназначена технология создания искусственных семян с заключением их в гелеобразную оболочку из альгината натрия, желируемого в присутствии хлористого кальция [Redenbaugh et al., 1986; Fujii et al., 1987]. При помощи этой технологии из отрезков косматых корней созданы искусственные семена ряда видов растений – хрена, шлемника байкальского, руты душистой [Uozumi et al., 1992; Repunte et al., 1995; Вдовитченко, Кузовкина, 2011; 2011a].

Коммерческое применение культур косматых корней

Для начала приведем ориентировочные стоимости некоторых упомянутых в данной статье вторичных метаболитов и ряда других, нарабатываемых в культурах растительных клеток, в том числе косматыми корнями. Так, стоимость шиконина составляет около 5 тыс. долларов за кг. Артемизинин значительно дешевле – около 500 долларов за кг. 1 кг противоракового препарата таксола или паклитаксела из культуры тиса стоит около 0,6 млн. долларов. Подсчитано, что в США ежегодно для борьбы с раком требуется около 250 кг Таксола. Для получения такого количества потребовалось бы ободрать кору с 360 тысяч деревьев тиса. Наиболее дорогими являются нарабатываемые в культуре барвинка розового *Catharanthus roseus* препараты, применяемые при лечении лейкемии – винбластин и винкристин, стоимость которых за 1 кг достигает 1 млн. и 3 млн. долларов соответственно. В США годовой объем рынка только трех десятков основных фармацевтических препаратов, добываемых из 29 видов растений, по недавним оценкам составляет 25 миллиардов долларов [De Luca et al., 2012] и можно смело предполагать, что он будет лишь расти. Так, согласно прогноза американского ресурса Molecular Farming, приведенного на их главной web-странице (<http://www.molecularfarming.com>), к 2025 г. в мире стоимость одних рекомбинантных белков, нарабатываемых растениями, составит 80 миллиардов долларов. Можно предположить, что немалая часть этих средств придется на долю продуктов, продуцируемых косматыми корнями. По прогнозу другого американского консалтингового агентства IndustryARC (<http://industryarc.com/Report/1285/Plant-Extracts-Market-Analysis.html>) ожидается, что с 41,5 млрд. долларов в 2014 г. при среднегодовом темпе

роста с учетом сложного процента (CAGR - Compound Annual Growth Rate) в 11,4% уже к 2020 году глобальный рынок различных фитосоединений, экстрагируемых из растений, составит более 79 млрд. долларов и в этом случае, конечно же, не удастся обойтись без культуры косматых корней.

Выше мы уже отмечали превосходство культивирования тканей растений по сравнению с природными растениями в наработке шиконина, для чего можно даже вывести такую формулу или пропорцию - 18 га × 4 года = 750 (600) литров × 2 недели. Вот такая арифметика получается. И это только по выходу конечного продукта. А если учитывать отнюдь недешевые трудозатраты при получении сырья в полевых условиях, включающих посев, выращивание, а затем сбор урожая и его первичную переработку для доведения до стадии экстракции самого шиконина, рекультивацию земли, то рентабельность такого производства данного вторичного метаболита становится вообще несравнимой с культивированием в биореакторе. Поэтому в мире немало компаний, специализирующихся на получении вторичных метаболитов растений биотехнологическим путем в культуре клеток, тканей и органов. Это японские Nitto Denka, Nippon Shinyaku; швейцарская ROOTec, французская Root Lines Technology; южнокорейская CBNBiotech, а также компании из США – ESCAgenetics Corp., Phytion Biotech, последняя имеет филиалы в Германии и Канаде.

Phytion Biotech является одним из пионеров коммерческого применения культур растительных клеток. Основав производство в 1990 г., в 1993 г. Фирма Phytion Biotech приобрела производственную базу в Германии, ставшую крупнейшим заводом в мире с биореакторами до 75 тысяч литров. В 2009 г. у Phytion Biotech появилось производство и в Канаде. В настоящее время Phytion Biotech является крупнейшим производителем паклитаксела (Таксола), для полусинтеза которого в культуре тканей растений ими производится 10-деацетилбаккатин III.

Швейцарская фирма ROOTec из косматых корней 16 разных видов растений производит вторичные метаболиты, среди которых атропин, камптотедин, анабазин, витамин D3, байкалин и др. Для выращивания косматых корней этой фирмой используются Mist-биореакторы собственной конструкции. Корейская CBNBiotech выращивает и поставляет косматые корни женьшеня, а также порошок из них. Французская Root Lines Technology специализируется на продукции в косматых корнях различных рекомбинантных белков. В России, насколько нам известно, косматые корни никаких растений в промышленных масштабах не выращиваются, хотя, например, сотрудниками

Института физиологии растений РАН получен патент Российской Федерации на культуру косматых корней копеечника чайного *Hedysarum theinum* – продуцента характерных и для корней нативного растения изофлавонов: ононина, гликозида тексазина, малонилононина, формононетина [Кузовкина и др., 2009]. Ими же с участием коллег из Томска [Суслов и др., 2010] в Российской Федерации запатентовано упомянутое выше в главе про биореакторы устройство для выращивания косматых корней, однако в настоящее время данный патент РФ на полезную модель перестал поддерживаться.

Заключение

История исследований косматых корней уходит своими корнями вглубь двадцатого века, начавшись в самом начале столетия с изучения феномена «hairy roots» у яблонь. Почти десятилетие потребовалось, чтобы понять, что причиной образования косматых корней является некая почвенная бактерия. И только через семь десятилетий, в начале 80-х годов прошлого века, стали ясны в общих чертах молекулярные основы развития у растений этого заболевания бактериальной природы. Было обнаружено, что почвенная агробактерия *A. rhizogenes* трансформирует растения так называемыми *rol*-генами, что и приводит к неопластическому плагиотропному разрастанию корней, фактически соответствующих ювенильному растению. Необходимо отметить, что в отличие от довольно хорошо изученного механизма образования корончатых галлов другой агробактерией *A. tumefaciens*, различные аспекты молекулярных основ фенотипического проявления *rol*-генов во многом остаются не совсем понятными. Но первоначально ризогенная бактерия нашла даже более широкое применение в генной инженерии и биотехнологии растений, нежели *A. tumefaciens*, и часть первых трансгенных растений была получена с использованием именно *A. rhizogenes*. В настоящее время экспериментаторы по всему миру применяют в фундаментальных и прикладных исследованиях для получения косматых корней не менее 90 штаммов *A. rhizogenes*. Некоторые из них используются довольно редко, тогда как другие можно считать гораздо более «популярными». При этом в подавляющем большинстве работ использованы два агропиновых штамма: ATCC15834 и A4, отличающиеся довольно высокой степенью вирулентности.

В первой половине 80-х годов XX века было предложено использовать культуры косматых корней в качестве продуцентов различных биологически активных веществ, среди которых розмариновая кислота, артемизинин, байкалин, аконитин,

антрахинон и многие многие другие вторичные метаболиты. При этом КК находят применение не только как продуценты биологически активных веществ в конечном виде, но используются еще и как источники предшественников различных соединений, которые могут быть затем задействованы в дальнейших химических преобразованиях.

К настоящему времени введены в культуру косматые корни нескольких сотен видов растений, причем немалая часть из них относится к хозяйственно-ценным. Некоторым сдерживающим фактором для получения с помощью косматых корней еще более широкого круга биологически активных веществ остается отсутствие у них вторичного роста, что могло бы быть у них давать в ряде случаев в ККК увеличенный выход целевых продуктов метаболизма, поскольку известно, что активность продукции веществ вторичного происхождения часто возрастает именно в корнях, характеризующихся вторичным ростом. В связи с этим являются весьма актуальными исследования, направленные на индукцию деления камбиальных клеток и возникновение вторичного роста у косматых корней.

Не в полной мере реализованными на практике остаются различные методы индуцирования продукции вторичных метаболитов в культурах косматых корней и их секреции в культуральную среду. Дополнительный интерес представляет возможность получения культур фотоавтотрофных зеленых косматых корней, которые для своего роста способны теоретически обходиться меньшим количеством питательных веществ в культуральной среде, а также характеризоваться увеличенными промежутками времени между пассажами.

Одной из проблем является необходимость сохранения косматых корней длительное время без постоянных пассажей. На данный момент предложено немало методов поддержания и сохранения статуса созданной культуры косматых корней, однако исследования в этой области должны быть обязательно продолжены с целью разработки еще более совершенных методов как криохранения, так и других способов сохранения культур корней.

В настоящее время разработано множество вариантов специальных биореакторов для промышленного выращивания культур косматых корней. Основным недостатком большинства биореакторов остается их дороговизна и сложность, поэтому существует необходимость в конструировании более дешевых и простых в эксплуатации биореакторов.

Несмотря на то, что в мире немало фирм, занимающихся получением вторичных метаболитов растений биотехнологическим путем в культурах клеток, тканей и органов в коммерческих целях, среди

них лишь единичные компании специализируются на использовании для этого ККК. Таким образом, существует огромный потенциал роста данного сегмента этого рынка. В России культурам косматых корней до сих пор не уделяется должного внимания. Лишь несколько научных групп по всей России ведут фундаментальные и прикладные исследования, используя, в том числе, в качестве модельных объектов КК. При этом успешно реализованные в этой области коммерческие проекты в России и вовсе отсутствуют.

Предваряя список литературы, хотим заметить, что помимо 450 процитированных в данной статье работ, для ее написания прочитано еще не менее 300 экспериментальных и обзорных публикаций, большинство из которых хотя и несли важную информацию, но не укладывались в очерченные нами рамки материала этой обзорной статьи по косматым корням растений. Из них около 220 работ составили статьи, из которых мы получили информацию об использованных разными авторами штаммах *A. rhizogenes*, также не считая возможного их процитировать, ввиду и так чрезмерно большого списка использованной литературы. Тем не менее, все эти работы помогли нам самим составить более полное представление о КК и о ККК. В этой связи просим тех авторов, чьи, безусловно, интересные работы по косматым корням не вошли в данный список, отнестись к этому с пониманием.

Использованная литература

1. Благова Д.К., Вершинина З.Р., Оркодашвили А.М., Баймиев Ал.Х. Создание новых ассоциативных симбиозов между томатом и ризобиями // Вестник БГАУ. 2013. Т. 26. С. 7-10.
2. Вершинина З.Р., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. Симбиотические реакции корней облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) трансгенных по гену лектина гороха посевного // Физиология растений. 2010. Т. 57. С. 108-116.
3. Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х., Благова Д.К., Князев А.В., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Биоинженерия симбиотических систем: создание новых ассоциативных симбиозов с помощью лектинов на примере табака и рапса // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. № 3. С. 336-342.
4. Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Благова Д.К., Оркодашвили А.М., Баймиев Ал.Х. Искусственная ассоциативная симбиотическая система рапса с ризобиями для защиты от фитопатогенов // Известия Самарского научного центра Российской

- академии наук. 2013. Т.15. №3(5). С. 1579-1582.
5. Владимиров И.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Гены биосинтеза и катаболизма опинов *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* // Генетика. 2015. Т.51. С. 137-146. Дрейпер Дж. и др. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991. 408 с.
 6. Кузовкина И.Н. Культивирование генетически трансформированных корней растений: возможности и перспективы использования в физиологии растений // Физиология растений. 1992. Т.39. С.1208-1214.
 7. Кузовкина И.Н. Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А. Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции // Физиология растений. 2001. Т.48. М.523-528.
 8. Кузовкина И.Н., Альтерман И.Е., Карандашов В.Е. Генетически трансформированные корни растений как модель изучения специфики метаболизма и симбиотических контактов корневой системы // Изв. АН, сер. биологическая. 2004. Т. 3. С. 310-318.
 9. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 787-797.
 10. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю., Альтерман И.Е., Гусева А.В. Культура корня *Hed.th. (Hedysarum thenium Kransnob.)* – продуцент изофлавонов / Патент РФ. 2009. № 2360964.
 11. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Ковач Д., Сёке Е., Вдовитченко М.Ю. Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 90-96.
 12. 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.
 13. Кузовкина И.Н., Прокофьева М.Ю., Умралина А.Р., Чернышева Т.П. Морфологические и биохимические особенности генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 1-11.
 14. Лавина А.М., Нигматуллина Л.Р., Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Создание ассоциативных симбиотических систем огурца с ризобиями // Бюллетень Оренбургского научного центра Уро РАН. – 2014. - № 3.
 15. Мазник К.С., Матвеева Н.А. Оптимизация екстрагування фруктанів із культивованих *in vitro* «бородатих» коренів цикорію // *Biotechnologia Acta*. 2013. Т.6. С.83-88.
 16. Мантрова О.В., Кузовкина И.Н., Дунаева М.В., Шнайдер Б., Мюллер-Ури Ф. Влияние метилового эфира жасмоновой кислоты на синтез антрахинонов в культуре генетически трансформированных корней марены красильной. Физиология растений. 1999. Т.46. С.276-279.
 17. Матвеева Н.А., Кіщенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В. Синтез інуліну в "бородатих коренях" цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // БІОТЕХНОЛОГІЯ. 2011. Т. 4. С.56-63.
 18. Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Герасименко І.М., Кваско О.Ю., Кучук Н.В. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Біополімери і клітина. 2009. Т. 25. С. 120-125.
 19. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010. Т.5. С.8–28.
 20. Оркодашвили А.М., Вершинина З.Р., Нигматуллина Л.Р., Лутфуллин А. З., Баймиев Ал.Х. Создание новых ассоциативных симбиозов между сладким перцем и ризобиями, обладающими фунгистатической активностью // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием "Современные проблемы биохимии и биотехнологии". Уфа. 2013. С. 143-147.
 21. Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. Т.2. М.: Мир, 1900. 344 с., ил.

22. Рукавцова Е.Б., Абрамихина Т.В., Шульга Н.Я., Быков В.А., Бурьянов Я.И. Тканеспецифическая экспрессия поверхностного антигена вируса гепатита В в клетках трансгенных растений и культуры тканей // Физиология растений. 2007. Т.54. С.864-869.
23. Суслов Н.И., Нецадимова И.И., Кузовкина И.Н. Устройство для биотехнологического выращивания растительных эксплантов. Патент на полезную модель РФ. 2011. №103533.
24. Хадеева Н.В., Майсурян А.Н., Бобкова А.Ф. Образование пероксидазы в культуре ткани хрена // Физиология растений. 1993. Т.40. С. 295-299.
25. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложно-положительных результатов при проведении полимеразной цепной реакции // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2012. Т. 8. С. 34-45.
26. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Нагаев Н.Р., Вахитов В.А. Причины ложно-негативной ПЦР и недопущение некоторых из них // Биомика. 2012а. Т.4. С.31-47.
27. Чумаков М.И. Белковый аппарат, реализующий горизонтальный перенос Т-ДНК из агробактерий в эукариотические клетки (Обзор) // Биохимия. 2013. Т.78. С.1670-1683.
28. Abdin M.Z., Israr M., Rehman R.U., Jain S.K. Artemisinin, a novel antimalarial drug: biochemical and molecular approaches for enhanced production // Planta Med. 2003. V. 69. P. 289-299.
29. Abel U., Koch C., Speitling M., Hansske F.G. Modern methods to produce natural-product libraries // Curr. Opin. Chem. Biol. 2002. V. 6. P. 453-458.
30. Aberle N.S., Ganesan A., Lambert J.N., Saubern S., Smith R. Parallel modification of tropane alkaloids // Tetrahedron Lett. 2001. V. 42. P. 1975-1977.
31. Ackermann C. Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes*-tumoren an *Nicotiana tabacum* // Plant Sci. Lett. 1977. V. 8. P. 23-30.
32. Afreen F. Temporary immersion bioreactor. In: Gupta S.D., Ibaraki Y. (eds.) Plan Tissue Culture Engineering. Springer Netherlands. 2006. P. 187-201.
33. Agostini E., Hernández-Ruiz J., Arnao M.B., Milrad S.R., Tugier H.A., Acosta M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits // Biotechnol. Appl. Biochem. 2002. V.35. P.1-7.
34. Agostini E., Talano M.A., González P.S., Oller A.L., Medina M.I. Application of hairy roots for phytoremediation: what makes them an interesting tool for this purpose? // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. P. 1017-1030.
35. Ahlawat S., Saxena P., Alam P., Wajid S., Abdin M.Z. Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. // J. Plant Interact. 2014. V. 9. P. 811-824.
36. Ahlawat S., Saxena P., Ram M., Alam P., Nafis T., Mohd A., Abdin M.Z. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots for enhanced production of artemisinin in *Artemisia annua* L. plants // Afr. J. Biotechnol. 2012. V. 11. P. 8684-8691.
37. Akasaka Y., Mii M., Daimon H. Morphological alterations and root nodule formation in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transgenic hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea* L.) // Ann. Bot. 1998. V. 81. P. 355-362.
38. Alpizar E., Dechamp E., Espeout S., Royer M., Lecouls A.C., Nicole M., Bertrand B., Lashermes P., Etienne H. Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. P. 959-967.
39. Al-Shalabi Z., Doran P.M. Metal uptake and nanoparticle synthesis in hairy root cultures // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2013. V. 134. P. 135-153.
40. Anderson A.R. Taxonomy and host specificity of the genus *Agrobacterium*. Thesis/dissertation: Manuscript Archival Material: English. 1977.
41. Anderson A.R., Moore L.W. Host specificity in the genus *Agrobacterium* // Phytopathology. 1979. V. 69. P. 320-323.
42. Angelini V.A., Agostini E., Medina M.I, González P.S. Use of hairy roots extracts for 2,4-DCP removal and toxicity evaluation by *Lactuca sativa* test // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2014. V. 21. P. 2531-2539.
43. Araujo B., Charlwood B.V., Pletsch M. Tolerance and metabolism of phenol and chloroderivatives by hairy root cultures of *Daucus carota* L. // Environ. Pollut. 2002. V.117. P. 329-335.
44. Ark P.A., Thompson J.P. Detection of hairy root pathogen, *Agrobacterium rhizogenes*, by the use

- of fleshy roots // *Phytopathology*. 1961. V.51. P. 69-71.
45. Ashikawa I., Fukuzawa A., Murai A., Kamada H., Koshi M. Production of potato cyst nematode hatching stimulus by hairy root cultures of tomato // *Agric. Biol. Chem.* 1991. V. 55. P. 2025-2029.
 46. Babakov A.V., Bartova L.M., Dridze I.L., Maisuryan A.N., Margulis G.U., Oganian R.R., Voblikova V.D., Muromtsev G.S. Culture of transformed horseradish roots as a source of fusicoccin-like ligands // *J. Plant Growth Regul.* 1995. V. 14. P. 163-167.
 47. Bais H.P., Dattatreya B.S., Ravishankar G.A. Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. under the influence of fungal elicitors and their analysis using solid-phase micro extraction gas chromatography–mass spectrometry // *J. Sci. Food. Agr.* 2003. V. 83. P. 769–774.
 48. Bais H.P., Govindaswamy S., Ravishankar G.A. Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V. 90. P. 648-53.
 49. Bais H.P., Sudha G., Ravishankar G.A. Putrescine influences growth and production of coumarins in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local) // *J. Plant Growth Regul.* 1999. V. 18. P. 159-165.
 50. Balasubramanian A., Venkatachalam R., Selvakesavan K.R., Mary A.S., Gherbi H., Svistoonoff S., Franche C., Bogusz D., Kumar N.K., Nambiar-Veetil M. Optimisation of methods for *Agrobacterium rhizogenes* mediated generation of composite plants in *Eucalyptus camaldulensis* // *BMC Proc.* 2011. V. 5: O45.
 51. Banerjee S., Singh S., Ur Rahman L. Biotransformation studies using hairy root cultures - A review // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. P. 461-468.
 52. Bányai P., Kuzovkina I.N., Kursinszki L., Szőke É. HPLC Analysis of alizarin and purpurin produced by *Rubia tinctorum* L. hairy root cultures // *Chromatographia*. 2006. V. 63. P. S111-S114.
 53. Bauer N., Kiseljak D., Jelaska S. The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots // *Biol. Plantarum*. 2009. V. 53. P. 650-656.
 54. Benabdoun M., Nambiar-Veetil M., Imanishi L., Svistoonoff S., Ykhlef N., Gherbi H., Franche C. Composite actinorhizal plants with transgenic roots for the study of symbiotic associations with *Frankia* // *J. Bot.* 2011. Article ID 702947.
 55. Benson E.E., Hamill J.D. Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* // *Plant Cell Tiss. Org.* 1991. V. 24. P. 163-172.
 56. Besumbes O., Sauret-Güeto S., Phillips M.A., Imperial S., Rodríguez-Concepción M., Boronat A. Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis* for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 88. P. 168-175.
 57. Bhadra R., Morgan J.A., Shanks J.V. Transient studies of light-adapted cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*: growth and indole alkaloid accumulation // *Biotechnol. Bioeng.* 1998. V. 60. P. 670-678.
 58. Binder B.Y., Peebles C.A., Shanks J.V., San K.Y. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots // *Biotechnol. Prog.* 2009. V. 25. P. 861-865.
 59. Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Bécard G., Rosenberg C., Barker D.G. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2001. V.14. P. 695-700.
 60. Bonaldi K., Gherbi H., Franche C. Bastien G. Fardoux J., Barker D., Giraud E., Cartieaux F. The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway: development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica* // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2010. V. 23. P. 1537-1544.
 61. Borovaya M.N., Naumenko A.P., Matvieieva N.A., Blume Y.B., Yemets A.I. Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture // *Nanoscale Res. Lett.* 2014. V. 9. P. 686.
 62. Bosselut N., Van Ghelder C., Claverie M., Voisin R., Onesto J.P., Rosso M.N., Esmenjaud D. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 1313-1326.
 63. Buitelaar R.M., Langenhoff A.A.M., Heidstra R., Tramper J. Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors // *Enzyme Microb. Tech.* 1991. V. 13. P. 487–494.

64. Bulgakov V.P. Functions of rol genes in plant secondary metabolism // *Biotechnol. Adv.* 2008. V. 26. P. 318-324.
65. Bulgakov V.P., Avramenko T.V. New opportunities for the regulation of secondary metabolism in plants: focus on microRNAs // *Biotechnol. Lett.* 2015. V. 37. P. 1719-1727.
66. 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. 1-22.
67. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpenchenko T.Y., Inyushkina Y.V. Application of *Agrobacterium rol* genes in plant biotechnology: a natural phenomenon of secondary metabolism regulation. In: Alvarez M. (ed.) *Genetic Transformation*. InTech, Rijeka. 2011. P. 261-271.
68. Cai Z., Kastell A., Knorr D., Smetanska I. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures // *Plant. Cell Rep.* 2012. V. 3. P. 461-477.
69. Canadell J., Jackson R.B., Ehleringer J.B., Mooney H.A., Sala O.E., Schulze E.-D. Maximum rooting depth of vegetation types at the global scale // *Oecologia*. 1996. V. 108. P. 583-595.
70. Canto-Canché B., Loyola-Vargas V.M. Chemicals from roots, hairy roots, and their application // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999. V. 464. P. 235-275.
71. Cao D., Hou W., Liu W., Yao W., Wu C., Liu X., Han T. Overexpression of TaNHX2 enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants // *Plant Cell Tiss. Org.* 2011. V. 107. P. 541-552.
72. Cao Q., Den Camp R.O., Kalhor M.S., Bisseling T., Geurts R. Efficiency of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation of *Parasponia* and *Trema* is temperature dependent // *Plant Growth Regul.* 2012. V. 68. P. 459-465.
73. Carlín A.P., Tafroy F., Solís A.G.A., Pérez-Molphe-Balch E. Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species // *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant.* 2015. V. 51. P. 332-339.
74. Caspeta L., Quintero R., Villarreal M.L. Novel airlift reactor fitting for hairy root cultures: developmental and performance studies // *Biotechnol. Prog.* 2005. V. 21. P. 735-740.
75. Chandra S., Chandra R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots // *Phytochemistry Rev.* 2011. V. 10. P. 371-395.
76. Chashmi N.A., Sharifi M., Karimi F., Rahnama H. Differential production of tropane alkaloids in hairy roots and in vitro cultured two accessions of *Atropa belladonna* L. under nitrate treatments // *Z. Naturforsch. C.* 2010. V. 65. P. 373-379.
77. Chatterjee C., Correll M.J., Weathers P.J., Wyslouzil B.E., Walcerz D.B. Simplified acoustic window mist bioreactor // *Biotechnol. Techn.* 1997. V. 11. P. 155-158.
78. Cheng Q., Su P., Hu Y., He Y., Gao W., Huang L. RNA interference-mediated repression of SmCPS (copalyl diphosphate synthase) expression in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* causes a decrease of tanshinones and sheds light on the functional role of SmCPS // *Biotechnol. Lett.* 2014. V. 36. P. 363-369.
79. Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempé J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells // *Nature*. 1982. V. 295. P. 432-434.
80. Christey M.C., Braun R.H. Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // *Methods Mol. Biol.* 2005. V. 286. P. 47-60.
81. Ciau-Uitz R., Miranda-Ham M.L., Coello-Coello J., Chí B., Pacheco L.M., Loyola-Vargas V.M. Indole alkaloid production by transformed and non-transformed root cultures of *Catharanthus roseus* // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.* 1994. V. 30. P. 84-88.
82. Clemow S.R., Clairmont L., Madsen L.H., Guinel F.C. Reproducible hairy root transformation and spot-inoculation methods to study root symbioses of pea // *Plant Methods.* 2011. V. 7. P. 46.
83. Collier R., Fuchs B., Walter N., Kevin Lutke W., Taylor C.G. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology // *Plant J.* 2005. V. 43. P. 449-457.
84. Colpaert N., Tilleman S., van Montagu M., Gheysen G., Terryn N. Composite *Phaseolus vulgaris* plants with transgenic roots as research tool // *Afr. J. Biotechnol.* 2008. V. 7. P. 404-408.
85. Condori J., Nopo-Olazabal C., Medrano G., Medina-Bolivar F. Selection of reference genes for qPCR in hairy root cultures of peanut // *BMC Res Notes.* 2011. V. 4. P. 392.

86. Costantino P., Capone I., Cardarelli M., De Paolis A., Mauro M.L., Trovato M. Bacterial plant oncogenes: the rol genes' saga // *Genetica*. 1994. V.94. P.203-211.
87. Cragg G.M., Grothaus P.G., Newman D.J. New horizons for old drugs and drug leads // *J. Nat. Prod.* 2014. V. 77. P. 703–723.
88. Cragg G.M., Newman D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1830. P. 3670-3695.
89. Davioud E., Kan C., Hamon J., Tempé J., Husson H.-P. Production of indole alkaloids by in vitro root cultures from *Catharanthus trichophyllus* // *Phytochemistry*. 1989. V. 28. P. 2675-2680.
90. Dawson R.F. The localization of the nicotine synthetic mechanism in the tobacco plant // *Science*. 1941. V. 94. P. 396-397.
91. De Araujo B.S., Dec J., Bollag J.M., Pletsch M. Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare* // *Chemosphere*. 2006. V. 63. P. 642-651.
92. De Cleene M., De Ley J. The host range of infectious hairy-root // *The Bot. Rev.* 1981. V.47. P. 147-194.
93. De Guzman G., Walmsley A.M., Webster D.E., Hamill J.D. Hairy roots cultures from different Solanaceous species have varying capacities to produce *E. coli* B-subunit heat-labile toxin antigen // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. P. 2495-2502.
94. De Jesus-Gonzalez L., Weathers P. J. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids // *Plant Cell Rep.* 2003. V. 21. P. 809-813.
95. De Luca V., Salim V., Atsumi S.M., Yu F. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making // *Science*. 2012. V. 336. P. 1658-1661.
96. Deng Y., Mao G., Stutz W., Yu O. Generation of composite plants in *Medicago truncatula* used for nodulation assays // *J. Vis. Exp.* 2011. V. 49. P. 2633.
97. Desoignies N., Legreve A. In vitro dual culture of *Polymyxa betae* in *Agrobacterium rhizogenes* transformed sugar beet hairy roots in liquid media // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2011. V. 58. P. 424-425.
98. Dilorio A.A., Cheetham R.D., Weathers P.J. Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor: reactor performance and evaluation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992. V. 37. P. 457-462.
99. Diouf D., Gherbi H., Prin Y., Franche C., Duhoux E., Bogusz D. Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: a system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree // *Mol. Plant Microbe Interact.* 1995. V. 8. P. 532-537.
100. Dolatabadian A., Modarres Sanavy S.A., Ghanati F., Gresshoff P.M. *Agrobacterium rhizogenes* transformed soybean roots differ in their nodulation and nitrogen fixation response to genistein and salt stress // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 29. P. 1327-1339.
101. Du M., Wu X.J., Ding J., Hu Z.B., White K.N., Branford-White C.J. Astragaloside IV and polysaccharide production by hairy roots of *Astragalus membranaceus* in bioreactors // *Biotechnol Lett.* 2003. V. 25. P. 1853-1856.
102. Du W. Towards new anticancer drugs: a decade of advances in synthesis of camptothecins and related alkaloids // *Tetrahedron*. 2003. V. 59. P. 8649–8687.
103. Eapen S., Suseelan K.N., Tivarekar S., Kotwal S.A., Mitra R. Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor* // *Environ. Res.* 2003. V. 91. P. 127-133.
104. Eibl R., Eibl D. Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures // *Phytochem. Rev.* 2007. V. 7. P. 593-598.
105. Engler G., Holsters M., Van Montagu M., Schell J., Hernalsteens J.P., Schilperoort R. Agrocin 84 sensitivity: a plasmid determined property in *Agrobacterium tumefaciens* // *Mol. Gen. Genet.* 1975. V. 138. P. 345–349.
106. Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Díaz-Camino C., Santana O., Murillo E., Guillén G., Sánchez-Guevara N., Acosta J., Quinto C., Li D., Gresshoff P.M., Sánchez F. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus spp.*: a tool for functional genomics // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2006. V. 19. P. 1385-1393.
107. Estrada-Navarrete G., Alvarado-Affantranger X., Olivares J.E., Guillén G., Díaz-Camino C., Campos F., Quinto C., Gresshoff P.M., Sanchez F. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus spp.* by *Agrobacterium rhizogenes* // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 1819-1824.
108. Faria J.M., Nunes I.S., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Trindade H., Barroso J.G. Biotransformation of menthol and geraniol by hairy root cultures of *Anethum graveolens*: effect

- on growth and volatile components // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 897-903.
109. Farrand S.K., Van Berkum P.B., Oger P. *Agrobacterium* is a definable genus of the family *Rhizobiaceae* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003. V. 53. P. 1681-1687.
 110. Fattahi M., Nazeri V., Torras-Claveria L., Sefidkon F., Cusido R.M., Zamani Z., Palazon J. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC-DAD-ESI-MS // *Food Chem.* 2013. V.141. P.139-146.
 111. Flocco C.G., Giuletta M. Effect of chitosan on peroxidase activity and isoenzyme profile in hairy root cultures of *Armoracia lapathifolia* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2003. V.110. P.175-183.
 112. Flores H.E., Dai Yr., Cuello J.L., Maldonado-Mendoza I.E., Loyola-Vargas V.M. Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ // *Plant Physiol.* 1993. V. 101. P. 363-371.
 113. Flores H.E., Filner P. Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of *Solanaceae*. In: Neumann K.-H., Barz W., Reinhard E. (eds.) *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Springer Berlin Heidelberg. 1985. P. 174-185.
 114. Flores H.E., Hoy M.W., Pickard J.J. Secondary metabolites from root cultures // *Trends Biotechnol.* 1987. V. 5. P. 64-69.
 115. Flores H.E., Vivanco J.M., Loyola-Vargas V.M. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism // *Trends Plant Sci.* 1999. V. 4. P. 220-226.
 116. Fujii J.A.A., Slade D.T., Redenbaugh K., Walker K.A. Artificial seeds for plant propagation // *Trends Biotechnol.* 1987. V. 5. P. 335-339.
 117. Fujita Y. Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures. In: Bajaj Y.P.S. (ed.) *Medicinal and Aromatic Plants I*. Springer Berlin Heidelberg. 1988. P. 225-236.
 118. Fujita Y., Hara Y., Suga C., Morimoto T. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*: II. A new medium for the production of shikonin derivatives // *Plant. Cell. Rep.* 1981. V.1. P. 61-63.
 119. Gafni Y., Levy Y. Coniferyl alcohol, a lignin precursor, stimulates *Rhizobium rhizogenes* A4 virulence // *Curr. Microbiol.* 2005. V. 50. P. 262-265.
 120. Gandhi S.G., Mahajan V., Bedi Y.S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants // *Planta.* 2015. V. 241. P.303-317.
 121. Gangopadhyay M., Dewanjee S., Bhattacharya S. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures // *J. Biosci. Bioeng.* 2011. V. 111. P. 706-710.
 122. Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N., Raskin I. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots // *Plant. Cell. Rep.* 2003. V. 12. P. 1188-1193.
 123. Gautheret R.J. Plant tissue culture: the history. In: Laimer M., Rucker W. (eds.) *Plant Tissue Culture*. Springer Vienna. 2003. P. 105-113.
 124. Georgiev M.I. Design of bioreactors for plant cell and organ cultures. In: Paek K-Y, Hosakatte N.M., Zhong J.-J. (eds.) *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Springer Netherlands. 2014. P. 3-15.
 125. Georgiev M.I., Agostini E., Ludwig-Müller J., Xu J. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 528-537.
 126. Georgiev M.I., Ludwig-Müller J., Alipieva K., Lippert A. Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30. P. 859-866.
 127. Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 74. P. 1175-1185.
 128. Gherbi H., Markmann K., Svistoonoff S., Estevan J., Autran D., Giczey G., Auguy F., Péret B., Laplaze L., Franche C., Parniske M., Bogusz D. SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and *Frankia* bacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 4928-4932.
 129. Giri A., Banerjee S., Ahuja P.S., Giri C.C. Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* Wall. using *Agrobacterium rhizogenes* // *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 1997. V. 33. P. 280-284.
 130. Giri A., Narasu M.L. Transgenic hairy roots. Recent trends and applications // *Biotechnol. Adv.* 2000. V. 18. P.1-22.

131. Giri A., Ravindra S.T., Dhingra V., Narasu M.L. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy root and artemisinin production in *Artemisia annua* // Curr. Sci. 2001. V. 81. P. 378-382.
132. Goel M.K., Mehrotra S., Kukreja A.K. Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. P. 1342-1355.
133. Grech-Baran M., Sykłowska-Baranek K., Krajewska-Patan A., Wyrwał A., Pietrosiuk A. Biotransformation of cinnamyl alcohol to rosavins by non-transformed wild type and hairy root cultures of *Rhodiola kirilowii* // Biotechnol. Lett. 2014. V. 3. P. 649-656.
134. Grzegorzczak I., Królicka A., Wysokińska H. Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid // Z Naturforsch C. 2006. V. 61. P. 351-356.
135. Guillon S., Trémouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era // Trends. Biotechnol. 2006. V. 24. P. 403-409.
136. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 2879-2884.
137. Häkkinen S.T., Raven N., Henquet M., Laukkanen M.-L., Anderlei T., Pitkänen J.-P., Twyman R. M., Bosch D., Oksman-Caldentey K.-M., Schillberg S., Ritala A. Molecular farming in tobacco hairy roots by triggering the secretion of a pharmaceutical antibody // Biotechnol. Bioeng. 2014. V. 111. P. 336-346.
138. Hamill J.D., Parr A.J., Rhodes M.J.C., Robins R.J., Walton N.J. New routes to plant secondary products // Nat. Biotechnol. 1987. V. 5. P. 800-804.
139. Hansen J., Jørgensen J.-E., Stougaard J., Marcker K.A. Hairy roots — a short cut to transgenic root nodules // Plant Cell Rep. 1989. V. 8. P. 12-15.
140. Hao G., Ji H., Li Y., Shi R., Wang J., Feng L., Huang L. Exogenous ABA and polyamines enhanced salvianolic acids contents in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f.alba // Plant Omics J. 2012. V. 5. P.446-452.
141. Hartmann T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism // Phytochemistry. 2007. V. 68. P. 2831-2846.
142. Hedgcock G.G. Field studies of the crown-gall and hairy-root of the apple-tree / U.S. Department of Agriculture. Bureau of Plant Industry—Bulletin No. 186. 1910. 105 pp.
143. Hendrickson A.A., Baldwin I.L., Riker A.J. Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes* and *Bacillus radiobacter*: part II // J. Bacteriol. 1934. V. 28. P. 597-618.
144. Hildebrand E. M. Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees // J. Agr. Research. 1934. V. 48. P. 857-885.
145. Hilton M.G., Rhodes M.J. Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. V. 33. P. 132-138.
146. Hirata K., Goda S., Phunchindawan M., Du D., Ishio M., Sakai A., Miyamoto K. Cryopreservation of horseradish hairy root cultures by encapsulation-dehydration // Journal Ferment. Bioeng. 1998. V. 86. P. 418-420.
147. Hirata K., Monthana P., Sakai A., Miyamoto K. Cryopreservation of *Armoracia rusticana* P. Gaert., B. Mey. et Scherb. (horseradish) hairy root cultures. In: Towill L.E., Bajaj Y.P.S. (eds.) Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer Berlin Heidelberg. 2002. P. 57-65.
148. Hirata K., Mukai M., Goda S., Ishio-Kinugasa M., Yoshida K., Sakai A., Miyamoto K. Cryopreservation of hairy root cultures of *Vinca minor* (L.) by encapsulation-dehydration // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. P. 371-376.
149. Hopkins D.L., Durbin R.D. Induction of adventitious roots by culture filtrates of the hairy root bacterium, *Agrobacterium rhizogenes* // Can. J. Microbiol. 1971. V. 17. P. 1409-1412.
150. Horn P., Santala J., Nielsen S.L., Hühns M., Broer I., Valkonen J.P. Composite potato plants with transgenic roots on non-transgenic shoots: a model system for studying gene silencing in roots // Plant Cell. Rep. 2014. V. 33. P. 1977-1992.
151. Huang B., Lin H., Yan C., Qiu H., Qiu L., Yu R. Optimal inductive and cultural conditions of *Polygonum multiflorum* transgenic hairy roots mediated with *Agrobacterium rhizogenes* R1601 and an analysis of their anthraquinone constituents // Pharmacogn. Mag. 2014. V.10. P. 77-82.
152. Hwang S.J. Baicalin production in transformed hairy root clones of *Scutellaria*

- baicalensis* // Biotechnol. Bioproc. E. 2006. V. 11. P. 105-109.
153. Ikenaga T., Oyama T., Muranaka T. Growth and steroidal saponin production in hairy root cultures of *Solanum aculeatissimum* // Plant Cell Rep. 1995. V. 14. P. 413-417.
154. Ilina E.L., Logachov A.A., Laplaze L., Demchenko N.P., Pawlowski K., Demchenko K.N. Composite *Cucurbita pepo* plants with transgenic roots as a tool to study root development // Ann. Bot. 2012. V. 110. P. 479-489.
155. Imanishi L., Vayssières A., Franche C., Bogusz D., Wall L., Svistoonoff S. Transformed hairy roots of *Discaria trinervis*: a valuable tool for studying actinorhizal symbiosis in the context of intercellular infection // Mol. Plant Microbe Interact. 2011. V. 24. P. 1317-1324.
156. Inoguchi M., Ogawa S., Furukawa S., Kondo H. Production of an allelopathic polyacetylene in hairy root cultures of goldenrod (*Solidago altissima* L.). // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. V. 67. P. 863-868.
157. Ionkova I., Fuss E. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and lignan production in *Linum tauricum* ssp. *tauricum* // Pharmacogn. Mag. 2009. V. 5. P. 14-18
158. Ishida J.K., Yoshida S., Ito M., Namba S., Shirasu K. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum* // PLoS One. 2011. V. 6. e25802.
159. Jacobs T.B., La Fayette P.R., Schmitz R.J., Parrott W.A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 // BMC Biotechnology. 2015. V. 15:16.
160. Jaggi M., Kumar S., Sinha A.K. Overexpression of an apoplastic peroxidase gene CrPrx in transgenic hairy root lines of *Catharanthus roseus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V.90. P.1005-1016.
161. Jaremicz Z., Luczkiewicz M., Kokotkiewicz A., Krolicka A., Sowinski P. Production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* (black henbane) hairy roots grown in bubble-column and spray bioreactors // Biotechnol. Lett. 2014. V. 36. P. 843-853.
162. Jaziri M., Shimomur A.K., Yoshimatsu K. Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production // J. Plant Physiol. 1995. V. 145. P. 175-177.
163. Jennewein S., Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. P. 13-19.
164. Jeong G.T., Park D.H., Hwang B., Park K., Kim S.W., Woo J.C. Studies on mass production of transformed *Panax ginseng* hairy roots in bioreactor // Appl. Biochem. Biotechnol. 2002. V. 98-100. P. 1115-1127.
165. Jeong G.T., Park D.H., Hwang B., Woo J.C. Comparison of growth characteristics of *Panax ginseng* hairy roots in various bioreactors // Appl. Biochem. Biotechnol. 2003. V. 105 - 108. P. 493-503.
166. Jha P., Modi N., Jobby R. Desai N. Differential expression of antioxidant enzymes during degradation of azo dye, Reactive Black 8 in hairy roots of *Physalis minima* L // Int. J. Phytoremediation. 2015 V. 17. P. 305-312.
167. Jittayasothorn Y., Yang Y., Chen S., Wang X., Zhong Y. Influences of *Agrobacterium rhizogenes* strains, plant genotypes, and tissue types on the induction of transgenic hairy roots in *Vitis* species // Vitis. 2011. V. 50. P. 107-114
168. Jolicoeur M., Williams R.D., Chavarie C., Fortin J.A., Archambault J. Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor // Biotechnol. Bioeng. 1999. V. 63. P. 224-232.
169. Jung G., Tepfer D. Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown in vitro // Plant Sci. 1987. V. 50. P. 145-151.
170. Kaczmarczyk A., Funnekotter B., Menon A., Phang P.Y., Al Hanbali A., Bunn E., Mancera R. Current issues in plant cryopreservation. In: Katkov I.I. (ed.) Current Frontiers in Cryobiology. Croatia: InTech. 2012. P. 417-438.
171. Kai G., Xu H., Zhou C., Liao P., Xiao J., Luo X., You L., Zhang L. Metabolic engineering tanshinone biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures // Metab. Eng. 2011. V. 13. P. 319-327.
172. Kaimoyo E., Farag M.A., Sumner L.W., Wasmann C., Cuello J.L., Van Etten H. Sublethal levels of electric current elicit the biosynthesis of plant secondary metabolites // Biotechnol. Prog. 2008. V. 24. P. 377-384.
173. Kajala K., Coil D.A., Brady S.M. Draft genome sequence of *Rhizobium rhizogenes* strain ATCC 15834 // Genome Announc. 2014. V. 2. e01108-14.

174. Kajikawa M., Morikawa K., Abe Y., Yokota A., Akashi K. Establishment of a transgenic hairy root system in wild and domesticated watermelon (*Citrullus lanatus*) for studying root vigor under drought // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. P. 771-778.
175. Kamada H., Okamura N., Satake M., Harada H., Shimomura K. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna* // *Plant Cell Rep.* 1986. V. 5. P. 239-242.
176. Kanho H., Yaoya S., Kawahara N., Nakane T., Takase Y., Masuda K., Kuroyanagi M. Biotransformation of benzaldehyde-type and acetophenone-type derivatives by *Pharbitis nil* hairy roots // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2005. V. 53. P. 361-365.
177. Kastell A., Smetanska I., Ulrichs C., Cai Z., Mewis I. Effects of phytohormones and jasmonic acid on glucosinolate content in hairy root cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. V. 169. P. 624-635.
178. Kereszt A., Li D., Indrasumunar A., Nguyen C.D., Nontachaiyapoom S., Kinkema M., Gresshoff P.M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 948-952.
179. Khojasteh A., Mirjalili M.H., Hidalgo D., Corchete P., Palazon J. New trends in biotechnological production of rosmarinic acid // *Biotechnol. Lett.* 2014. V. 36. P. 2393-2406.
180. Kim H.H., Popova E.V., Shin D.J., Bae C.H., Baek H.J., Park S.U., Engelmann F. Development of a droplet-vitrification protocol for cryopreservation of *Rubia akane* (Nakai) hairy roots using a systematic approach // *Cryo-Lett.* 2012. V. 33. P. 506-517.
181. Kim H.H., Popova E.V., Yi J.Y., Cho G.T., Park S.U., Lee S.C., Engelmann F. Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Nakai) using a droplet-vitrification procedure // *Cryo-Lett.* 2010. V. 31. P. 473-484.
182. Kim H.J. *Agrobacterium rhizogenes*-induced cotton hairy root culture as an alternative tool for cotton functional genomics // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 958. P. 179-187.
183. Kim S.R., Sim J.S., Ajjappala H., Kim Y.H., Hahn B.S. Expression and large-scale production of the biochemically active human tissue-plasminogen activator in hairy roots of Oriental melon (*Cucumis melo*) // *J. Biosci. Bioeng.* 2012. V. 113. P. 106-111.
184. Kim Y., Wyslouzil B., Weathers P. A comparative study of mist and bubble column reactors in the in vitro production of artemisinin // *Plant Cell Rep.* 2001. V. 20. P. 451-455.
185. Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors // *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 2002. V. 38. P. 1-10.
186. Kim Y.H., Yoo Y.J. Development of a bioreactor for high density culture of hairy roots // *Biotechnol. Techn.* 1993 V. 7. P. 859-862.
187. Kim Y.J., Weathers P.J., Wyslouzil B.E. Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 83. P. 428-443.
188. Kim Y.S., Soh W.Y. Amyloplast distribution in hairy roots induced by infection with *Agrobacterium rhizogenes* // *Biol. Sci. Space.* 1996. V. 10. P. 102-104.
189. Kingsbury W.D., Boehm J.C., Jakas D.R., Holden K.G., Hecht S.M., Gallagher G., Caranfa M.J., McCabe F.L., Faucette L.F., Johnson R.K., Hertzberg R.P. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity // *J. Med. Chem.* 1991. V.34. P.98-107.
190. Kino-oka M., Nagatome H., Taya M. Characterization and application of plant hairy roots endowed with photosynthetic functions // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2001. V. 72. P. 183-218.
191. Kintzios S., Makri O., Pistola E., Matakias T., Shi H.P., Economou A. Scale-up production of puerarin from hairy roots of *Pueraria phaseoloides* in an airlift bioreactor // *Biotechnol. Lett.* 2004, V. 26. P. 1057-1059.
192. Klimek-Chodacka M., Baranski R. A protocol for sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of haploid and diploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) explants // *Acta Biochim. Pol.* 2014. V. 61. P. 13-17.
193. Kochan E., Wysokinska H., Chmiel A., Grabias B. Rosmarinic acid and other phenolic acids in hairy roots of *Hyssopus officinalis* // *Z. Naturforsch.* 1999. V. 54, P. 11-16.
194. Kotte W. Wurzelmeristem in Gewebekultur // *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.* 1922. V.40. P.269-272.
195. Kovács Gy., Kuzovkina I.N., Szoke É., Kursinszki L. HPLC determination of flavonoids in hairy-root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi // *Chromatographia.* 2004. V. 60. P. S81-S85.

196. Kovacs K., Zhang L., Linforth R.S., Whittaker B., Hayes C.J., Fray R.G. Redirection of carotenoid metabolism for the efficient production of taxadiene [taxa-4(5),11(12)-diene] in transgenic tomato fruit // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. P. 121-126.
197. Kovalenko P.G., Antonjuk V.P., Maliuta S.S. Secondary metabolites synthesis in transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Potentilla alba* L. as producers of radioprotective compounds // *Ukr. Bioorg. Acta.* 2004. V. 1-2. P. 13-22.
198. Kovalenko P.G., Maliuta S.S. An effect of transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production // *Ukr. Bioorg. Acta.* 2003. V. 1. P.50-60.
199. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonov Y.M., Chemeris A.V. The poplar ARGOS-LIKE gene promotes leaf initiation, cell expansion and controls organ size // *Biologia Plantarum.* 2016. V. 60. In press.
200. Kumar G.B.S., Ganapathi T.R., Srinivas L., Revathi C.J., Bapat V.A. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots // *Plant Sci.* 2006. V. 170. P. 918-925.
201. Kumar V., Sharma A., Prasad B.C.N., Gururaj H.B., Ravishanka G.A. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment // *Electron. J. Biotechnol.* 2006. V. 9. P. 349-357.
202. Kusch U., Greiner S., Steininger H., Meyer A.D., Corbière-Divialle H., Harms K., Rausch T. Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (*Cichorium intybus*) hairy roots // *New Phytol.* 2009. V. 184. P. 127-140.
203. Kuzovkina I.N., Schneider B. Genetically transformed root cultures — generation, properties and application in plant sciences. In: Esser K., Lüttge U., Beyschlag W., Murata J. (eds.) *Progress in Botany.* Springer Berlin Heidelberg, 2006. P. 275-314.
204. Kuzovkina I.N., Prokof'eva M.Yu., Umralina A.R., Chernysheva T.P. Morphological and biochemical characteristics of genetically transformed roots of *Scutellaria andrachnoides* // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 697-706.
205. Kwok K.H., Doran P.M. Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor // *Biotechnol. Prog.* 1995. V. 11. P. 429-435.
206. Lambert C., Tepfer D. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting // *Nat. Biotechnol.* 1991. V.9. P. 80-83.
207. Lambert E., Geelen D. Cryopreservation of hairy root cultures from *Maesa lanceolata* // *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 2007. V. 72. P. 225-228.
208. Lambert E., Goossens A., Panis B., Van Labeke M.C., Geelen D. Cryopreservation of hairy root cultures of *Maesa lanceolata* and *Medicago truncatula* // *Plant Cell Tiss. Org.* 2009. V. 96. P. 289-296.
209. Le Flem-Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M.A. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album, a difficult-to-transform plant, by *A. rhizogenes* LBA 9402 // *Planta.* 2004. V. 18. P.890-893.
210. Lee M.H., Yoon E.S., Jeong J.H., Choi Y.E. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 22. P. 822-827.
211. Lee S.Y., Xu H., Kim Y.K., Park S.U. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze // *World J. Microb. Biot.* 2007. V. 24. P. 969-972.
212. Lee, S.Y., Kim, S.G., Song, W.S., Kim, Y.K., Park, N.I. and Park, S.U. Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on hairy root induction and production of alizarin and purpurin in *Rubia akane* Nakai // *Rom. Biotechnol. Lett.* 2010. V. 15. P. 5405-5409.
213. Lehmann N., Dittler I., Lämsä M., Ritala A., Rischer H., Eibl D., Oksman-Caldentey K.-M., Eibl R. Disposable bioreactors for cultivation of plant cell cultures. In: Paek K.-Y., Murthy H.N., Zhong J.-J. (eds.) *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology.* Springer Netherlands, 2014. P. 17-46.
214. Liang Y., Wu J., Li Y., Li J., Ouyang Y., He Z., Zhao S. Enhancement of ginsenoside biosynthesis and secretion by Tween 80 in *Panax ginseng* hairy roots // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2015. V. 62. P. 193-199.
215. Lin H.W., Kwok K.H., Doran P.M. Production of podophyllotoxin using cross-species coculture of *Linum flavum* hairy roots and *Podophyllum hexandrum* cell suspensions // *Biotechnol. Prog.* 2003. V.19. P.1417-1426.
216. Lin M.H., Gresshoff P.M., Indrasumunar A., Ferguson B.J. pHairyRed: a novel binary vector containing the DsRed2

- reporter gene for visual selection of transgenic hairy roots // *Mol. Plant*. 2011. V.4. P.537-545.
217. Lippincott J.A., Lippincott B.B. Tumour-initiating ability and nutrition in the genus *Agrobacterium* // *Microbiology*. 1969. V. 59. P. 57-75.
218. Liu C.-Z., Guo C., Wang Y.-C., Ouyang F. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. // *Process Biochem*. 2002. V. 38. P. 581–585.
219. López E.G., Ramírez E.G., Gúzman O.G., Calva G.C., Ariza-Castolo A., Pérez-Vargas J., Rodríguez H.G. MALDI-TOF characterization of hGH1 produced by hairy root cultures of *Brassica oleracea* var. *italica* grown in an airlift with mesh bioreactor // *Biotechnol. Prog.* 2014. V. 30. P. 161-171.
220. Loyola-Vargas V.M., Miranda-Ham M.deL. Root culture as a source of secondary metabolites of economic importance. In: Arnason J.T., Mata R., Romeo J.T. (eds.) *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Springer US. 1995. P. 217-248.
221. Ludwig-Müller J., Jahn L., Lippert A., Püschel J., Walter A. Improvement of hairy root cultures and plants by changing biosynthetic pathways leading to pharmaceutical metabolites: strategies and applications // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 32. P. 1168-1179.
222. Magnussen D., Clapham D., Grönroos R., von Arnold S. Induction of hairy and normal roots on *Picea abies*, *Pinus sylvestris* and *Pinus cortorta* by *Agrobacterium rhizogenes* // *Scand. J. For. Res.* 1994. V. 9. P. 46-51.
223. Mahesh A., Jeyachandran R. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root induction in *Taraxacum officinale* and analysis of sesquiterpene lactones // *Plant Biosystems*. 2011. V. 145. P. 620-626.
224. Mahobia A., Jha Z. Efficiency of method and media composition on transformation of *Andrographis paniculata* for hairy root production // *Cell Tiss. Res.* 2015. V. 15. P. 4897-4902.
225. Majumder A., Jha S. Hairy roots: a promising tool for phytoremediation. In: Satyanarayana T., Johri B.N., Prakash A. (eds.) *Microorganisms in Environmental Management*. Springer Netherlands. 2012. P. 607-629.
226. Makhzoum A.B., Sharma P., Bernards M.A., Trémouillaux-Guiller J. Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. In: Gang D.R. (ed.) *Phytochemicals, Plant Growth, and the Environment*. Springer New York. 2012. P. 95-142.
227. Malarz J., Stojakowska A., Kisiel W. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus* // *Acta Physiol. Plant.* 2007. V. 29. P. 127-132.
228. Malarz J., Stojakowska A., Kisiel W. Sesquiterpene lactones in a hairy root culture of *Cichorium intybus* // *Z. Naturforsch. C.* 2002. V.57. P. 994-997.
229. Maldonado-Mendoza I.E., Ayora-Talavera T., Loyola-Vargas V.M. Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1993. V.33. P.321-329.
230. Mano Y., Nabeshima S., Matsui C., Ohkawa H. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica* // *Agr. Biol. Chem. Tokyo*. 1986. V. 50. P. 2715-2722.
231. Marchev A., Georgiev V., Ivanov I., Badjakov I., Pavlov A. Two-phase temporary immersion system for *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation of sage (*Salvia tomentosa* Mill.) // *Biotechnol. Lett.* 2011. V. 33. P. 1873-1878.
232. Marchev A., Haas C., Schulz S., Georgiev V., Steingroewer J., Bley T., Pavlov A. Sage in vitro cultures: a promising tool for the production of bioactive terpenes and phenolic substances // *Biotechnol. Lett.* 2014. V. 36. P. 211-221.
233. Markmann K., Giczey G., Parniske M. Functional adaptation of a plant receptor kinase gene paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria // *PLoS Biol.* V. 6. e68.
234. Marsh Z., Yang T., Nopo-Olazabal L., Wu S., Ingle T., Joshee N., Medina-Bolivar F. Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* // *Phytochemistry*. 2014. V.107. P.50-60.
235. Matsumoto T., Sakai A., Yamada K. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration // *Plant Cell Rep.* 1994. V. 13. P. 442-446.
236. Matthyse AG. Attachment of *Agrobacterium* to plant surfaces // *Front Plant Sci.* 2014. V.5. 252.

237. Matvieieva N.A., Kudriavets Yu.I., Lichova O.Yu., Kvasko O.Yu., Shachovsky A.M. Construction and study of *Althaea officinalis* transgenic roots culture with human interferon $\alpha 2B$ gene // *Biotechnologia Acta*. 2013. V.6. P.074-079.
238. Matvieieva N.A. *Agrobacterium*-mediated transformation of compositae plants. I. Construction of transgenic plants and «hairy» roots with new properties // *Biotechnologia Acta*. 2015. V. 8. P. 19-31.
239. Matvieieva N.A., Shakhovsky A.M., Belokurova V.B., Drobot K.O. *Artemisia tilesii* Ledeb. hairy roots establishment using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2015. [Epub ahead of print].
240. Mazaheri H., Piri K. Removal of phenol by *A. belladonna* L. hairy root // *Int. J. Phytoremediation*. 2015. [Epub ahead of print]
241. Maznik K.S., Matvieieva N.A. Optimization of fructans extraction from in vitro cultivated chicory 'hairy' roots // *Biotechnologia Acta*. 2013. V.6. P.083-088.
242. 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. Tiss. Org.* 1993. V. 34. P. 53-62.
243. McKelvey S.A., Gehrig J.A., Hollar K.A., Curtis W.R. Growth of plant root cultures in liquid- and gas dispersed reactor environments // *Biotechnol. Prog.* 1993. V. 9. P. 317-322.
244. Mehrotra S., Rahman L.U., Kukreja A.K. An extensive case study of hairy-root cultures for enhanced secondary-metabolite production through metabolic-pathway engineering // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2010. V. 56. P. 161-172.
245. Mehrotra S., Srivastava V., Rahman L.U., Kukreja A.K. Hairy root biotechnology-indicative timeline to understand missing links and future outlook // *Protoplasma*. 2015. [Epub ahead of print]
246. Mellor K.E., Hoffman A.M., Timko M.P. Use of ex vitro composite plants to study the interaction of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm *Striga gesnerioides* // *Plant Methods*. 2012. V. 8:22.
247. Menzel G., Harloff H.J., Jung C.. Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 60. P. 571-576.
248. Mihaljević S., Stipković S., Jelaska S. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria // *Plant Cell Rep.* 1996. V. 15. P. 610-614.
249. Mizukami H., Konoshima M., Tabata M. Variation in pigment production in *Lithospermum erythrorhizon* callus cultures // *Phytochemistry*. 1978. V.17. P.95-97.
250. Mohammadi-Dehcheshmeh M., Ebrahimie E., Tyerman S.D., Kaiser B.N. A novel method based on combination of semi-in vitro and in vivo conditions in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of *Glycine* species // *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 2014. V. 50. P. 282-291.
251. Moore L., Warren G., Strobel G. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes* // *Plasmid*. 1979. V. 2. P. 617-626.
252. Moyano E., Palazón J., Bonfill M., Osuna L., Cusidó R.M., Oksman-Caldentey K.M., Piñol M.T. Biotransformation of hyoscyamine into scopolamine in transgenic tobacco cell cultures // *J. Plant Physiol.* 2007. V. 164. P. 521-524.
253. Mrosk C., Forner S., Hause G., Küster H., Kopka J., and Hause B. Composite *Medicago truncatula* plants harbouring *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots reveal normal mycorrhization by *Glomus intraradices* // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 3797-3807.
254. Mukundan U., Carvalho E.B., Curtis W.R. Growth and pigment production by hairy root cultures of *Beta vulgaris* L. in a bubble column reactor // *Biotechnol. Lett.* 1998. V. 20. P. 469-474.
255. Murakami Y., Omoto T., Asai I., Shimomura K., Yoshihira K., Ishimaru K. Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis* // *Plant Cell. Tiss. Org.* 1998. V. 53. P. 75-78.
256. Muranaka T., Ohkawa H., Yamada Y. Continuous production of scopolamine by a culture of *Duboisia leichhardtii* hairy root clone in a bioreactor system // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993. V. 40. P. 219-223.
257. Nagatome H., Tsutsumi M., Kino-Oka M., Taya M. Development and characterization of a photoautotrophic cell line of pak-bung hairy roots // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V.89. P.151-156.
258. Nagatome H., Yamamoto T., Taya M., Tanaka N. Viability of plant hairy roots is sustained without propagation in low sugar

- medium kept at ambient temperature // *Biochem. Eng J.* 2000. V. 6. P. 75-80.
259. Narayanan R.A., Atz R., Denny R., Young N.D. Somers D.A. Expression of soybean cyst nematode resistance in transgenic hairy roots of soybean // *Crop Sci.* 1999. V. 39. P. 1680-1686.
260. Nedelkoska T.V., Doran P.M. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens* // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 67. P. 607-615.
261. Nedelkoska T.V., Doran P.M. Hyperaccumulation of nickel by hairy roots of *Alyssum* species: comparison with whole regenerated plants // *Biotechnol. Prog.* 2001. V. 17. P. 752-759.
262. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010 // *J. Nat. Prod.* 2012. V. 75. P. 311-335
263. Nopo-Olazabal C., Hubstenberger J., Nopo-Olazabal L., Medina-Bolivar F. Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) // *J Agric Food Chem.* 2013. V. 61. P. 11744-11758.
264. Nourozi E., Hosseini B., Hassani A. A reliable and efficient protocol for induction of hairy roots in *Agastache foeniculum* // *Biologia.* 2014. V.69. P.870-879.
265. Nuutila A.M., Lindqvist A.-S., Kauppinen V. Growth of hairy root cultures of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) in three different types of bioreactors // *Biotechnol. Tech.* 1997. V. 11. P. 363-366.
266. Nuutila A.M., Toivonen L., Kauppinen V. Bioreactor studies on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Comparison of three bioreactor types // *Biotechnol. Tech.* 1994. V.8. P.61-66.
267. Odegaard E., Nielsen K.M., Beisvag T., Evjen K., Johnsson A., Rasmussen O., Iversen T.H. Agravitropic behaviour of roots of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes* // *J. Gravit. Physiol.* 1997. V. 4. P. 5-14.
268. Oksman-Caldentey K.-M., Sevón N., Vanhala L., Hiltunen R. Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus* // *Plant Cell. Tiss. Org.* 1994. V. 38. P. 263-272.
269. Ono N.N., Tian L. The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities // *Plant Sci.* 2011. V. 180. P. 439-446.
270. Ooi C.T., Syahida A., Stanslas J., Maziah M. Efficiency of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy roots induction in *Solanum mammosum* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 29. P. 421-430.
271. Ortholand J.Y., Ganesan A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004. V. 8. P. 271-280.
272. Pakdin A., Farsi M., Nematzadeh G.A., Kakhki A.M. Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction in *Valeriana officinalis* L. // *Cont. J. Biol. Sci.* 2013. V. 6. P. 9-15.
273. Palavalli R.R., Srivastava S., Srivastava A.K. Development of a mathematical model for growth and oxygen transfer in *in vitro* plant hairy root cultivations // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012. V. 167. P. 1831-1844.
274. Palazón J., Mallol A., Eibl R., Lettenbauer C., Cusidó R.M., Piñol M.T. Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor // *Planta. Med.* 2003. V.69. P.344-349.
275. Palazón J., Moyano E., Cusidó R.M., Bonfill M., Oksman-Caldentey K.-M., Piñol M.T. Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the h6h gene // *Plant Sci.* 2003. V. 165. P. 1289–1295.
276. Park N.I., Xu H., Li X., Kim S.J., Park S.U. Enhancement of flavone levels through overexpression of chalcone isomerase in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* // *Funct. Integr. Genomics.* 2011. V. 11. P. 491-496.
277. Park S.U., Facchini P.J. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures // *J. Exp. Bot.* 2000. V.51. P.1005-1016.
278. Park S.U., Kong H., Shin D.J., Bae C.H., Lee S.C., Bae C.H., Rha E.S., Kim H.H. Development of vitrification protocol in *Rubia akane* (nakai) hairy roots using a systematic approach // *Cryo-Lett.* 2014. V. 35. P. 138-144.
279. Park S.U., Uddin R., Xu H., Kim Y.K., Lee S.Y. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant // *Afr. J. Biotechnol.* 2008. V. 7. P. 4959-4965.
280. Parsons J., Wirth S., Dominguez M., Bravo-Almonacid F., Giuliotti A.M., Talou J.R. Production of human epidermal growth factor (hEGF) by *in vitro* cultures of *Nicotiana tabacum*: Effect of tissue differentiation and

- sodium nitroprusside addition // Intern. J. Biotechnol. Biochem. 2010. V.6. P. 131–138.
281. Patra N, Srivastava A.K. Enhanced production of artemisinin by hairy root cultivation of *Artemisia annua* in a modified stirred tank reactor // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 174. P. 2209-2222.
282. Pavli O.I., Panopoulos N.J., Goldbach R., Skaracis G.N. BNYVV-derived dsRNA confers resistance to rhizomania disease of sugar beet as evidenced by a novel transgenic hairy root approach // Transgenic Res. 2010. V.19. P.915–922.
283. Pavlova O.A., Matveyeva T.V., Lutova L.A. rol-Genes of *Agrobacterium rhizogenes* // Russ. J. Genet. Appl. Res. 2014. V.4. P.137-145.
284. Peraza-Luna F., Rodríguez-Mendiola M., Arias-Castro C., Bessiere J.M., Calva-Calva G. Sotolone production by hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. in airlift with mesh bioreactors // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. P. 6012-6019.
285. Petersen M. Rosmarinic acid: new aspects // Phytochemistry Reviews. 2013. V. 12. P. 207-227.
286. Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P., Casse-Delbart F., Tempé J. Further extension of the opine concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation // Mol. Gen. Genet. 1983. V.190. P.204-214.
287. Pham N.B., Schäfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // Biotechnol. J. 2012 V.7. P.537-545.
288. Pheler M., Petit M., Martin L., Duhoux E., Tempe J. Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocasuarina verticillata* Lam. // Biotechnol. 1991. V. 9. P. 461–466.
289. Phillips W.S. Depth of roots in soil // Ecology. 1963. V. 44. P. 424.
290. Pirian L.K., Piri K. Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on noradrenalin accumulation in hairy roots of *Portulaca oleracea* // Int. Res. J. Appl. Bas. Sci. 2012. V. 3. P. 213-218.
291. Pistelli L., Giovannini A., Ruffoni B., Bertoli A., Pistelli L. Hairy root cultures for secondary metabolites production // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 698. P. 167-184.
292. Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M. Effects of gibberellin GA7 on kinetics of growth and tropane alkaloid accumulation in hairy roots of *Brugmansia candida* // In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant. 1997. V. 33. P. 147-153.
293. Porter J.R. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes* // Crit. Rev. Plant Sci. 1991. V. 10. P. 387-421.
294. Quandt H.J., Pühler A. and Broer I. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules // Mol. Plant Microbe Interact. 1993. V. 6. P. 699-706.
295. Rahimi S., Hasanloo T., Najafi F., Khavari-Nejad R.A. Methyl jasmonate influence on silymarin production and plant stress responses in *Silybum marianum* hairy root cultures in a bioreactor // Nat. Prod. Res. 2012. V. 26. P. 1662-1667.
296. Rajasekaran T., Ravishankar G.A., Reddy B.O. In vitro growth of *Tagetes patula* L. hairy roots, production of thiophenes and its mosquito larvicidal activity // IJBT. 2004. V. 3. P. 92-96.
297. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal Behav. 2011. V. 6. P. 1720-1731.
298. Ramakrishnan D., Salim J., Curtis W.R. Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors // Biotechnol. Techn. 1994. V. 8. P. 639-644.
299. Ranjan R., Ahmed N., Khanna R., Mishra B. N. Design of an ON/OFF mist duty cycle in mist bioreactors for the growth of hairy roots // Biotechnol. Bioproc. E. 2009. V. 14. P. 38-45.
300. Rao S.R., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites // Biotechnol. Adv. 2002. V. 20. P. 101-153.
301. Rao S.R., Tripathi U., Suresh B., Ravishankar G.A. Enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula* under the influence of microalgal elicitors // Food Biotechnol. 2001. V. 15. P. 35-46.
302. Rashidi B., Mehrabi S., Demchenko K., Pawlowski K. The *Casuarina glauca* metallothionein I promoter in nodulated transgenic hairy roots of the actinorhizal plant *Datisca glomerata* // Funct. Plant Biol. 2011. V.38 P. 728-737.
303. Ream W. *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* use different proteins to transport bacterial DNA into the plant cell nucleus // Microb. Biotechnol. 2009. V.2. P.416-427.
304. Redeeithnbaugh K., Paasch B.D., Nichol J.W., Kossler M.E., Viss P.R., Walker

- K.A. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos // *Nat. Biotechnol.* 1986. V. 4. P. 797-801.
305. Repunte V.P., Taya M., Tone S. Preparation of artificial seeds using cell aggregates from horseradish hairy roots encapsulated in alginate gel with paraffin coat // *J. Ferment. Bioeng.* 1995. V. 79. P. 83-86.
306. Rezek J., Macek T., Mackova M., Triska J. Plant metabolites of polychlorinated biphenyls in hairy root culture of black nightshade *Solanum nigrum* SNC-90 // *Chemosphere.* 2007. V. 69. P. 1221-1227.
307. Rhodes M.J.C., Hilton M., Parr A.J., Hamill J.D., Robins R.J. Nicotine production by "hairy root" cultures of *Nicotiana rustica*: Fermentation and product recovery // *Biotechnol. Lett.* 1986. V. 8. P. 415-420.
308. Rijhwani S.K., Shanks J.V. Effect of elicitor dosage and exposure time on biosynthesis of indole alkaloids by *Catharanthus roseus* hairy root cultures // *Biotechnol. Prog.* 1998. V. 14. P. 442-449.
309. Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W. The relation of certain bacteria to the development of roots // *Science.* 1928. V. 68. P. 357-359.
310. Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H.E. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees // *J. Agr. Research.* 1930. V. 41. P. 507-540.
311. Riker A.J., Berbee J.G., Smalley E.B. Effects of crown gall and hairy root on the growth of apple trees // *Phytopathology.* V.49. P.88-90.
312. Riker A.J., Hildebrand E.M. Seasonal development of hairy root, crown gall, and wound overgrowth on apple trees in the nursery // *J. Agr. Research.* 1934. V. 48. P. 887-912.
313. Robbins W.J. and Maneval W.E. Effect of light on growth of excised root tips under sterile conditions // *Botanical Gazette.* 1924. V. 78. P. 424-432.
314. Robbins W.J. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions // *Botanical Gazette.* 1922. V. 73. P. 376-390.
315. Robbins W.J., Maneval W.E. Further experiments on growth of excised root tips under sterile conditions // *Botanical Gazette.* 1923. V. 76. P. 274-287.
316. Roberts S.C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture // *Nat. Chem. Biol.* 2007. V. 3. P. 387-395.
317. Ron M., Kajala K., Pauluzzi G., Wang D., Reynoso M.A., Zumstein K., Garcha J., Winte S., Masson H., Inagaki S., Federici F., Sinha N., Deal R.B., Bailey-Serres J., Brady S.M. Hairy root transformation using *Agrobacterium rhizogenes* as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model // *Plant Physiol.* 2014. V. 166. P. 455-469.
318. Runo S., Macharia S., Alakonya A., Machuka J., Sinha N., Scholes J. Striga parasitizes transgenic hairy roots of *Zea mays* and provides a tool for studying plant-plant interactions // *Plant Methods.* 2012. V. 8: 20.
319. Ružić D., Vujović T., Cerović R. Cryopreservation of cherry rootstock Gisela 5 (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) shoot tips by droplet-vitrification technique // *J. Hortic. Res.* 2014. V. 21, P. 79-85.
320. Ryder M.H., Tate M.E., Kerr A. Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root discs // *Plant Physiol.* 1985. V. 77. P. 215-221.
321. Sagen H.E., Riker A.J., and Baldwin I.L. Studies on certain physiological characters of *Phytomonas tumefaciens*, *Phytomonas rhizogenes*, and *Bacillus radiobacter*: part I // *J. Bacteriol.* 1934. V. 28. P. 571-595.
322. Sakai A., Engelmann F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review // *Cryo-Lett.* 2007. V. 28. P. 151-172.
323. Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification // *Plant Cell Rep.* 1990. V. 9. P. 30-33.
324. Sauerwein M., Yamazaki T., Shimomura K. Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis* // *Plant Cell Rep.* 1991. V. 9. P. 579-581.
325. Savka M.A., Ravillion B., Noel G.R., Farrand S.K. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode // *Phytopathology.* 1990. V. 80. P. 503-508.
326. Scarpati M.L., Oriente G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.) // *Ric Sci.* 1958. V.28. P.2329-2333. (цит. по Petersen, 2013)
327. Seo W.T., Park Y.H., Choi T.B. Production of shikonin by a hairy root culture of *Lithospermum erythrorhizon* // *J. Microbiol. Biotechnol.* 1992. V.2. P.41-45.
328. Shadwick F.S., Doran P.M. Propagation of plant viruses in hairy root cultures: a potential method for in vitro production of epitope

- vaccines and foreign proteins // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V.96. P.570-583.
329. Shadwick F.S, Doran P.M. Infection, propagation, distribution and stability of plant virus in hairy root cultures // *J. Biotechnol.* 2007a. V.131. P.318-329.
330. Shaneeja V.M., Keshavachandran R., James P., Nazeem P.A. Genetic transformation in *Artemisia annua* L. for hairy root induction and enhancement of secondary metabolites // *J. Trop. Agr.* 2014. V. 52. P.149.
331. Shanks J.V., Morgan J. Plant 'hairy root' culture // *Curr. Opin. Biotech.* 1999. V. 10. P. 151–155.
332. Sharaf S.A., Shibli R.A., Kasrawi M.A., Baghdadi S.H. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification // *Plant Cell. Tiss. Org.* 2012. V. 108, P. 437-444.
333. Sharafi A., Hashemi Sohi H., Mousavi A., Azadi P., Dehsara B., Hosseini Khalifani B. Enhanced morphinan alkaloid production in hairy root cultures of *Papaver bracteatum* by over-expression of salutaridinol 7-*o*-acetyltransferase gene via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V.29. P.2125-2131.
334. Sharma S., Shahzad A. Bioreactors: A rapid approach for secondary metabolite production. In: Shahid M., Shahzad A., Malik A., Sahai A. (eds). *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants.* Springer Netherlands. 2013. P. 25-49.
335. Sheludko Y., Gerasymenko I. Biosynthetic potential of hairy roots for production of new natural products. In: Chandra S., Lata H., Varma A. *Biotechnology for Medicinal Plants.* Springer Berlin Heidelberg. 2013. P. 241-262.
336. Shevyakov S.V., Davydova O.I., Kiselyov A.S., Kravchenko D.V., Ivachtchenko A.V., Krasavin M. Natural products as templates for bioactive compound libraries: part 2. Novel modifications of vasicine (peganine) core via efficient and regioselective generation of 3-lithiodeoxyvasicine and its stereoselective addition to aliphatic ketones section sign // *Nat. Prod. Res.* 2006. V. 20. P. 871-881.
337. Shiao T.L., Doran P.M. Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in hairy root cultures // *J. Biotechnol.* 2000. V. 83. P. 199-210.
338. Shih S.M, Doran P.M. In vitro propagation of plant virus using different forms of plant tissue culture and modes of culture operation // *J. Biotechnol.* 2009. V.143. P.198-206.
339. Shimomura K., Sudo H., Saga H., Kamada H. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* // *Plant Cell Rep.* 1991.V. 10. P. 282-285.
340. Shin D.J., Lee H.E., Bae C.H., Park S.U., Kang H.N., Kim H.H. Development of an encapsulation-vitrification protocol for *Rubia akane* (nakai) hairy roots: a comparison with non-encapsulation // *Cryo-Lett.* 2014. V. 35. P. 377-384.
341. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Aminin D.L., Zhuravlev Y.N. Decreased ROS level and activation of antioxidant gene expression in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* // *Planta.* 2010. V. 232. P. 1023-1032.
342. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev 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. 100. P. 118-125.
343. Sim S.J., Chang H.N. Increased shikonin production by hairy roots of *Lithospermum erythrorhizon* in two phase bubble column reactor // *Biotechnol. Lett.* 1993. V. 15. P. 145-150.
344. Singh A., Sarin R. Antimalarial artemisinin content of *Artemisia scoparia* // *Journal of Pharmacy Research.* 2010. V. 3. P. 2831.
345. Singh H., Dixit S., Verma P.C., Singh P.K. Evaluation of total phenolic compounds and insecticidal and antioxidant activities of tomato hairy root extract // *J. Agric. Food Chem.* 2014. V. 62. P. 2588-2594.
346. Singh S., Melo J.S., Eapen S., D'Souza S.F. Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂ // *J. Biotechnol.* 2006. V.123. P.43-49.
347. Sinharoy S., Pislariu C.I., Udvardi M.K. A high-throughput RNA interference (RNAi)-based approach using hairy roots for the study of plant-rhizobia interactions // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1287. P.159-178.
348. Sinharoy S., Saha S., Chaudhury S.R., Dasgupta M. Transformed hairy roots of *Arachis*

- hypogea*: a tool for studying root nodule symbiosis in a non-infection thread legume of the *Aeschynomeneae* tribe // Mol. Plant Microbe. Interact. 2009. V. 22. P. 132-142.
349. Sivanandhan G., Arunachalam C., Selvaraj N., Sulaiman A.A., Lim Y.P., Ganapathi A. Expression of important pathway genes involved in withanolides biosynthesis in hairy root culture of *Withania somnifera* upon treatment with *Gracilaria edulis* and *Sargassum wightii* // Plant. Physiol. Biochem. 2015. V.91. P.61-64.
350. Skarjinskaia M., Ruby K., Araujo A., Taylor K., Gopalasamy-Raju V., Musiyuchuk K., Chichester J.A., Palmer G.A., de la Rosa P., Mett V., Ugulava N., Streatfield S.J. Yusibov V. Hairy roots as a vaccine production and delivery system // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2013. V. 134. P.115-134.
351. Smith E.F., Brown N.A., Townsend C.O. Crown-gall of plants: its cause and remedy. USDA Bur. Plant Indus. Bull. 312. 1911. 215 pp.
352. Smith T.C., Weathers P.J., Cheetham R.D. Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: Growth and artemisinin production // In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant. 1997. V. 33. P. 75-79.
353. Solt M.L. Nicotine production and growth of excised tobacco root cultures // Plant Physiol. 1957. V. 32. P. 480-484.
354. Solt M.L. Nicotine production and growth of tobacco scions on tomato rootstocks // Plant Physiol. 1957a. V. 32. P. 484-490.
355. Sommer S., Köhle A., Yazaki K., Shimomura K., Bechthold A., Heide L. Genetic engineering of shikonin biosynthesis hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* transformed with the bacterial *ubiC* gene // Plant Mol. Biol. 1999. V. 39. P. 683-693.
356. Soudek P., Petrová Š., Benešová D., Vaněk T. Uranium uptake and stress responses of in vitro cultivated hairy root culture of *Armoracia rusticana* // Agrochimica. 2011. V. 55. P. 15-28.
357. Spanò L., Wullems G.J., Schilperoort R.A., Costantino P. Hairy root: In vitro growth properties of tissues induced by *Agrobacterium rhizogenes* on tobacco // Plant Sci. Lett. 1981. V. 23. P. 299-305.
358. Srivastava S., Srivastava A.K. Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor // Bioprocess Biosyst. Eng. 2012. V. 35. P. 1549-1553.
359. Srivastava S., Srivastava A.K. Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. V. 172. P. 2286-2297.
360. Srivastava S., Srivastava A.K. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites // Crit. Rev. Biotechnol. 2007. V. 27. P. 29-43.
361. Srivastava S., Srivastava A.K. Production of the biopesticide azadirachtin by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in liquid-phase bioreactors // Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. V. 171. P. 1351-1361.
362. Stewart F.C., Rolfs F.M., Hall F.H. A fruit-disease survey of western New York in 1900. Geneva, N.Y.: New York Agricultural Experiment Station. 1900. P. 293-331.
363. Stiles A.R., Liu C.Z. Hairy root culture: bioreactor design and process intensification // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2013. V. 134. P. 91-114.
364. Stiller J., Martirani L., Tuppale S., Chian R-J., Chiurazzi M., Gresshoff P.M. High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus* // J. Exp. Bot. 1997. V.48. P.1357-1365.
365. Strobel G.A. Development of plant roots / US Patent Number 4,588,693. Filed: Feb. 28, 1983. Issued: May 13, 1986.
366. Strobel G.A., Gavlak A.H., Jaynes J.M. Compositions containing and methods of use of an infectivity-cured Hr plasmid-bearing microorganism / US Patent 4,425,150. Filed May 4, 1981. Issued Jan. 10, 1984.
367. Subroto M.A., Kwok K.H., Hamill J.D., Doran P.M. Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites // Biotechnol. Bioeng. 1996. V.49. P.481-494.
368. Sun J. , Xiao J , Wang X , Yuan X , Zhao B. Improved cardenolide production in *Calotropis gigantea* hairy roots using mechanical wounding and elicitation // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 563-569.
369. Sun X., Hu Z., Chen R., Jiang Q., Song G., Zhang H., Xi Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system // Sci. Rep. 2015. V. 5:10342.
370. Syklovska-Baranek K., Pietrosiuk A., Kokoszka A., Furmanowa M. Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii* // J. Plant Physiol. 2009. V.166. P.1950-1954.

371. Tabata M., Mizukami H., Hiraoka N., Konoshima M. Pigment formation of callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon* // *Phytochemistry*. 1974. V.13. P.927–932.
372. Tabata M., Fujita Y. Production of shikonin by plant cell cultures. In: Zaitlin M., Day P., Hollaender A. (eds.) *Biotechnology in Plant Science*. Academic Press, Orlando, FL, U.S.A. 1985. P. 207-218.
373. Tada H., Murakami Y., Omoto T., Shimomura K., Ishimaru K. Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum* // *Phytochemistry*. 1996. V. 42. P. 431–434.
374. Tavizi A., Javaran M.J., Moieni A., Mohammadi-Dehcheshmeh M., Mohebodini M., Ebrahimie E. Root and shoot parts of strawberry: factories for production of functional human pro-insulin // *Mol. Biol. Rep.* 2015. V. 42. P. 1013-1023.
375. Taylor C.G., Fuchs B., Collier R., Lutke W.K. Generation of composite plants using *Agrobacterium rhizogenes* // *Methods. Mol. Biol.* 2006. V. 343. P. 155-167.
376. Teoh K.H., Weathers P.J., Cheetham R.D., Walcerz D.B. Cryopreservation of transformed (hairy) roots of *Artemisia annua* // *Cryobiology*. 1996. V. 33. P. 106-117.
377. Tepfer D. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* // *Physiologia Plantarum*. 1990. V. 79. P. 140–146.
378. Tepfer D. The potential uses of *Agrobacterium rhizogenes* in the genetic engineering of higher plants: nature got there first. In: Lurquin P.F., Kleinhofs A. (eds.) *Genetic Engineering in Eukaryotes*. Plenum, New York. 1983. P. 153-164.
379. Tepfer D.A., Tempe J. Production d'agropine par des racines formees sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4 // *C. R. Acad. Sci. Paris. III*. 1981. V.292. P.153-156.
380. Terada A., Tanoue Y., Hatada A., Sakamoto H. Total synthesis of shikalkin [(±)-shikonin] // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983. V. 18. P. 987-988.
381. Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Narayan M.S., Ravishankar G.A. Food-grade chemical and biological agents permeabilize red beet hairy roots, assisting the release of betalains // *Biotechnol. Prog.* 2003. V. 19. P. 1274-1282.
382. Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Vinod K., Venkatachalam L., Sreedhar R.V., Ravishankar G.A. Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*) // *Electronic J. Biotechnology*. 2005. V.8. P.185-196.
383. Thimmaraju R., Venkatachalam L., Bhagyalakshmi N. Morphometric and biochemical characterization of red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots obtained after single and double transformations // *Plant Cell Rep.* 2008. V.27. P.1039-1052.
384. Tian L. Using hairy roots for production of valuable plant secondary metabolites // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2015. V. 149. P. 275-324.
385. Tikhomiroff C., Allais S., Klvana M., Hisiger S., Jolicoeur M. Continuous selective extraction of secondary metabolites from *Catharanthus roseus* hairy roots with silicon oil in a two-liquid-phase bioreactor // *Biotechnol. Prog.* 2002. V. 18. P. 1003-1009.
386. Tiwari R.K., Trivedi M., Guang Z.-C., Guo G.-Q., Zheng G.-C. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots // *Biol. Plantarum*. 2008. V. 52. P. 26-35.
387. Toivonen L. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites // *Biotechnol. Prog.* 1993. V. 9. P. 12–20.
388. Toivonen L., Ojala M., Kauppinen V. Indole alkaloid production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Growth kinetics and fermentation // *Biotechnol. Lett.* 1990. V. 12. P. 519-524.
389. Tomilov A., Tomilova N., Yoder J.I. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of the parasitic plant *Triphysaria versicolor* retain parasitic competence // *Planta*. 2007. V. 225. P.1059-1071.
390. Torkamani M.R.D., Abbaspour N., Jafari M., Samadi A. Elicitation of valerenic acid in the hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L (*Valerianaceae*) // *Trop. J. Pharm. Res.* 2014. V. 13. P. 943-949.
391. Torregrosa L., Bouquet A. *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus // *Plant Cell. Tiss. Org.* 1997. V. 49. P. 53-62.
392. Touno K., Yoshimatsu K., Shimomura K. Characteristics of *Atropa belladonna* hairy roots cryopreserved by vitrification method // *Cryo-Lett.* 2006. V. 27. P. 65-72.
393. Towler M.J., Kim Y., Wyslouzil B.E., Correll M.J., Weathers P.J. Design,

- development, and applications of mist bioreactors for micropropagation and hairy root culture. In: Gupta S.D., Ibaraki Y. (eds.) *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer Netherlands. 2006. P. 119-134.
394. Trick H.N., Finer J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // *Transgenic Research*. 1997. V. 6. P. 329-336.
395. Tusevski O., Petreska Stanoeva J., Stefova M., Simic S.G. Phenolic profile of dark-grown and photoperiod-exposed *Hypericum perforatum* L. hairy root cultures // *Sci. World J*. 2013: 602752.
396. Uozumi N. Large-scale production of hairy root. In: Kobayashi T. (ed.) *Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan II*. Springer Berlin Heidelberg. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 91. P. 75-103.
397. Uozumi N., Nakashimada Y., Kato Y., Kobayashi T. Production of artificial seed from horseradish hairy root // *J. Ferment. Bioeng.* 1992. V. 74. P. 21-26.
398. Van de Velde W., Karimi M., Den Herder G., Van Montagu M., Holsters M., Goormachtig S. *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of plants. In: Jackson J.F., Linskens H.F. (eds.) *Genetic Transformation of Plants*. Springer Berlin Heidelberg. 2003. P. 23-44.
399. Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoord R.A., Schell J. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability // *Nature*. 1974. V. 252. P. 169-170.
400. Vanhala L., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K.M. Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus* // *Plant Cell Rep*. 1995. V.14. P. 236-240.
401. Varchi G., Battaglia A., Samori C., Baldelli E., Danieli B., Fontana G., Guerrini A., Bombardelli E. Synthesis of deserpidine from reserpine // *J. Nat. Prod*. 2005. V. 68. P. 1629-1631.
402. Vdovitchenko M.Yu., Kuzovkina I.N. Artificial seed preparation as the efficient method for storage and production of healthy cultured roots of medicinal plants // *Russ. J. Plant Physl*. 2011. V. 58. P. 524-530.
403. Vdovitchenko M.Yu., Kuzovkina I.N. Artificial seeds as a way to produce ecologically clean herbal remedies and to preserve endangered plant species // *Mosc. Univ. Biol. Sci.Bull*. 2011. V. 66. P. 48-50.
404. Velázquez E., Palomo J.L., Rivas R., Guerra H., Peix A., Trujillo M.E., García-Benavides P., Mateos P.F., Wabiko H., Martínez-Molina E. Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes* // *Syst. Appl. Microbiol*. V. 33. P. 247-251.
405. Verdejo S., Jaffee B.A., Mankau R. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant roots genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes* // *J. Nematol*. 1988. V. 20. P. 599-604.
406. Verma P., Mathur A.K., Shanker K. Growth, alkaloid production, rol genes integration, bioreactor up-scaling and plant regeneration studies in hairy root lines of *Catharanthus roseus* // *Plant biosyst*. 2012. V.146. P. 27-40.
407. Vershinina Z.R., Baymiev An.K., Blagova D.K., Chubukova O.V., Baymiev Al.K., Chemeris A.V. Artificial colonization of non-symbiotic plants roots with the use of lectins // *Symbiosis*. 2012. V. 56. P. 25-33.
408. Vladimirov I.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* // *Russ. J. Genet*. 2015. V. 51. P. 121-129.
409. Wang G.R., Qi N.M. Influence of mist intervals and aeration rate on growth and second metabolite production of *Pseudostellaria heterophylla* adventitious roots in a siphon-mist bioreactor // *Biotechnol. Bioproc. E*. 2010 V. 15. P. 1059-1064.
410. Wang J.W., Kong F.X., Tan R.X. Improved artemisinin accumulation in hairy root cultures of *Artemisia annua* by (22S, 23S)-homobrassinolide // *Biotechnol. Lett*. 2002. V. 24. P. 1573-1577.
411. Wang J.W., Wu J.Y. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2013. V. 134. P. 55-89.
412. Weathers P.J., Cheetham R.D., Follansbee E., Teoh K. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* // *Biotechnol. Lett*. 1994. V. 16. P. 1281-1286.
413. Weathers P.J., Zobel R.W. Aeroponics for the culture of organisms, tissues and cells // *Biotechnol. Adv*. 1992. V. 10. P. 93-115.

414. White F.F., Ghidossi G., Gordon M.P., Nester E.W. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. P. 3193-3197.
415. White F.F., Nester E.W. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity // J. Bacteriol. 1980. V. 144. P. 710-720.
416. White P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium // Plant Physiol. 1934. V. 9. P. 585-600.
417. Wilczańska-Barska A., Królicka A., Głód D., Majdan M., Kawiak A., Krauze-Baranowska M. Enhanced accumulation of secondary metabolites in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* following elicitation // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 1757-1763.
418. Willmitzer L., Sanchez-Serrano J., Buschfeld E., Schell J. DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues // Mol. Gen. Genet. 1982. V. 186. P. 16-22.
419. Wilson P.D.G. The pilot-scale cultivation of transformed roots. In: Doran P.M. (ed.) Hairy roots: culture and applications. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. 1997. P. 179-190.
420. Wilson P.D.G., Hilton M.G., Meehan P.T.H., Waspe C.R., Rhodes M.J.C. The cultivation of transformed roots from laboratory to pilot plant. In: Nijkamp H.J.J., Van Der Plas L.H.W., Van Aartrijk J. (eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Springer Netherlands. 1990. P. 700-705.
421. Wink M., Alfermann A.W., Franke R., Wetterauer B., Distl M., Windhövel J., Krohn O., Fuss E., Garden H., Mohagheghzadeh A., Wildi E., Ripplinger P. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant in vitro cultures: anticancer agents // Plant Genet. Resour. Characterization and Utilization. 2005. V. 3. P. 90-100.
422. Wongsamuth R., Doran P.M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots // Biotechnol. Bioeng. 1997. V. 54. P. 401-415.
423. Wongwicha W., Tanaka H., Shoyama Y., Putalun W. Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures // Z. Naturforsch. C. 2011. V. 66. P. 423-428.
424. Woods R.R., Geyer B.C., Mor T.S. Hairy-root organ cultures for the production of human acetylcholinesterase // BMC Biotechnol. 2008. V. 8. P. 95.
425. Wright W.H., Hendrickson A.A., Riker A.J. Studies on the progeny of single-cell isolations from the hairy-root and crown-gall organisms // J. Agr. Research. 1930. V. 41. P. 541-547.
426. Wu J.Y., Ng J., Shi M., Wu S.J. Enhanced secondary metabolite (tanshinone) production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots in a novel root-bacteria coculture process // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 77. P. 543-550.
427. Wubben M.J., Callahan F.E., Triplett B.A., Jenkins J.N. Phenotypic and molecular evaluation of cotton hairy roots as a model system for studying nematode resistance // Plant Cell Rep. 2009. V. 28. P. 1399-1409.
428. Wyslouzil B.E., Waterbury R.G., Weathers P.J. The growth of single roots of *Artemisia annua* in nutrient mist reactors // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 70. P. 143-150.
429. Wyslouzil B.E., Whipple M., Chatterjee C., Walcerz D.B., Weathers P.J., Hart D.P. Mist deposition onto hairy root cultures: aerosol modeling and experiments // Biotechnol. Prog. 1997. V. 13. P. 185-194.
430. Xiao X.-Y., Parandoosh Z., Nova M.P. Design and synthesis of a taxoid library using radiofrequency encoded combinatorial chemistry // J. Org. Chem. 1997. V. 62. P. 6029-6033.
431. Xiao Y., Gao S., Di P., Chen J., Chen W., Zhang L. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures // Physiol. Plant. 2009. V. 137. P. 1-9.
432. Xie D., Wang L., Ye H., Li G. Isolation and production of artemisinin and stigmaterol in hairy root cultures of *Artemisia annua* // Plant Cell. Tiss. Org. 2000. V. 63. P. 161-166.
433. Xie D., Zou Z., Ye H., Li G., Guo Z. Selection of hairy root clones of *Artemisia annua* L. for artemisinin production // Israel J. Plant Sci. 2001. V. 49. P. 129-134.
434. Xing B., Yang D., Guo W., Liang Z., Yan X., Zhu Y., Liu Y. Ag+ as a more effective elicitor for production of tanshinones than phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots // Molecules. 2015. V. 20. P. 309-324.
435. 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 // Sci. China Series C: Life Sci. 2006. V. 49. P. 305-310.
436. Xu J., Dolan M.C., Medrano G., Cramer C.L., Weathers P.J. Green factory: plants as

- bioproduction platforms for recombinant proteins // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. 1171-1184.
437. Xue S.-H., Luo X.-J., Wu Z.-H., Zhang H.-L., Wang X.-Y. Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa* Mill., *Astragalus membranaceus* and *Gentiana macrophylla* Pall. // *Plant Cell Tiss. Org.* 2008. V. 92. P. 251-260.
438. Yan Q., Shi M., Ng J., Wu J.Y. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots // *Plant Sci.* 2006. V. 170. P. 853-858.
439. Yaoya S., Kanho H., Mikami Y., Itani T., Umehara K., Kuroyanagi M. Umbelliferone released from hairy root cultures of *Pharbitis nil* treated with copper sulfate and its subsequent glucosylation // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004. V. 68. P. 1837-1841.
440. Yibrah H.S., Grönroos R., Lindroth A., Franzén 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. P. 75-85.
441. Yoshikawa T., Asada Y., Furuya T. Continuous production of glycosides by a bioreactor using ginseng hairy root culture // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 1993. V. 39. P. 460-464.
442. Yoshimatsu K., Yamaguchi H., Shimomura K. Traits of *Panax ginseng* hairy roots after cold storage and cryopreservation // *Plant. Cell. Rep.* 1996. V. 15. P. 555-560.
443. 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. P. 89-103.
444. Young-Am C., Yu H.-S., Song J.-S., Chun H.-K., Park S.-U. Indigo production in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. // *Biotechnol. Lett.* 2000. V. 22. P. 1527-1530.
445. Zehra M., Banerjee S., Sharma S., Kumar S. Influence of *Agrobacterium rhizogenes* strains on biomass and alkaloid productivity in hairy root lines of *Hyoscyamus muticus* and *H. albus* // *Planta Med.* 1999. V. 65. P. 60-63.
446. Zhang H.C., Liu J.M., Chen H.M., Gao C.C., Lu H.Y., Zhou H., Li Y., Gao S.L. Up-regulation of licochalcone A biosynthesis and secretion by Tween 80 in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch // *Mol. Biotechnol.* 2011. V. 47. P. 50-56.
447. Zhang H.C., Liu J.M., Lu H.Y., Gao S.L. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment // *Plant Cell Rep.* 2009. V. 28. P. 1205-1213.
448. Zhao J., Xiang D., Peng L., Zou L., Wang Y., Zhao G. Enhancement of rutin production in *Fagopyrum tataricum* hairy root cultures with its endophytic fungal elicitors // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014. V. 44. P. 782-794.
449. Zheng L.P., Guo Y.T., Wang J.W., Tan R.X. Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots // *J. Integr. Plant. Biol.* 2008. V. 50. P. 49-55.
450. Zhou L., Tian T., Xue B., Song L., Liu L., Yu R. Biosynthesis of coumarin glycosides by transgenic hairy roots of *Polygonum multiflorum* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. V. 76. P. 1008-1010.
451. Zhou M.-L., Tang Y.-X., Wu Y.-M. Plant hairy roots for remediation of aqueous pollutants // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 31. P. 1-8.
452. Zhou M.L., Zhu X.M., Shao J.R., Tang Y.X., Wu Y.M. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 90. P. 1229-1239.
453. Zhou X., Wu Y., Wang X., Liu B., Xu H. Salidroside production by hairy roots of *Rhodiola sachalinensis* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* // *Biol. Pharm. Bull.* 2007. V. 30. P. 439-442.

PLANT «HAIRY» ROOTS ARE IMPORTANT INSTRUMENTATION FOR RESEARCHERS AND POWERFUL PHYTOCHEMIBIOFACTORY FOR MANUFACTURERS

Kuluev B.R. *, Vershinina Z.R. *, Knyazev A.V., Chemeris D.A.,
Baymiev An.K., Chumakov M.I.¹, Baymiev Al.K., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, chemeris@anrb.ru

¹Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms and Plants of Russian Academy of Sciences, Saratov

Resume

The review highlights the history of studying the phenomenon of hairy roots and biodiversity strains of *Agrobacterium rhizogenes* used to create these roots. Briefly discusses the features of the interaction of *A. rhizogenes* with plants and the process of hairy roots formation. The main emphasis in this review is given to the practical use of hairy roots as producers of the biologically active substances, including producing raw materials for further chemical synthesis. In recent years hairy roots became commercial application, so part of the review devoted to the description of a special bioreactors developed for the industrial cultivation and the development of the methods for long-term preservation of the hairy roots' cultures. At the same time hairy roots remain one of the major models in molecular biology and physiology of plants, but their potential for fundamental research is not fully exploited. References amounted to more than 450 publications covering a 115-year period.

Keywords: root, hairy roots, culture of hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, genetical transformation, composite plants, primary metabolites, secondary metabolites, bioreactor

* These authors have an equal contribution in writing this article.