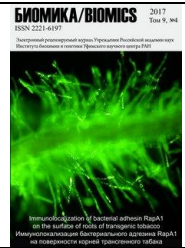




БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



**ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ *ROL*-ГЕНОВ
AGROBACTERIUM RHIZOGENES В РАСТЕНИЯХ**

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

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

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

Резюме

Фитопатогенность *Agrobacterium rhizogenes* обусловлена наличием *Ri* плазмиды, индуцирующей образование так называемых «hairy roots», известных в русскоязычной литературе как бородачатые, косматые, или генетически трансформированные pRi корни. Ключевая роль в формировании таких корней принадлежит генам *rol*, расположенным в T-ДНК *Ri* плазмиды. В процессе взаимодействия бактерий с растениями происходит передача и устойчивое встраивание генов *rolA*, *B*, *C* и *D* в растительный геном. Белковые продукты *rol*-генов являются регуляторами активности фитогормонов, и их экспрессия в растениях проявляется изменением многих физиологических и морфологических признаков. Так, *rolB* стимулирует образование ауксинсвязывающих белков, индуцирует образование корней, формирование случайных почек и увеличение размеров цветков. К тому же, трансгенные по *rolB*-генам растения характеризуются устойчивостью к солевому стрессу, низким и высоким температурам, чрезмерному свету и активным формам кислорода. Продукты генов *rol* могут не только влиять на ростовые процессы, но и повышать защитные функции растений, а также способствовать синтезу ценных первичных и вторичных метаболитов в культурах hairy roots. Поэтому технологии культивирования косматых корней являются перспективными для использования в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности. Несмотря на большой объем исследований *rol*-генов, их функции остаются не до конца изученными. В данной обзорной статье осуществлена попытка обобщить результаты исследований особенностей фенотипического проявления *rol*-генов в растениях и культурах hairy roots.

Ключевые слова: *rol*-гены, *Ri* плазмиды, hairy roots, бородачатые корни, косматые корни, *Agrobacterium rhizogenes*, T-ДНК, трансгенные растения, фенотипические признаки, вторичные метаболиты, стрессоустойчивость.

**FEATURES OF PHENOTYPIC MANIFESTATION OF *ROL*-GENES
FROM *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* IN PLANTS**

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

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

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

Resume

Ri plasmids are transferred by *Agrobacterium rhizogenes* into plant cells and causing the appearance hairy roots. The *rol*-genes play a key role of such roots formation, and locate in the T-DNA of *Ri* plasmid. Bacteria interact with plants and transfer the *rolA*, *B*, *C* and *D* genes into the plant genome. Expression products of *rol*-genes are regulators of the phytohormones activity and change the physiological and morphological characteristics of plants. For example, *rolB* induces roots and stochastic buds formation, the

increase of flowers size, and stimulates the production of auxin-binding proteins. The *rolB*-transgenic plants have resistance to salt stress, low and high temperatures, excessive light and to active forms of oxygen. The *rol*-genes products can influence growth processes, enhance the protective functions of plants, and promote the synthesis of valuable primary and secondary metabolites in hairy roots. Therefore, the technology of hairy roots cultivation is promising for use in the pharmaceutical, food and perfume industries. *Rol*-genes are studied for a long time but today their functions are not sufficiently explored. In this review article, we attempted to generalize the results of studies on the phenotypic manifestation of *rol* genes in growing plants and hairy roots.

Key words: *rol*-genes, *Ri* plasmid, hairy roots, *Agrobacterium rhizogenes*, T-DNA, transgenic plants, phenotypic characteristics, secondary metabolites, stress resistance

Введение

Для создания трансгенных растений чаще всего используют два вида агробактерий – *Agrobacterium tumefaciens* [Чемерис и др., 2014; 2015; Кулуев и др., 2014] и *Agrobacterium rhizogenes* [Кулуев и др., 2016; Knyazev et al., 2017]. Последний из них в процессе генетической трансформации довольно часто способствует переносу и интеграции в геном растений четырех генов, обозначаемых *rolA*, *B*, *C* и *D* (от *root locus*), что приводит к разрастанию адвентивных корней, известных под названием hairy roots или бородачатые/косматые корни. Экспрессия генов *rol* в целых растениях приводит к проявлению многочисленных фенотипических отклонений от нормы, часть которых могут оказаться весьма полезными для использования в биотехнологии. Функции этих четырех *rol*-генов остаются не до конца изученными [Павлова и др., 2013]. Целью данной обзорной статьи была попытка описать некоторые изученные к данному моменту фенотипические проявления экспрессии генов *rol* в трансгенных растениях и культурах корней hairy roots.

Краткая характеристика агробактерий

К *Agrobacterium* относят аэробные мезофильные бактерии, преимущественно обитающие в почвенной сфере. Это короткие, подвижные грамотрицательные палочки с перитрихальными жгутиками, образующие на своей поверхности полисахаридную капсулу. При культивировании на обогащенной питательными веществами среде формируют большое количество инволюционных скоплений, представленных V-образными фигурами. Агробактерии не образуют спор, способны к утилизации глюкозы и продукции бета-лактозы, дают положительный тест на каталазу [Чумаков, 2001].

Большинство агробактерий являются фитопатогенами двудольных растений и способны вызывать у них раковые заболевания в результате горизонтального переноса онкогенов [Mohajjel-Shoja, 2010]. Например, *Agrobacterium vitis*, или

агробактерия «виноградная», поражает корни винограда. «Опухолеобразующая» бактерия, или *A. tumefaciens* вызывает болезнь «корончатый галл» у большого числа хозяев, а *A. rhizogenes*, или агробактерия «корнеродная» является причиной заболевания «hairy root», что можно перевести как «бородачатый корень» [Чумаков и др., 2001; Мусин и др., 2017] или «косматый корень» [Кулуев и др., 2015]. Для обозначения hairy roots в русскоязычной литературе также используют термин генетически трансформированные pRi корни [Кузовкина и др., 2012; Эрст и др., 2017].

Патогенность агробактерий запрограммирована в особых мегаплазмидах, размер которых колеблется в пределах от 200 до 800 т.п.н. и более [Costantino et al., 1994]. Наиболее изучены агробактериальные плазмиды двух типов. Первый тип – это *Ti* плазмиды (от англ. tumor inducing— вызывающие образование опухолей), ко второму типу относятся *Ri* плазмиды (от англ. root inducing— вызывающие образование корней). *Ri* плазида содержит Т-ДНК, включающую в себя гены *rol* (от *root locus*) (*A*, *B*, *C*, *D*), ответственные за индукцию генетически трансформированных pRi корней. Т-ДНК транскрибируется в эукариотических клетках РНК-полимеразой II [Costantino et al, 1994; Mohajjel-Shoja, 2010].

Механизм передачи Т-ДНК агробактериальной плазмиды

Т-регион агробактериальной *Ri* плазмиды состоит из двух участков: один из них – это левый фрагмент или TL (left) и правый фрагмент, который так же обозначают как TR (right). *Rol*-гены, индуцирующие hairy roots, локализованы в районе TL-ДНК, тогда как гены синтеза опинов (источников питания агробактерий) ближе к TR-ДНК. Встраивание *rol*-генов нарушает нормальное функционирование организма-хозяина за счет изменения гормонального баланса, что, в конечном итоге, приводит к неопластическому росту hairy roots [Barampuram et al., 2011; Павлова и др., 2013]. Стоит отметить, что гены, закодированные в Т-ДНК, в

самих бактериях не функционируют, так как они находятся под управлением эукариотических промоторов.

Механизм агробактериальной трансформации растений на сегодняшний день в целом изучен [Чумаков, 2013]. Рассмотрим данный процесс на примере *A. tumefaciens*. В природных условиях агробактерии инфицируют здоровые растения, проникая через повреждения корней, которые выделяют в ризосферу большое количество полисахаридов, кислот, фенольных соединений, в том числе ацетосирингон. Эти вещества активируют экспрессию *vir*-генов и способствуют инфицированию растений. *Vir*-система (*virulence*— патогенность) кодирует гены, контролирующие синтез и перенос Т-ДНК в растительный организм и содержит в себе 7 оперонов: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* и *virG*. Каждый из них несет информацию о белках, участвующих в образовании одноцепочечной Т-ДНК, транспорте через мембрану, интеграции Т-ДНК в хромосому клеток растений [Jill, 1995]. Белок *VirA*, кодируемый одноименным геном в составе *Vir*-региона, является связанным с мембраной рецептором к ацетосирингону, который выделяется растениями при повреждении. После того, как белок-рецептор воспринял сигнал о повреждении участка растения, он передает информацию

внутриклеточному белку *VirG*, который запускает процесс активации всех остальных генов, отвечающих за инфицирование. Белок *VirD1* совместно с белком *VirD2* “находят” в плазмиде определённые участки, состоящие из 25 пар нуклеотидов, и разрезают их, перемещая ковалентную связь с конца ДНК на белок *VirD2*. Область ДНК, располагающаяся между двумя повторами размером 25 пар оснований – «right border» и «left border», носит название Т-ДНК (от англ. «transfer» – переносимая) [Чуб, 2011].

Далее комплекс из одноцепочечной Т-ДНК с белком *VirD2* связывается с белком *VirE2* (образуется Т-комплекс), который защищает Т-ДНК от расщепления ферментными системами клетки. На поверхности агробактерии при помощи разнообразных белков *VirB* образуется специальный белковый комплекс для транспортировки ДНК из агробактериальной клетки в растительную. После этого комплекс одноцепочечной Т-ДНК с *Vir*-белками проникает в цитоплазму, а затем и в ядро растительной клетки. Белок *VirE2* отвечает за узнавание ядерной поры и за процесс встраивания Т-ДНК в растительную хромосому [Mohajjel-Shoja, 2010; Чуб, 2011].

Таблица

Фенотипические проявления экспрессии онкогенов *A. rhizogenes*
[по Schmülling et al., 1988; Dehio et al., 1993; Кулаева и др., 2006; Shkryl et al., 2008; Mohajjel-Shoja, 2010; Avramenko, 2015; Mauro et al., 2017]

Онкоген	Фенотипические проявления в растениях
<i>rolA</i>	Повышает чувствительность клеток к ауксину во время цветения; вызывает снижение содержания цитокининов, гибберелловой и абсцизовой кислот, ауксина. Стимулирует корнеобразование и рост корней, укорочение междоузлий и формирование морщинистых листьев.
<i>rolB</i>	Участвует в сигнальной трансдукции ауксина; способствует повышенному образованию придаточных корней, образованию цветочных зачатков, формированию случайных почек, увеличению размеров цветков; активирует ответные реакции на стрессовые воздействия и синтез вторичных метаболитов.
<i>rolC</i>	Влияет на метаболизм цитокининов и гиббереллинов; способствует формированию более разветвленных корней, карликового фенотипа, коротких междоузлий, ланцетовидных листьев, раннего цветения, уменьшению размера цветка и количества пыльцы; активирует ответные реакции на стрессовые воздействия и синтез вторичных метаболитов.
<i>rolD</i>	Вызывает раннее наступление цветения и ускоренный переход из вегетативной стадии в репродуктивную. Уменьшает укоренение, вызывает гетеростилию и формирование меристем в постэмбриональный период. Не способен самостоятельно индуцировать формирование hairy roots.

Функциональная характеристика *rol*-генов

Чтобы идентифицировать вклад каждого гена-индуктора корнеобразования, Уайт с коллегами в 1985 провели инсерционно-делеционный анализ Т-ДНК штамма А4 *A. rhizogenes*. Результаты

исследования позволили определить наличие по меньшей мере четырех генетических локусов, которые были обозначены как *rolA*, *rolB*, *rolC* и *rolD*, соответствующие рамкам считывания: ORF10, ORF11, ORF12 и ORF15 [White et al., 1985;

Avramenko, 2015]. Дальнейшие исследования показали, что для индукции *hairy roots* достаточно использовать как отдельные *rol*-гены, так и их комбинации [Spena et al., 1987; Mohajjel-Shoja, 2010], а трансгенные растения, регенерировавшие из них, фенотипически сходны с растениями, несущими всю TL-ДНК. Более того, *rol*-гены могут быть перенесены в растения даже без использования агробактерий методом бомбардировки золотыми частицами [Ясыбаева и др., 2016; Yasybaeva et al., 2017]. Несмотря на бактериальную природу *rol*-генов, они снабжены регуляторными последовательностями, во многом напоминающими эукариотические, что обеспечивает их активность в клетках растений. Несмотря на то, что исследование генов *rol* проводится уже длительный период времени, влияние экспрессии этих генов на физиологические параметры растений остается не до конца изученным (таблица) [Moriuchi et al., 2004; Кулаева и др., 2006].

В настоящее время *hairy roots* считаются перспективными продуцентами различных первичных и вторичных метаболитов [Кулуев и др., 2015; Михайлова и др., 2016; Эрст и др., 2017]. Так как метаболизм растений сопряжен со сложными механизмами защитного ответа на раздражающие факторы, совместная или индивидуальная экспрессия бактериальных онкогенов может приводить к увеличению устойчивости трансгенных клеток к негативным абиотическим факторам. Так, например, показано, что каллусные культуры марены сердцелистной (*Rubia cordifolia*), трансформированные генами *rolB* и *rolC*, характеризуются устойчивостью к солевому стрессу, низким и высоким температурам и чрезмерному свету [Bulgakov et al., 2013]. На сегодняшний день также известно о способности *rol*-генов активировать продукцию антрахинонов, гинзенозидов [Kunshi et al., 1998], гингколидов [Ayadi et al., 2003] и других вторичных метаболитов у растений [Bonhomme et al., 2000]. Такие метаболиты выполняют обширные функции, например, регулируют процессы роста и дифференцировки растительных клеток, препятствуют поеданию животными, обладают антимикробными свойствами, способны выделяться в атмосферу в виде летучих эфиров и посылать сигнал об опасности, активируя защитные ответы в здоровых растениях [Avramenko, 2015].

Гены *rolA*

Гены *rolA* присутствуют во всех *Ri* плазидах и кодируют небольшой белок, молекулярная масса которого составляет около 11 кДа [Mohajjel-Shoja, 2010]. N-конец этого белка высоко консервативен у различных видов штаммов *A. rhizogenes*, в то время как у C-конца отмечаются

значительные вариации [Павлова и др., 2013]. Установлено, что экспрессия данного онкогена увеличивает чувствительность к ауксину в период цветения, стимулирует корнеобразование и рост корней [Кулаева и др., 2006].

Экспрессия гена *rolA* под контролем собственного промотора ингибирует рост растяжением клеток паренхимы в проводящих пучках, что приводит к укорочению междоузлий и формированию морщинистых листьев [Guivarch et al., 1996; Павлова и др., 2013]. В связи с этим трансгенные растения табака с геном *rolA* демонстрировали специфический фенотип: растения имели морщинистые листья, короткие междоузлия и аномальные соцветия [Schmülling et al., 1988; Carnerio et al., 1993].

Показано, что в тканях стебля *rolA*-трансгенных растений наблюдается повышенная экспрессия гена *rolA*, а в корнях и листьях уровень экспрессии оказался низким [Sinkar et al., 1988; Carneiro et al., 1993]. В 1994 году Магрелли с соавторами обнаружили интрон в 5'-нетранслируемой области гена *rolA* и показали, что мутации сайта сплайсинга приводят к подавлению фенотипа *rolA* [Magrelli et al., 1994]. Также известно, что присутствие *rolA* повышает β-глюкононидазную активность в 50 раз, на основе чего было высказано предположение о том, что этот белок препятствует денатурации белка GUS [Barros et al., 2003].

Экспрессия *rolA* в табаке может приводить к резкому снижению количества некоторых гормонов таких как цитокинины, ауксины, гибберелловая и абсцизовая кислоты. Степень снижения содержания фитогормонов зависит от стадии развития растения и типа трансформированной ткани [Dehio et al., 1993]. Несмотря на низкий уровень ауксина в трансформантах, они проявляют повышенную чувствительность к этому гормону [Maurel et al., 1991].

Промоторная область гена *rolA* состоит из трех функциональных доменов А, В и С [Guivarch et al., 1996]. Последовательное удаление каждого из них влечет за собой уменьшение количества транскрипта *rolA* в листьях и в итоге приводит к полному его отсутствию. Возможно, что все три домена промотора выполняют совместную регуляцию экспрессии онкогена *rolA*. У трансгенных растений, содержащих в промоторной области только домен А, ген *rolA* экспрессировался только в листьях, но не обнаруживался в тканях стебля и корня. Потеря функциональности в результате делеции домена А приводила к обратному эффекту [Dehesh et al., 1990]. Молекулярный механизм такого процесса, на сегодняшний день, остается неизученным. Эксперименты показали, что домен А

является ингибитором работы доменов В и С. Кооперативный механизм действия доменов В и С приводит к появлению морщинистых листьев и укороченных междоузлий, а присутствие только домена С определяло карликовый фенотип с нормальной формой листьев [Павлова и др., 2013].

Гены *rolB*

В течение достаточно продолжительного времени считалось, что именно *rolB* играет ключевую роль в корнеобразовании [Nilsson et al., 1997], поскольку трансформация растений всеми остальными онкогенами при инактивированном *rolB*-гене, не приводила к неопластическому росту, а встраивание в геном растений *rolB* способствовало обильному образованию *hairy roots*. *RolB* экспрессируется во всех меристематических тканях и в проводящей системе растения [Altamura, 2004].

Все индуцирующие корнеобразование *Ri* плазмиды содержат в себе гены *rolB*. Гомология соответствующих последовательностей гена у разных штаммов составляет около 60%. Протяженность кодирующей области гена *rolB* варьирует от 765 п.н. (штамм 8196) до 840 п.н. (штамм 2659). Продукт гена *rolB* штаммов 1724 и 2659 имеет дополнительные 17 аминокислот в N-концевой части в отличие от белка штамма 1855 (A4) 8196 [Meyer et al., 2000]. С 1985 года усиленно изучался механизм функционирования гена *rolB*. *RolB* является единственным среди представителей *rol*-генов, который при инактивации полностью подавляет индукцию *hairy roots* на листьях каланхоэ, к тому же только его экспрессия приводит к индуцированию укоренения почти так же эффективно, как Т-ДНК дикого типа *A. rhizogenes* в пораженных стеблях и листьях табака [White et al., 1985, Sprea et al., 1987; Bellincampi et al., 1996]. A4-*rolB* трансгенные растения табака, в которых *rolB* находится под контролем 35S промотора [Кулуев, 2012] или его собственного промотора, имели следующие аномалии: изменение морфологии листьев и размера цветка и увеличение образования корней на стебле [Schmülling et al., 1988].

Несмотря на то, что многие авторы определяют *rolB* как основной индуктор корнеобразования, его функции этим не ограничиваются. Так, например, в культуре *in vitro* тонких срезов цветоножек и стеблей табака *rolB* в значительной степени способствует образованию *de novo* как корней, так и цветочных зачатков. Считается, что такие эффекты зависят от компетентности клеток и растительного гормонального статуса [Altamura et al., 1994]. Стимулирование роста корней и цветков из клеток дикого типа в значительной степени зависит от участия экзогенного ауксина, а образование побегов

осуществляется под действием экзогенного цитокинина. Исходя из этого, была высказана гипотеза о том, что стимулирующее действие *rolB* на меристематическую ткань происходит вследствие повышенной восприимчивости клеток, экспрессирующих данный ген, к ауксину [Mohajjel-Shoja, 2010].

Морфологические аномалии *rolB*-трансформантов наиболее ярко проявляются в ответ на растительный гормон ауксин. Ауксин ответственен за апикальное доминирование и за индукцию корней во всех растениях и культурах тканей, выполняет ключевую функцию во многих этапах развития цветка и женских органов [Okada et al., 1991; Oka et al., 1999; Nemhauser et al., 2000; Tobena-Santamaria et al., 2002]. При культивировании *in vitro* *rolB*-трансгенные листья табака демонстрируют способность образовывать корни при чрезвычайно низких концентрациях ауксина, в отличие от листьев растений дикого типа, что указывает на повышенную чувствительность к гормону у *rolB*-трансформантов [Spano et al., 1988; Costantino et al., 1994]. В промоторной области гена *rolB* находится сайт связывания с факторами транскрипции NtBBF1 и RBF1, восприимчивыми к ауксину [De Paolis et al., 1996], а добавление экзогенного ауксина приводит к активному синтезу транскриптов онкогена *rolB*. Предполагают, что продукт гена *rolB* может активировать экспрессию ауксин-связывающих белков и/или увеличивать их активность [Avramenko, 2015]. Таким образом, белок *rolB* участвует в каскаде реакций, определяющих трансдукцию ауксинового сигнала, и уровень экспрессии этого белка является ауксин-зависимым [Кулаева и др., 2006]. Добавление ауксина к культуре эксплантов приводит к индукции адвентивных корней с фенотипом типичным для *rolB*-корней [Carone et al., 1994].

Промотор гена *rolB* представляет собой комплекс из пяти доменов: А, В, С и Е. Каждый из этих доменов взаимодействует с различными растительными регуляторами и модулирует работу онкогена относительно типа ткани, гормональных сигналов и стадии развития растения. В корневой части наличие всех доменов в промоторе приводит к экспрессии гена в корневом чехлике, протодерме, меристемах кортекса и в проводящей системе, т.е. в тех клетках, из которых развиваются различные ткани корня. Появление делеции в домене А влечет за собой подавление экспрессии в корневом чехлике и протодерме, такая же мутация в доменах В и Е блокирует работу гена по всей меристеме. В состав транскрипционного фактора NtBBF1 *Nicotiana tabacum* (*Nicotiana tabacum rolB* domain B Factor 1) входит единичный цинковый палец, принадлежащий

к семейству белков с Dof-доменами (DNA binding with one finger). Это семейство представляет собой специфические транскрипционные факторы, играющие роль активаторов и репрессоров во многих биологических процессах в растительных организмах [Yanagisawa, 2004; Павлова и др., 2013]. Без домена D невозможна экспрессия в меристеме кортекса. Присутствие домена С требуется для экспрессии во внутренних меристематических тканях, к тому же благодаря ему подавляется экспрессия в протодерме. Наиболее значимым считается домен В, выполняющий важную роль в регуляции транскрипции *rolB*. В том случае, когда в данном домене возникает делеция, онкоген не экспрессируется в меристемах и не индуцируется ауксином [Carone et al., 1994; Павлова и др., 2013].

Известна способность гена *rolB* активировать защитные системы растения в ответ на появление АФК. Этот эффект при чрезмерном их накоплении становился настолько сильным, что трансгенные клетки *R. cordifolia* могли переносить сверхвысокие дозы АФК продолжительное время [Bulgakov et al., 2013]. С физиологической точки зрения такой эффект аналогичен адаптации, во время которой растения производят каталазы, пероксидазы, аскорбаты и другие АФК-детоксицирующие ферменты для защиты своих клеток от стрессовых воздействий [Gechev et al., 2006; Bulgakov et al., 2013]. Это приводит к устойчивой антиоксидантной защите и защите растений от последующих стрессов. Установлено так же, что *rolB* способен предотвращать гибель некротических клеток и уменьшать апоптотические симптомы у трансформантов [Bulgakov et al., 2013].

Среди всех онкогенов семейства *rol*-генов, именно *rolB* оказывает наибольшее влияние на изменения вторичного метаболизма у генетически модифицированных растений [Shkryl et al., 2008]. Опыты на *R. cordifolia* свидетельствуют, что присутствие *rolB* (штамма А4) в геноме каллусов влечет за собой активацию экспрессии *PR*-генов (от англ. pathogenesis-related genes), а также генов, кодирующих пероксидазы 3-го класса. Представленный онкоген повышает экспрессию антиоксидантных ферментов: аскорбатпероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы [Bulgakov et al., 2013; Mauro et al., 2017] и ферментов синтеза фитоалексинов [Veremeichik et al., 2012]. Имеются данные, что *rolB* увеличивает биосинтез ресвератрола в культурах клеток *Vitis amurensis* более чем в 100 раз [Kiselev et al., 2007], а также повышает производство антрахинонов в 15 раз [Avramenko, 2015]. Ресвератролом называют важный природный фитоалексин, обладающий антиоксидантными, противовоспалительными,

антибактериальными, противовирусными и противогрибковыми свойствами. Это вещество так же является сильным противоопухолевым агентом, эффективным против многих видов раковых заболеваний [Aggarwal et al., 2004]. В трансгенной по генам *rolB* и *rolC* полыни *Artemisia carvifolia* увеличивалось содержание артемизинина* [Dilshad et al., 2015]. Есть сведения о том, что ген *rolB* может вызывать нарушение баланса кальция в растительном организме [Bulgakov et al., 2003; Павлова и др., 2013]. Предполагается, что одной из причин проявления эффектов продукта гена *rolB* является подавление экспрессии различных генов посредством стимуляции сверхэкспрессии микроРНК (miRNA), регулирующих биологические процессы, в том числе и механизмы вторичного метаболизма [Bulgakov et al., 2015; Mauro et al., 2017].

Гены *rolC*

Самый консервативный из онкогенов ген *rolC* присутствует в геноме всех изученных штаммов *A. rhizogenes*. Длина гена *rolC*, выделенного из различных *Ri* плазмид, варьирует от 537 (штамм 8196) до 543 п.н. (штаммы 2659, 1724, А4). Они кодируют белки размером от 178 до 180 аминокислот (приблизительно 20 кДа) со степенью гомологии около 65% [Meyer et al., 2000].

RolC впервые исследовали в 80-х годах прошлого века. Благодаря проведенным в 1985 г [White et al., 1985] опытам удалось установить, что инактивация этого онкогена в агробактериях *A. rhizogenes* (штамм А4) влечет за собой ослабление индукции корней на листовых пластинах каланхоэ. Дальнейшие исследования показали, что ген *rolC* штамма А4 способен как сам по себе, так и под контролем 35S промотора образовывать более разветвленные корни на листьях табака, чем корни, индуцированные при помощи генов *rolA* или *rolB*. Однако подобного эффекта на листьях каланхоэ получить не удалось [Mohajjel-Shoja, 2010].

Отмечается, что экспрессия гена *rolC* орган-специфична, так, она максимальна в корнях и уменьшается в ряду: корни–стебель–цветки–листья. На тканевом уровне продукты транскрипции *rolC* обнаруживались во флоэме и в железистых клетках табака [Guivarch et al., 1996; Павлова и др., 2013]. Растения, трансформированные геном *rolC* под контролем собственного промотора, имели следующие фенотипические признаки: уменьшение апикального доминирования, приводящего к усилению ветвления, появление карликовости,

* Artemisinin - противомаларийное и противораковое соединение.

коротких междоузлий, ланцетовидных листьев, раннего цветения, уменьшение размера цветка и производства пыльцы. Следует подчеркнуть, что скорость роста и развития корней была больше, чем у корней дикого типа, однако меньше, чем у образцов, в геном которых были встроены все 4 *rol*-гена [Spena et al., 1987; Schmülling et al., 1988; Ono et al., 1990; Palazon et al., 1998]. Трансформированные геном *rolC* растения клубники обладали более тяжелыми плодами и повышенной толерантностью к паразитам *Phytophthora cactorum*. Существуют работы по трансформации геном *rolC* некоторых декоративных цветковых растений с целью улучшения их декоративных свойств [Landi et al., 2009]. Так, ценные морфологические признаки наблюдались у таких родов, как *Syzygium* [Zuker et al., 2001], *Kalanchoe* [Christensen et al., 2008] и *Limonium* [Mercuri et al., 2001; Mauro et al., 2017].

Стимулирование роста корней при помощи *rolC* может быть объяснено ауксиноподобным эффектом онкогена [Schmülling et al., 1988; Zuker et al., 2001]. Измерение трансмембранной гиперполяризации в ответ на ауксин показало, что протопласты табака, имеющие в своем геноме ген *rolC*, более чувствительны к ауксину, чем их аналоги дикого типа [Maurel et al., 1991; Mohajjel-Shoja, 2010]. Также имеются данные, что белок *rolC* (продуцируемый в *E. coli*) обладает β -глюкокоронидазной активностью, которая способствует высвобождению активных форм цитокининов из их неактивных глюкозидных конъюгатов [Estruch et al., 1991].

Механизм регуляции экспрессии гена *rolC* усложняется взаимодействием с другими последовательностями Т-ДНК. Когда другие гены Т-ДНК отсутствуют, промотор онкогена *rolC* экспрессируется в корнях и стеблях, в то время как в листьях табака наблюдается довольно низкий уровень продукта гена [Spena et al., 1987; Schmülling et al., 1988]. Однако в присутствии всей Т-ДНК, *rolC* также экспрессируется на высоком уровне и в листьях табака [Durand-Tardif et al., 1985; Leach et al., 1991]. Несмотря на то, что область экспрессии *rolC*, как правило, ограничивается клетками флоэмы, ген может быть индуцирован в любой клетке, при условии культивирования в среде, богатой сахарозой. Чувствительная к сахарозе промоторная область размещена между 135 и 94 п.н. и обогащена АТ-последовательностями [Faiss et al., 1996; Nilsson et al., 1997].

Доказано, что *rolC*, как и *rolB*, способен активизировать синтез значительного количества вторичных метаболитов. Онкоген индуцирует производство тропановых алкалоидов [Bonhomme et al., 2000], алкалоидов пиридина и индола [Palazon et

al., 1998], гинсенозидов [Bulgakov et al., 2002] и антрахиноновых фитоалексинов [Shkryl et al., 2008]. Кроме того, в салате (*Lactuca sativa*) *rolC* повышает антиоксидантные и противовоспалительные свойства этого растения вследствие увеличения продукции фенолов и флавоноидов [Ismail et al., 2016]. Растения, трансформированные генами *rolA* и *rolC*, демонстрируют повышенное производство никотина [Palazon et al., 1998], антрахинонов, гинсенозидов [Bulgakov et al., 2002; Shkryl et al., 2008] и алкалоидов [Palazon et al., 1998; Bonhomme et al., 2000; Mauro et al., 2017].

Флоэмо-специфическая экспрессия промотора *rolC* делает его полезным инструментом в биотехнологических целях, направленных на повышение устойчивости к растительным патогенам. Насекомых-переносчиков инфекционных заболеваний растений часто относят к решающим факторам фитопатогенеза, значительно усиливающих негативные последствия проявления болезни, вследствие взаимного усиления эффектов на растение. В число дендрофильных насекомых, осуществляющих перенос фитопатогенной инфекции, входит *Homoptera* (гемиптера). Лютеовирусы, реовирусы и большинство геминивирусов, способные реплицироваться лишь в клетках флоэмы, передаются при помощи гемиптерных насекомых [Черпаков, 2013]. А специфичная для флоэмы экспрессия инсектицидного гена, токсичного для таких биологических переносчиков, поможет непосредственно контролировать передачу патогена. Например, в трансгенных растениях риса, табака и нута, ген *ASAL* (*Allium sativum leaf agglutinin*), кодирующий растительный лектин с инсектицидной активностью, помещенный под контроль промотора *rolC*, обеспечивает устойчивость к гемиптерийным вредителям [Mohajjel-Shoja, 2010].

Гены *rolD*

Ген *rolD* входит в состав только ТЛ-ДНК агропиновых *Ri* плазмид [Christey, 2001]. Основными из фенотипических признаков *rolD* генно-модифицированных растений табака можно назвать раннее цветение и уменьшение укоренения. Из-за раннего перехода от вегетативного роста к репродуктивному на некоторых растениях не образуются почки, к тому же высота трансформантов меньше, чем у контрольных образцов. У цветков отмечается явление гетеростилии, тем не менее, семена, полученные от самоопыления, жизнеспособны [Mauro et al., 1996; Павлова и др., 2013]. Закодированный данным онкогеном цитозольный белок проявляет активность орнитинцикламидаминазы (OCD), способной

превращать орнитин в пролин [Mauro et al., 1996; Trovato et al., 2001]. Было выдвинуто предположение, что раннее цветение связано с синтезом пролина, поскольку его высокие уровни наблюдаются именно в цветках [Trovato et al., 2001]. В культуре тонких срезов экспрессия гена *rolD* приводила к обильному формированию цветковых меристем, даже в том случае, когда в норме должны появиться корни, т.е. можно выдвинуть предположение, что данный онкоген подавляет образование корней. Опыты, продемонстрированные на целом растении, никаких значительных эффектов на корневую систему не оказали. Такие же данные были получены на томате [Mauro et al., 1996] и на арабидопсисе [Falasca et al., 2010]. Среди всех онкогенов семейства *rol*, только *rolD* не способен самостоятельно спровоцировать образование hairy roots [Mauro et al., 1996; Avramenko, 2015]. На основе вышесказанного следует сделать вывод, что основное проявление *rolD* — это формирование меристем в постэмбриональный период, в частности пазушных почек [Павлова и др., 2013]. Экспрессия онкогена не является специфичной для тканей, но регулируется в процессе развития растения. Активность промотора гена *rolD* наблюдается в удлиняющихся и дифференцирующихся тканях каждого органа взрослого растения, за исключением апикальных меристем. Доказано, что в процессе роста растений экспрессия гена *rolD* уменьшается и прекращается при их старении. Подобно *rolB*, *rolD* рассматривается как ген, индуцируемый гормоном ауксином. Однако в то время как активация промотора *rolB* усиливается с увеличением концентрации ауксина, индукция промотора *rolD*, напротив, достигает определенного максимума и уменьшается при более высоких концентрациях ауксина. Промотор гена *rolD* так же, как и промотор гена *rolB* несет в себе Dof-связывающий элемент, участвующий в индукции данного гормона [Trovato et al., 1997; Mohajjel-Shoja, 2010].

Заключение

A. rhizogenes является природным переносчиком онкогенов *rol A, B, C* и *D* в клетки растений, что вызывает заболевание «hairy root». Экспрессия каждого из таких *rol*-генов, оказывая влияние на параметры роста, приводит к определённым фенотипическим эффектам в растениях. У трансформантов отмечаются нарушения фитогормонального и кальциевого статуса, приобретение новых морфологических и фенотипических признаков, повышение устойчивости по отношению к различным стрессовым воздействиям. Поэтому *rol*-гены *A. rhizogenes* могут оказаться перспективными при создании трансгенных растений, характеризующихся

улучшенными параметрами роста и повышенной стрессоустойчивостью. Причем *rol*-гены могут быть перенесены в строго определенные места генома растений при помощи технологии CRISPR/Cas9 [Кулуев и др., 2017]. Однако на сегодняшний день для планирования работ по использованию *rol*-генов в геномной инженерии и геномном редактировании не хватает эмпирических данных и поэтому продолжение этого направления исследований остается весьма актуальным.

Получаемые при агробактериальной трансформации культуры hairy roots используются для синтеза первичных и вторичных метаболитов, и эти технологии могут быть полезны в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности. Оптимизированные для жидких культур hairy roots можно выращивать в промышленных биореакторах для получения широкого спектра фитохимикатов [Ono et al., 2011]. Так, на сегодняшний день при помощи hairy roots уже синтезируются ресвератрол, антиоксидантные ферменты: аскорбатпероксидаза, каталаза и супероксиддисмутаза, ферменты синтеза фитоалексинов, алкалоиды: тропановые, пиридиновые, индольные; гинсенозиды, фитоалексины, артемизинины и т.д. При этом тонкая регуляция экспрессии *rol*-генов может быть использована для модуляции синтеза вторичных метаболитов.

Перенос генов *A. rhizogenes* в растения может быть не только стратегией, помогающей выживанию агробактерий, но и в свете новых данных может рассматриваться как симбиоз между бактерией и растением. Если даже это взаимодействие не является симбиозом в привычном понимании этого термина, в любом случае это пример возникшей в процессе длительной эволюции устойчивой природной системы, которая может быть полезной не только для агробактерии, но и для растения-хозяина. Дальнейшие детальные исследования структуры, функции и биохимической активности *rol*-генов и их белковых продуктов помогут прояснить тонкие механизмы регуляции процессов взаимодействия агробактерий и растений, а также функционирования Т-ДНК в растительном геноме. Эти знания могут приблизить нас в будущем к разработке методов целенаправленного управления ростом и продуктивностью как целых растений, так и их частей, с применением, в том числе, онкогенов агробактерий. По крайней мере, агробактерии в процессе эволюции уже давно «научились» управлять ростом растений, поэтому изучение молекулярных механизмов агробактериальной трансформации растений, может и нас приблизить к решению этой актуальной проблемы науки о растениях.

Литература

1. Авраменко Т.В. Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*: автореф. дис. канд. биол. наук / Т. В. Авраменко; Биол.-почв. ин-т ДВО РАН. Владивосток, 2015. 24 с. [Avramenko T.V. Activity and production of Class III peroxidases in cell cultures of plants transformed with *rolB* and *rolC* genes: Abstract. dis. cand. biol. sciences / T.V. Avramenko; Biol.-soil. institute of Far Eastern Branch of RAS. Vladivostok, 2015. 24 p. In Russian].
2. Кулаева О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Горизонтальный перенос генов от агрообактерий к растениям // Экологическая генетика. 2006. Т. IV. № 4. С. 10–19. [Kulaeva O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal transfer of genes from agroobacteria to plants // Ecological genetics. 2006. V. IV. № 4. P. 10–19. In Russian].
3. Кулуев Б.Р. Каулимовирусы и их полногеномные промоторы // Биомика. 2012. Т. 4. №1. С. 1-19. [Kuluev B.R. Caulimoviruses and their promoters // Biomics. 2012. V. 4. P. 1-19. In Russian].
4. Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // Биомика. 2015. Т. 7. №2. С. 70–120. [Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A., Baimiev A.N., Chumakov M.I., Baimiev A.L., Chemeris A.V. Plant hairy roots are important instrumentation for researchers and powerful phytochembiofactory for manufacturers // Biomics. 2015. V. 7. №2. P. 70–120. In Russian].
5. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ал.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Ясыбаева Г.Р., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017. Т. 9. №3. С. 155–182. [Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Baymiev An.Kh., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Matniyazov R.T., Gumerova G.R., Mikhailova E.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris D.A., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. CRISPR/Cas genome editing of plants // Biomics. 2017. V. 9. №3. P. 155–182. In Russian].
6. Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модельная система для изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения / В кн.: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. Под ред. Кузнецова Вл. В., Кузнецова В.В., Романова Г.А. Москва, 2012. БИНОМ, Лаборатория знаний, С. 137–153. [Kuzovkina I.N., Vdovitchenko M.Yu. Genetically transformed roots as a model system for studying the physiological and biochemical processes of the root system of an entire plant / In: Molecular genetic and biochemical methods in modern plant biology. Kuznetsova V.I.V., Kuznetsova V.V., Romanova G.A. Moscow, 2012. BINOM, Laboratory of Knowledge, P. 137–153. In Russian].
7. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородачатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 40–45. [Mikhailova E.V., Kuluev B.R., Yasibaeva G.R., Chemeris A.V. Creation of cultures of hairy roots *Withania somnifera* and assessment of parameters of their growth at cultivation on firm and liquid nutritious environments // Journal “Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology”. 2017. V. 13. № 2. P. 40-45. In Russian].
8. Мусин Х.Г., Якупова А.Б., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Особенности роста культур генетически трансформированных (бородачатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 46–50. [Musin Kh.G., Yakupova A.B., Mikhailova E.V., Kuluyev B.R. Peculiarities of the growth of cultures of genetically transformed (hairy) roots of tobacco and vitania with a change in the volume of nutrient medium // Journal “Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical

- Biology". 2017. V. 13. № 2. P. 46–50. In Russian].
9. Павлова О.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. *Rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes* // Экологическая генетика. 2013. Т. XI. №1. С. 59–68. [Pavlova O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. *Rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes* // Ecological genetics. 2013. V. XI. N 1. P. 59–68. In Russian].
 10. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг // Биомика. 2014. Т.6. № 2. С. 77–138. [Chemeris A.V., Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Baymiev A.L., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Maksimov I.V. Should beware of the GMOs? On-site observers view on the hysteria around // Biomics. 2014. V.6. № 2. P. 77–138. In Russian].
 11. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Баймиев А.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Борьба с ГМО как неолысенковщина // Биомика. 2015. Т. 7. № 1. С. 1–39. [Chemeris A.V., Chemeris D.A., Baymiev A.Kh., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Maksimov I.V. The fight against GMO is neolysenkoism // Biomics. V. 7. № 1. P. 1–39. In Russian].
 12. Черпаков В.В. Дендрофильные насекомые - переносчики и симбионты возбудителей болезней древесных растений // VII Чтения памяти О. А. Катаева. Вредители и болезни древесных растений России / Материалы междунар. конференции, Санкт-Петербург, 25–27 ноября 2013 г. СПб.: СПб ГЛТУ, 2013. С. 97–98. [Cherpakov V.V. Dendrophilous insects - carriers and symbionts of pathogens of diseases of wood plants // VII Readings in memory of OA Katayev. Pests and diseases of woody plants in Russia / Intern. Conference, St. Petersburg, November 25–27, 2013 SPb.: St. Petersburg State Technical University, 2013. P. 97–98. In Russian].
 13. Чуб В.В. Растения-ГМО: как это делается // Потенциал. Химия. Биология. Медицина. 2011. № 11. [Chub V.V. Plants-GMOs: how it's done // Potential. Chemistry. Biology. Medicine 2011. № 11. In Russian].
 14. Чумаков М.И. Механизм агробактериальной трансформации растений. Саратов: Слово, 2001. 256 с. [Chumakov M.I. The mechanism of agrobacterial transformation of plants. Saratov: The Word, 2001. 256 pp. In Russian].
 15. Чумаков М.И. Белковый аппарат, реализующий горизонтальный перенос Т-ДНК из агробактерий в эукариотические клетки (обзор) // Биохимия. 2013. Т. 78. № 12. С. 1670–1683. [Chumakov M.I. The protein complex realizes the horizontal transfer of T-DNA from agrobacterium to eukaryotic cells (review) // Biochemistry. 2013. V. 78. № 12. P. 1670–1683. In Russian].
 16. Эрст А.А., Зибарева Л.Н., Железниченко Т.В., Ковзунова О.В. Культура генетически трансформированных корней (hairy roots) *Silene roemerii* Friv. – источник получения фитоэджидстероидов // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2017. № 37. С. 17–30. [Erst A.A., Zibareva L.N., Zheleznichenko T.V., Kovzunova O.V. Culture of genetically transformed roots (hairy roots) *Silene roemerii* Friv is source of phytoecdysteroids production // Tomsk State University Journal of Biology. 2017. №. 37. P. 17–30. In Russian].
 17. Ясыбаева Г.Р., Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Безбактериальное получение косматых корней // Вестник защиты растений. 2016. Т. 89. № 3. С. 187–188. [Yasibaeva G.R., Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. Induction of hairy roots without *Agrobacterium* transformation // Plant Protection News. 2016. T. 89. № 3. P. 187–188. In Russian].
 18. Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies // Anticancer Res. 2004 V. 24. P. 2783–2840.
 19. Altamura M.M., Capitani F., Gazza L., Capone I., Costantino P. The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flower and root meristemoids in tobacco thin cell layers // New Phytol. 1994. V. 126. P. 283–293. doi: 10.1111/j.1469-8137.1994.tb03947.x
 20. Altamura M.M. *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. V. 77. P. 89–101. doi: 10.1023/B:TICU.0000016609.22655.33
 21. Ayadi R., Tremouillaux-Guiller J. Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba* // Tree Physiol. 2003. V. 23. P. 713–718. doi: 10.1093/treephys/23.10.713
 22. Barros L.M.G., Curtis R.H., Viana A.A.B., Campos L., Carneiro M. Fused *RoIA* Protein enhances glucoronidase activity 50-fold: implication for *rolA* mechanism of action. protein pep // Lett. 2003. V. 10. P. 303–311. doi: 10.2174/0929866033478951

23. Bellincampi D., Cardarelli M., Zaghi D., Serino G., Salvi G., Gatz C., Cervone F., Altamura M.M., Costantino P., De Lorenzo G. Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in *rolB* transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the *rolB* gene // *Plant Cell*. 1996. V. 8. P. 477–487. doi: 10.1105/tpc.8.3.477
24. Bonhomme V., Laurain Mattar D., Fliniaux M.A. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* // *J Nat Prod*. 2000. V. 63. P. 1249–1252. doi: 10.1021/np990614l
25. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N., Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes // *Biotechnol*. 2002. V.97. P. 113–221. doi: 10.1016/S0168-1656(02)00067-6
26. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpenchenko T.Y., Vereshchagina Y.V. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2013. V.134. P.11–22. doi: 10.1007/10_2013_179
27. Bulgakov V.P., Veremeichik G.N., Shkryl Y.N. The *rolB* gene activates the expression of genes encoding microRNA processing machinery // *Biotechnol Lett*. 2015. V. 37. P. 921–925. doi: 10.1007/s10529-014-1743-7
28. Capone I., Frugis G., Costantino P., Cardarelli M. Expression in different populations of cells of the root meristem is controlled by different domains of the *rolB* promoter // *Plant Mol. Biol*. 1994. V. 25. P. 681–691. doi: 10.1007/BF00029606
29. Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spano L., Capone I., Costantino P. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype // *Mol. Gen. Genet*. 1987. V. 209. P. 475–480. doi: 10.1007/BF00331152
30. Carneiro M., Vilaine F. Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development // *Plant J*. 1993. V. 3. P. 785–792. doi: 10.1111/j.1365-313X.1993.00785.x
31. Christey M.C. Use of *Ri*-mediated transformation for production of transgenic plants // *In Vitro Cell Dev Biol*. 2001. V. 37. P. 687–700. doi: 10.1079/IVP2001203
32. Christensen B., Sriskandarajah S., Serek M., Müller R. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with *rol*-genes is useful in molecular breeding towards compact growth // *Plant Cell Rep*. 2008. V. 27. P. 1485–1495. doi: 10.1007/s00299-008-0575-0
33. Costantino P., Capone I., Cardarelli M., DePaolis A., Mauro M.L., Trovato M. Bacterial plant oncogenes: the *rol* genes' saga // *Genetica*. 1994. V. 94. P. 203–211. doi: 10.1007/BF01443434
34. De Paolis A., Sabatini S., De Pascalis L., Costantino P., Capone I. A *rolB* regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins // *Plant J*. 1996. V. 10. P. 215–223. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.10020215.x
35. Dehio C., Schell J. Stable expression of a single-copy *rolA* gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allows an exhaustive mutagenic analysis of the transgene associated phenotype // *Mol. Gen. Genet*. 1993. V. 241. P. 359–366. doi: 10.1007/BF00284689
36. Dehesh K., Bruce W.B., Quail P.H. A transacting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter // *Science*. 1990. V. 250. P. 1397–1399. doi: 10.1126/science.2255908
37. Dilshad E., Cusido R.M., Palazon J., Estrada K.R., Bonfill M., Mirza B. Enhanced artemisinin yield by expression of *rol* genes in *Artemisia annua* // *Malar. J*. 2015. V. 14. P. 424. doi: 10.1186/s12936-015-0951-5
38. Durand-Tardif M., Broglie R., Slightom J., Tepfer D. Structure and expression of *Ri* T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*. Organ and phenotypic specificity // *Mol. Biol*. 1985. V. 186. P. 557–564. doi: 10.1016/0022-2836(85)90130-5
39. Estruch J.J., Chriqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates // *EMBO J*. 1991. V. 10. P. 2889–2895.
40. Faiss M., Strnad M., Redig P., Doležal K., Hanuš J., Van Onckelen H., Schmülling T. Chemically induced expression of the *rolC*-encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta // *Plant J*. 1996. V. 10. P. 33–46. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.10010033.x

41. Falasca G., Altamura M.M., D'Angeli S., Zaghi D., Costantino P., Mauro M.L. The *rolD* oncogene promotes axillary bud and adventitious root meristems in *Arabidopsis* // *Plant Physiol Biochem.* 2010. V. 48. P. 797–804. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.06.002
42. Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., Laloi C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // *Bioessays.* 2006. V. 28. P. 1091–1101. doi: 10.1002/bies.20493
43. Guivarch A., Spena A., Noin M. The pleiotropic effects induced by the *rolC* gene in transgenic plants are caused by expression restricted to protophloem and companion cells // *Transgen. Res.* 1996. V. 5. P. 3–11. doi: 10.1007/BF01979917
44. Ismail H., Dilshad E., Tahir Waheed M., Sajid M., Kayani K., Mirza B. Transformation of *Lactuca sativa* L. with *rolC* gene results in increased antioxidant potential and enhanced analgesic, anti-inflammatory and antidepressant activities *in vivo* // *Biotech* 2016. V. 6. P. 215. doi: 10.1007/s13205-016-0533-4
45. Jill S. Gartland. *Agrobacterium* virulence // *Methods in Molecular Biology.* 1995. V. 44. P. 15–28. doi: 10.1385/0-89603-302-3:15
46. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // *J Biotechnol.* 2007. V. 128. P. 681–692. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.008
47. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size // *Biologia Plantarum.* 2016. V. 60. P. 513–522.
48. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Postrigan B.N., Chemeris A.V. The creation of transgenic tobacco plants expressing fragments of the *ARGOS* and *NiEXPA4* genes in antisense orientation // *Russian Journal of Genetics.* 2014. V. 50. P. 37–44. doi: 10.1134/S1022795414010074
49. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction in *Parasponia andersonii* Planch // *Asian Journal of Plant Sciences.* 2017. V. 16 (4). P. 227–234.
50. Kunshi M., Shimomura K., Takida M., Kitanaka S. Growth and ginsenoside production of adventitious and hairy root cultures in an interspecific hybrid ginseng (*Panax ginseng*, *P. quinquefolium*) // *Nat Med.* 1998. V. 52. P. 1–4.
51. Landi F., Capocasa E., Costantini B., Mezzetti M. *RolC* strawberry plant adaptability, productivity, and tolerance to soil-borne disease and mycorrhizal interactions // *Transgenic Res.* 2009. V. 18. P. 933–942. doi: 10.1007/s11248-009-9279-7
52. Leach F., Aoyagi K. Promoter analysis of the highly expressed *rolC* and *rolD* root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated // *Plant Sci.* 1991. V. 79. P. 69–76. doi: 10.1016/0168-9452(91)90071-F
53. Magrelli A., Langenkemper K., Dehio C., Schell J., Spena A. Splicing of the *rolA* transcript of *Agrobacterium rhizogenes* in *Arabidopsis* // *Science.* 1994. V. 266. P. 1986–1988. doi: 10.1126/science.7528444
54. Maurel S., Barbier-Bryqoo H., Spena A., Temp G., Guern G. Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum* // *Plant Physiol.* 1991. V. 97. P. 212–216. doi: 10.1104/pp97.1.212
55. Mauro M.L., Trovato M., Paolis A.D., Gallelli A., Costantino P., Altamura M.M. The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants // *Dev. Biol.* 1996. V. 180. P. 693–700. doi: 10.1006/dbio.1996.0338
56. Mauro M.L., Costantino P.P., Bettini P. The never ending story of *rol* genes: a century after // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2017. V. 2. P. 201–212. doi: 10.1007/s11240-017-1277-5
57. Mercuri A., Bruna S., De Benedetti L., Burchi G., Schiva T. Modification of plant architecture in *Limonium* spp. induced by *rol* genes // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 2001. V. 65. P. 247–253. doi: 10.1023/A:1010623309432
58. Meyer A.D., Tempé J., Costantino P. Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes // *Plant microbe interaction.* 2000. V 5. P. 93–139.
59. Mohajjel-Shoja H. Contribution to the study of the *Agrobacterium rhizogenes* plast genes, *rolB* and *rolC*, and their homologs in *Nicotiana tabacum*. Thesis of University of Strasbourg. 2010.
60. Moriuchi H., Okamoto C., Nishihama R., Yamashit I., Machida Y., Tanaka N. Nuclear localization and interaction of *rolB* with plant 14-3-3 proteins correlate with induction of

- adventitious roots by the oncogene *rolB* // Plant J. 2004. V. 38. P. 260–275. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02041.x
61. Nemhauser J.L., Feldman L.J., Zambryski P.C. Auxin and ETTIN in *Arabidopsis* gynoecium morphogenesis // Development. 2000. V. 127. P. 3877–3888.
 62. Nilsson O., Olsson O. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots // Physiol Plant. 1997. V. 100. P. 463–473. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb03050.x
 63. Palazon J., Cusido R.M., Roig C., Piñol M.T. Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants // Plant Cell Rep. 1998. V. 17. P. 384–390. doi: 10.1007/s002990050411
 64. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravle Y.N. Individual and combined effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli // Biotechnol. Bioeng. 2008. V. 1. P. 118–125. doi: 10.1002/bit.21727
 65. Schmülling T., Schell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development // EMBO J. 1988. V. 7. P. 2621–2629.
 66. Shyamkumar Barampuram, Zhanyuan J. Zhang Recent Advances in Plant Transformation // Methods in Molecular Biology. 2011. V. 701. P. 1–35. doi: 10.1007/978-1-61737-957-4_1
 67. Sinkar P.S., Pythoud F., White F.F., Nester E.W., Gordon M.P. *RolA* locus of the *Ri* plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants // Genes Dev. 1988. V. 2. P. 688–697. doi: 10.1101/gad.2.6.688
 68. Spano L., Mariotti D., Cardarelli M., Branca C., Costantino P. Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of *Ri* T-DNA // Plant Physiol. 1988. V. 87. P. 479–483.
 69. Spena A., Schmülling T., Koncz C., Shell J. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants // EMBO J. 1987. V. 6. P. 3891–3899.
 70. Ono N.N., Tian L. The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities // Plant Sci. 2011. V. 180. P. 439–446. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.11.012.
 71. Palazon J., Cusido R.M., Roig C., Piñol M.T. Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants // Plant Cell Rep. 1998. V. 17. P. 384–390. doi: 10.1007/s002990050411
 72. Tobena-Santamaria R., Bliet K., Ljung G., Sandberg J.N.M. FLOOZY of petunia is a Flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture // Gene Dev. 2002. V. 16. P. 753–763.
 73. Trovato M., Mauro M.L., Costantino P., Altamura, M.M. The *rolD* gene from *Agrobacterium rhizogenes* is developmentally regulated in transgenic tobacco // Protoplasma. 1997. V. 197. P. 111–120. doi: 10.1007/BF01279889
 74. Trovato M., Maras B., Linhares F., Constantino P. The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001. V. 98. P. 13449–13453. doi: 10.1073/pnas.231320398
 75. Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Zhuravlev Y.N. Molecular cloning and characterization of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures // Plant Cell Rep. 2012. V. 6. P. 1009–1019. doi: 10.1007/s00299-011-1219-3.
 76. White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* // J. Bacteriol. 1985. V. 164. P. 33–44.
 77. Yanagisawa S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants // Plant Cell Physiol. 2004. V. 45. P. 386–391.
 78. Yasybaeva G.R., Vershinina Z.R., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Baymiev A.H., Chemeris A.V. Biolistic-mediated plasmid-free transformation for induction of hairy roots in tobacco plants // Plant Root. 2017. V. 11. P. 33–39. doi: 10.3117/plantroot.11.33
 79. Zuker A., Tzfira T., Scovel G., Ovadis M., Shklarman E., Itzhaki H. *RolC*-transgenic carnation with improved agronomic traits: Quantitative and qualitative analyses of greenhouse-grown plants // J. Am. Soc. Hortic. Sci. 2001. V. 126. P. 13–18.