

На правах рукописи



ШКРЫЛЬ  
ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ *ROL* КАК АКТИВАТОРЫ  
БИОСИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И  
СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ**

1.5.6. Биотехнология  
(биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Владивосток 2024

Работа выполнена в лаборатории бионанотехнологий и биомедицины ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН

**Научный консультант:** доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, **Булгаков Виктор Павлович**

**Официальные оппоненты:** **Кулуев Булат Разяпович,**  
доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений

**Жукова Наталья Владимировна,**  
доктор биологических наук, доцент, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, главный научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии

**Калинин Владимир Иванович,**  
доктор биологических наук, ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории химии морских природных соединений

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Защита состоится «24» сентября 2024 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159. Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Тюнин А. П.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Почвенные бактерии *Rhizobium rhizogenes* способны переносить область транспортной ДНК (Т-ДНК) своей плазмиды Ri (от англ. *r*oot *i*nducing) в геном растений. Это природный механизм трансформации, безопасный для человека или животных, который приводит к появлению природно-трансгенных растений и является примером горизонтального переноса генов между про- и эукариотическими организмами (Matveeva and Otten, 2019). В составе Т-ДНК агробактерий содержатся гены с известными функциями, обеспечивающими биосинтез опинов и растительных гормонов, а также малоизученные гены семейства *plast*, к которым, в частности, относятся гены *rol* (от англ. *r*oot *l*oci). Последние которые как в отдельности, так и в комбинации друг с другом, способны вызывать неопластический рост с образованием «волосатых» корней, а также другие морфологические и физиологические изменения в трансформированных растениях и клеточных культурах. Индукция «волосатых» корней агробактерией возможна практически у любых двудольных растений и с точки зрения биотехнологии интересна тем, что в условиях *in vitro* данный тип ткани способен к неограниченному гормон-независимому росту и активной продукции вторичных метаболитов (Stepanova et al., 2022). Высокая генетическая стабильность трансформированных корней благоприятствует их применению для получения рекомбинантных белков и вакцин (Gutierrez-Valdes et al., 2020). Генетически трансформированные корни также представляют собой ценную модель для исследований в области фиторемедиации, физиологических процессов и путей биосинтеза у растений (Doran, 2009; Ono and Tian, 2011; Sharma et al., 2013).

Отдельные гены *rol* давно привлекают внимание исследователей своими необычными свойствами, особенностями происхождения и эволюции, а также значительным потенциалом в области биотехнологии. Накопленные данные подчёркивают значимость этих генов как регуляторов в разнообразных аспектах жизнедеятельности растений — начиная от гормонального баланса и заканчивая защитными механизмами и метаболизмом (Павлова и др., 2013; Mauro et al., 2017; Paolis et al., 2019). Несмотря на эти значительные успехи в изучении генов *rol*, есть существенные пробелы в понимании молекулярных механизмов их действия, что ограничивает их практическое применение. Белки, кодируемые генами *rol*, не имеют какой-либо четкой гомологии с известными белками растений или бактерий, а данные об их ферментативной активности немногочисленны и противоречивы. Более того, было выяснено, что гены *rol* могут оказывать плейотропное воздействие на процессы роста и вторичного метаболизма. Поэтому изучение молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе действия генов *rol*, а также анализ их воздействия на биосинтетические процессы в растительных клетках представляют собой актуальное направление научных исследований.

Клеточные культуры растений являются ценным инструментом биотехнологии для исследования молекулярных и физиологических процессов в контролируемых условиях. В отличие от растений, культуры клеток обеспечивают генетически однородный материал, что повышает воспроизводимость и упрощает анализ данных. Особый интерес представляет использование клеточных культур для получения вторичных метаболитов растений — уникальных соединений, обладающих широким

спектром биологических эффектов и имеющих значительный потенциал в разработке новых лекарственных средств. Эти метаболиты включают алкалоиды, флавоноиды, терпеноиды и многие другие соединения, которые могут служить мощными антиоксидантами, антимикробными, противовоспалительными и противоопухолевыми агентами. Важно отметить, что клеточные культуры позволяют не только обойти ограничения, связанные с сезонностью и изменениями климата, но и увеличить выход ценных веществ, зачастую недоступных или сложных для извлечения из традиционных растительных источников. Методы генетической инженерии значительно расширяют возможности модификации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений, способствуя увеличению их биотехнологического потенциала.

### **Степень разработанности темы**

Долгое время считалось, что исключительной функцией генов *rol* является воздействие на гормональный статус трансформированных клеток. Однако такая упрощенная «гормональная» гипотеза со временем утратила актуальность в связи с появлением новых сведений о действии *rol*-генов на разнообразные аспекты функционирования растительных клеток, не связанные напрямую с эффектами фитогормонов. Также оставался открытым вопрос о влиянии генов *rol* на экспрессию генов, ответственных за биосинтез вторичных метаболитов, и о стабильности индуцированных ими изменений метаболизма.

Активные формы кислорода (АФК) служат не только фактором защиты растений от патогенных микроорганизмов, но и являются важными интермедиатами сигнальных систем в регуляции роста, развития и ответов на абиотические стрессовые условия. Тем не менее, особенности взаимодействия *R. rhizogenes* с растениями в контексте метаболизма АФК оставались неизвестны. Этот вопрос представляет значительный интерес для биотехнологии в связи с потенциальным влиянием АФК на механизмы защиты растений и адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данной работы являлось выявление молекулярных механизмов действия агробактериальных генов *rol* на биосинтез вторичных соединений, метаболизм АФК и устойчивость растительных клеток к абиотическим стрессовым факторам. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить особенности *rol*-опосредованной регуляции вторичного метаболизма в клеточных культурах лекарственных и модельных растений.
2. Определить влияние отдельных генов *rolB* и *rolC*, а также трансформации диким штаммом *R. rhizogenes* A4, на содержание АФК в трансгенных клетках и на их устойчивость к абиотическим стрессовым воздействиям.
3. Выявить взаимосвязь между содержанием АФК, экспрессией генов антиоксидантной системы и НАДФН-оксидазы в трансформированных клетках растений.
4. Оценить участие  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых протеинкиназ в *rol*-опосредованных реакциях трансформированных растительных клеток.
5. Изучить экспрессию генов, связанных с биогенезом микроРНК, гормональной регуляцией и защитными механизмами, в *rolB*-трансгенных клеточных культурах.

### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

Установлено, что гены *rolA* и *rolB* способны длительное время поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах марены сердцелистной (*Rubia cordifolia*). Гены *rol* увеличивают синтез антрахинонов путем активации экспрессии ключевых генов их биосинтеза – изохоризмат-синтазы (*ICS*), О-сукцинилбензоат-КоА-синтазы (*OSBS*) и О-сукцинилбензоат-КоА-лигазы (*OSBL*) и изопентенилдифосфат-дельта-изомеразы (*IPPi*). При этом максимальный эффект активации под действием *rolB* проявляется сразу после трансформации, тогда как *rolA* вызывает постепенное повышение уровня продукции антрахинонов в процессе культивирования трансгенных клеток.

Впервые выявлена способность генов *rol*, как по отдельности, так и в составе нативной Т-ДНК агробактерий, ингибировать продукцию внутриклеточных АФК. Данный эффект проявляется как в нормальных условиях, так и при воздействии стрессовых факторов, обеспечивая повышенную устойчивость трансгенных клеток к неблагоприятным воздействиям.

Установлено, что гены *rol* по-разному осуществляют генетическую регуляцию путей генерации и детоксикации АФК трансгенных клеток. Ген *rolC* способствует снижению продукции АФК, ингибируя экспрессию НАДФН-оксидаз, тогда как эффект *rolB* связан с активацией транскрипции генов антиоксидантных ферментов.

Впервые охарактеризовано воздействие гена *rolB* на биогенез микроРНК, а также экспрессию белков теплового шока и циклофилинов, связанных с гормональной регуляцией и защитными реакциями растений.

Достигнута эффективная активация вторичного метаболизма в клетках лекарственных растений, используя метод генетической трансформации генами *rol*. В клеточной культуре марены сердцелистной данный подход позволяет многократно увеличить продукцию антрахинонов по сравнению с контрольной культурой. В трансформированных корнях кирказона маньчжурского концентрация магнофлорина достигла значений, превышающих показатели дикорастущей лианы.

### **Методология и методы исследования**

В работе применяли современные методы биотехнологии, генной инженерии и молекулярной биологии растений. Инструментальные методы анализа включали полимеразную цепную реакцию в реальном времени, жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией, конфокальную микроскопию и секвенирование ДНК. В ходе диссертационной работы были использованы информационные ресурсы, включая базы данных GenBank и TAIR. Для анализа и обработки экспериментальных данных были применены специализированные программные пакеты, такие как Phym1, Phylip, ProtTest, MUSCLE и MEGA.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Гены *rol* обеспечивают стабильную и регулируемую активацию биосинтеза различных классов вторичных метаболитов растений: антрахинонов, производных фенантрена, индольных глюкозинолатов и флавоноидов. Повышение продукции обусловлено активацией транскрипции генов биосинтеза вторичных метаболитов. При этом эффекты генов *rolB* и *rolC* достигают максимальных значений сразу после трансформации и остаются стабильными на протяжении длительного

культивирования клеток. Стимулирующие свойства гена *rolA* усиливаются при длительном культивировании.

2. Гены *rol* модулируют окислительно-восстановительный гомеостаз, подавляя продукцию внутриклеточных АФК. Механизм действия генов *rol* на продукцию АФК различается. Ген *rolC* снижает, а ген *rolB* активирует экспрессию НАДФН-оксидаз и ферментов антиоксидантной системы. В клетках, трансформированных диким штаммом *R. rhizogenes*, наблюдается смешанный эффект: снижение экспрессии НАДФН-оксидаз и активация некоторых антиоксидантных генов. Поддержание заданного уровня АФК достигается также посредством регуляции изоформ *CDPK*, обеспечивающих снижение ее внутриклеточного содержания.

3. Подавление продукции внутриклеточных АФК отдельными генами *rolB* и *rolC*, а также диким штаммом *R. rhizogenes* А4, обеспечивает трансгенным культурам повышенную устойчивость к абиотическим стрессовым воздействиям. Показатели жизнеспособности в трансгенных культурах были выше, тогда как ответная реакция на стресс – менее выражена, что также свидетельствует о большей устойчивости.

4. Плеiotропное влияние *rolB* на физиологические и метаболические процессы трансформированных клеток связано с активацией отдельных компонентов аппарата РНК-интерференции, включая ключевые белки созревания, стабилизации и функционирования микроРНК, а также белков теплового шока и циклофилинов, обеспечивающих, в том числе, повышение устойчивости к стрессовым факторам.

#### **Степень достоверности результатов**

Степень достоверности результатов, полученных в ходе диссертационной работы, подтверждается использованием валидированных аналитических методов, строгим соблюдением принципов научного эксперимента и комплексным подходом к анализу данных. Все эксперименты в рамках данного исследования проводились минимум в трех биологических повторах, сопровождаемых соответствующими контрольными испытаниями. Данные, собранные в ходе экспериментов, были подвергнуты статистическому анализу, включая проверку значимости наблюдаемых различий, с использованием *t*-критерия Стьюдента и многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

#### **Апробация работы**

Материалы данной работы были представлены на следующих российских и международных конференциях и симпозиумах: Международная конференция “Биотехнология на рубеже двух тысячелетий” (Саранск, 2001), 7-ая Пущинская школа-конференция “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2003), 7-ая региональной конференция молодых ученых “Актуальные проблемы химии и биологии” (Владивосток, 2003), Всероссийская конференция “Химия и технология растительных веществ” (Саратов, 2004), региональная конференция “Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии” (Владивосток, 2004), 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (Тэгу, Южная Корея, 2013), The 8th International Conference on European Science and Technology (Мюнхен, Германия, 2014), Second European Conference on Biology and Medical Sciences (Вена, Австрия, 2014), XV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), VI

Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015).

#### **Личный вклад автора**

Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ результатов и подготовку публикаций. Химический анализ культур марены сердцелистной выполнен совместно с сотрудниками лаборатории химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН к.х.н. Мищенко Н.П. и д.х.н. Федоревым С.А. Фармакологическая активность антрахинонов определена совместно с коллегами из Алтайского государственного медицинского университета (г. Барнаул). Вторичные метаболиты резуховидки Таля и кирказона маньчжурского анализировали совместно с н.с. Григорчук В.П. (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН). Цитотоксические свойства экстрактов из клеточных культур кирказона определены совместно с коллегами из лаборатории биомедицинских клеточных технологий Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток). Анализ содержания АФК с помощью конфокальной микроскопии проведён совместно с руководителем лаборатории клеточной биологии и биологии развития ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН к.б.н. Горпенченко Т.Ю.

#### **Публикации**

По материалам диссертации опубликована 31 работа, из них 17 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 3 статьи в других периодических изданиях и 11 работ в материалах конференций.

#### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 802 источника. Работа изложена на 353 страницах и содержит 61 рисунок и 18 таблиц.

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В качестве объектов исследования использовали нетрансформированные и *rol*-трансгенные клеточные культуры лекарственных и модельных растений: марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) и резуховидки Таля (*Arabis thaliana* (L.) Heynh.) экотипа Columbia-0. Качественный и количественный состав вторичных метаболитов анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения на приборе Shimadzu LCMS-IT-TOF (Япония) в режиме отрицательных ионов с ионизацией электрораспылением. УФ-видимые спектры и данные фрагментации MS<sup>2</sup> были получены с использованием аналитической системы ВЭЖХ 1260 Infinity (Agilent Technologies, США), сопряженной с матричным фотодиодным детектором G1315D и масс-спектрометром с ионной ловушкой HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Хроматографическое разделение вторичных метаболитов проводили с использованием обращённо-фазовых колонок C18 с внутренним диаметром 2,1 мм. Содержание внутриклеточных АФК измеряли методом лазерной конфокальной микроскопии с помощью конфокального

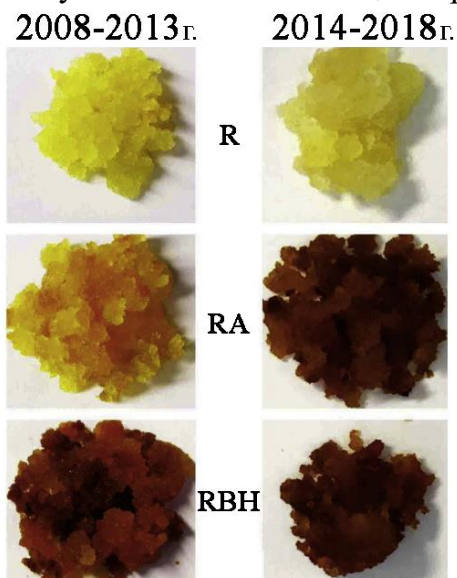
сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия), оснащенного аргоновым лазером с эффективной мощностью 30 мВт. Интенсивность лазера составила 5,9% от максимального значения для зонда H<sub>2</sub>DCF-DA и 10% для зонда H<sub>2</sub>R123. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с помощью метода ПЦР в реальном времени с использованием системы CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, США). Секвенирование ДНК проводили с использованием генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems, США).

Результаты экспериментов обработаны при помощи программы Statistica версии 10.0 (StatSoft Inc., США). Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Для проверки гипотезы о различии средних двух независимых выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. Гипотезу о нормальности распределения данных проверяли с применением теста Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Для множественного сравнения средних значение проводили многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием теста наименьшей значимой разности (НЗР) Фишера. Уровень статистической значимости был установлен на уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Эффекты *rolA* и *rolB* при длительном культивировании каллусов *Rubia cordifolia*

Марена сердцелистная является лекарственным растением и накапливает окрашенные вторичные метаболиты – антрахиноны. Ген *rolB* оказал наиболее значительное влияние на биосинтез антрахинонов, проявившееся уже на стадии селекции трансгенной культуры и сохранявшееся в процессе последующего культивирования. Гены *rolA* и *rolC* оказывали умеренное стимулирующее действие на синтез антрахинонов, однако, в отличие от *rolB*, их экспрессия не сопровождалась ингибирующим влиянием на накопление биомассы клеток. Эффект генов *rolB* и *rolC* в культурах клеток марены сердцелистной оказался чрезвычайно устойчивым. Ростовые и биосинтетические характеристики трансгенных линий оставались стабильными на протяжении 20 лет культивирования. Между тем, клетки, трансформированные геном *rolA*, со временем приобретали более интенсивную окраску, что указывало на активацию продукции антрахинонов (Рисунок 1).



**Рисунок 1** – Характерный внешний вид каллусных культур *R. cordifolia* в разные периоды культивирования. R – контрольная культура; RA – *rolA*-трансгенная культура; RBH – *rolB*-трансгенная культура с высоким уровнем экспрессии трансгена.

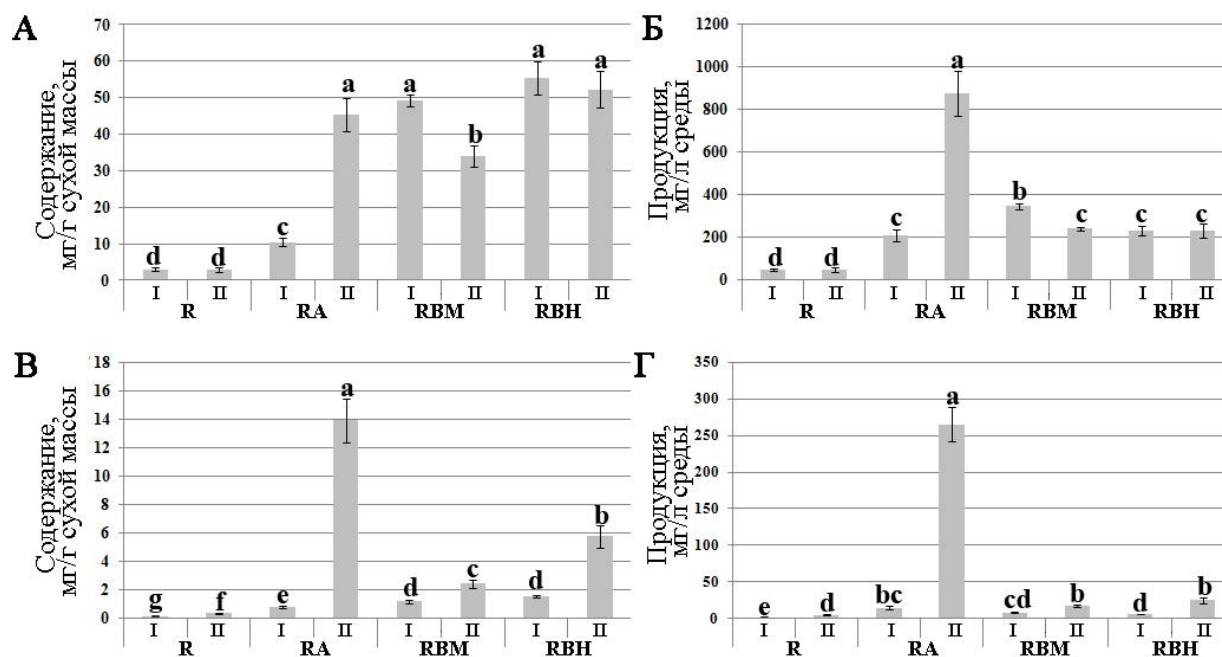
Чтобы подробнее изучить наблюдаемые морфологические изменения был проведен химический и молекулярный анализ каллусных линий с использованием биомассы клеток и образцов кДНК, собранных в два периода: с 2008 по 2013 г. (до того, как культура RA изменила окраску) и с 2014 по 2018 г. (после изменения окраски культуры RA). Было установлено, что уровень экспрессии генов *rolA* и *rolB* в разные периоды культивирования значительно не менялся (Таблица 1). Следовательно, увеличение накопления антрахинонов в культуре RA задействует более сложные молекулярные механизмы, чем в *rolB*- и *rolC*-трансгенных культурах, у которых содержание вторичных метаболитов находится в прямой зависимости от силы экспрессии трансгенов. Накопление свежей и сухой биомассы в клеточных культурах также оказалось стабильным (Таблица 1). Экспрессия *rolA* приводила к стимуляции роста каллуса в 1,2–1,6 раза по сравнению с контрольной культурой в течение всего периода наблюдения, тогда как ген *rolB* ингибировал накопление биомассы клеток в 2–4 раза.

**Таблица 1** – Экспрессия генов *rol* и накопление биомассы клеток в контрольной (R), *rolA*- и *rolB*-трансгенных (RA и RB, соответственно) каллусных культурах *R. cordifolia*

	R-I	R-II	RA-I	RA-II	RB-I	RB-II
Экспрессия гена <i>rolA</i>	н.о.	н.о.	0,51±0,08 <sup>a</sup>	0,47±0,07 <sup>a</sup>	н.о.	н.о.
Экспрессия гена <i>rolB</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0,92±0,03 <sup>a</sup>	0,91±0,05 <sup>a</sup>
Прирост свежей биомассы, г/л	366,5±14,4 <sup>b</sup>	355,6±29,1 <sup>b</sup>	599,8±7 <sup>a</sup>	619±35,8 <sup>a</sup>	163,1±9,1 <sup>d</sup>	166,1±6,1 <sup>d</sup>
Прирост сухой биомассы, г/л	16,4±0,4 <sup>b</sup>	16,5±0,9 <sup>a</sup>	19,8±0,9 <sup>a</sup>	19,2±0,6 <sup>a</sup>	4,1±0,1 <sup>d</sup>	4,3±0,3 <sup>d</sup>

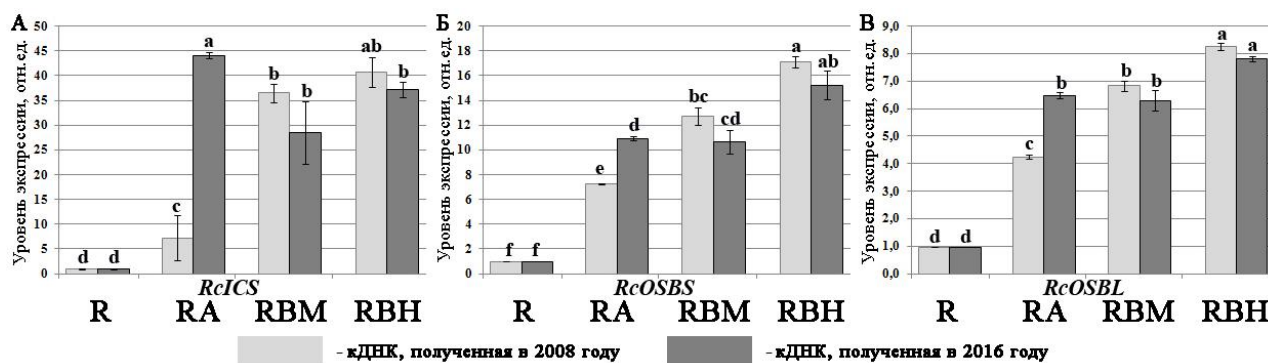
Римские числа после названия клеточной линии, I и II, обозначают два периода сбора биомассы клеток: 2008–2013 гг. и 2014–2018 гг., соответственно. Разные надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия средних значений в строках ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера. Н.о. – не обнаружено.

Было установлено, что в течение первого исследуемого временного интервала (2008–2013 гг.) общее содержание антрахинонов в *rolA*-трансгенной линии составляло 11 мг/г сухой массы клеток, тогда как во втором периоде (2014–2018 гг.) их накопление повысилось в 4 раза и составило 45 мг/г (Рисунок 2А). Более того, поскольку прирост биомассы в этой клеточной линии оставался стабильно высоким, общая продукция антрахинонов достигла 874 мг/л среды (Рисунок 2Б). При длительном культивировании содержание руберитриновой кислоты в *rolA*-трансгенной линии увеличилось с 0,7 до 13,9 мг/г сухой массы клеток (Рисунок 2В), а продукция с 14,4 до 265 мг/л среды (Рисунок 2Г). Таким образом, содержание руберитриновой кислоты в культуре RA оказалось в 53 раза выше, чем в контрольной культуре, и в 10 раз выше, чем в линии RBH. Кроме руберитриновой кислоты, в *rolA*-трансгенной линии более чем в 4 раза увеличилось и содержание производных муньистина, достигнув при этом 40 мг/г сухой массы клеток, что почти соответствует уровню накопления метаболитов данной группы в культуре RBH. Содержание производных пурпурина в линии RA не изменилось.



**Рисунок 2** – Содержание и продукция антрахинонов (А, Б) и руберитриновой кислоты (В, Г) в каллусных культурах *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия; RA – *rolA*-трансгенная клеточная линия; RBM – *rolB*-трансгенная клеточная линия со средним уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Римские числа после названия клеточной линии, I и II, обозначают два периода сбора биомассы клеток: 2008–2013 гг. и 2014–2018 гг., соответственно. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Используя образцы кДНК контрольной и *rol*-трансгенных линий, полученные в разные периоды культивирования, была изучена динамика экспрессии ключевых генов биосинтеза антрахинонов: изохоризмат-синтазы (*ICS*), O-сукцинилбензоат-КоА-синтазы (*OSBS*), O-сукцинилбензоат-КоА-лигазы (*OSBL*) и изопентенилдифосфат-дельта-изомеразы (*IPPi*). Было установлено, что в процессе культивирования в культуре RA происходит активация транскрипционной активности всех изученных генов. При этом наиболее выраженный эффект был отмечен для гена *RcICS*, уровень экспрессии которого во втором периоде вырос более чем в 6 раз (Рисунок 3А). В то же время транскрипционная активность генов биосинтеза антрахинонов в *rolB*-трансформированных клеточных линиях в исследуемые периоды существенно не отличалась (Рисунок 3Б, В). Уже в первоначальный период культивирования *rolB*-трансгенные линии характеризовались наибольшим уровнем экспрессии *RcICS*, что и определяло активацию накопления в них антрахинонов. Однако при длительном культивировании экспрессия этого гена в линии RA достигла значений RBH и, вероятно, является максимально возможной для сохранения нормальных ростовых характеристик клеток *R. cordifolia*. Это свидетельствует о том, что именно изохоризмат-синтаза является лимитирующим ферментом вторичного метаболизма *R. cordifolia*.

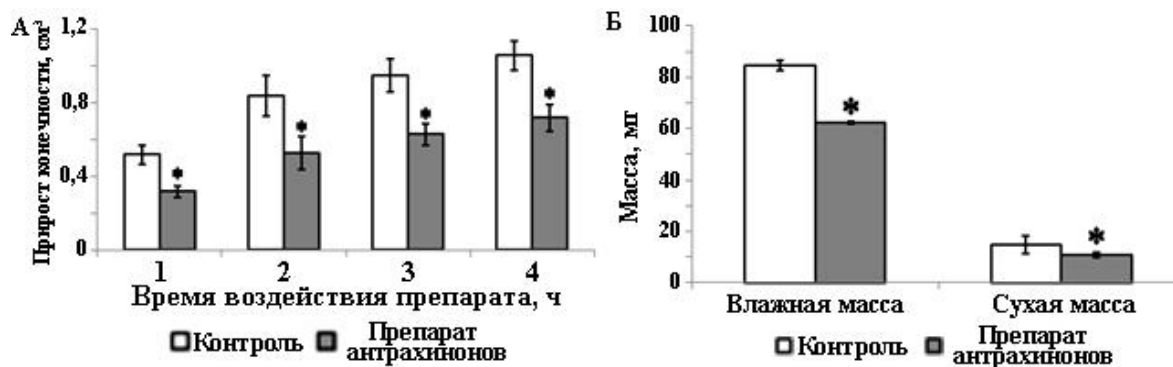


**Рисунок 3** – Экспрессия генов *R. cordifolia*, участвующих в биосинтезе антрахинонов: изохоризмат-синтаза, *RcICS* (А), О-сукцинилбензоат-КоА-синтаза, *RcOSBS* (Б) и О-сукцинилбензоат-КоА-лигаза, *RcOSBL* (В). R – контрольная клеточная линия; RA – *rolA*-трансгенная клеточная линия; RBM – *rolB*-трансгенная клеточная линия со средним уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

### Фармакологическая активность антрахинонов из каллусной культуры *Rubia cordifolia*

В качестве объекта исследования использовали препараты, приготовленные из контрольной каллусной культуры марены сердцелистной. До 85% общего содержания антрахинонов в препарате составляли два соединения – муньистин и пурпурин, еще 9% приходилось на ализарин и руберитриновую кислоту, а минорные компоненты были представлены ксантапурпурином и эфирами ксантапурпурина и муньистина. В целом, процентное содержание данных антрахинонов в препарате соответствовало их накоплению в каллусах.

Противовоспалительную активность препарата испытывали на модели острого воспалительного отека конечностей крыс, индуцированного каррагенином. Было установлено, что на фоне введения антрахинонов увеличение объема конечности у опытных крыс было менее выражено (Рисунок 4А). Противовоспалительные свойства препарата проявлялись и на модели индуцированной гранулемы крыс. Антрахиноны замедляют прирост влажной и сухой массы гранулемы на 27% по сравнению с контролем (Рисунок 4Б). Таким образом, препарат антрахинонов ослабляет развитие как острого, так и хронического воспаления.



**Рисунок 4** – Влияние антрахинонов из клеточной культуры *R. cordifolia* на (А) развитие каррагенин-индуцированного отека конечностей и (Б) формирование хлопчатобумажной гранулемы у крыс. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

При моделировании окислительного стресса путем субплантарного введения формалина, в плазме крови крыс возрастала концентрация тиобарбитурат-реактивных продуктов, что свидетельствует об индукции перекисного окисления липидов (Таблица 2). Наблюдаемый эффект сопровождался активацией антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (Таблица 2). Применение препарата из каллусной биомассы уменьшало содержание тиобарбитуровых продуктов в 1,2 раза по сравнению с контрольными животными, однако их концентрация оставалась на 26,5% выше уровня интактной группы. При этом индукция активности каталазы и глутатионпероксидазы в опытных животных оказалась на 18–19% ниже, чем в контроле, тогда как активность супероксиддисмутазы статистически не отличалась. Таким образом, можно предположить, что в условиях свободно-радикального окисления антрахиноны активируют ферментные системы антиоксидантной защиты клеток.

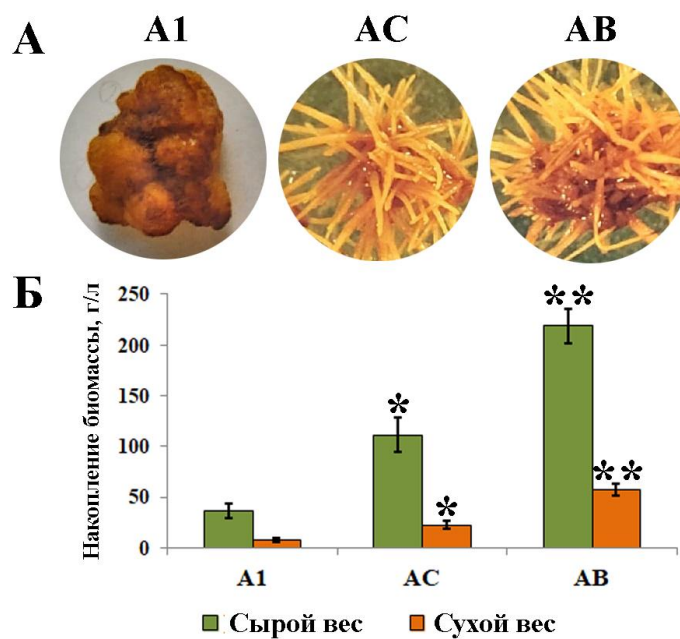
**Таблица 2.** Показатели окислительного и антиоксидантного статуса крови у крыс под действием антрахинонов из клеточной культуры *R. cordifolia*

	Животные		
	Интактные	Контрольные	Опытные
ТБРП, мкМ	2,5±0,18	4,2±0,18*	3,4±0,12*
Каталаза, %	12,2±1,27	22,4±1,02*	18,3±0,43*
Супероксиддисмутаза, %	16,9±0,81	28,3±1,05*	27,1±0,82*
Глутатионпероксидаза, Ед/мг	233±7,3	243±11,2	195,3±5*

ТБРП – тиобарбитурат-реактивные продукты. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ),  $t$ -тест Стьюдента.

### **Влияние генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов в трансформированных корнях *Aristolochia manshuriensis***

На примере клеточных культур кирказона маньчжурского *A. manshuriensis* был проведен сравнительный анализ влияния генов *rol* на накопление отдельных производных фенантрена. Исследование показало, что гены *rolC* и *rolB* индуцируют формирование «волосатых» корней на черешковых и стеблевых эксплантах *A. manshuriensis*, причём *rolB* демонстрирует более сильное действие, чем *rolC*. Корневые культуры стеблевого происхождения, трансформированные генами *rolC* и *rolB*, обозначенные как АС и АВ, имеют желтую окраску и интенсивное боковое ветвление, типичное для культур «волосатых» корней (Рисунок 5А). В качестве контроля в данном исследовании использовали нетрансформированную каллусную культуру (А1), которая была ранее получена из стеблей *A. manshuriensis*.



**Рисунок 5** – Характерный внешний вид (А) и накопление биомассы (Б) в клеточных культурах *A. manshuriensis*. А1 — нетрансформированная каллусная линия; АС – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; АВ – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Статистически значимые различия средних значений обозначены \* ( $p < 0,05$ ) и \*\* ( $p < 0,01$ ), *t*-тест Стьюдента.

Экспоненциальный рост клеточных линий был зафиксирован между третьей и четвертой неделями эксперимента, при этом максимальное увеличение биомассы клеток наблюдалось в культурах на четвертой неделе. В целом, ростовые параметры *rol*-трансгенных культур "волосатых" корней в 3–5 раз превышали показатели линии А1 (Рисунок 5Б).

В клеточных культурах и стеблях *A. manshuriensis* было идентифицировано семь основных производных фенантроновой кислоты, включая аристолохиевые кислоты I, II, IIIa, IVa/b (АК-I, АК-II, АК-IIIa, АК-IVa/b, соответственно), глюкозиды аристолохиевых кислот IIIa и IVa/b (АК-IIIa-G и АК-IVa/b-G, соответственно), а также магнофлорин. В трансгенных клеточных линиях АС и АВ общее содержание аристолохиевых кислот оказалось в 7–8 раз выше по сравнению с контрольными каллусами А1. Однако их уровень все же был в 1,5–1,6 раза ниже, чем в стеблях *A. manshuriensis*. При сравнении эффектов генов *rolC* и *rolB* на накопление аристолохиевых кислот были выявлены определенные различия (Таблица 3). Самое заметное увеличение концентрации, в 12–40 раз, отмечено для АК-IIIa, АК-IVa/b и АК-IIIa-G, тогда как более умеренное увеличение, в 6–8 раз, наблюдалось для АК-II и АК-IVa/b-G. В то же время, уровень АК-I снизился в 5,5 раз. Содержание магнофлорина оказалось наибольшим в *rolC*- и *rolB*-трансформированных корнях, превышая показатели каллусной линии А1 в 5,8 и 2,8 раза, соответственно. В результате продукция этого алкалоида в четырехнедельных культурах АС и АВ достигла значений 128,7 и 158,7 мг/л, соответственно. Как и в случае с клеточными культурами *R. cordifolia*, активирующий эффект генов *rolC* и *rolB* на вторичный метаболизм кирказона проявился сразу после трансформации и сохранялся на протяжении длительного культивирования «волосатых» корней.

**Таблица 3** – Содержание аристолохиевых кислот и магнофлорина (мг/г сухой массы) в клеточных культурах и стеблях *A. manshuriensis*

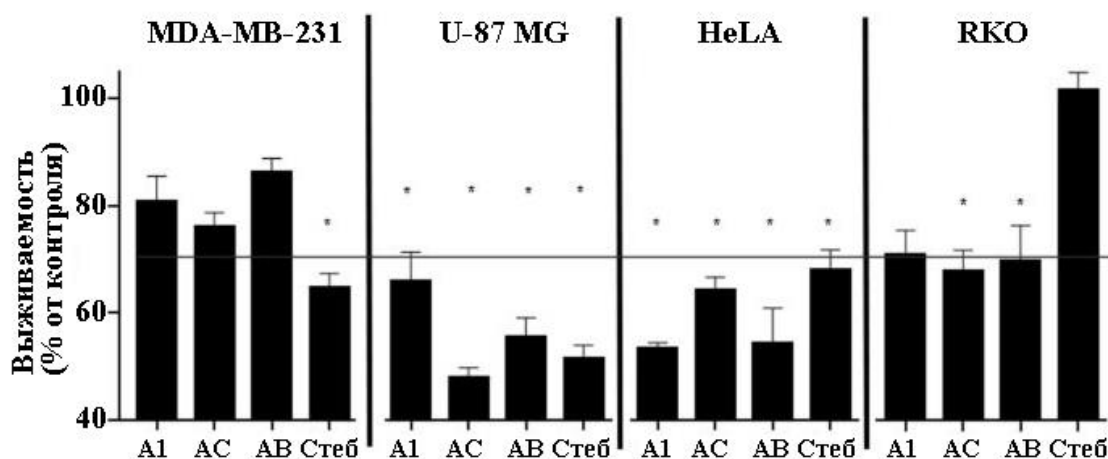
Метаболиты	A1	АС	АВ	Стебель
Магнофлорин	0,99 ± 0,102 <sup>d</sup>	5,72 ± 0,686 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,304 <sup>c</sup>	3,39 ± 0,475 <sup>b</sup>
АК-I	0,11 ± 0,010 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,02 ± 0,002 <sup>c</sup>	1,23 ± 0,139 <sup>a</sup>
АК-II	0,01 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,010 <sup>b</sup>	0,06 ± 0,007 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,027 <sup>a</sup>
АК-IIIa	н.о.	0,12 ± 0,016 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,033 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,006 <sup>c</sup>
АК-IVa/b	0,01 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,020 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,034 <sup>a</sup>	н.о.
АК-IIIa-G	0,02 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,098 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,119 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,109 <sup>a</sup>
АК-IVa/b-G	0,14 ± 0,019 <sup>c</sup>	0,99 ± 0,133 <sup>ab</sup>	0,94 ± 0,136 <sup>b</sup>	1,18 ± 0,154 <sup>a</sup>
Сумма АК	0,29 ± 0,037 <sup>c</sup>	2,13 ± 0,280 <sup>b</sup>	2,32 ± 0,266 <sup>b</sup>	3,61 ± 0,513 <sup>a</sup>

A1 — нетрансформированная каллусная линия; АС – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; АВ – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Разные надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия средних значений в строках ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера. н.о. – не обнаружено.

### **Фармакологическая активность экстрактов из клеточных культур *Aristolochia manshuriensis***

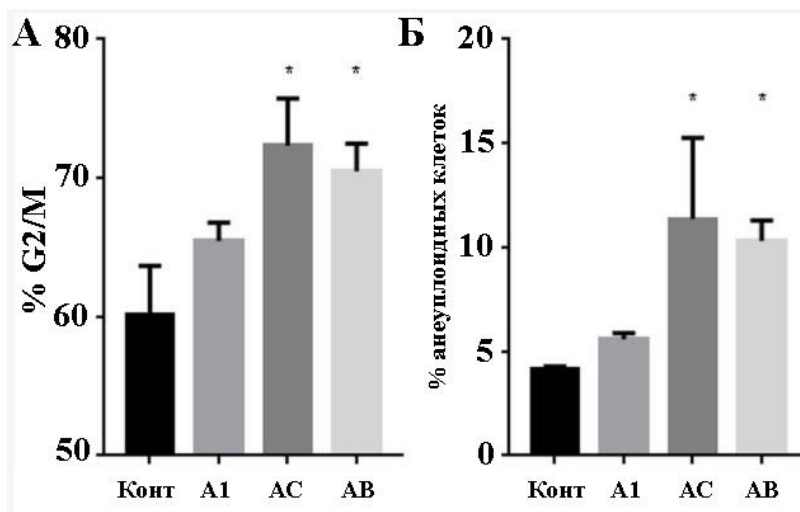
Антиоксидантную активность оценивали по способности экстрактов связывать оксидные радикалы дифенилпикрилгидразина (ДФПГ). Исследования показали, что культуры трансформированных корней АС и АВ демонстрируют значительную антиоксидантную способность, которая была почти в 2,8 и 2,9 раз выше по сравнению с контрольными каллусами, соответственно. Более того, активность АС и АВ оказалась сопоставимой с таковой в стеблях дикорастущей лианы *A. manshuriensis*. Однако важно учитывать, что оценка антиоксидантной способности с использованием метода ДФПГ требует осторожного подхода, так как результаты могут не полностью соответствовать активности экстрактов в живых организмах.

Цитотоксическую активность экстрактов из культур А1, АС, АВ и стебля *A. manshuriensis* исследовали с помощью МТТ-анализа на четырех клеточных линиях: трижды негативных клетках рака молочной железы (MDA-MB-231), клетках глиобластомы человека (U-87 MG), клетках рака шейки матки (HeLa CCL-2) и клетках карциномы толстой кишки человека (RKO) (Рисунок 6). Экстракт каллусной линии А1 снижал жизнеспособность раковых клеточных линий HeLa CCL-2, U87MG, RKO и MDA-MB-231 на 47%, 35%, 30% и 19,2%, соответственно. Экстракты АС снижали метаболическую активность клеток U-87 MG на 53% и клеток HeLa CCL-2 на 36%, а также RKO на 33% и MDA-MB-231 на 23,9%. Экстракты АВ снижали активность HeLa CCL-2, U-87 MG, RKO и MDA-MB-231 на 46%, 45%, 31% и 13,8%, соответственно. Экстракты стеблей показали ингибирующее действие на рост клеток U-87 MG, MDA-MB-231 и HeLa CCL-2 на 48,4%, 35,4% и 32,1%, соответственно, тогда как цитотоксичности в отношении RKO не наблюдалось (Рисунок 6). В целом, эти результаты показывают, что экстракты из трансформированных корней проявляют значительные цитотоксические эффекты, которые различаются в зависимости от типа раковых линий, из чего следует, что воздействие было специфичным для каждого типа клеток.



**Рисунок 6** – Влияние экстрактов из клеточных культур и стеблей *A. manshuriensis* на жизнеспособность клеточных линий MDA-MB-231, U-87 MG, HeLa CCL-2 и RKO. A1 — нетрансформированная каллусная линия; AC – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; AB – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Все воздействия, за исключением экстракта стебля против линии RKO, значительно отличаются от соответствующих контрольных условий (принятых за 100%) при  $p < 0,01$ ,  $t$ -тест Стьюдента. Звездочка обозначает ингибирование жизнеспособности более 30%.

Обработка экстрактами из трансформированных корней AC и AB приводила к заметному увеличению процента клеток в фазе G2/M по сравнению с контрольными образцами (Рисунок 7А). Также наблюдалось повышение уровня анеуплоидии более чем на 10% при воздействии на раковые клетки RKO (Рисунок 7Б). Стадия G2/M является критической точкой, где клетка проверяет отсутствие повреждений ДНК и в случае их обнаружения включает механизм клеточной гибели. Эти данные позволяют предположить, что компоненты экстрактов AC и AB могут способствовать хромосомной нестабильности, ведущей к гибели клеток и, как следствие, к антипролиферативным эффектам за счет повреждения ДНК.



**Рисунок 7** – Анализ клеточного цикла (А) и процент анеуплоидии (Б) в линии раковых клеток RKO после обработки экстрактами из клеточных культур *A. manshuriensis*. A1 — нетрансформированная каллусная линия; AC – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; AB – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ),  $t$ -тест Стьюдента.

### Влияние генов *rolB* и *rolC* на биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах *Arabidopsis thaliana*

Исследования генов *rol* традиционно проводились на лекарственных и декоративных растениях, однако для молекулярно-генетического анализа предпочтительно использовать модельные организмы, к которым относится *A. thaliana*. Было получено несколько независимых линий арабидопсиса с разным уровнем экспрессии генов *rolC* или *rolB*. Однако если у *R. cordifolia* различия в силе экспрессии генов *rol* ярко проявлялись в интенсивности окраски каллусов, у *A. thaliana* внешние отличия между трансгенными линиями были незначительны.

Было установлено, что как контрольные, так и трансгенные каллусные культуры *A. thaliana* продуцируют индольные глюкозинолаты, а также небольшое количество индольного алкалоида – камалексина (Таблица 4). При этом в самих проростках *A. thaliana* было идентифицировано 25 соединений, характерных для данного вида растения, включая алифатические глюкозинолаты и гликозиды флавоноидов. Эти результаты свидетельствуют о подавлении вторичного метаболизма в каллусных клетках *A. thaliana*.

**Таблица 4** – Содержание вторичных метаболитов в клеточных культурах и проростках *A. thaliana* (мкМ/г сухой массы)

Метаболиты	At	AB	AC	Проростки
Индольные глюкозинолаты	0,77	2,20	1,04	9,06
Индол-3-ил-метил-глюкозинолат	0,52±0,08	1,41±0,16*	0,53±0,10	1,85±0,21
4-метоксииндол-3-илметил-глюкозинолат	0,25±0,07	0,79±0,12*	0,51±0,08*	0,44±0,09
Алифатические глюкозинолаты	-	-	-	6,15
Алкалоиды				
Камалексин	0,02±0,008	0,02±0,005	0,02±0,006	-
Гликозиды флавоноидов	-	-	-	2,68

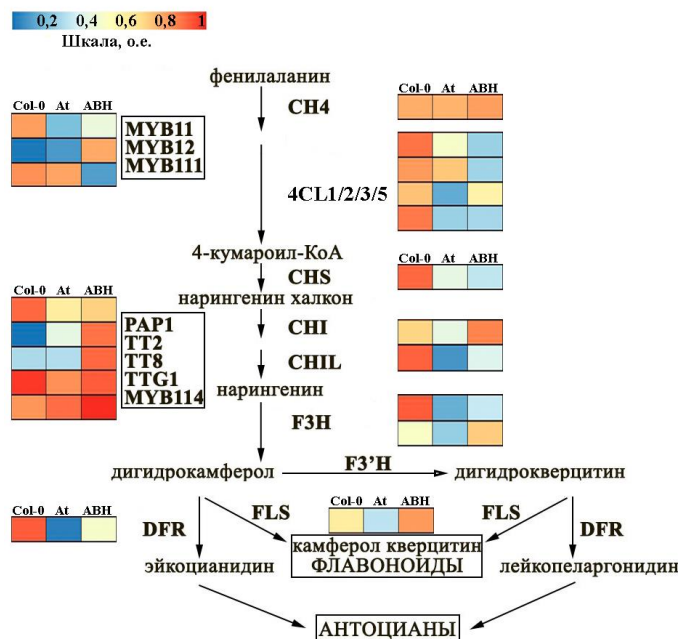
At – контрольная культура, AB и AC – *rolB*- и *rolC*-трансгенные культуры, соответственно. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем (At), *t*-тест Стьюдента.

Ген *rolB* значительно увеличивал уровень накопления индольных глюкозинолатов в трансгенной культуре, хотя их общее содержание составляло лишь 25% от уровня в интактном растении (Таблица 4). Ген *rolC* не оказал значительного влияния на накопление вторичных метаболитов *A. thaliana*. При этом каллусные культуры продуцировали равное количество камалексина, который в обычных условиях не синтезируется в растении *A. thaliana*. Таким образом, способность *rolB* активировать вторичный метаболизм в трансгенных клетках *A. thaliana* была менее выражена по сравнению с культурами *R. cordifolia* и не оказывала влияния на биосинтез алифатических глюкозинолатов и флавоноидов.

Чтобы прояснить особенности вторичного метаболизма в клеточных линиях At и ABH, был проведен анализ экспрессии ключевых генов, ответственных за его регуляцию. В интактном растении и контрольной культуре At отмечен относительно высокий уровень экспрессии транскрипционных факторов *MYB11* и *MYB111*, тогда как экспрессия гена *MYB12* была снижена (Рисунок 8). Подобный транскрипционный паттерн экспрессии *MYB* генов характерен для семядольных листьев *A. thaliana*

экотипа Col-0 (Stracke et al., 2007) и поэтому мог сохраниться и в контрольной культуре. Примечательно, что сверхэкспрессия *rolB* нарушает вышеописанный баланс, превращая его в типичный «корневой» паттерн – с высокой экспрессией *MYB12* и низкой экспрессией *MYB11* (Рисунок 8). Хотя каллусы АВН не проявляют признаков корнеобразования, они, вероятно, сохраняют это присущее гену свойство на транскрипционном уровне. Таким образом, *rolB* значительно влияет на экспрессию факторов транскрипции, связанных со вторичным метаболизмом, и эта активность может быть обусловлена его способностью индуцировать неопластическую трансформацию клеток.

Ген *rolB* активировал экспрессию ключевых генов биосинтеза флавоноидов: халкон-синтазы (*CHS*), халкон-изомеразы (*CHI*), флаванон-3-гидроксилазы (*F3H*) и флаванол-синтазы (*FLS*) (Рисунок 8). Однако, несмотря на этот эффект, их транскрипционная активность в культуре АВН оставалась значительно ниже, чем в интактном растении. В то же время транскрипция генов циннамат-4-гидроксилазы (*CHH*), флавоноид-3'-монооксигеназы (*F3'H*) и ди-гидрофлаванол-4-редуктазы (*DFR*) не менялась. Анализ транскрипционной активности 4-кумарат-КоА-лигазы (*4CL*), регулирующей метаболические потоки на ранних этапах фенилпропаноидного пути, показал неоднозначный результат. Гены *4CL1* и *4CL2* подавлялись *rolB*, тогда как экспрессия *4CL3* активировалась, а экспрессия *4CL5* оставалась неизменной. Способность *rolB* подавлять определенные изоформы *4CL* также могла послужить причиной отсутствия продукции флавоноидов в трансформированных каллусах.

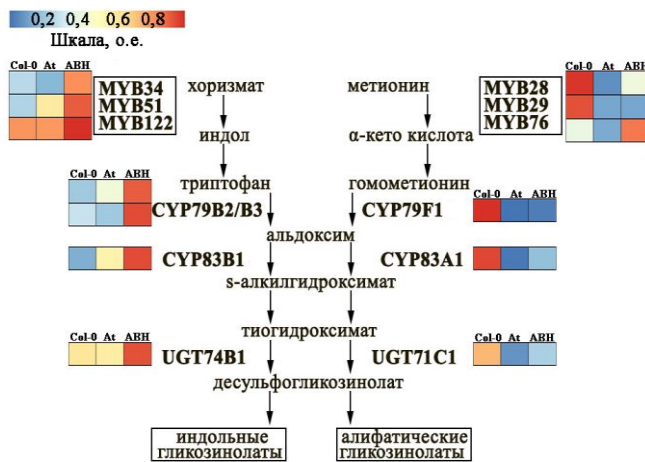


**Рисунок 8** – Экспрессия транскрипционных факторов и ключевых генов биосинтеза флавоноидов и антоцианов в растении и клеточных культурах *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; At – контрольная клеточная линия; АВН – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена.

Был проведен анализ экспрессии генов, участвующих в регуляции биосинтеза антоцианов. Транскрипционная активность факторов TRANSPARENT TESTA 2 (*TT2*) и TRANSPARENT TESTA 8 (*TT8*) в *rolB*-трансгенном каллусе была выше, чем в контрольной культуре и растении. Уровень экспрессии транскрипционного фактора PLASTID-LIPID-ASSOCIATED PROTEIN 1 (*PAP1*) в обеих каллусных линиях оставался низким в сравнении с проростками *A. thaliana*. Содержание мРНК WD40-белка TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (*TTG1*) в растении и клеточных культурах значительно не отличалось (Рисунок 8). Несмотря на повышенную активность некоторых транскрипционных факторов, в культурах не наблюдалось накопления даже следовых количеств антоцианов.

Была определена экспрессия генов, отвечающих за биосинтез алифатических глюкозинолатов. В *rolB*-трансгенной культуре уровень транскрипции *MYB29* не изменился, тогда как экспрессия *MYB28* и *MYB76* увеличилась в 4 и более раз (Рисунок 9). Из литературных данных известно, что *MYB76* играет лишь вспомогательную роль в регуляции синтеза алифатических глюкозинолатов, тогда как *MYB28* является главным транскрипционным фактором, активирующим их продукцию (Hirai et al., 2007; Sonderby et al., 2010). Тем не менее его активация под действием гена *rolB* не привела к заметному накоплению данной группы метаболитов в культуре АВН. Более того, транскрипционная активность была значительно повышена и у ферментов биосинтеза: *CYP79F1*, *CYP83A1* и *UGT74C1*, но при этом оставалась ниже, чем в интактном растении.

Экспрессия транскрипционных факторов *MYB*, контролирующих биосинтез индольных глюкозинолатов (*MYB34*, *MYB51* и *MYB122*), в *rolB*-трансгенной линии была значительно выше, чем в контрольной культуре и растении (Рисунок 9). Данный эффект сопровождался повышенной транскрипционной активностью ферментов, отвечающих за биосинтез данных соединений – цитохром Р450-зависимых монооксигеназ (*CYP79B2*, *CYP79B3* и *CYP83B1*), а также тиогидроксимат S-глюкозилтрансферазы (*UGT74B1*). Таким образом, повышение содержания индольных глюкозинолатов в культуре АВН связано с увеличением экспрессии генов, регулирующих данный метаболический путь.

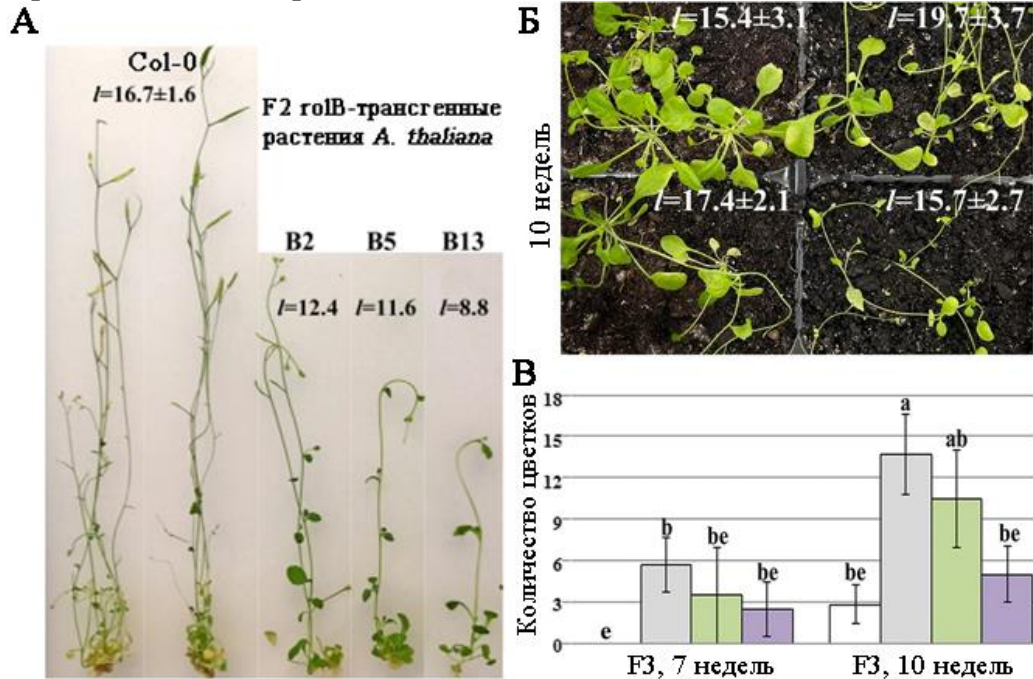


**Рисунок 9** – Экспрессия транскрипционных факторов и ключевых генов биосинтеза индольных и алифатических глюкозинолатов в растении и клеточных культурах *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; At – контрольная клеточная линия; АВН – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена.

Таким образом, каллус *A. thaliana* продуцирует малое количество и относительно бедный состав вторичных метаболитов. Ингибирование путей образования вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений является общей проблемой для биотехнологии, которую связывают с эпигенетическими изменениями, происходящими на уровне хроматина в процессе формирования каллусной ткани (Strauss and Reyes-Dominguez, 2011). В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что *rolB* проявляет явную стимулирующую активность на уровне транскрипции генов фенилпропаноидного пути, однако этот эффект вызывал только увеличение содержания индольных глюкозинолатов, но не изменял качественный состав метаболитов в каллусах *A. thaliana*.

## Влияние гена *rolB* на биосинтез вторичных метаболитов в растениях *Arabidopsis thaliana*

Для изучения действия *rolB* на вторичный метаболизм целого растения, были получены три независимые трансгенные линии *A. thaliana* – B2, B5 и B13.



**Рисунок 10** – Характерный внешний вид контрольных и трансгенных линий *A. thaliana* (А). На фотографии указана общая длина ( $l$ , см) 7-недельных проростков. Морфология контрольных и трансгенных линий *A. thaliana* третьего поколения (F3) (Б). Время цветения растений контрольных и трансгенных линий *A. thaliana* (В). Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; B2, B5 и B13 – *rolB*-трансгенные линии *A. thaliana*. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

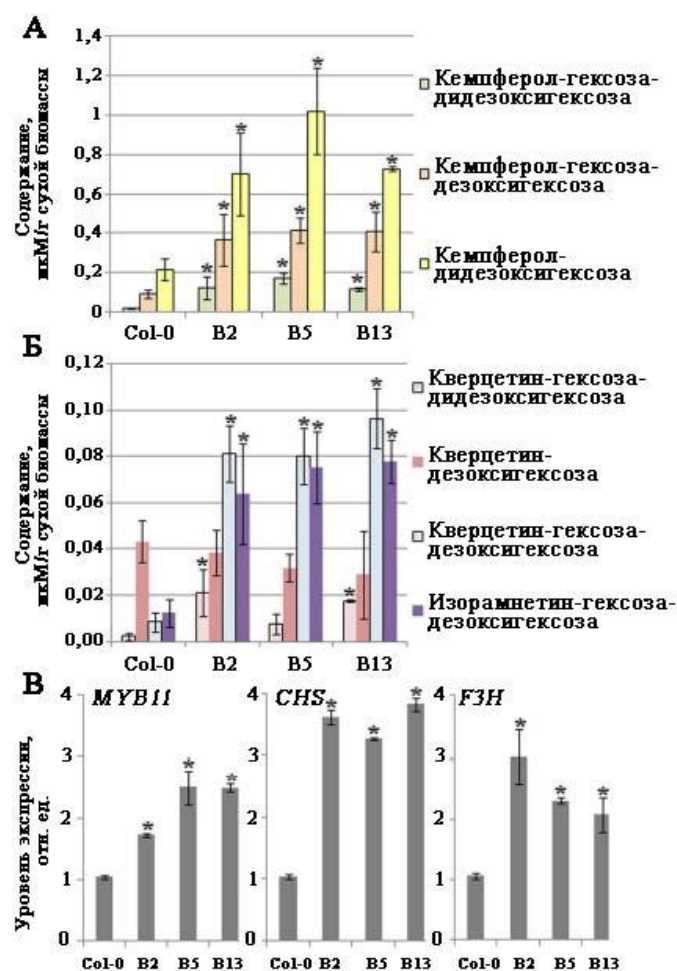
Наиболее выраженным результатом трансформации являлось уменьшение размера *rolB*-трансгенных растений: длина стеблей семинедельных проростков линий B2, B5 и B13 была в 1,5–2 раза меньше, чем у контрольной линии (Рисунок 10А, Б). Кроме того, *rolB*-трансгенные линии отличались от контроля ранней инициацией цветения (Рисунок 10В). При этом другие характерные признаки *rolB*-трансгенных растений, такие как некроз и скрученность листьев, кустистость, интенсивное корнеобразование в линиях B2, B5 и B13 отмечены не были. Известно, что проявление определенных морфологических и физиологических эффектов генов *rol* зависит как от вида трансформированного растения, так и типа, используемого для гетерологичной экспрессии промотора (Casanova et al., 2005).

Содержание индольных глюкозинолатов оказалось одинаковым во всех исследованных линиях растений (Таблица 5). При этом накопление некоторых алифатических производных в *rolB*-трансгенных линиях возрастало (8-метилтиооктил-глюкозинолат и 8-метилсульфинилоктитл-глюкозинолат) или, наоборот, падало (3-метилсульфинилпропил-глюкозинолат). В тоже время общее содержание глюкозинолатов в трансгенных линиях *A. thaliana* снижалось по сравнению с контрольными растениями. Таким образом, стимулирующая активность *rolB* на биосинтез индольных глюкозинолатов в трансгенных каллусных клетках оказалась нивелирована в контексте регуляторной системы целого растения.

**Таблица 5** – Содержание глюкозинолатов в контрольной и трансгенных линиях растений *A. thaliana* (мкМ/г сухой массы)

Метаболиты	Col-0	B2	B5	B13
Индольные глюкозинолаты	1,84 ± 0,37	1,8 ± 0,35	1,5 ± 0,12	1,68 ± 0,25
Алифатические глюкозинолаты	6,273 ± 1,2	5,04 ± 0,92	4,89 ± 1,32	4,36 ± 0,97
Прочие глюкозинолаты	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,004
Сумма	8,20	6,97	6,47	6,11

Было установлено, что ген *rolB* оказал существенное влияние на накопление флавоноидных соединений. При этом гликозиды кемпферола составляли основную фракцию флавоноидов и их накопление значительно увеличивалось под действием гена *rolB* (Рисунок 11А). В частности, содержание кемпферол-гексоза-дидезоксигексозы-2 в трансгенных линиях было в 7–10 раз выше, по сравнению с контрольными растениями. Накопление кемпферол-гексоза-дидезоксигексозы и кемпферол-дидезоксигексозы увеличилось в *rolB*-трансгенных проростках в 3–5 раз.



**Рисунок 11** – Содержание флавоноидов (А, Б) и экспрессия ключевых генов их биосинтеза (В) в растениях и *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; B2, B5 и B13 – *rolB*-трансгенные линии *A. thaliana*. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

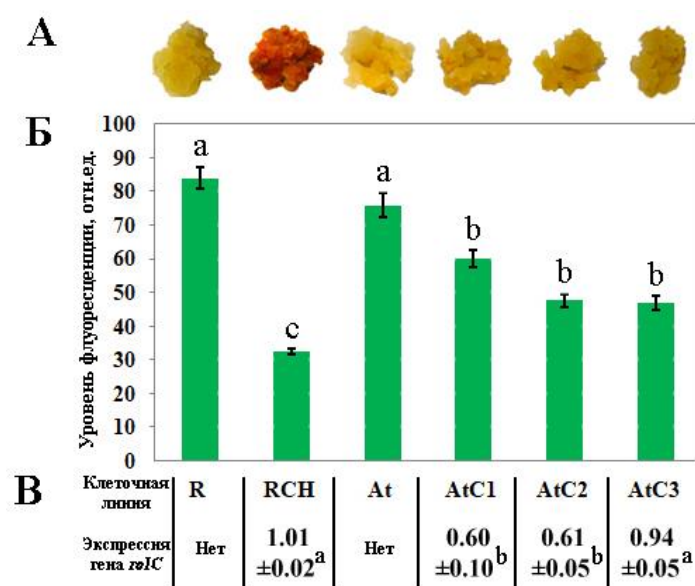
Сверхэкспрессия *rolB* также дифференцировано повлияла и на содержание производных кверцетина (Рисунок 11Б). Наибольший уровень активации наблюдался для кверцетин-гексозо-дезоксигексозы, содержание которой увеличилось в 9–12 раз. Две линии, B2 и B13, имели повышенный уровень накопления кверцетин-гексоза-дидезоксигексозы, в то время как ее содержание в линии B5 не изменилось. Уровень накопления изорамнетин-гексоза-дезоксигексозы во всех *rolB*-трансгенных линиях был в 6–7 раз выше контроля.

Было установлено, что экспрессия *MYB11*, *CHS*, и *F3H* под действием *rolB* во всех трансгенных линиях *A. thaliana* была активирована в 2–4 раза (Рисунок 11В). Эти результаты свидетельствуют о том, что индуцированное *rolB* накопление флавоноидов коррелирует с активацией соответствующих биосинтетических и регуляторных генов *A. thaliana*.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *rolB* в растениях *A. thaliana* привела к значительному увеличению содержания флавоноидных соединений, что подтверждает предположение о блокировании действия трансгена в культуре АВН на уровне специализированного метаболизма каллусных клеток. Накопление флавоноидов, индуцированное *rolB*, коррелирует с активацией биосинтетических и регуляторных генов, контролирующих продукцию этих соединений в *A. thaliana*. Наблюдаемый паттерн экспрессии транскрипционных факторов в исследованных трансгенных клеточных культурах и растениях указывает на важную роль транскрипционного фактора *MYB11* в *rolB*-опосредованной регуляции биосинтеза флавоноидов. Поиск эффективных способов активации биосинтеза флавоноидов актуален в биотехнологии растений в связи с высокой востребованностью их противовоспалительных, противоаллергических, противовирусных и антиканцерогенных свойств.

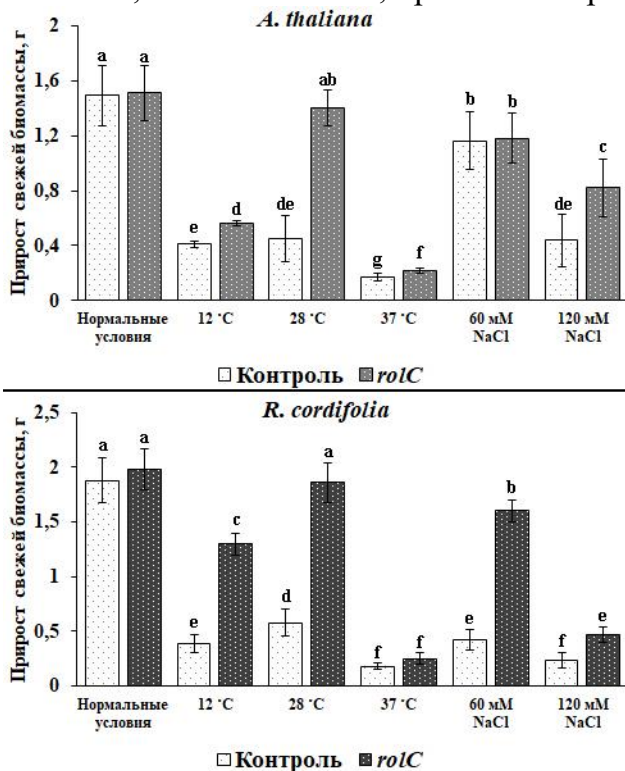
### Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, экспрессирующих ген *rolC*

Известно, что ген *rolC* приводит к значительным изменениям морфологических и биохимических свойств трансформированных растений и клеточных культур (Otten, 2018). Это наблюдение позволило предположить, что комплексные биологические эффекты гена *rolC* зависят от окислительно-восстановительного состояния трансгенных клеток. Для того, чтобы подтвердить данную гипотезу был проведен сравнительный анализ содержания внутриклеточных АФК в *rolC*-трансгенной культуре *R. cordifolia* RCH и трех независимых каллусных линиях *A. thaliana* AtC1, AtC2 и AtC3. Установлено, что уровень внутриклеточных АФК в *rolC*-трансгенных каллусах *A. thaliana* AtC1, AtC2 и AtC3 составлял 79%, 63% и 62%, соответственно, по сравнению с клетками контрольной культуры (Рисунок 12). При этом содержание АФК в линии RCH составляло всего 39% по отношению к контрольным клеткам *R. cordifolia*.



**Рисунок 12** – Внешний вид культур (А), содержание внутриклеточных АФК (Б) и экспрессия гена *rolC* (В) в трансгенных клетках *R. cordifolia* и *A. thaliana*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия; AtC1, AtC2 и AtC3 – *rolC*-трансгенные каллусные линии *A. thaliana*. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Для сравнительной оценки чувствительности клеток *A. thaliana* и *R. cordifolia* к абиотическим стрессовым воздействием контрольные (At и R) и *rolC*-трансгенные (RCH и ACH) каллусные линии культивировали в условиях нормальной (24°C), повышенной (28°C и 37°C) и пониженной (12°C) температур, а также в присутствии различных концентраций NaCl (60 и 120 мМ). Воздействие высокой температуры значительно ингибировало рост контрольных клеточных линий (Рисунок 13). Повышение температуры на 4°C по сравнению с нормальными условиями привело к снижению накопления биомассы каллусов R и At более чем в 3 раза, но не оказало влияние на рост каллусных линий, экспрессирующих *rolC*. Более значительное повышение температуры на 13°C практически полностью останавливало рост контрольных каллусов, в то время как линии ACH и RCH, хотя и были ингибированы на 85% и 88%, соответственно, при этом сохраняли способность к росту.



**Рисунок 13** – Влияние температурного и солевого стресса на рост каллусных культур *A. thaliana* (А) и *R. cordifolia* (Б). R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ACH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Культивирование каллусов в условиях холода (12°C) выявило повышенную устойчивость *rolC*-экспрессирующих линий по сравнению с контрольными культурами (Рисунок 13). Накопление биомассы культуры ACH составило 36% от таковой в нормальных условиях, тогда как прирост культуры At достиг только 28%. Еще более выраженная устойчивость к холодному стрессу наблюдалась у *rolC*-трансгенных каллусов *R. cordifolia*. Холод ингибировал рост культуры RCH на 35%, а рост контрольной каллусной линии – на 81%.

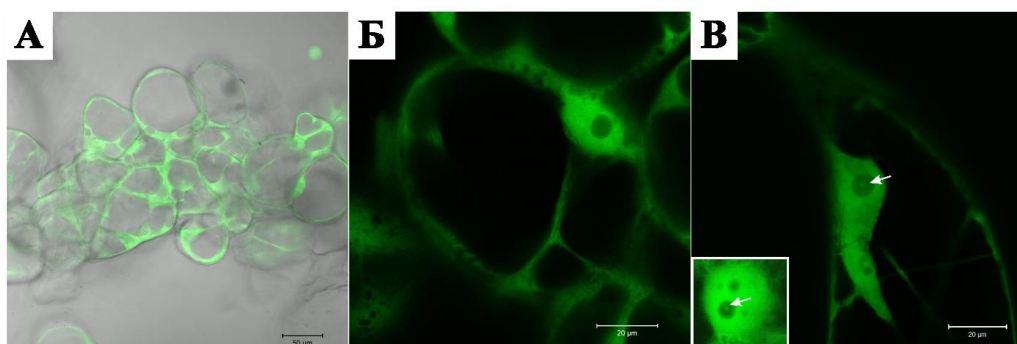
Солевой стресс оказал различное влияние на рост каллусных линий *A. thaliana* и *R. cordifolia* (Рисунок 13). Разница в устойчивости к воздействию соли между контрольной и трансгенной культурами *A. thaliana* проявилась только при повышенной концентрации NaCl. Так, накопление биомассы клеток в линии ACH в присутствии 120 мМ NaCl, составило 55% от роста в нормальных условиях, тогда как прирост культуры At достиг лишь 30% от контрольных условий. При этом уже в присутствии 60 мМ NaCl в среде, рост контрольной каллусной линии *R. cordifolia* подавлялся на 78%, а при 120 мМ NaCl ее рост практически полностью прекращался.

Клетки *R. cordifolia*, экспрессирующие *rolC*, проявляли повышенную солеустойчивость, так как накопление биомассы культуры RCH в присутствии 60 и 120 mM NaCl, составило 82 и 24% от массы клеток в нормальных условиях, соответственно.

Таким образом, ингибирующий эффект гена *rolC* на уровень АФК способствовал значительному повышению стрессоустойчивости трансформированных клеток. Выступая в роли супрессора АФК, ген *rolC*, вероятно, может предотвращать окислительное повреждение клеточных структур и биомолекул, связанное с реакцией на абиотический стресс. Хотя реакции, индуцируемые *rolC* в трансформированных клетках, такие как увеличение продукции фитоалексинов и усиление экспрессии PR-белков, напоминают эффекты, вызываемые грибковыми элиситорами, очевидно, что ген *rolC* активирует защитные реакции используя другой механизм. Комбинация защитных реакций в сочетании с эффектом подавления АФК представляет собой уникальный случай действия одного и того же трансгена.

### Внутриклеточная локализация белка RolC

Внутриклеточная локализация белка является важным показателем его функциональных особенностей. Проведенные ранее исследования внутриклеточной локализации RolC были выполнены на основе иммунохимического анализа отдельных клеточных фракций и свидетельствовали о его накоплении в цитоплазме (Estruch et al., 1991; Oono et al., 1991). Для уточнения этих данных, было исследовано накопление белка RolC, слитого с флуоресцентным белком EGFP, непосредственно в живых клетках. Модельным объектом в данном эксперименте служили трансформированные протопласты *R. cordifolia*. Флуоресценцию EGFP детектировали в ядре и цитоплазме клеток, за исключением вакуолей (Рисунок 14), что является типичным пространственным распределением для данного белка (Collings, 2013). Химерный белок RolC-EGFP имел сходный паттерн внутриклеточной локализации (Рисунок 14), что отчасти подтверждает литературные данные. Детальный анализ ядер трансформированных клеток показал, что определенная фракция RolC накапливается также и в ядрышках трансформированных клеток. Идентификация белка RolC в ядрышках растений может свидетельствовать о его участии в эпигенетическом контроле экспрессии генов.

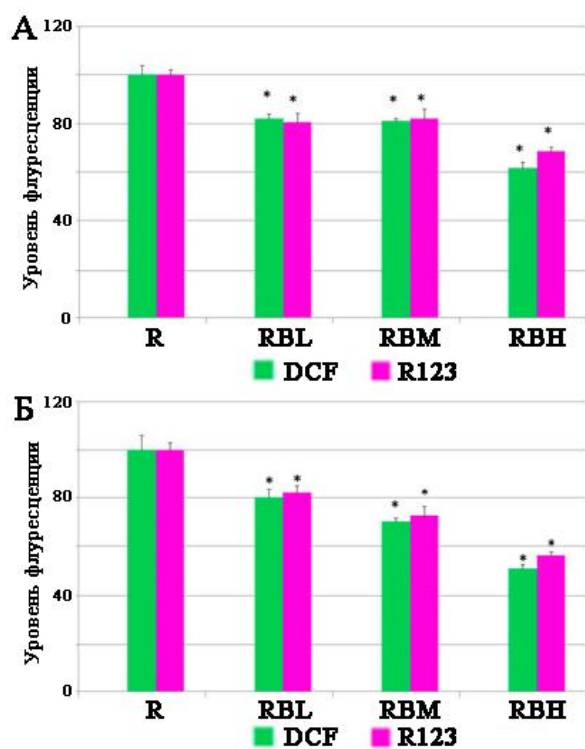


**Рисунок 14** – Локализация белка RolC-EGFP в трансформированных клетках *R. cordifolia*. Общий вид клеток, трансформированных конструкцией *rolC-EGFP* (А); клетки, трансформированные геном *EGFP* (Б); Ядерная локализация белка RolC-EGFP (В). Стрелки указывают точечную флуоресценцию химерного белка в ядрышках трансформированных клеток.

### Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, экспрессирующих ген *rolB*

Ген *rolB* является наиболее важным генетическим фактором для индукции «волосатых» корней у трансформированных агробактериями растений (Nilsson, Olsson, 1997). Хотя гены *rolB* и *rolC* действуют синергически при индукции корней, в отношении ряда других эффектов они проявляют антагонистическое действие (Schmülling et al., 1988). Эти результаты свидетельствуют, что такой неоднозначный характер взаимодействия генов может проявляться и в отношении метаболизма АФК.

Было установлено, что уровень АФК в трансгенных клеточных линиях *R. cordifolia* с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* (RBL, RBM и RBH, соответственно) был снижен и составлял, в зависимости от уровня экспрессии *rolB*, 50–83% от уровня контрольной культуры (Рисунок 15). Аналогичный эффект был отмечен и в клетках *A. thaliana*, в которых высокая экспрессия трансгена подавляла образование АФК в 1,6 раза по сравнению с контролем (Таблица 6).



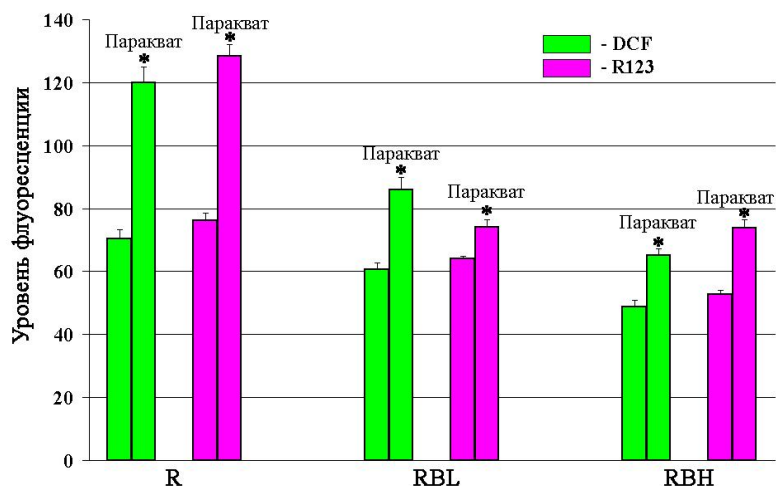
**Рисунок 15** – Внутриклеточное содержание АФК в суспензионных (А) и каллусных (Б) культурах *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBL, RBM и RBH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена, соответственно. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

**Таблица 6** – Внутриклеточное содержание АФК в контрольных и *rolB*-трансгенных клеточных культурах *A. thaliana*

Клеточная линия	Кол-во проанализированных клеток	Уровень флуоресценции, отн. ед.
Контрольная каллусная культура <i>A. thaliana</i>	100	75 ± 3,5
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>A. thaliana</i> ABL	100	60 ± 2,5*
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>A. thaliana</i> ABH	100	48 ± 1,9*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

Чтобы оценить влияние *rolB* на окислительно-восстановительный гомеостаз клеток не только в нормальном состоянии, но и при стрессовом воздействии, были изучены особенности накопления АФК в трансгенных культурах *R. cordifolia* при воздействии таких известных индукторов кислородных радикалов как паракват, менадион и световой стресс. При воздействии параквата были использованы условия, которые вызывали двукратное увеличение АФК в контрольных клетках, но при этом не приводили к их гибели (10 мкМ и 1 час световой инкубации). При этих же параметрах в *rolB*-трансгенных клетках происходило лишь незначительное повышение уровня АФК по сравнению с контролем (Рисунок 16).



**Рисунок 16** – Влияние параквата на внутриклеточное содержание АФК в контрольных (R) и *rolB*-трансгенных (RBL и RBH) культурах *R. cordifolia*. Клетки культивировали в темноте в течение 4 суток, после чего обрабатывали паракватом (10 мкМ) в течение 1 ч при непрерывном воздействии света. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

Для изучения реакции клеток *R. cordifolia* на воздействие менадиона, культуры R и RBH подвергали культивированию в течение 24 часов в среде с концентрациями данного соединения от 0 до 500 мкМ. Установлено, что значения  $IC_{50}$  менадиона для культур R и RBH составили 100 мкМ и 250 мкМ, соответственно. В контрольной культуре менадион в дозе 100 мкМ вызвал почти двукратное повышение внутриклеточных АФК примерно через 20 часов с начала воздействия. При этом *rolB*-трансгенные клетки оказались практически нечувствительны к менадиону на протяжении эксперимента (Таблица 7). Стоит отметить, что *rolB*-трансгенные клетки были жизнеспособны даже в присутствии 500 мкМ менадиона, тогда как клетки контрольной культуры полностью погибали.

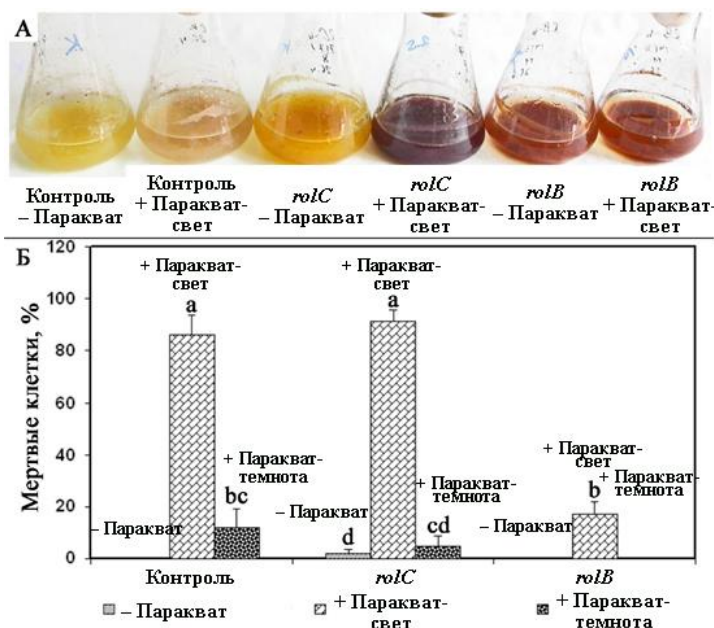
Контрольные и *rolB*-трансгенные клетки подвергали световому стрессу под воздействием аргонового лазера (488 нм) в течение 16 минут. В контрольной культуре уровень АФК в этих условиях увеличился в 1,7 раза (Таблица 7). В культуре с низкой экспрессией *rolB* повышение уровня АФК было менее значительным (в 1,5 раза), тогда как в культуре с высокой экспрессией *rolB* изменения уровня АФК под действием света не происходило. Таким образом, *rolB* предотвращает образование АФК в трансгенных клетках, как в нормальных условиях, так и при воздействии различных стрессовых факторов.

**Таблица 7** – Внутриклеточное содержание АФК в контрольных (R) и *rolB*-трансгенных (RBL и RBH) культурах *R. cordifolia* при воздействии менадиона и светового стресса

Обработка	Уровень флуоресценции DCF		
	R	RBL	RBH
Менадион, мкМ <sup>a</sup>			
0	82,0 ± 4,3	70,9 ± 3,9	48,0 ± 2,4
100	123,5 ± 5,0*	74,0 ± 4,6	53,4 ± 4,1
Интенсивный свет (время воздействия, сек) <sup>b</sup>			
2	77,0 ± 4,0	59,8 ± 5,3	62,5 ± 3,2
600	113,9 ± 5,3*	83,5 ± 3,8*	63,8 ± 5,4
1000	130,7 ± 6,4*	87,4 ± 5,2*	64,9 ± 6,1

<sup>a</sup>Менадион добавляли в 4-х дневные суспензионные культуры. Интенсивность флуоресценции DCF анализировали по прошествии 20 дней инкубации. <sup>b</sup>Клетки подвергали воздействию аргонового лазера (длина волны 488 нм, 5,9% от максимальной интенсивности)  
\* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

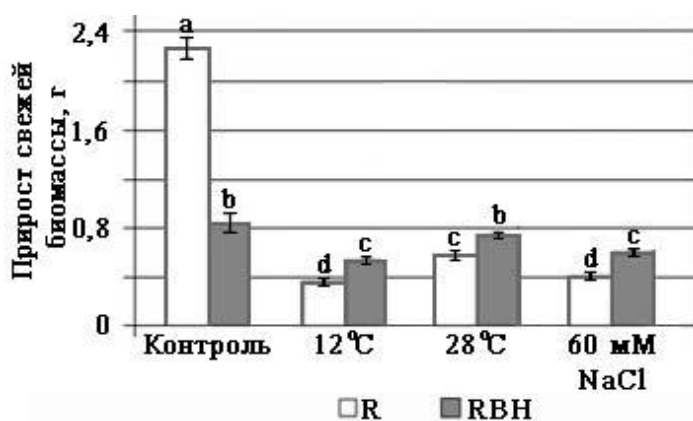
Чтобы определить влияние длительного окислительного стресса на устойчивость трансгенных клеток, суспензионные культуры R, RCH и RBH инкубировали в присутствии 100 мкМ параквата как в условиях освещенности, так и в темноте. При инкубации на свету, воздействие параквата приводило к заметным внешним изменениям: в культурах R и RCH наблюдалась массовая гибель клеток, тогда как культура RBH оставалась жизнеспособной (Рисунок 17). Установлено, что в культуре R количество мертвых клеток в темноте и на свету составляло 11% и 85%, соответственно (Рисунок 17). В культуре RBH при воздействии параквата в темноте мертвые клетки не были обнаружены, а при освещении их количество составляло около 16%, что говорит о значительном снижении АФК-индуцированной клеточной гибели в трансгенной культуре. Ген *rolC* не предотвращал гибель клеток – их количество в темноте и на свету составляло 5% и 92%, соответственно.



**Рисунок 17** – Жизнеспособность контрольных (R), *rolC*- и *rolB*-трансгенных (RCH и RBH, соответственно) культур *R. cordifolia* в присутствии параквата. Внешний вид клеточных культур (А) и оценка цитотоксичности параквата (Б). Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Дополнительно был изучен эффект экзогенного воздействия  $H_2O_2$  на рост суспензионных культур *R. cordifolia*. При концентрации 2 мМ перекись водорода ингибировала рост контрольных и *rolC*-трансгенных культур, тогда как рост *rolB*-трансгенных культур не изменился. Более того, культура RBH была жизнеспособной даже при воздействии 10 мМ  $H_2O_2$ .

Для оценки устойчивости *rolB*-трансгенных клеток к воздействию абиотических стрессов, каллусные линии R и RBH культивировали при нормальной (24°C), повышенной (28°C) и пониженной (12°C) температуре, а также в присутствии NaCl (60 мМ). Воздействие высокой и низкой температуры значительно ингибировало рост контрольной клеточных линий R (Рисунок 18). При повышении температуры на 4°C по сравнению с нормальными условиями, рост каллусных линий, экспрессирующих *rolB*, статистически значимо не изменился. Культивирование каллусов в условиях холода (12°C) также выявило повышенную устойчивость *rolB*-трансгенных линий по сравнению с контрольными культурами (Рисунок 18). Солевой стресс оказал негативное влияние на рост клеточных культур *R. cordifolia*. При этом клетки, экспрессирующие *rolB*, проявляли выраженную солеустойчивость, так как накопление биомассы культуры RBH в присутствии 60 мМ NaCl снизилось только на 35% (Рисунок 18).



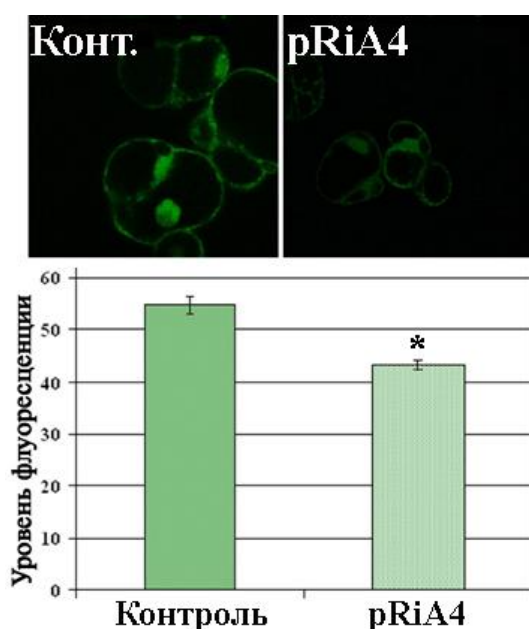
**Рисунок 18** – Влияние температурного и солевого стресса на рост каллусных культур *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Ген *rolB* вызывает наиболее значительную активацию вторичного метаболизма среди других генов *rol*. При высоком уровне экспрессии трансгена этот эффект сочетается с некротическими проявлениями и подавлением роста культуры (Schmülling et al., 1988). Поскольку эти признаки обычно связаны с высоким уровнем АФК, можно было ожидать, что *rolB* способен индуцировать продукцию АФК в трансформированных клетках. Результаты проведенного исследования, однако, не подтвердили данную гипотезу. Ген *rolB* снижал концентрацию АФК в растительных клетках и предотвращал или ослаблял их образование в ответ на внешние факторы, что обеспечивает повышенную устойчивость трансгенным клеткам.

#### Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, трансформированных pRiA4

Результаты проведенного исследования указывали на то, что *rolC*- и *rolB*-индуцированная модификация окислительно-восстановительного баланса в трансгенных культурах должна приводить к схожему эффекту и в клетках, трансформированных диким штаммом *R. rhizogenes*. В составе pRiA4 данные гены находятся в контексте других функциональных генов, как относящихся к семейству *plast*, так и нет. К тому же, наблюдаемое снижение уровня АФК находилось в прямой

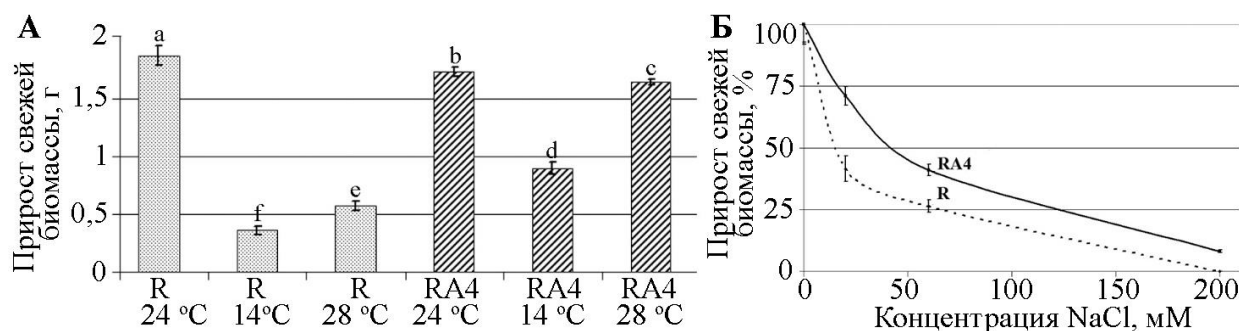
зависимости от силы экспрессии трансгенов, которую в культурах обеспечивал сильный вирусный промотор 35S CaMV. В плазмиде pRiA4 транскрипционный контроль осуществляется собственными промоторами, работа которых может отличаться от вирусных регуляторных элементов. Таким образом, предстояло определить, является ли данный феномен биологическим эффектом, присущим самим агробактериям, или данное свойство проявляется только при сверхэкспрессии отдельных генов *rol*. Чтобы проверить данное предположение, была проанализирована продукция АФК в контрольной и pRiA4-трансформированной культуре *R. cordifolia*. Конфокальные изображения отдельных клеток и уровень внутриклеточных АФК в них представлены на Рисунке 19. Уровень АФК в pRiA4-трансформированной культуре составлял 79% от уровня АФК, наблюдаемого в клетках контрольной культуры (Рисунок 19). Из этого следует, что в составе Т-ДНК pRiA4 гены *rol* также вызывают снижение продукции АФК. Эти наблюдения подтверждают роль генов *rol* в регулировании окислительного баланса в клетках растений.



**Рисунок 19** – Содержание внутриклеточных АФК в листе, контрольных (R) и pRiA4-трансформированных (RA4) каллусных культурах *R. cordifolia*. Микрофотографии клеток (А) и внутриклеточное содержание АФК (Б). Уровень АФК оценивали по интенсивности флуоресценции DCF в отдельных клетках. \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ),  $t$ -тест Стьюдента.

Для оценки чувствительности трансгенных клеток к стрессам, каллусные культуры R и RA4 подвергали воздействию соли, высокой и низкой температуры. Накопление биомассы клеток в линии RA4 при пониженной и повышенной температуре составляло, соответственно, 52% и 94% от нормальных условий культивирования, что значительно превосходит показатели линии R (Рисунок 20А). В условиях солевого стресса  $IC_{50}$  NaCl, составляла 15 мМ и 42 мМ для каллусных линий R и RA4, соответственно (Рисунок 20Б). Корреляционный анализ Пирсона выявил высокую зависимость между устойчивостью культуры RA4 к высокой, низкой температуре и солевому стрессу и содержанием внутриклеточных АФК ( $r = -0,960$ ,  $p = 0,040$ ;  $r = -0,935$ ,  $p = 0,065$  и  $r = -0,921$ ,  $p = 0,079$ , соответственно). Таким образом, эффект подавления АФК в pRiA4-трансформированных клетках сопровождается заметной резистентностью к абиотическим стрессам. Повышение устойчивости растений к таким стрессовым воздействиям, как соленость, экстремальные температуры и радиация, является важной задачей биотехнологии. Полученные в ходе исследования результаты могут быть использованы для практического применения, поскольку в

ряде стран растения, трансформированные природными штаммами агробактерий и не содержащие рекомбинантных молекул ДНК, относятся к природно-трансгенным и не подлежат регулированию как обычные генно-модифицированные организмы (Директива 2001/18/ЕС Европейского парламента и Совета от 12 марта 2001 г.).



**Рисунок 20** – Влияние температурного (А) и солевого (Б) стресса на рост каллусных культур *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RA4 – pRiA4-трансформированная клеточная линия *R. cordifolia*. Данные по солевому стрессу выражены в процентах ингибирования роста по отношению к значениям прироста биомассы клеток в нормальных условиях. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

### Влияние генов *rol* на экспрессию генов антиоксидантной защиты

Ферменты антиоксидантной системы играют ключевую роль в защите клеток растений от окислительного стресса, вызванного образованием АФК (Shigeoka and Shao, 2014). Были идентифицированы гены аскорбатпероксидазы (*Apx*), Cu/Zn-супероксиддисмутазы (*CSD*) и каталазы (*Cat*) в растении *R. cordifolia*: *RcApx1–RcApx3* (номера доступа в GenBank GQ380494, GU949549 и GU949550, соответственно), *RcCSD1–RcCSD3* (номера доступа в GenBank GQ380492, GU949547 и GU949548, соответственно) и *RcCat1* (номер доступа в GenBank GQ380493). Был проведен анализ воздействия генов *rol* на транскрипционную активность антиоксидантных генов в клеточных культурах *R. cordifolia*, а также на экспрессию их гомологов в культурах *A. thaliana*.

В pRiA4-трансформированной культуре *R. cordifolia* экспрессия всех изученных генов аскорбатпероксидазы была значительно выше, чем в нетрансформированной культуре. Уровень транскрипции *RcApx1*, *RcApx2* и *RcApx3* в культуре RA4 превышал значения контрольной линии в 1,3, 5 и 3 раза, соответственно (Таблица 8). Уровень экспрессии *RcCSD1* и *RcCSD3* в каллусах RA4 статистически значимо не отличался от линии R. При этом транскрипционная активность *RcCSD2* в pRiA4-трансформированной культуре была в 1,7 раза выше, чем в контроле (Таблица 8). Транскрипция *RcCat1* в каллусах RA4 лишь в 1,2 раза превышала значения контрольной линии, однако это различие было статистически значимым (Таблица 8). В совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что трансформация диким штаммом *R. rhizogenes* A4 активизирует транскрипционную активность определенных изоформ ферментов антиоксидантной системы. Также была выявлена отрицательная корреляционная связь между экспрессией антиоксидантных генов и накоплением АФК в RA4-трансгенных каллусах ( $r = -0,977$ ,  $p = 0,023$ ).

**Таблица 8** – Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в контрольной (R) и pRiA4-трансформированной каллусных культурах *R. cordifolia*

	R	RA4
Аскорбатпероксидазы		
<i>RcApx1</i>	0,688 ± 0,002	0,919 ± 0,042*
<i>RcApx2</i>	0,023 ± 0,001	0,114 ± 0,005*
<i>RcApx3</i>	0,014 ± 0,001	0,042 ± 0,002*
Cu/Zn-супероксиддисмутазы		
<i>RcCSD1</i>	0,879 ± 0,006	0,901 ± 0,014
<i>RcCSD2</i>	0,070 ± 0,002	0,117 ± 0,002*
<i>RcCSD3</i>	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,001
Каталазы		
<i>RcCat1</i>	0,183 ± 0,001	0,215 ± 0,017*

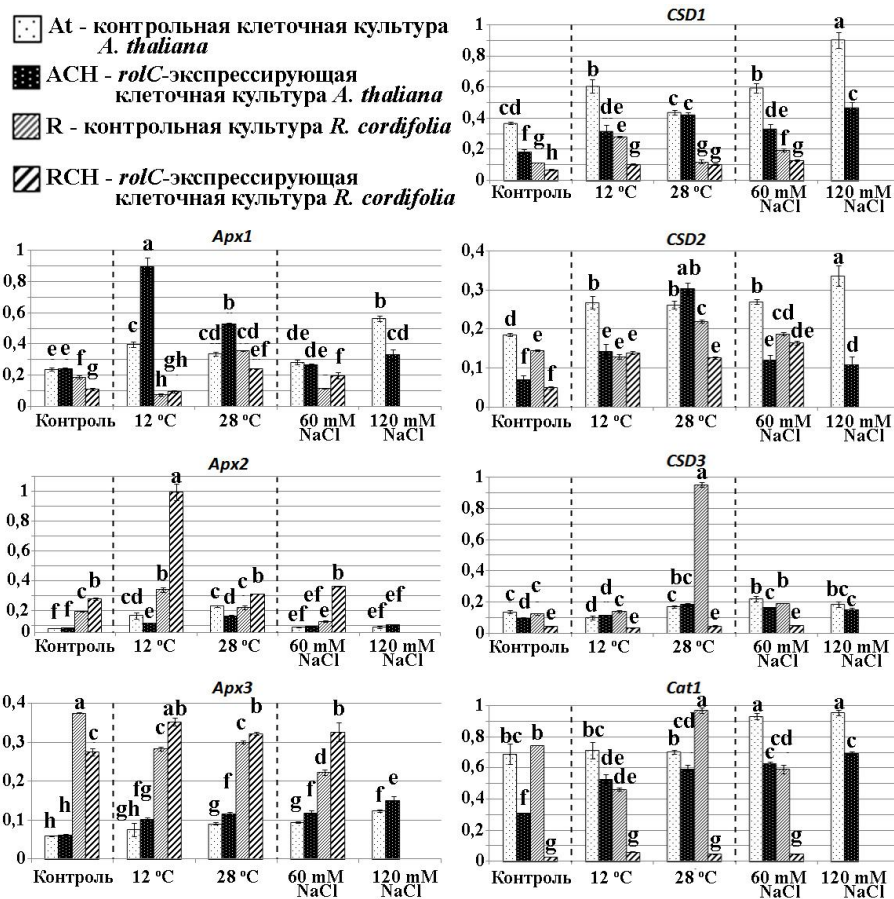
\* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

Ген *rolC* не оказал существенного влияния на экспрессию генов *AtApx* в трансгенной клеточной линии *A. thaliana* (Рисунок 21). В то же время в *rolC*-трансгенных клетках *R. cordifolia* транскрипционная активность *RcApx1* и *RcApx3* была снижена в 1,7 и 1,4 раза, соответственно, а экспрессия *RcApx2* была повышена в 1,6 раза по сравнению с контрольной культурой. Стрессовые воздействия вызывали аналогичное изменение транскрипционной активности изоформ *Apx* как в контрольных, так и в *rolC*-трансгенных клетках *A. thaliana* и *R. cordifolia*, увеличивая их экспрессию в 2–6 раз.

Ген *rolC* вызвал снижение уровня транскрипции всех исследованных генов *CSD* в культурах АСН и РСН в 2–3 раза (Рисунок 21). Однако, в отличие от контрольных клеток, экспрессия генов *CSD1* и *CSD2* в *rolC*-трансгенных каллусах в ответ на стрессовые факторы активировалась в 1,5–4,3 раза. Кроме того, транскрипция *AtCSD3* в культуре АСН повышалась в 2 раза при тепловом стрессе и обработке NaCl. При этом стрессовые воздействия не оказали значительного влияния на уровень экспрессии *RcCSD3* в каллусной культуре РСН.

Транскрипционная активность *Cat1* в *rolC*-трансгенных линиях *A. thaliana* и *R. cordifolia* была снижена в 2,2 и 27,3 раза, соответственно (Рисунок 21). Изменения экспрессии этого гена в трансгенных культурах при стрессовых стимулах также были сходными. Во всех случаях наблюдалось 1,7–2,2-кратное увеличение экспрессии гена *Cat1* в каллусных линиях АСН и РСН.

Из приведенных результатов видно, что в *rolC*-трансгенных каллусных линиях *A. thaliana* и *R. cordifolia* общее содержание транскриптов антиоксидантных ферментов было в 1,7 и 3,3 раза ниже, чем в соответствующих контрольных линиях. Более того, несмотря на то что в условиях абиотического стресса уровень экспрессии антиоксидантных ферментов в них повышался, общая транскрипционная активность оставалась на относительно низком уровне по сравнению с контролем. Таким образом, *rolC* не только не повышает, но в некоторых случаях и снижает уровень экспрессии антиоксидантных генов. Этот результат свидетельствует о том, что редокс-статус *rolC*-трансгенных клеток связан с особенностями образования АФК.



**Рисунок 21** – Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в калусных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ACH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Ген *rolB* индуцировал экспрессию всех исследованных генов *Apx* в трансгенных клеточных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* (Таблица 9). Наибольшее влияние трансген оказал на изоформы *Apx1* и *Apx2*, транскрипционная активность которых увеличилась до 3,5 раз. Стоит заметить, что экспрессия генов *Apx* положительно коррелировала с транскрипционной активностью трансгена, но эта зависимость наблюдалась только в культурах с низким и умеренным уровнем экспрессии *rolB*. В культуре RCH транскрипционная активность изоформ *RcApx* статистически значимо не отличалась от контрольной линии.

Из трех проанализированных генов Cu/Zn-супероксиддисмутазы, в *rolB*-трансгенных культурах увеличилась экспрессия только изоформы *CSD1* (Таблица 9). В данном случае был также выражен эффект «дозы» гена: высокий уровень экспрессии *rolB* оказывал максимальное влияние на транскрипцию *CSD1*. Содержание мРНК *CSD2* и *CSD3* в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* не отличалось от контроля.

Уровень экспрессии генов *AtCat1* и *RcCat1* в *rolB*-трансгенных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* был в 2–3 раза выше по сравнению с контролем, в зависимости от силы транскрипции трансгена (Таблица 9).

**Таблица 8** – Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в контрольных и *rolB*-трансгенных каллусных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*

<i>Arabidopsis thaliana</i>			<i>Rubia cordifolia</i>			
At	ABL	ABH	R	RBL	RBM	RBH
<i>rolB</i>						
-	0,054±0,013	0,191±0,018	-	0,062±0,004	0,266±0,018	0,706±0,059
<i>AtApx1</i>			<i>RcApx1</i>			
0,288±0,01	0,511±0,004	0,991±0,009	0,292±0,00	0,581±0,011	0,978±0,021	0,301±0,012
<i>AtApx2</i>			<i>RcApx2</i>			
0,324±0,00	0,646±0,006	1,016±0,016	0,164±0,01	0,324±0,042	0,404±0,015	0,155±0,008
<i>AtApx3</i>			<i>RcApx3</i>			
0,341±0,04	0,553±0,061	0,901±0,099	0,342±0,00	0,514±0,003	0,696±0,028	0,332±0,011
<i>AtCSD1</i>			<i>RcCSD1</i>			
0,498±0,02	0,496±0,038	0,966±0,033	0,601±0,00	0,611±0,009	0,761±0,006	0,873±0,009
<i>AtCSD2</i>			<i>RcCSD2</i>			
0,882±0,01	0,911±0,051	0,915±0,086	0,571±0,05	0,611±0,006	0,535±0,011	0,598±0,038
<i>AtCSD3</i>			<i>RcCSD3</i>			
0,802±0,04	0,779±0,014	0,918±0,083	0,597±0,01	0,577±0,027	0,621±0,023	0,517±0,002
<i>AtCat1</i>			<i>RcCat1</i>			
0,278±0,01	0,651±0,027	0,939±0,061	0,379±0,01	0,397±0,048	0,485±0,015	0,738±0,027

At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ABL и ABH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *A. thaliana* с низким и высоким уровнем экспрессии трансгена; R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBL, RBM и RBH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена.  
\* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

Таким образом, *rolB* является мощным индуктором экспрессии антиоксидантных генов, что в свою очередь может обуславливать изменение редокс-статуса трансгенных клеток, а также препятствовать образованию АФК под действием стрессовых индукторов. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что *rolB* активирует защитные механизмы, направленные на индукцию АФК. Трансформированные клетки пытаются компенсировать этот эффект с помощью генов антиоксидантной защиты. Во многих случаях компенсация проходит успешно, и *rolB*-клетки сохраняют окислительно-восстановительный баланс близкий к таковому в контроле. В случаях, когда этот механизм недостаточен вследствие чрезмерной экспрессии *rolB*, клетки погибают. Такая гипотеза позволяет объяснить, почему высокие дозы белка RolB вызывают некротическую гибель клеток, в то время как низкие дозы предотвращают некроз.

### **Влияние генов *rol* на экспрессию генов НАДФН-оксидазы**

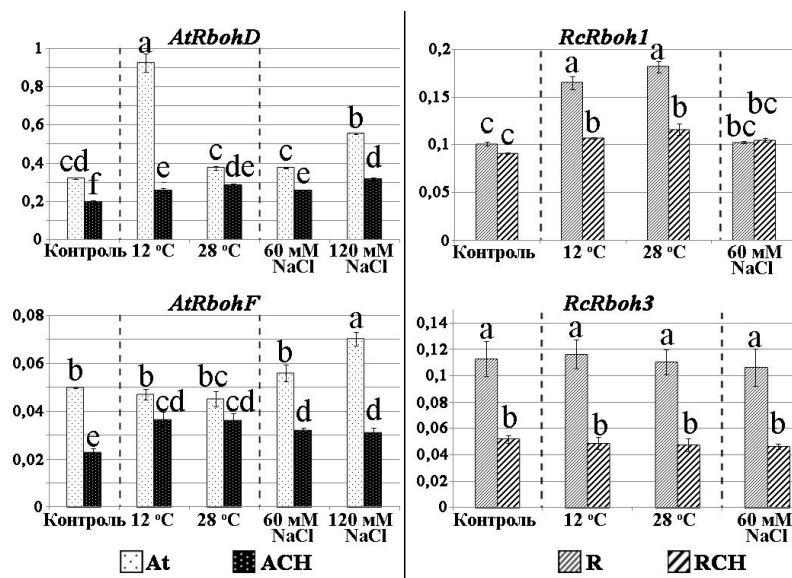
Гомологи оксидазы респираторного взрыва (*Rboh*s), которые являются специфичными НАДФН-оксидазами растений, отвечают за образование АФК как в нормальных условиях, так и при ответе на стрессовые факторы (Chu-Puga et al., 2019). Были идентифицированы изоформы НАДФН-оксидазы *R. cordifolia*, *RcRboh1* и *RcRboh3*, которые были депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа KP987238 и KP987239, соответственно.

Было изучено влияние *rolC* на экспрессию *RcRboh1* и *RcRboh3*, а также гомологичных генов *AtRbohD* и *AtRbohF* в трансгенных культурах *R. cordifolia* и *A. thaliana* как в нормальных условиях, так и при воздействии температурного и солевого стресса (Рисунок 22). Уровни экспрессии *AtRbohD* и *AtRbohF* в *rolC*-

трансгенной линии *A. thaliana* были примерно в два раза ниже по сравнению с контрольной культурой. Сверхэкспрессия *rolC* в трансгенной культуре *R. cordifolia* привела к двукратному снижению уровня транскрипции *RcRboh3*, но не оказала существенного влияния на транскрипционную активность *RcRboh1*. В контрольных каллусных линиях *A. thaliana* и *R. cordifolia* общее содержание мРНК *Rboh* было в 1,7 и 1,6 раза выше, чем в *rolC*-трансгенных каллусных линиях, соответственно. Более того, исследованные абиотические стрессы повышали уровень экспрессии *Rboh* в 2 раза в контрольных клетках, тогда как в клетках, экспрессирующих *rolC*, наблюдалось максимальное увеличение в 1,4 раза.

Гены *Rboh* по-разному реагировали на стрессовые условия в экспериментальных условиях (Рисунок 22). В клеточных культурах *A. thaliana* изоформа *AtRbohD* активировалась преимущественно холодом, тогда как наибольший транскрипционный ответ изоформы *AtRbohF* был вызван воздействием солевого стресса. В культивируемых клетках *R. cordifolia* абиотические факторы оказали влияние только на экспрессию изоформы *RcRboh1*, в то время как транскрипция *RcRboh3* не изменялась в условиях стрессовых воздействий и, вероятно, участвует в поддержании гомеостаза АФК в клетках марены сердцелистной.

В целом полученные результаты говорят об ингибирующем влиянии *rolC* на транскрипционную активность НАДФН-оксидаз. Несмотря на различное влияние стрессовых факторов на экспрессию гомологичных изоформ *Rboh* в трансгенных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*, при любых воздействиях их транскрипционная активность была значительно подавлена под влиянием гена *rolC*.



**Рисунок 22** – Влияние *rolC* на экспрессию генов *Rboh* в каллусных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ACH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Было установлено, что вызванное *rolB* ингибирование продукции АФК не связано со снижением экспрессии генов НАДФН-оксидазы. Транскрипционная активность изоформы *RcRboh1* была значительно повышена в клетках, экспрессирующих *rolB* (6- и 7-кратное увеличение в культурах RBM и RBH, соответственно) (Таблица 10).

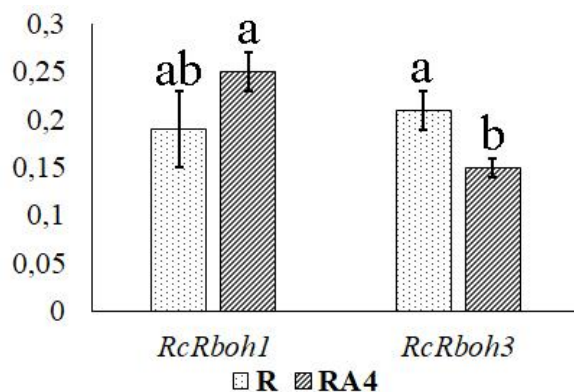
Содержание транскриптов *RcRboh3* в культурах RBM и RBH также увеличилось и превышало значения контрольной культуры в 3 и 4 раза, соответственно. Такая же тенденция изменения экспрессии НАДФН-оксидаз наблюдалась и в культурах *A. thaliana* (Таблица 10). В линиях ABL и ABH транскрипционный уровень гена *AtRbohD* увеличился в 2,5 и 3 раза, тогда как транскрипция *AtRbohF* увеличилась в 4 и 7 по сравнению с контрольной культурой, соответственно. Анализ показал положительную корреляционную зависимость между уровнем экспрессии *rolB* и экспрессией генов *RcRboh1* и *RcRboh3* ( $r = 0,89$ ,  $p < 0,01$  и  $r = 0,92$ ,  $p < 0,01$ , соответственно), а также генов *AtRbohD* и *AtRbohF* ( $r = 0,85$ ,  $p < 0,01$  и  $r = 0,96$ ,  $p < 0,01$ , соответственно).

**Таблица 10** – Экспрессия генов *Rboh* в контрольных и *rolB*-трансгенных каллусных культурах *R. cordifolia* и *A. thaliana*

<i>R. cordifolia</i>			<i>A. thaliana</i>		
R	RBM	RBH	At	ABL	ABH
<i>RcRboh1</i>			<i>AtRbohD</i>		
0,101±0,002 <sup>c</sup>	0,576±0,036 <sup>b</sup>	0,691±0,012 <sup>a</sup>	0,242±0,019 <sup>c</sup>	0,615±0,024 <sup>b</sup>	0,803±0,062 <sup>a</sup>
<i>RcRboh3</i>			<i>AtRbohF</i>		
0,132±0,002 <sup>c</sup>	0,399±0,019 <sup>b</sup>	0,521±0,003 <sup>a</sup>	0,119±0,011 <sup>c</sup>	0,432±0,043 <sup>b</sup>	0,801±0,025 <sup>a</sup>

R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBM и RBH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ABL и ABH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *A. thaliana* с умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия средних значений в строках ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Таким образом установлено, что индивидуальная экспрессия *rolC* и *rolB* приводит к активации или подавлению транскрипционной активности генов *Rboh*, соответственно. Чтобы выяснить, как гены *rol* будут проявлять данные свойства в составе исходной Т-ДНК, была проанализирована экспрессия генов НАДФН-оксидаз в pRiA4-трансформированной культуре *R. cordifolia* (Рисунок 23). Транскрипционная активность изоформы *RcRboh1* была немного повышена в трансгенных клетках, однако это различие не являлось статистически значимым. Содержание транскриптов *RcRboh3* в культуре RA4 снизилось в 1,4 раза по сравнению с линией R.



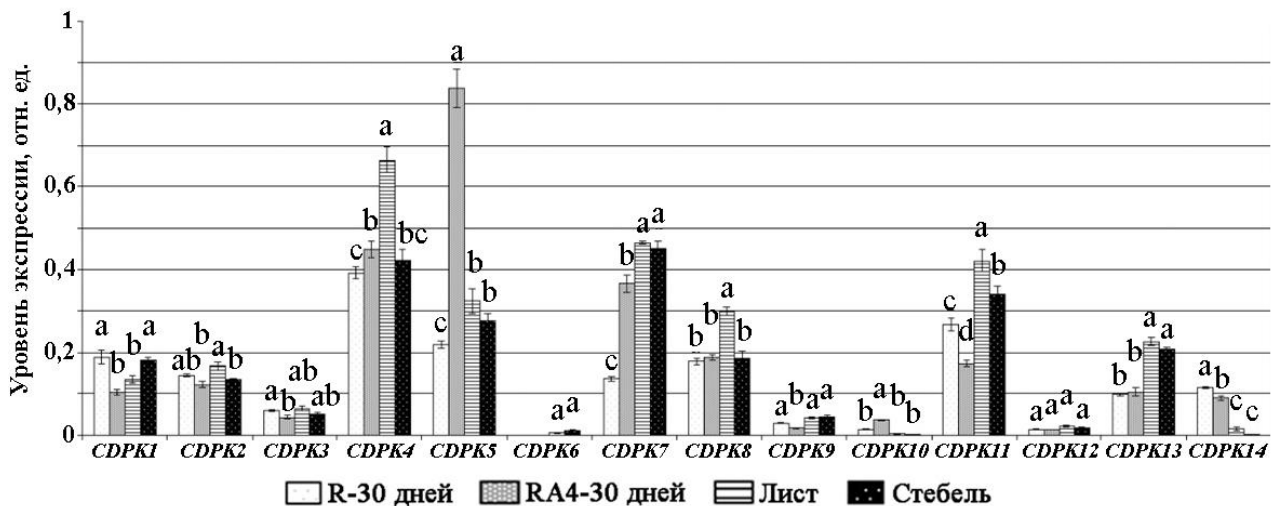
**Рисунок 23** – Влияние трансформации *R. rhizogenes* A4 на экспрессию генов *Rboh* в каллусной культуре *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия; RA4 – pRiA4-трансформированная клеточная линия. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Паттерн экспрессии изоформ *RcRboh* в культуре *R. cordifolia*, трансформированной диким штаммом *R. rhizogenes* A4, в большей степени схож с *rolC*-трансгенными линиями. В pRiA4-трансформированных клетках, вероятно, устанавливается такой баланс транскрипционной активности генов *rol*, при котором *rolC* компенсирует негативное влияние *rolB*. Не исключено, что это соотношение в определенных условиях может сдвигаться в ту или иную сторону под действием, например, стрессовых факторов или гормональных сигналов, однако данное предположение требует дальнейшего всестороннего изучения.

Таким образом, *rolC* подавляет экспрессию генов *Rboh* как в нормальных, так и в стрессовых условиях, тогда как *rolB* действует как активатор обеих систем, генерации и детоксикации АФК. Эти результаты являются еще одним примером антагонизма генов *rolC* и *rolB*, что, вероятно, служит адаптационным механизмом, выработанным в процессе эволюции взаимоотношений агробактерий и растений-хозяев.

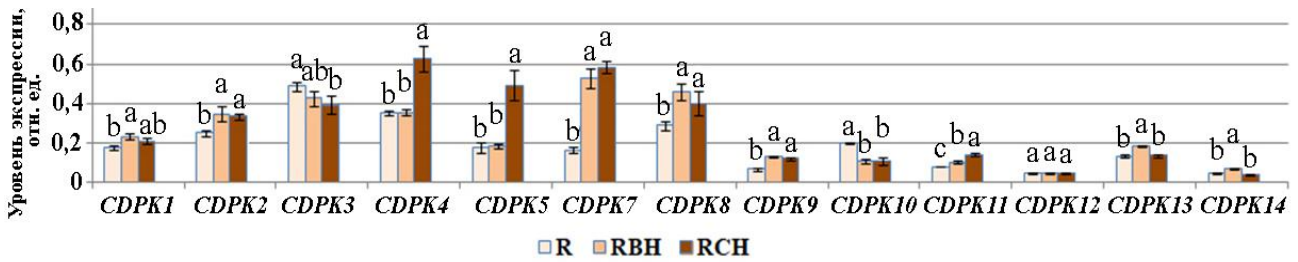
### Влияние генов *rol* на экспрессию $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ

Известно, что  $Ca^{2+}$ -зависимые протеинкиназы (CDPK) регулируют образование АФК в клетках растений (Kobayashi et al., 2007). Было выявлено 14 изоформ *CDPK* марены сердцелистной. Идентифицированные последовательности, *RcCDPK1–RcCDPK14*, депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа DQ531564, EF090621, EF090620, JQ954841, JQ954842, JQ954843, J Q954844, JQ954845, JQ954846, JQ954847, JQ954848, JQ954849, JQ954850 и JQ954851, соответственно. В контрольной каллусной линии уровень экспрессии транскриптов *RcCDPK* оказался в 1,3 и 1,6 раза ниже, по сравнению со стеблем и листом зрелого растения, соответственно (Рисунок 24). Трансформация клеток марены сердцелистной как отдельными генами *rol*, так и диким штаммом *R. rhizogenes* A4, вызывала значительные изменения в профиле экспрессии генов *RcCDPK*. При этом в ответ на интеграцию Т-ДНК pRiA4 транскрипция 4-х изоформ *RcCDPK* была активирована, тогда как экспрессия 5-ти изоформ снижалась (Рисунок 24).



**Рисунок 24** – Экспрессия генов *CDPK* в контрольных (R) и pRiA4-трансформированных (RA4) каллусных культурах, листьях и стеблях *R. cordifolia*. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

В культурах RBH и RCH сверхэкспрессия генов *rol* вызывала тот или иной транскрипционный ответ у 12 из 14 исследованных изоформ *RcCDPK* (Рисунок 25).



**Рисунок 25** – Экспрессия генов *CDPK* в каллусных культурах *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

Интересно отметить, что общий уровень экспрессии *RcCDPK* во всех трансгенных линиях одинаково повышался примерно в 1,4 раза по сравнению с контролем. Однако паттерн изменений отдельных изоформ в линиях RA4 и RBH/RCH значительно варьировал. Экспрессия *RcCDPK1*, *RcCDPK9*, *RcCDPK10*, *RcCDPK11* и *RcCDPK14* имела противоположные изменения в pRiA4- и *rol*-трансформированных каллусах. Например, экспрессия *RcCDPK10* в линии RA4 была повышена по сравнению с контрольными клетками, в то время как в обеих *rol*-экспрессирующих культурах она была снижена. Напротив, в каллусах RA4 наблюдалось снижение уровней экспрессии *RcCDPK1*, *RcCDPK9*, *RcCDPK11* и *RcCDPK14*, однако в линиях RBH и RCH их транскрипционная активность была выше контроля. Экспрессия *RcCDPK2*, *RcCDPK8* и *RcCDPK13* оставалась неизменной после трансформации диким штаммом *R. rhizogenes* A4, но активировалась в *rol*-трансгенных культурах. Сходный паттерн экспрессии кальций-зависимых протеинкиназ в *rol*- и pRiA4-трансформированных клетках был обнаружен для *RcCDPK3*, *RcCDPK4*, *RcCDPK5*, *RcCDPK7* и *RcCDPK12*. Наблюдаемые отличия эффектов трансгенеза могут быть вызваны тем, что в культурах RBH и RCH транскрипцию генов *rol* обеспечивает сильный вирусный промотер 35S CaMV, тогда как в линии RA4 все гены находятся под контролем их собственных регуляторных систем. Более того, очевидно, что другие гены, входящие в состав Т-ДНК, также могут оказывать собственное влияние на экспрессию кальций-зависимых протеинкиназ, однако литературные сведения на этот счет пока отсутствуют.

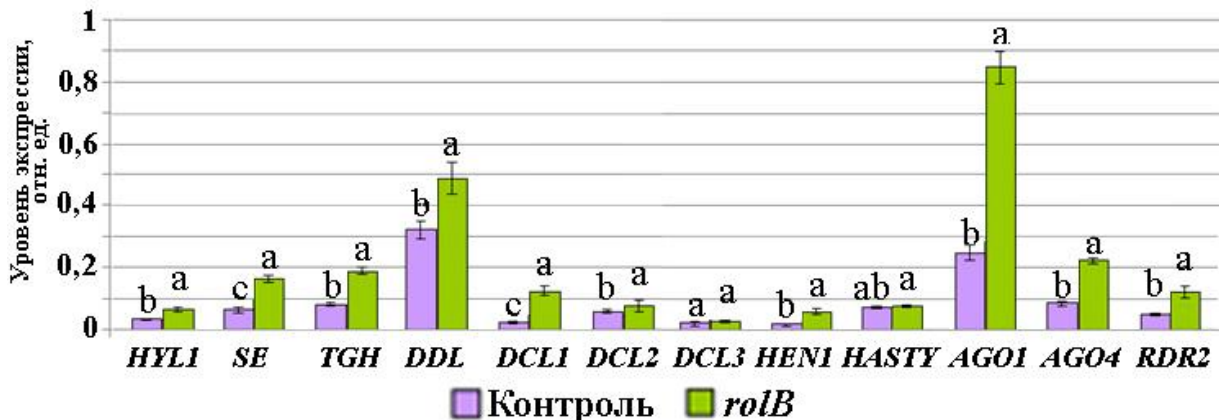
Субстратная специфичность различных представителей семейства  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ пока слабо изучена, что затрудняет интерпретацию функциональной значимости всех идентифицированных изоформ CDPK в трансгенных культурах. Однако полученные в данной работе результаты указывают, что трансформация клеток *R. cordifolia* диким штаммом *R. rhizogenes* A4 приводит к значительному снижению транскрипции изоформ *RcCDPK3* и *RcCDPK11*, являющихся ближайшими гомологами генов *AtCDPK1* и *StCDPK5* из арабидопсиса и томата. Оба этих гена известны своей способностью повышать активность НАДФН-оксидазы и индуцировать продукцию АФК (Kobayashi et al., 2007; Xing et al., 2001). Индивидуальная экспрессия генов *rol* также приводила к подавлению транскрипционной активности изоформы *RcCDPK3*. В то же время экспрессия

изоформ *RcCDPK5* и *RcCDPK7* в трансгенных каллусных линиях увеличивалась. Указанные изоформы гомологичны генам  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ из риса и люцерны, *OsCPK12* и *MtCDPK1*, которые участвуют в детоксикации АФК (Asano et al., 2012; Ivashuta et al., 2005). Результаты проведенного анализа показали, что снижение продукции АФК, вызванное агробактериальными генами, связано с подавлением экспрессии *RcCDPK3* и *RcCDPK11*, а также повышением транскрипционной активности *RcCDPK5* и *RcCDPK7*.

### Влияние гена *rolB* на молекулярный механизм биогенеза микроРНК

Ранее было установлено, что белок 6b из Ti плазмиды *R. radiobacter* напрямую взаимодействует с ключевыми компонентами комплексов DCL1-SE-HYL1 и RISC/AGO1, отвечающими за биогенез малых некодирующих РНК, подавляя способность растительных клеток к РНК-интерференции (Wang et al., 2011). Поскольку гены *rol* и *6b* относятся к одному семейству генов *plast*, было изучено воздействие *rolB* на функционирование данных систем в трансгенных клетках. В клетках АВН было обнаружено 2–7-кратное увеличение транскриптов *DCL1*, *HYL1* и *SE* (Рисунок 26). Увеличение транскрипционной активности всех трех ключевых генов, участвующих в процессинге микроРНК, указывает на то, что молекулярный аппарат транскрипции и созревания первичных транскриптов микроРНК в *rolB*-трансгенных культурах гиперактивирован.

Белок TGH взаимодействует с молекулами пре-микроРНК и необходим для нормального функционирования модуля DCL1-SE-HYL1 (Ren and Yu, 2012). DDL взаимодействует с DCL1, способствуя распознаванию пре-микроРНК с помощью DCL1 (Bologna, Voinnet, 2014). Установлено, что экспрессия как *TGH*, так и *DDL* была увеличена в клетках с высоким уровнем трансгена (Рисунок 26), что дополнительно подтверждает активацию биогенеза микроРНК.



**Рисунок 26** – Экспрессия генов, регулирующих биогенез малых некодирующих РНК, в контрольных (At) и трансгенных каллусных культурах *A. thaliana* с низким и высоким уровнем экспрессии *rolB* (ABL и АВН, соответственно). Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), НЗР-тест Фишера.

РНК-метилтрансфераза HEN1 метилирует зрелые молекулы малых интерферирующих РНК и микроРНК, что препятствует их энзиматической деградации (Ji and Chen, 2012). Экспрессия *HEN1* повышалась в трансгенных клетках более, чем в 2 раза (Рисунок 26), что указывает на роль *rolB* не только в созревании, но также и в стабилизации микроРНК.

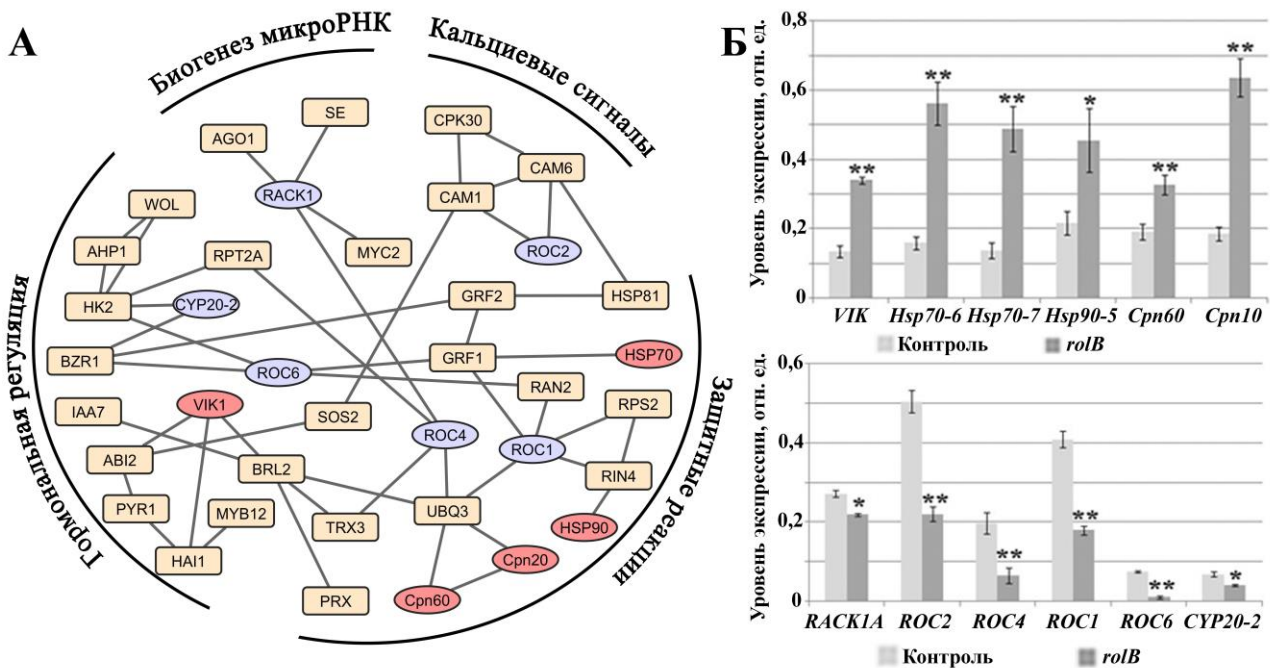
Экспрессия *AGO1* в культуре АВН была увеличена в 3,5 раза (Рисунок 26), что свидетельствует об активации комплекса RISC/AGO1. Кроме того, в клетках с высоким уровнем экспрессии *rolB* была индуцирована транскрипционная активность гена *AGO4*, в 2,7 раза, и гена *RDR2* – в 2,5 раза. *AGO4* в комплексе с белком *RDR2* (РНК-зависимая РНК полимеразы 2) является основным эффектором РНК-направленного метилирования ДНК (Böhmdorfer et al., 2014). Вероятно, *rolB* может активировать не только формирование и стабилизацию, но и функционирование микроРНК – подавление экспрессии генов-мишеней.

### **Влияние гена *rolB* на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией и защитой растений**

Для понимания механизмов, лежащих в основе *rolB*-индуцированных изменений в гормональной и защитной системах, был осуществлен поиск и анализ среди белков-регуляторов, обеспечивающих контроль над реализацией соответствующих процессов, и изучена их транскрипционная активность. Полученные данные позволили реконструировать сеть белок-белковых взаимодействий, которые могут быть задействованы в множественных эффектах, индуцируемых геном *rolB* (Рисунок 27А). Транскрипционная активность шаперонинов, *Cpn10* и *Cpn60*, а также белков теплового шока (HSP, heat shock proteins) – *Hsp70-6*, *Hsp70-7* и *Hsp90-5*, была значительно повышена в *rolB*-трансгенных клетках (Рисунок 27Б). *Hsp70* высоко консервативны у эукариот, и некоторые их функции у животных и растений схожи. У животных сверхэкспрессия *Hsp70* обеспечивает повышенную выживаемость опухолевых клеток благодаря своей способности ингибировать разнообразные пути клеточной гибели, включая апоптоз (Murphy, 2013). Также известно, что *Hsp70* вместе с другими шаперонами контролируют нормальный фолдинг белков и предотвращает их агрегацию при неблагоприятных условиях (Jacob et al., 2017). Таким образом, *rolB*-индуцированная активация белков теплового шока обеспечивает благоприятные условия для неопластической трансформации и роста растительной ткани, а также вносит вклад в повышенную устойчивость трансгенных клеток к стрессам.

Анализ экспрессии гена киназы VIK (VH1-interacting kinase), выявил почти 3х-кратную активацию транскрипции под действием *rolB* (Рисунок 27Б). Белок VIK играет важную роль в ауксин-активируемом сигнальном пути, защитном ответе на микробные элиситоры, программируемой клеточной гибели, регуляции гиперчувствительного ответа растений и ответах на холододовой и осмотический стресс (Ceserani et al., 2009). Интересно, что многие из этих процессов присущи клеткам, экспрессирующим *rolB*, что указывает на их взаимосвязь в регуляции физиологических ответов растений.

Некоторые представители семейства циклофилинов, такие как *CYP18-3* (ROC1), *CYP19-2* (ROC6), *CYP19-3* (ROC2), *CYP20-2* и *CYP20-3* (ROC4), подавлялись в *rolB*-трансгенных клетках (Рисунок 27Б). Данные белки относят к одному семейству близкородственных циклофилинов, участвующих в рефолдинге и поддержании оптимальной конформации различных белков (Romano et al., 2004).



**Рисунок 27** – Сеть белок-белковых взаимодействий, вовлеченных в *rolB*-опосредованную регуляцию различных клеточных процессов (А). Экспрессия регуляторных генов в контрольных (At) и трансгенных каллусах *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии *rolB* (АВН) (Б). \* Статистически значимые различия средних значений ( $p < 0,05$ ), *t*-тест Стьюдента.

ROC1 связан с развитием эффектор-активированного иммунитета растений, а также опосредуют импорт белков в ядра и клеточный ответ на солевой стресс (Shin et al., 2011; Li et al., 2014). ROC2 физически взаимодействует с кальмодулинами и таким образом влияет на широкий спектр реакций, контролируемых этими белками (Kaur et al., 2015). ROC4 связывает окислительно-восстановительные и световые сигналы с биосинтезом цистеина и стрессовыми реакциями в хлоропластах (Dominguez-Solis et al., 2008). Снижение уровня ROC4 в трансформированных клетках могло привести к изменению иммунного статуса клеток. ROC6 (CYP19-2) и CYP20-2 взаимодействуют с транскрипционным репрессором BZR1 и цитокининовой сигнальной системой (Zhang et al., 2013), что может объяснить морфологические изменения, наблюдаемые у *rolB*-трансформированных растений *A. thaliana*. Другим возможным эффектом сниженной транскрипции циклофилинов в *rolB*-трансгенных клетках может являться подавление экспрессии гена рецептора для активированной С-киназы 1А (RACK1A), важного белка, регулирующего биогенез малых РНК (микроРНК и коротких интерферирующих РНК). RACK1A это регуляторный WD40-содержащий белок, который является основным представителем семейства RACK1 и участвует в регуляции множества сигнальных путей, опосредованных взаимодействиями RACK1A-циклофилины (Kundu et al., 2013). Белок RACK1A обеспечивает накопление и процессинг некоторых при-микроРНК, непосредственно взаимодействуя с SERRATE и комплексом AGO1 (Speth et al., 2013). Эти особенности могут быть вовлечены в модуляцию экспрессии компонентов процессинга микроРНК под действием *rolB*. Данная сеть взаимодействий также включает факторы транскрипции MYB и MYC, которые участвуют в регуляции вторичного метаболизма.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате настоящей диссертационной работы показано, что гены *rol* обладают уникальной способностью активировать вторичный метаболизм растений и сохраняют свой эффект на протяжении длительного культивирования трансгенных клеточных культур. Изучены молекулярно-генетические механизмы активирующего сигнала отдельных генов, а также эффекты их совместного применения. Высокий уровень транскрипционной активности гена *rolB* существенно усиливает биосинтез вторичных метаболитов. Однако важно отметить, что чрезмерная экспрессия этого гена может негативно влиять на пролиферацию клеток. Это создаёт необходимость в «дозировании» его экспрессии, осуществляемой путём отбора подходящих клеточных линий на начальных этапах создания *rolB*-трансгенных культур. Такой подход позволяет максимизировать полезные свойства гена при минимизации потенциальных нежелательных эффектов. В отличие от гена *rolB*, ген *rolC* оказывает менее выраженное активирующее действие, однако, он обладает важным преимуществом в способности увеличивать прирост клеточной биомассы, и этот эффект сохраняется даже в условиях высокой транскрипционной активности трансгена. Особенно примечательно, что при совместной экспрессии *rolC* способен компенсировать негативное влияние *rolB* на пролиферацию клеток. Также впервые было обнаружено, что в процессе длительного культивирования ген *rolA* вызывает постепенное увеличение биосинтетического потенциала клеток. Этот результат является неожиданным, учитывая общепринятое утверждение, что длительное культивирование клеток растений обычно снижает их продуктивность. Важно отметить, что активирующее действие генов *rol* может проявляться по-разному в зависимости от вида растения, что обуславливает специфичность их эффектов в различных объектах.

Гены *rol* также обеспечивают защиту растений от разнообразных стрессовых факторов, что объясняется их влиянием на метаболизм активных форм кислорода (АФК). Было установлено, что оба гена способствуют уменьшению внутриклеточной концентрации АФК, причём данный эффект зависел от уровня экспрессии трансгена. Этот феномен наблюдался как в клетках, находящихся в нормальном состоянии, так и при воздействии внешних индукторов АФК. Кроме того, снижение уровня АФК сохранялось и при трансформации клеток диким штаммом *R. rhizogenes* A4, что указывает на общую биологическую активность этого патогена. Важно отметить, что гены *rol* не проявляют синергического эффекта в отношении продукции АФК. Клетки, трансформированные диким штаммом агробактерий, показали умеренное снижение концентрации АФК, уровень которого оставался выше, чем в *rolC*-культурах, но был ниже по сравнению с *rolB*-экспрессирующими культурами. Также установлено, что ген *rolC* не оказывает влияния на клеточную систему детоксикации АФК. Уровень экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, в *rolC*-трансгенных клетках остался неизменным по сравнению с контрольными клетками. Однако этот ген подавлял активность НАДФН-оксидазы, которая является ключевым компонентом системы генерации АФК в растениях. В отличие от гена *rolC*, ген *rolB* не подавлял транскрипционную активность НАДФН-оксидаз, напротив, вызывая ее стимуляцию. Следовательно, эффект белка RolB связан с активацией защитных реакций клетки, что, в теории, могло бы привести к увеличению продукции АФК.



## ВЫВОДЫ

1. На примере клеточной культуры *Rubia cordifolia* впервые выявлена способность гена *rolA* индуцировать накопление вторичных метаболитов и транскрипцию генов их биосинтеза в процессе длительного культивирования клеток. В то же время, влияние генов *rolB* и *rolC* на вторичный метаболизм остается стабильным на протяжении всего периода наблюдения. В клеточных культурах *R. cordifolia* достигнут высокий уровень продукции антрахинонов, обладающих противовоспалительными и антиоксидантными свойствами.

2. Показано, что гены *rolB* и *rolC* активируют накопление производных фенантрена, аристолохиевых кислот и магнофлорина, в трансформированных корнях *Aristolochia manshuriensis*, повышая при этом антиоксидантную и цитотоксическую активность экстрактов из этих культур. Важным достоинством *rol*-трансгенных культур является снижение концентрации токсичного соединения – аристолохиевой кислоты I.

3. Трансформация клеточных культур *Arabidopsis thaliana* геном *rolB* повышает концентрации индольных глюкозинолатов, не влияя при этом на качественный состав метаболитов. В растении экспрессия *rolB* стимулирует биосинтез флавоноидов. Данные эффекты сопряжены с модуляцией экспрессии факторов транскрипции *MYB* и *bHLH*, а также координируемых ими биосинтетических генов.

4. Выявлены новые аспекты влияния генов *rol* на редокс-статус трансформированных клеток растений. Гены *rolB* и *rolC* вызывают снижение концентрации внутриклеточных АФК, коррелирующее с уровнем их экспрессии, но при этом не оказывают синергического эффекта в клетках, трансформированных диким штаммом *R. rhizogenes* A4. Показано, что как *rol*-трансгенные, так и pRiA4-трансформированные клеточные культуры обладают повышенной устойчивостью к температурному и солевому стрессу.

5. Раскрыт молекулярный механизм действия генов *rol* на метаболизм АФК. Ген *rolB* активирует как прооксидантные (НАДФН-оксидазы), так и антиоксидантные гены (аскорбатпероксидазы, супероксиддисмутаза и каталазы), тогда как *rolC* ингибирует активность НАДФН-оксидазы, не затрагивая антиоксидантную защитную систему. Кроме того, обнаружена дифференциальная регуляция изоформ кальций-зависимых протеинкиназ, обеспечивающая снижение уровня внутриклеточных АФК.

6. Впервые показано, что ген *rolB* влияет на молекулярный механизм биогенеза микроРНК, активируя экспрессию генов, участвующих в формировании, стабилизации и функционировании этих молекул. Действие белка RolB связано с модуляцией экспрессии гена *RACK1A*, регулирующего биогенез малых РНК.

7. Охарактеризовано влияние *rolB* на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией, защитными реакциями и кальциевой сигнальной системой. Наиболее заметные изменения выявлены в регуляции транскрипционной активности белков теплового шока и некоторых представителей семейства циклофилинов.

8. Установлено, что гены *rol* представляют собой эффективный инструмент в биотехнологии для создания стабильных клеточных культур растений с повышенным содержанием вторичных метаболитов. Кроме того, они также перспективны для разработки стратегий, направленных на усиление стрессоустойчивости растений.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ, и в приравняемых к ним периодических изданиях, входящих хотя бы в одну из библиографических баз цитирования (Web of Science или Scopus):

1. Mishchenko N.P., Fedoreev S.A., Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Azarova O.V., **Shkryl Yu.N.**, Chernoded G.K. Chemical composition and pharmacological activity of anthraquinones from *Rubia cordifolia* cell culture // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2007. V. 41. P. 605–609.
2. **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 // Biotechnology and Bioengineering. 2008. V. 100. P. 118–125.
3. **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. № 5. P. 1023–1032.
4. 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 Reports. 2012. V. 31. № 6. P. 1009–1019.
5. Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.**, Tchernoded G.K., Bulgakov D.V., Aminin D.L., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through sustained activation of antioxidant defense // Plant Physiology. 2012. V. 158. № 3. P. 1371–1381.
6. 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 // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 2013. V. 134. P. 1–22.
7. **Shkryl Y.N.**, Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Günter E.A., Ovodov Y.S., Muzarok T.I., Zhuravlev Y.N. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* // Journal of Biotechnology. 2013. V. 168. № 1. P. 64–70.
8. Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.**, Pinkus S.A., Bulgakov V.P. Expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes (*CDPK1-14*) in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* under temperature- and salt-induced stresses // Journal of Plant Physiology. 2014. V. 171. № 7. P. 467–474.
9. Bulgakov V.P., Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.** The *rolB* gene activates the expression of genes encoding microRNA processing machinery // Biotechnology Letters. 2015. V. 37. № 4. P. 921–925.
10. Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., **Shkryl Y.N.** Modulation of NADPH-oxidase gene expression in *rolB*-transformed calli of *Arabidopsis thaliana* and *Rubia cordifolia* // Plant Physiology and Biochemistry. 2016. V. 105. P. 282–289.
11. Bulgakov V.P., Veremeichik G.N., Grigorchuk V.P., Rybin V.G., **Shkryl Y.N.** The *rolB* gene activates secondary metabolism in *Arabidopsis* calli via selective activation of

genes encoding *MYB* and *bHLH* transcription factors // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2016. V. 102. P. 70–79.

12. Bulgakov V.P., Vereshchagina Y.V., Bulgakov D.V., Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.** The *rolB* plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone signaling and plant defense // *Scientific Reports*. 2018. V. 8. Article ID 2285.

13. Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., **Shkryl Y.N.**, Silantieva S.A., Makhazen D.S., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Vasileva E.A. Activation of anthraquinone biosynthesis in long-cultured callus culture of *Rubia cordifolia* transformed with the *rolA* plant oncogene // *Journal of Biotechnology*. 2019. V. 306. P. 38–46.

14. **Shkryl Y.N.**, Veremeichik G.N., Silantieva S.A., Bulgakov V.P. Differential expression of calcium-dependent protein kinase genes (CDPK1–14) in *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes // *Plant Gene*. 2020. V. 21. Article ID 100215.

15. Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.**, Rusapetova T.V., Silantieva S.A., Grigorchuk V.P., Velansky P.V., Brodovskaya E.V., Konnova Y.A., Khopta A.A., Bulgakov D.V., Bulgakov V.P. Overexpression of the *A4-rolB* gene from the pRiA4 of *Rhizobium rhizogenes* modulates hormones homeostasis and leads to an increase of flavonoid accumulation and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants // *Planta*. 2022. V. 256. Article ID 8.

16. **Shkryl Y.**, Veremeichik G., Avramenko T., Gorpenchenko T., Tchernoded G., Bulgakov V. Transcriptional regulation of enzymes involved in ROS metabolism and abiotic stress resistance in *rolC*-transformed cell cultures // *Plant Growth Regulation*. 2022. V. 97. P. 485–497.

17. **Shkryl Y.N.**, Tchernoded G.K., Yugay Y.A., Grigorchuk V.P., Sorokina M.R., Gorpenchenko T.Y., Kudinova O.D., Degtyarenko A.I., Onishchenko M.S., Shved N.A., Kumeiko V.V., Bulgakov V.P. Enhanced production of nitrogenated metabolites with anticancer potential in *Aristolochia manshuriensis* hairy root cultures. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. Article ID 11240.

#### **Статьи, опубликованные в других периодических изданиях:**

18. Bulgakov V.P., **Shkryl Y.N.**, Veremeichik G.N. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia cell* cultures through transformation with *rol* genes // *Plant Secondary Metabolism Engineering. Methods and Applications. Series: Methods in Molecular Biology*. 2010. V. 643. P. 229–242.

19. 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, genetic transformation. In: Alvarez M.A., editor. *Genetic Transformation*. IntechOpen; Rijeka, Croatia: 2011. P. 261–270.

20. Eskandarzadeh M., Esmaeili A., Nikbakht M., Hitotsuyanagi Y., **Shkryl Y.**, Yadegari J., Rezazadeh H., Khalilifard J. Genus *Rubia*: Therapeutic Effects and Toxicity: A Review // *Herbal Medicines Journal*. 2023. V. 8. P. 1–14.

#### **Работы, опубликованные в материалах региональных и международных научных конференциях, симпозиумах:**

21 **Шкрыль Ю.Н.**, Чернопед Г.К., Красовская Н.П., Булгаков В.П. Содержание аристолохиевых кислот в культурах клеток *Aristolochia manshuriensis*,

трансформированных генами *rolB* и *rolC* // Биотехнология на рубеже двух тысячелетий: Международная конференция, г. Саранск, 2001 г., с. 143.

22. **Шкрыль Ю.Н.**, Чернодед Г.К., Безруков Д.В., Булгаков В.П. Влияние  $Ca^{2+}$  на рост трансгенных культур *Rubia cordifolia*, содержащих гены *rolB* и *rolC* // Биология – наука XXI века: VII пушинская школа-конференция молодых ученых, г. Пущино, 2003 г., с. 392.

23. **Шкрыль Ю.Н.**, Чернодед Г.К., Глазунов В.П., Мищенко Н.П. Активация синтеза антрахинонов в каллусных культурах *Rubia cordifolia*, трансформированных генами *rolB* и *rolC* // Актуальные проблемы химии и биологии: VII Дальневосточная молодежная школа-конференция, г. Владивосток, 2003 г., с. 58–59.

24. **Шкрыль Ю.Н.**, Чернодед Г.К., Булгаков В.П., Журавлев Ю.Н. Продукция антрахинонов трансгенными культурами *Rubia cordifolia* // Химия и технология растительных веществ: III Всероссийская конференция, г. Саратов, 2004 г., с. 256–257.

25. Журавлев Ю.Н., Булгаков В.П., **Шкрыль Ю.Н.** Биотехнология редких лекарственных растений Дальнего Востока // Региональная научная конференция: Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии, г. Владивосток, 2004 г., с. 6–7.

26. Avramenko T.V., Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.**, Gorpenchenko T.Y., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N. Simultaneous activation of secondary metabolism and an increase in temperature stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells by overexpression of a calcium-dependent protein kinase gene // 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Daegu, South Korea, 2013, p. 0-S8-0035.

27. Avramenko T.V., Veremeichik G.N., **Shkryl Y.N.**, Bulgakov V.P. Characterization and phylogenetic analysis of seven class III peroxidases from *Rubia cordifolia* callus culture // 8th International Conference on European Science and Technology, Munich, Germany, 2014, vol. 1., p.57–62.

28. Avramenko T.V., **Shkryl Y.N.**, Veremeichik G.N., Bulgakov V.P. Molecular cloning of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures // Proceedings of the 2nd European Conference on Biology and Medical Sciences, Vienna, Austria, 2014, vol. 1., p. 20–25.

29. Югай Ю.А., Авраменко Т.В., **Шкрыль Ю.Н.** Исследование активности антиоксидантных ферментов в *rolC*-трансгенных корневых культурах // XV Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, г. Владивосток, 2014 г., с. 60.

30. Авраменко Т.В., Веремейчик Г.Н., **Шкрыль Ю.Н.**, Булгаков В.П. Продукция растительных пероксидаз III класса в трансгенных клеточных культурах *Rubia cordifolia*, трансформированных геном *rolB* из *Agrobacterium rhizogenes* // Биотехнология: состояние и перспективы развития: VIII Московский международный конгресс, г. Москва, 2015 г., т. 1. с. 311–316.

31. Авраменко Т.В., Веремейчик Г.Н., **Шкрыль Ю.Н.**, Булгаков В.П. Активация пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных агробактериальным геном *rolB* // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины, г. Ростов-на-Дону, 2015 г., т. 1. с. 10–11.

ШКРЫЛЬ  
ЮРИЙ НИКОЛАЕВИЧ

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ *ROL* КАК АКТИВАТОРЫ  
БИОСИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И  
СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ**