

Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro*

Т.В. Матвеева¹✉, О.Д. Богомаз¹, Л.А. Голованова¹, Ю.С. Ли², Д. Димитров³

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный музей естественной истории, София, Болгария

Агробактериальная трансформация – самый распространенный способ получения трансгенных растений в лабораторных условиях. В природе в пределах родов *Nicotiana*, *Linaria* и *Ipomoea* описаны виды, содержащие в геномах гомологи генов Т-ДНК агробактерий, как результат агробактериальной трансформации их предковых форм. Такие растения называют природно-трансгенными, а Т-ДНК в них обозначается как клеточная (кЛТ-ДНК). Предполагается, что в эволюции указанных родов привнесенные последовательности играли важную роль. Эту мысль подтверждают данные о неоднократной трансформации нескольких видов растений в ходе эволюции и сведения об экспрессии некоторых генов кЛТ-ДНК у *Nicotiana* и *Ipomoea*. Ранее экспрессия генов кЛТ-ДНК у *Linaria* не была описана, хотя анализ нуклеотидной последовательности гена *rolC* (наиболее консервативного из генов Т-ДНК) свидетельствует в пользу его функциональности у *L. vulgaris* Mill., *L. acutiloba* Fisch. ex Rchb. и *L. genistifolia* (L.) Mill. В настоящей работе проведено секвенирование гомолога гена *rolC* у прежде не изученного вида льнянки *Linaria cretica* Kuprian. Анализ *in silico* показал, что этот ген кодирует полноразмерный пептид. С использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени мы продемонстрировали, что *rolC* экспрессируется в культуре растений *in vitro* в побегах, корнях и каллусах *L. vulgaris* Mill., а также в побегах *L. cretica* Kuprian. Полученные результаты – важный факт в пользу того, что кЛТ-ДНК функциональна и ее закрепление в геномах играло определенную роль в ходе эволюции. Однако уровень экспрессии изучаемого гена достаточно низок у льнянок. Кроме того, аналогичная тенденция отмечена и у других природно-трансгенных видов. Этим можно объяснить отсутствие явных морфологических отличий видов, содержащих кЛТ-ДНК, от их не-трансгенных родственников.

Ключевые слова: *Linaria*; кЛТ-ДНК; *rolC*; экспрессия трансгена; культура *in vitro*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Матвеева Т.В., Богомаз О.Д., Голованова Л.А., Ли Ю.С., Димитров Д. Гомологи гена *rolC* природно-трансгенных льнянок *Linaria vulgaris* и *Linaria cretica* экспрессируются *in vitro*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):273-278. DOI 10.18699/VJ18.359

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Matveeva T.V., Bogomaz O.D., Golovanova L.A., Li Yu.S., Dimitrov D. Homologs of the *rolC* gene of naturally transgenic toadflaxes *Linaria vulgaris* and *Linaria cretica* are expressed *in vitro*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):273-278. DOI 10.18699/VJ18.359 (in Russian)

УДК 602.6:57.085.2

Поступила в редакцию 28.11.2017

Принята к публикации 26.12.2017

© АВТОРЫ, 2018

✉ e-mail: radishlet@gmail.com

Homologs of the *rolC* gene of naturally transgenic toadflaxes *Linaria vulgaris* and *Linaria cretica* are expressed *in vitro*

T.V. Matveeva¹✉, O.D. Bogomaz¹, L.A. Golovanova¹, Yu.S. Li², D. Dimitrov³

¹ Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

² All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

³ National Museum of Natural History, Sofia, Bulgaria

Agrobacterium mediated transformation is the most common way for obtaining transgenic plants in laboratory conditions. At the same time, there are species inside the genera *Nicotiana*, *Linaria* and *Ipomoea* that contain homologs of agrobacterial T-DNA genes as a result of genetic transformation of their ancestral forms in natural conditions. Such plants are called naturally transgenic plants, and T-DNA in their genomes is called cellular (cT-DNA). It is proposed that in the evolution of these genera, the introduced sequences played an important role. This idea is confirmed by the data on the expression of some T-DNA genes in *Nicotiana* and *Ipomoea*. Until the last moment, the expression of cT-DNA genes in *Linaria* has not been documented. However, the analysis of the nucleotide sequence indicates the functionality of *rolC* gene in *L. vulgaris* Mill., *L. acutiloba* Fisch. ex Rchb., *L. genistifolia* (L.) Mill. In this research work, we have sequenced the *rolC* homolog in one more toadflax species (*Linaria cretica* Kuprian). The *in silico* analysis of this gene has shown that it can encode a full-length peptide. Using the real time RT-PCR method, we have demonstrated that the *rolC* homolog is expressed *in vitro* in shoots, roots and calli of *L. vulgaris* Mill., as well as in shoots of *L. cretica* Kuprian. The results obtained are an important argument in favor of the fact that cT-DNA is functional and that its fixation in genomes played a certain role in the evolutionary process. However, the level of expression of the gene studied is quite low. A similar trend was observed in other naturally transgenic species. This can explain the absence of explicit morphological differences of species containing cT-DNA from their non-transgenic relatives.

Key words: *Linaria*; cT-DNA; *rolC*; transgene expression; *in vitro*.

Агробактериальная трансформация является самым распространенным способом получения трансгенных растений в лабораторных условиях (Vain, 2007; www.isaaa.org). Вместе с тем в природе описаны виды, содержащие в геномах гомологи генов Т-ДНК агробактерий. Эти виды относятся к родам *Nicotiana*, *Ipomoea* и *Linaria* (White et al., 1983; Furner et al., 1986; Matveeva et al., 2012; Chen et al., 2014; Kyndt et al., 2015). Предковые формы таких растений были трансформированы в природных условиях и не только смогли выжить после этого, но и дали начало новым видам, стабильно передающим Т-ДНК своим потомкам. В геномах природно-трансгенных растений Т-ДНК получила название клеточной (клТ-ДНК) (White et al., 1983). У табака последовательности клТ-ДНК охарактеризованы наиболее детально: обнаружено, что у представителей разных видов клеточные Т-ДНК различаются по составу и количеству интегрированных в геном фрагментов, кроме того, показано, что гены клТ-ДНК экспрессируются (Meyer et al., 1995; Nagata et al., 1996; Intrieri, Buiatti, 2001; Chen, Otten, 2017). Экспрессия всех генов клТ-ДНК отмечена также у багата (Kyndt et al., 2015). Только у льнянок экспрессия генов клТ-ДНК до сих пор не выявлена. Однако результаты сравнения нуклеотидных последовательностей клТ-ДНК у *L. vulgaris* Mill., *L. acutiloba* Fisch. ex Rchb. и *L. genistifolia* (L.) Mill. свидетельствуют о том, что наиболее консервативным геном с ненарушенной ОРС является *rolC* (Matveeva, Lutova, 2014). *L. vulgaris* и *L. acutiloba* относятся к секции *Linaria*, *L. genistifolia* – к секции *Speciosae*, *L. acutiloba* иногда рассматривают как подвид *L. vulgaris* (www.plantarium.ru). Поскольку все указанные виды содержат Т-ДНК, а сайт ее локализации в геноме у них совпадает, то был сделан вывод о монофилетическом происхождении секций, к которым относятся данные виды. Соответственно, предполагают, что и другие виды секций *Linaria* и *Speciosae* содержат клТ-ДНК (Matveeva, Lutova, 2014). В настоящей работе мы изучили экспрессию гена *rolC* у нескольких видов льнянок *in vitro*. В качестве объектов исследования были выбраны *L. vulgaris* и *L. genistifolia*; поскольку у них охарактеризована последовательность клТ-ДНК, они относятся к разным секциям, характеризуются наиболее широкими ареалами (www.plantarium.ru). Кроме того, мы использовали в работе вид, произрастающий на крайне бедных почвах меловых холмов Белгородской, Воронежской и Ростовской областей, – *L. cretica*. Выбор этих видов был не случаен. Мы исходили из того, что если привнесенные трансгены придавали растениям селективное преимущество, то это могло привести к широкому распространению природно-трансгенных форм или их адаптации к каким-либо экстремальным условиям. В качестве контрольного не содержащего клТ-ДНК вида использовали *L. maroccana* Hook (Matveeva et al., 2012). У данного вида не выявлено методами ПЦР и РВ-ПЦР ни одного из описанных у *L. vulgaris* генов клТ-ДНК.

До настоящего времени нет окончательной ясности относительно функций гена *rolC*. Предполагают его влияние на содержание цитокининов в клетке, углеводный обмен и вторичный метаболизм (Matveeva, Sokornova, 2017). Поскольку цитокинины контролируют программу побегообразования, в данном исследовании мы тести-

ровали способность к побегообразованию у эксплантов льнянок *in vitro* и оценивали экспрессию гена в побегах, а также эксплантах, склонных к побегообразованию.

Материалы и методы

Семена льнянок собирали в природных популяциях: *L. vulgaris* – в Ленинградской области (Старый Петергоф), *L. ceticola* – в Белгородской области вблизи пос. Чернянка, *L. genistifolia* – на Дунайской равнине у г. Лом. Семена *L. maroccana* сорта Калейдоскоп (ГК «Русский Огород-НК», Щелково, Московская область, Россия) приобретены в розничной торговле.

Семена обрабатывали в течение 5 мин 30 % раствором перекиси водорода и высевали на питательную среду Мурашига–Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) без гормонов для прорастивания. Культивирование проводили при постоянном освещении. Растения поддерживали и размножали в асептической культуре черенкованием. Для изучения различных морфогенетических реакций экспланты междоузлий и корней помещали на среду МС без гормонов (МС0) и МС с добавлением гормонов БАП (бензиламинопурина) и/или НУК (нафтилуксусная кислота) в различных концентрациях. Учеты проводили через месяц после эксплантации. ДНК из растений выделяли ЦТАБ-методом (Дрейпер и др., 1991).

ПЦР на матрице геномной ДНК проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1 мкл ДНК 10 мкл DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), по 10 пмоль каждого праймера, под минеральным маслом в амплификаторе Терцик («ДНК-Технология», Москва, Россия) по программе: 5 мин – 95 °С, далее 35 циклов (95 °С – 15 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 30 с), финальная элонгация 5 мин при 72 °С. Последовательности всех использованных праймеров приведены в таблице. Праймеры синтезированы ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в агарозном геле на 1-кратном буфере ТБЭ. Фрагменты визуализировали на трансиллюминаторе Vilber Lourmat при длине волны 254 нм.

Секвенирование фрагментов ДНК осуществляли при помощи набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) по прилагаемому к нему протоколу. Разделение и анализ фрагментов сиквеновой смеси проводили на приборе AbiPrism 3500 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США).

РНК в каждом варианте опыта выделяли из смеси, содержащей материал не менее пяти эксплантов, при помощи набора лабораторных реагентов для выделения РНК из растений RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Дюссельдорф, Германия) по прилагаемому к нему протоколу.

Обратную транскрипцию ставили в объеме 20 мкл при помощи набора реагентов для синтеза первой цепи кДНК Maxima™ H Minus, (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) по прилагаемому к нему протоколу.

ПЦР в реальном времени проводили в объеме 20 мкл, содержащем 1 мкл кДНК, 10 мкл смеси Luminaris™ Color HiGreen Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) и по 10 пмоль праймеров по программе: 5 мин – 95 °С, далее 40 циклов (95 °С – 18 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с) в амплификаторе АНК32 (ЗАО «Синтол», Москва,

Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность	Назначение
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Аmplификация фрагмента для видоидентификации
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
rolCF	CTGGATACAA GCCACATGTT	Аmplификация полноразмерного гена
rolCR	ACTCGTCAGCCCATCGACTA	
Re-rolCF	GACGTGACATGCAGCGATGA	Оценка экспрессии
Re-rolCR	GAATGAGCAGATGGAGCTAAC	
gapdhF	ACTGGTGTCTTCACTGACAAGG	Референсный ген, кодирующий глицеральдегидфосфатдегидрогеназу
gapdhR	TGACACCCACAACAAACATCGG	

Россия). Количество повторностей было не менее трех. Относительную экспрессию оценивали методом $\Delta\Delta Ct$ (Livak, Schmittgen, 2001). В качестве референсного гена использовали ген глицеральдегидфосфатдегидрогеназы *gapdh*.

В экспериментах по культивированию льнянок *in vitro* вычисляли процентное содержание эксплантов с различными типами морфогенетических реакций и его ошибку. Абсолютные частоты эксплантов с различными морфогенетическими реакциями сравнивали между собой с использованием критерия хи-квадрат (Терентьев, Ростова, 1977). Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программы MEGA 7.0.21 (Kumar et al., 2016).

Результаты и обсуждение

После проращивания семян для подтверждения видовой принадлежности растений *L. cretica*, *L. genistifolia* и *L. maroccana* проведено секвенирование фрагментов, содержащих их ITS1, ген 5.8S РНК, ITS2. Последовательности этого участка ДНК у *L. maroccana* и *L. genistifolia* идентичны последовательностям JX481097.1 и KT031859.1 (NCBI) соответственно. Последовательность анализируемого фрагмента *L. cretica* совпала на 99 % с сиквенсом JX481143.1 того же вида. Отличия были связаны с присутствием в референсном сиквенсе значительного количества неоднозначных прочтений нуклеотидов, поэтому мы депонировали полученную нами более точную последовательность в базу под номером KY611806.

Поскольку у *L. cretica* клТ-ДНК ранее не была охарактеризована, мы амплифицировали и секвенировали ген *rolC* из этого вида. В результате работы выявлено два варианта последовательности, которые депонированы в базу NCBI под номерами MF997051 и MF997052.

В результате сравнения сиквенсов показано, что оба гомолога могут кодировать полноразмерные пептиды, что подтверждает ранее высказанную идею о консервативности и возможной функциональности *rolC* у льнянок. Результаты сравнения полученных сиквенсов с известными последовательностями *rolC* льнянок свидетельствуют в пользу того, что установленные последовательности являются аллельными вариантами, более близкими к *rolC* правого плеча клТ-ДНК *L. vulgaris* (рис. 1).

В культуре *in vitro* при размножении черенкованием на среде МС0 побеги всех исследуемых видов легко увели-

чивали биомассу, достаточно быстро образовывали придаточные корни. Так, при помещении на среды фрагментов стеблей, содержащих по одному узлу, из пазушных почек развивались побеги, которые за месяц достигали высоты 5–7 см и начинали укореняться. Однако морфология побегов у разных видов различалась. *L. maroccana*, *L. vulgaris* и *L. genistifolia* формировали одиночные побеги нормального фенотипа, в то время как *L. cretica* образовывала огромное количество тонких сильно ветвящихся побегов с мелкими листьями (рис. 2, а).

Для оценки экспрессии гомологов *rolC* были использованы побеги льнянок. Поскольку уже показано (Matveeva, Sokolova, 2017), что экспрессия многих генов клТ-ДНК у табака наблюдается в каллусах, мы индуцировали каллусогенез из эксплантов междоузлий льнянок на средах с БАП и НУК. В первом варианте среды оба гормона использовали в концентрации 0.1 мг/л, а во втором – 0.4 мг/л. На обоих вариантах сред все исследованные виды льнянок образовывали каллусы с эффективностью, близкой к 100 %, но морфогенетические процессы у видов сильно различались (см. рис. 2, б). Каллусы *L. cretica* были покрыты многочисленными побегами. Экспланты *L. vulgaris* образовывали единичные побеги нормальной морфологии. Количество эксплантов с побегами у *L. cretica* было достоверно выше на обоих вариантах среды по сравнению с *L. vulgaris*. Отмечена тенденция более интенсивного побегообразования на среде с более низким содержанием гормонов. Каллусы *L. genistifolia* отличались от других тем, что были ярко-зеленого цвета. Регенерации побегов из каллусов *L. genistifolia* и *L. maroccana* не наблюдали. Эти данные иллюстрируют роль генотипа растения в регуляции регенерационных процессов (Лутова и др., 1994). Взаимосвязи между интенсивностью побегообразования и наличием в геноме Т-ДНК не выявлено. РНК выделили из каллусов, полученных на среде с содержанием 0.1 мг/л БАП и НУК.

Методом ОТ-ПЦР на матрице РНК, полученной из побегов и каллусов Т-ДНК-содержащих льнянок, выявлено, что ген экспрессируется в побегах *L. vulgaris* и *L. cretica*, а также в каллусах *L. vulgaris*. Относительная интенсивность экспрессии гена представлена на рис. 2, в. Во всех случаях интенсивность экспрессии была ниже, чем у референсного гена. Экспрессии гена у *L. genistifolia* в условиях данного эксперимента не выявлено. Таким образом, привнесенная в растения клТ-ДНК вписывается в систему

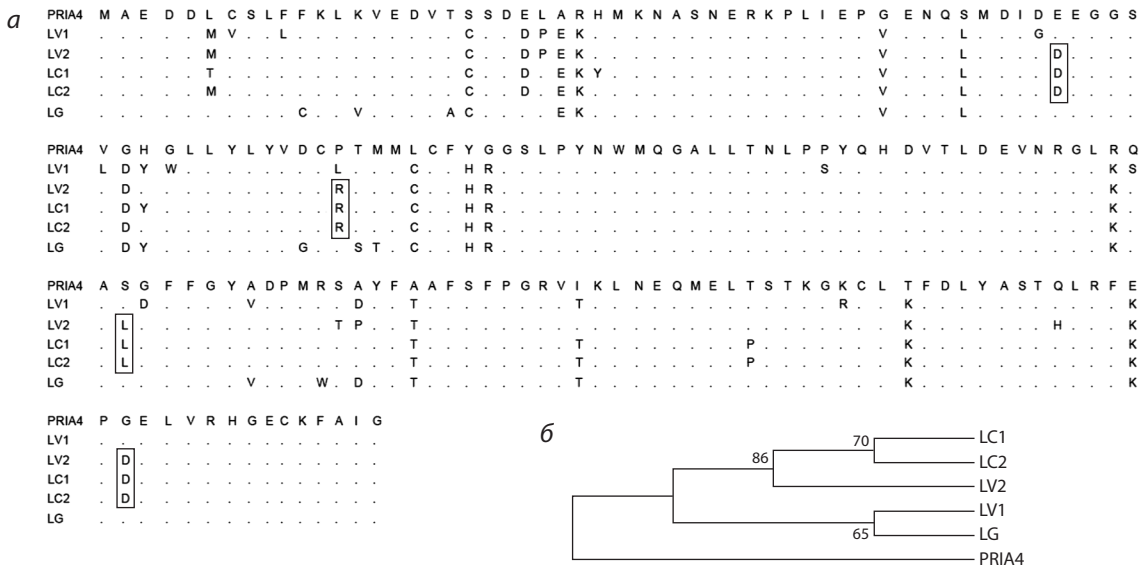


Рис. 1. Результаты сравнения аминокислотных последовательностей RoIC *A. rhizogenes* штамма A4 (PRIA4), левого и правого плеча клТ-ДНК *L. vulgaris* (LV1 и LV2 соответственно), *L. genistifolia* (LG) и *L. cretica* (LC1 и LC2).

а – выравнивание аминокислотных последовательностей (в рамках – аминокислоты, совпадающие у LV2, LC1 и LC2 и отличающие их от других последовательностей); **б** – филогенетическое древо, построенное с применением метода максимального правдоподобия. Консенсусное древо построено на основе 500 реплик бутстрэпа. Начальное древо для эвристического поиска получено автоматически, с применением алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием модели JTT, и последующим выбором топологии древа с более высоким значением логарифма правдоподобия.

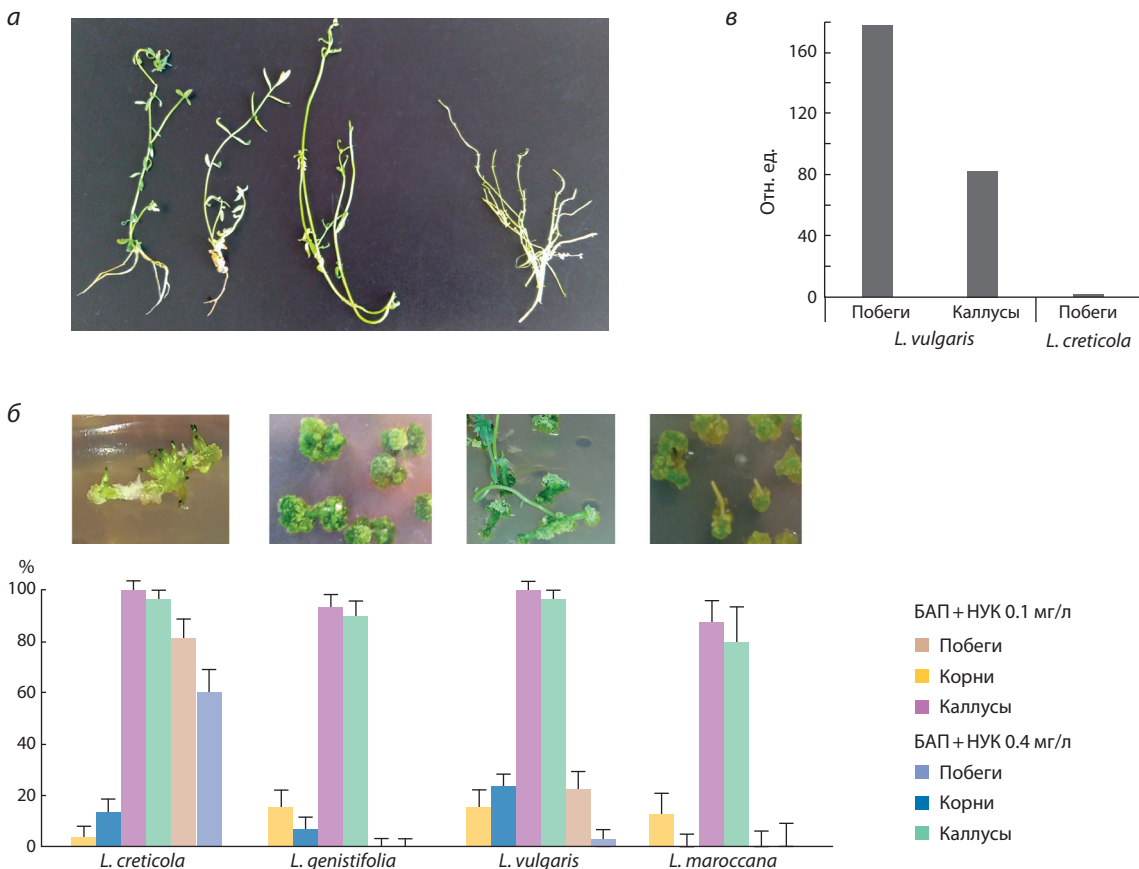


Рис. 2. Морфогенетические особенности различных видов льнянок *in vitro*.

а – общий вид побегов слева направо: *L. genistifolia*, *L. vulgaris*, *L. maroccana* и *L. cretica*; **б** – процентное содержание эксплантов междоузлий с различными морфогенетическими реакциями при культивировании на средах с БАП и НУК. Над диаграммой показан типичный эксплант каждого вида; **в** – относительная экспрессия гена *roIC* у льнянок.

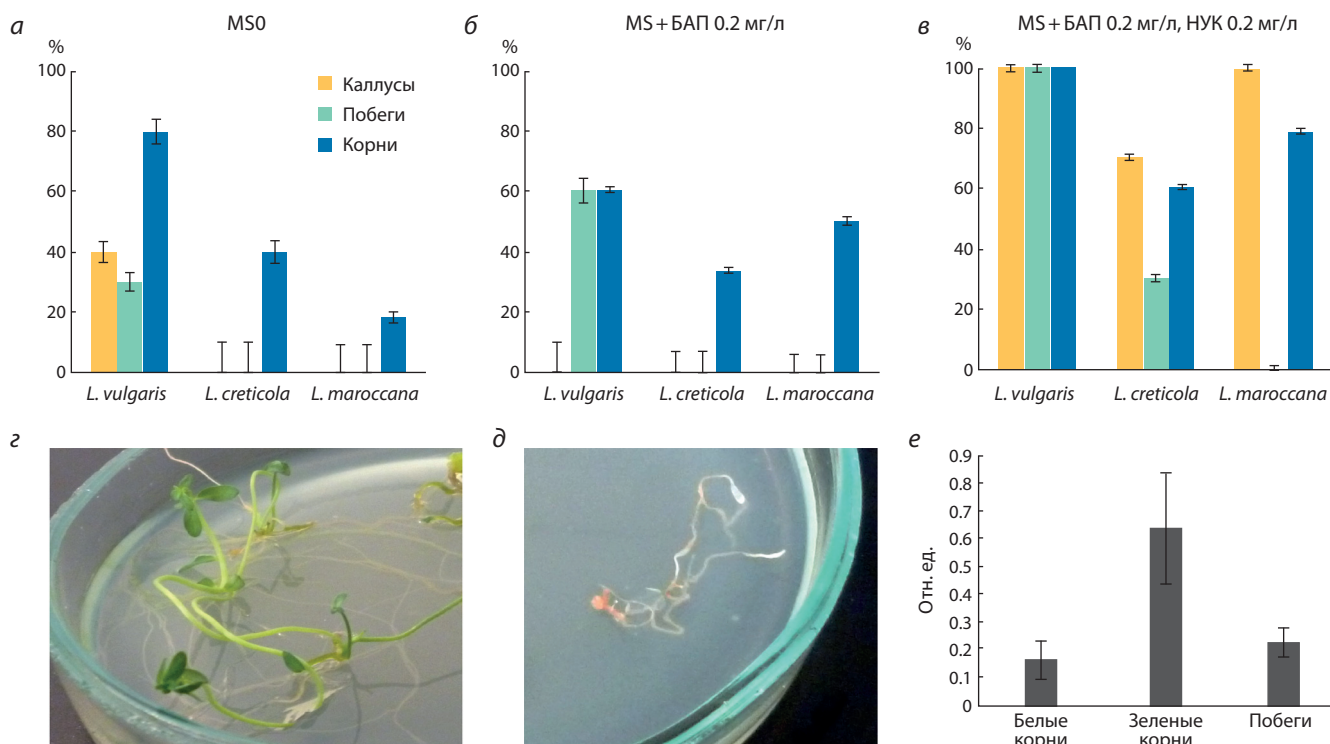


Рис. 3. Разнообразие морфогенетических реакций при культивировании эксплантов корней льнянок на различных средах.

a–в – количественные характеристики регенерационных процессов в процентах (состав сред указан на рисунках); *z* – типичный эксплант, образующий побеги; *д* – типичный эксплант, образующий только боковые корни на среде MSO; *е* – относительная экспрессия *rolC* в корнях и регенерировавших из них побегах *L. vulgaris*.

каждого генотипа, не нарушая морфологической целостности растений. Возможно, она специфически влияет на другие признаки, но не на интенсивность побегообразования и регенерацию побегов из стеблевых эксплантов.

Дальнейшее внимание мы сконцентрировали на *L. vulgaris* и *L. cretica*, поскольку именно у них обнаружена экспрессия изучаемого гена. Эти два вида исследовали по способности регенерировать побеги из эксплантов корней *in vitro*. Контролем в данном эксперименте служил вид *L. maroccana*, не содержащий Т-ДНК. Как видно из диаграмм на рис. 3 (*a–в*), только *L. vulgaris* способна формировать побеги из корневых эксплантов на среде без гормонов (см. рис. 3, *a, z*). Экспланты двух других видов только образовывали боковые корни на этой среде (см. рис. 3, *a, д*). *L. maroccana* не образовывала побегов ни на одной из сред, а *L. cretica* формировала побеги из каллусной ткани, полученной на среде с ауксином НУК и цитокинином БАП.

Интересно отметить, что при культивировании на питательных средах на свету корневые экспланты *L. vulgaris* сначала приобретали зеленую окраску, а потом начинали регенерировать побеги и/или образовывать каллусы. Боковые корни, образованные на эксплантах, сначала имели белую окраску, а потом тоже зеленели и образовывали каллусы и побеги, что, по всей видимости, – проявление способности льнянки обыкновенной вегетативно размножаться корневыми отпрысками.

В корнях и регенерировавших из них побегах проведена оценка уровня экспрессии гена *rolC*. Результаты представ-

лены на рис. 3, *е*. Показано, что экспрессия повышается в зеленых корнях, т. е. усиление экспрессии наблюдается совместно с активацией регенерационных процессов в корневых эксплантах. Требуется дополнительное исследование, чтобы понять, как связана регенерация из корневых отпрысков с экспрессией гена *rolC* у *L. vulgaris*.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что у льнянок *L. cretica* есть гомолог гена *rolC*, способный кодировать полноразмерный пептид, ген *rolC* клТ-ДНК экспрессируется у льнянок. Сопоставляя наши предыдущие эксперименты с полученными результатами, можно предположить, что ген *rolC* экспрессируется в почках. Гипотеза связана с тем, что транскрипта не обнаружено в междоузлиях и листьях (Matveeva et al., 2012), но он выявлен в молодых побегах. В таком случае меньшее количество транскрипта *rolC* у *L. cretica* по сравнению с *L. vulgaris* может быть обусловлено в том числе и более низким соотношением биомассы почек по отношению к массе побега. Особый интерес вызывает способность *L. vulgaris* формировать побеги на корневых эксплантах, а также увеличение экспрессии гена *rolC* в ходе этого процесса. Обсуждая данные, можно предполагать, что широкое распространение *L. vulgaris* связано с ее высокой способностью к размножению корневыми отпрысками, в которую вносит свой вклад экспрессия гена *rolC* клТ-ДНК. Вместе с тем следует отметить, что уровень экспрессии *rolC* был сравнительно низким во всех тканях, где его удалось обнаружить. Аналогично у табака и батата гены клТ-ДНК экспрессируются на низком уровне (Kundt et al.,

2015; Chen, Otten, 2017). С этим, скорее всего, связано отсутствие каких-либо видимых морфологических отличий природно-трансгенных видов от других растений.

Заключение

В настоящей работе мы показали, что у *L. creticola* имеется гомолог гена *rolC*, способный кодировать полноразмерный пептид. Ген *rolC* экспрессируется в культуре растений *in vitro* в побегах, корнях и каллусах *L. vulgaris*, а также в побегах *L. creticola*. Таким образом, клТ-ДНК льнянок функциональна, а значит, ее закрепление в геномах могло играть эволюционную роль.

Благодарности

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» при поддержке РНФ (грант № 16-16-10010). Авторы благодарят проф. Л.А. Лутову за ценные советы и критические замечания при подготовке статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидидж Ф., Дьюри Г., Джекоб Л., Уолден Р., Кумар А., Джефферсон Р., Хэмил Дж. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армидиджа, Р. Уолдена. М.: Мир, 1991.

Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С., Левашина Е.А., Тиходеев О.Н., Ходжайова Л.Т., Шарова Н.В., Шишкова С.О. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы. Генетика. 1994;30:1065-1074.

Терентьев П.В., Ростова Н.С. Практикум по биометрии. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1977.

Chen K., Dorlhac de Borne F., Szegedi E., Otten L. Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J.* 2014;80(4):669-682.

Chen K., Otten L. Natural agrobacterium transformants, recent results and some theoretical considerations. *Front. Plant Sci.* 2017. DOI 10.3389/fpls.2017.01600.

Furner I.J., Huffman G.A., Amasino R.M., Garfinkel D.J., Gordon M.P., Nester E.W. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature.* 1986;319(6052):422-427.

Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001;20:100-110. DOI 10.1006/mpev.2001.0927.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33:1870-1874. DOI 10.1093/molbev/msw054.

Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(18):5844-5849. DOI 10.1073/pnas.1419685112.

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.

Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A., Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012;25:1542-1551. DOI 10.1094/MPMI-07-12-0169-R.

Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Front. Plant. Sci.* 2014;5:326. DOI 10.3389/fpls.2014.00326.

Matveeva T.V., Sokornova S.V. Biological traits of naturally transgenic plants and their evolutionary roles. *Russ. J. Plant Physiol.* 2017;64: 635-648. DOI 10.1134/S1021443717050089.

Meyer A.D., Ichikawa T., Meins F. Horizontal gene transfer: regulated expression of tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. *Mol. Gen. Genet.* 1995;249:265-273. DOI 10.1007/BF00290526.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962;15:165-170.

Nagata N., Kosono S., Sekine M., Shinmyo A., Syono K. Different expression patterns of the promoters of the NgrolB and NgrolC genes during the development of tobacco genetic tumors. *Plant Cell Phys.* 1996;37:489-498. DOI 10.1093/oxfordjournals.pcp.a028971.

Vain P. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnol. J.* 2007;5:221-229. DOI 10.1111/j.1467-7652.2006.00225.x.

White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature.* 1983;301:348-350. www.plantarium.ru. Accessed on 1.09.2017.

www.isaaa.org. Accessed on 3.09.2017.