



БЕРЕЖНЕВА ЗОЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**РОЛЬ ГЕНОВ ЭКСПАНСИНОВ И
КСИЛОГЛЮКАНЭНДОТРАНСГЛИКОЗИЛАЗ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА
КОРНЕЙ ПРИ АБИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории геномики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук

Научный руководитель: **Кулуев Булат Разяпович**

доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**

доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук

Ермошин Александр Анатольевич

кандидат биологических наук, доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Ведущая организация:

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук (г. Владивосток)

Защита диссертации состоится 11 июня 2024 г. в 14:00 ч. на заседании диссертационного совета 24.2.479.01, созданного на базе ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий» по адресу: 450008, г. Уфа, ул. Карла Маркса, 12, корпус 1, e-mail: disbiobsu@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», адрес сайта: <http://www.uust.ru>

Автореферат разослан «___» апреля 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного
совета, к.б.н.



Григориади Анна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Абиотический стресс отрицательно влияет на рост, развитие и продуктивность сельскохозяйственных растений (Madhava Rao et al., 2006). Поэтому создание и использование стрессоустойчивых сортов растений имеет большое экономическое значение. Растения, подверженные различным абиотическим стресс-факторам, проявляют множественные морфофизиологические изменения, которые часто являются результатом реструктуризации клеточной стенки растительного организма. Первичная клеточная стенка растений построена на основе целлюлозы, связующих гликанов и пектина, сохраняет гомеостаз растительного организма и защищает его от неблагоприятных условий внешней среды (Cosgrove, 2000). Важную роль в регуляции жесткости клеточных стенок растений играют белки экспансины (EXPs) (Chen et al., 2018), которые разрыхляя клеточную стенку, непосредственно влияют на рост растений, процессы развития, а также реакцию на абиотические стресс-факторы (Cosgrove, 2005; Liu et al., 2019). EXPs – неферментативные белки, способствующие разрыву водородных связей между микрофибриллами целлюлозы и связующими гликанами клеточной стенки, приводящему к ее ослаблению, последующему поступлению воды в центральную вакуоль, что способствует росту клетки, органа и растения в целом (McQueen-Mason, Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2015).

Помимо EXPs в регуляции и обеспечении роста клеток растяжением участвует большое количество других генов, кодирующих ферменты, и наиболее важные из них, ксиланглюканэндотрансгликозилазы (XTHs) (Nishikubo et al., 2007), которые осуществляет реакцию трансгликозилирования ксиланглюканов, когда одна цепочка ксиланглюкана расщепляется и снова присоединяется к нередуцирующему концу другого ксиланглюкана (Smith, Fry, 1991). XTHs участвуют, к примеру, при удлинении гипокотилей, инициации роста корневых волосков и в большинстве других процессов, требующих реструктуризации клеточной стенки (Miedes et al., 2011). Связь между генетически детерминированными признаками роста корня и урожайностью сельскохозяйственных культур хорошо известна (Kell, 2011; Hufnagel et al., 2014; Narayanan et al., 2014), в особенности в условиях влияния абиотических стресс-факторов (Uga et al., 2013). Для

повышения урожайности сельскохозяйственных культур, а также улучшения их стрессоустойчивости представляет большой интерес исследование генетических детерминант корневой системы, которые могут быть использованы в качестве мишеней для генно-инженерных манипуляций (Pawlowski, Demchenko, 2012; Bao et al., 2014). Корневая система растений способна адаптироваться в ответ на изменения содержания влаги и количества питательных веществ в почвенных слоях, что позволяет оценивать природную пластичность корневой системы для выявления молекулярных механизмов, которые способствуют повышению урожайности и стрессоустойчивости (Lynch, 1995; Kano et al., 2011; Grossman, Rice, 2012). Устойчивость растений к влиянию различных абиотических стресс-факторов во многом так же определяется системами обезвреживания активных форм кислорода (АФК). Защита от вредного воздействия АФК связана с функционированием в клетках различных компонентов антиоксидантной системы (АОС), основу которой составляют как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные антиоксиданты (АО), роль которых в настоящее время лучше всего изучена в побеге (Полесская, 2007; Mittler et al., 2011; Pucciarrello et al., 2012). При этом исследований направленных на изучение компонентов АОС в корневой системе растительного организма значительно меньше, особенно в связке с компонентами клеточной стенки, такими как EXPs и XTHs, как при нормальных условиях, так и при влиянии различных абиотических стресс-факторов. Также представляет интерес выяснение механизмов повышения урожайности и стрессоустойчивости путем влияния на эти мишени в корнях. Имеются сведения о том, что повышенная экспрессия генов *EXPs* и *XTHs* ассоциирована с улучшением параметров роста корней (Ren et al., 2018, Zhang et al, 2022). Увеличенные размеры корней и повышение скорости роста, как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов могут способствовать повышению устойчивости растений к стрессам, вызывающим дефицит влаги, так как это будет способствовать достижению корнями глубоко залегающих водоносных слоев. Однако на сегодняшний день механизмы позитивного влияния *EXPs* и *XTHs* на рост корней и стрессоустойчивость растений остаются малоизученными. Так как сверхэкспрессия *EXPs* и *XTHs*

довольно часто способствует повышению устойчивости к абиотическим стресс-факторам, интересно выяснить, как при этом меняется состояние антиоксидантной системы растений в корнях. Все это позволит приблизиться к пониманию функций генов *EXPs* и *XTHs* в регуляции и обеспечении роста корней и стрессоустойчивости растений.

Цель работы: определить вклад генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляцию и обеспечение роста, стрессоустойчивости и оценить их влияние на компоненты антиоксидантной системы корней трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. при воздействии абиотических стресс-факторов.

Задачи:

1) Отобрать линии трансгенных растений табака с высоким содержанием транскриптов генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корнях и провести их морфометрический анализ при нормальных условиях и при действии абиотических стресс-факторов;

2) на основе данных по морфометрическому анализу трансгенных растений табака, отобрать наиболее перспективные линии, имеющие существенное увеличение размеров корней в условиях стресса, и оценить размер паренхимных клеток корней;

3) оценить состояние компонентов антиоксидантной системы и содержание белка в корнях трансгенных растениях табака, сверхэкспрессирующих гены экспансинов, при нормальных условиях и при кадмиевом стрессе;

4) оценить состояние компонентов антиоксидантной системы и содержание белка в корнях трансгенных растениях табака, сверхэкспрессирующих гены ксилоглюканэндотрансгликозилаз, при нормальных условиях и при кадмиевом стрессе.

Положения, выносимые на защиту:

1. Трансгенные растения табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз имеют улучшенные параметры роста корней по сравнению с растениями дикого типа, как при нормальных условиях, так и при воздействии абиотических стресс-факторов.

2. Сверхэкспрессия генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз способствует повышению устойчивости растений к кадмию.

3. Сверхэкспрессия генов экспансинов в корнях способствует увеличению общей антиоксидантной способности, активности глутатион-S-трансферазы и аскорбатпероксидазы в условиях кадмиевого стресса.

4. Сверхэкспрессия генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корнях способствует увеличению общей антиоксидантной способности и активности аскорбатпероксидазы в условиях кадмиевого стресса.

Научная новизна. Впервые проведены комплексные исследования влияния сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs* на рост корней при действии абиотических стресс-факторов и на различные компоненты антиоксидантной системы. В экспериментах с корнями трансгенных растений табака доказано, что при сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs* происходит увеличение размеров клеток, как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов. Также в ходе экспериментов у трансгенных растений выявлены изменения в антиоксидантной системе: повышение общей антиоксидантной способности, пероксидазной активности, количества глутатиона как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов.

Достоверность научных положений, рекомендаций и выводов подтверждена использованием современных методов физиологии и биохимии растений. Для интерпретации результатов, полученных в ходе проведенных экспериментов, была проанализирована литература по теме диссертационного исследования. Полученные результаты согласуются с уже имеющимися данными из отечественной и зарубежной литературы. При анализе данных проводился статистический анализ, полученных в ходе экспериментов результатов. Для сравнения результатов достоверных различий между диким типом и трансгенными линиями в опытах по морфометрии и микроскопии, а также в опытах по оценке достоверных изменений показателей компонентов антиоксидантной системы использовался статистический анализ по тестам Duncan в программе Statistica 10.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были доложены на научных конференциях: Всероссийская научная конференция «Актуальные вопросы фундаментальной и экспериментальной биологии» 27-28 апреля 2016 года, Уфа; VI Всероссийский симпозиум «ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», 16-21 ноября 2016 года, Москва; I Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Молекулярная биотехнология» 28-30 марта 2017 года, Москва; конференция «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 года, Крым, Судак; XVIII Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии», 19-20 апреля 2018 года, Москва; Международная научная конференция PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», 13-17 июня 2018 года, Уфа; Всероссийская научно-практическая конференция «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» 22–23 июня 2022 года, Санкт-Петербург; 3-я Международная научная конференция PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», 3-8 октября 2022 года, Санкт-Петербург; 22-я Всероссийская конференция молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», 7-9 ноября 2022 года, Москва; Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 60-летию Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства», 30 ноября – 1 декабря 2022 года, Уфа; VI Всероссийская научная конференция с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды», 3–7 июля 2023 года, Иркутск – Большое Голоустное; X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата», 18-23 сентября 2023 года, Уфа.

Теоретическая и практическая значимость. Знания о взаимодействии генов, продукты которых участвуют в регуляции и обеспечении роста растительных организмов, а также данные об

особенностях их сигналинга и регуляции экспрессии могут способствовать разработке стратегии создания хозяйственно-ценных растений с увеличенной корневой системой, способных продолжать рост при действии стрессовых факторов, таких как засоление, гипотермия и загрязнение кадмием. Исследованные гены и их ортологи могут быть использованы в качестве мишени для генно-инженерных манипуляций с целью создания высокоурожайных и стрессоустойчивых сельскохозяйственных культур. Показана взаимосвязь белков клеточной стенки с компонентами антиоксидантной системы, что поднимает новые вопросы о вероятных молекулярных механизмах такого взаимодействия. Испытанные в работе трансгенные растения табака могут быть предложены в качестве модельных для исследований функций экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. Результаты исследования доказывают перспективность применения полученных ранее генно-инженерных конструкций с генами *EXPs* и *XTHs* для создания трансгенных растений с улучшенным ростом корней и повышенной стрессоустойчивостью.

Личный вклад автора в проведенные исследования. Направление исследований в диссертационной работе, цели и задачи определены совместно с научным руководителем. Автором самостоятельно изучена литература по теме диссертационной работы, а также написана рукопись диссертации. Автором самостоятельно выполнены эксперименты по оценке содержания транскриптов изучаемых генов, по морфометрии корней, по микроскопии и по оценке антиоксидантной системы корней трансгенных растений табака с экспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз. Автором самостоятельно проведена статистическая обработка. Также автор сама готовила материалы для публикаций по теме диссертационной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Работа выполнена по специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки). Определено содержание транскриптов генов *EXPs* и *XTHs* в корнях растений табака, трансгенных по данным генам (соответствует пункту «Геном растений, регуляция экспрессии генома; транскрипция, трансляция, пост-транскрипционные и

посттрансляционные механизмы»). Также в экспериментах показаны результаты прироста корневой системы трансгенных растений табака со сверхэкспрессией изучаемых генов при нормальных условиях (соответствует пункту «Онтогенетические программы роста и морфогенеза растений, включая эмбриогенез, вегетативный рост, генеративное развитие, плодоношение и старение»). Изучено влияние абиотических стресс-факторов, таких как засоление, гипотермия и воздействие кадмия на морфофизиологические и биохимические показатели роста, стрессоустойчивости и на компоненты антиоксидантной системы корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* и при сравнении с показателями при нормальных условиях (соответствует пункту «Экологическая физиология растений. Растение и стресс. Адаптация и устойчивость растений к абиогенным и биогенным факторам внешней среды»). В результате экспериментов показано, что сверхэкспрессия генов *EXPs* и *XTHs* в корнях трансгенных растений способствует росту паренхимных клеток (соответствует пункту «Вторичный метаболизм растений, структура и биосинтез клеточной стенки»). Также показано и обсуждено влияние сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs* на компоненты антиоксидантной системы корней трансгенных растений при нормальных условиях и при кадмиевом стрессе (соответствует пункту «Генная инженерия растений, физиология трансгенных растений. Получение хозяйственно-ценных генотипов»).

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения и выводов, библиографического списка и списка сокращений. Работа изложена на 167 страницах и содержит 4 таблицы, 33 рисунка. Список литературы включает 322 источника, среди них 94 – отечественных, 228 – зарубежных.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликована 21 печатная работа, из них 5 статей в журналах Web of Science.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н. Кулуеву Б.Р. за помощь в формулировании цели и задач диссертационного исследования, интерпретации и обсуждении

полученных результатов, а также в подготовке публикаций по теме диссертации и рукописи работы, к.с.-х.н. Князеву А.В. за помощь в создании трансгенных растений, используемых для последующих экспериментов по теме работы, к.б.н. Мусину Х.Г. за помощь в освоении ряда биохимических методов анализа корней исследуемых растений и последующих статистических расчетов, а также руководству Института биохимии и генетики УФИЦ РАН за предоставление ресурсов для проведения экспериментов по теме диссертационной работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования служили трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 со сверхэкспрессией генов экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* (клонированы из *N. tabacum*), *PnEXPA3* (клонирован из *Populus nigra* L.), *AtEXPA10* (клонирован из *Arabidopsis thaliana* L.) и со сверхэкспрессией ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT* (клонирован из *N. tabacum*), *PtrXTH1* (клонирован из *Populus tremula* L.) (Кулуев и др., 2013; 2014; 2017; 2018). Во всех растениях экспрессия трансгена находится под контролем конститутивного 35S CaMV промотора. Все трансгенные растения табака, использованные в работе, получены ранее в ИБГ УФИЦ РАН д.б.н. Кулуевым Б.Р. и к.с.-х.н. Князевым А.В. при участии диссертантки Бережневой З.А. В качестве контроля использовали растения табака сорта Petit Havana линии SR1, которые согласно устоявшейся терминологии называли диким типом (ДТ).

Трансгенные растения проращивали в камерах роста Binder (Германия) при температуре +25 °С, освещенности около 140 мкМ на кв. м в сек и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС и по прошествии 10 дней определяли прирост корней (изменение длины) при норме (контроль), действии 50 и 100 мМ NaCl, при действии 100, 200 и 400 мкМ ацетата кадмия, а также гипотермии +12 °С. В ходе последующего морфометрического анализа проводили измерение прироста корней за 10 дней. Результаты оценки представляли в виде арифметических средних показателей с планками погрешностей в виде стандартной ошибки.

Статистическое различие данных показателей анализировали с применением теста Duncan (1955) для независимых выборок. Для микроскопического анализа корни табака фиксировали в 4% формалине на фосфатном буфере. Далее их переносили в смесь глицерина и диметилсульфоксида, перекладывали в «просветляющий раствор» (Филин, Иванов, 2016). Размеры клеток корней изучали в вариантах: контроль, 50 мМ NaCl и 200 мкМ CdAc. Для измерений размеров паренхимных клеток корней использовали флуоресцентный микроскоп Biozero BZ-8100. Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) использовали метод, в котором учитывается то, насколько данный фермент может подавить реакцию восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) (Giannopolitis, Ries, 1977; Полеская и др., 2004). Активность каталазы (КАТ) определяли по скорости деградации молекул перекиси водорода (Panchuk et al., 2002). Активность гваяколпероксидазы (ГПОК) определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола (Ermakov et al., 1987). Активность аскорбатпероксидазы (АПОК) определялась по методу Verma и Dubey (2003). Активность фермента глутатион-S-трансферазы (GST) определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов, образовавшихся между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДБН) (Habig et al., 1974). Количество окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона определяли по методике Шальго с соавторами (2007). Метод определения пролина был основан на работе Bates (1973) с модификациями от Khedr (2003). Содержание водорастворимых сахаров (ВРС) определяли по методике, описанной Dubois (1956). Общую антиоксидантную способность (ОАС) оценивали по методу, описанному Boestfleisch (2014). Содержание общего растворимого белка определяли по методу Брэдфорд (1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ содержания транскриптов генов *EXPs* и *XTHs* в корнях трансгенных растений табака

В полученных ранее в ИБГ УФИЦ РАН трансгенных растениях табака проводился анализ содержания транскриптов целевых генов только в листьях. Так как объектом диссертационного исследования являются корни, была поставлена задача определить уровень экспрессии

изучаемых трансгенов как в листьях, так и в корнях. Была проведена оценка содержания транскриптов исследуемых генов на трансгенных растениях, выращенных при нормальных условиях. Содержание транскриптов оценивалось отдельно в листьях и корнях трансгенных растений с исследуемыми генами. По результатам оценки содержания транскриптов генов было выяснено, что не во всех трансгенных линиях, в которых содержание транскриптов генов *EXPs* и *XTHs* было высоким в листьях, оно проявлялось и в корнях (рис. 1).

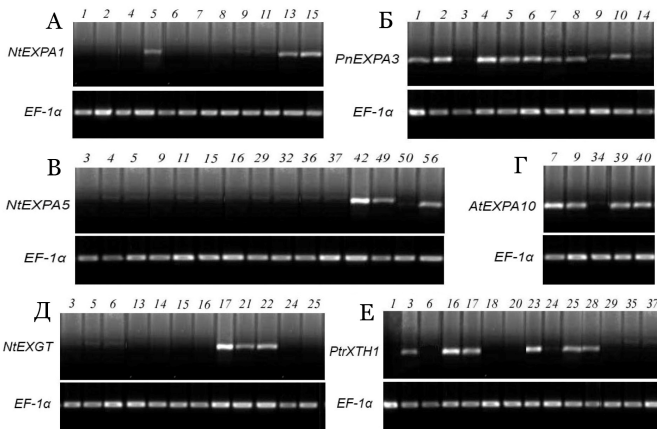


Рисунок 1. Электрофоретические спектры ПЦР-продуктов при анализе содержания транскриптов генов *EXPs*: *NiEXPA1* (А), *NiEXPA5* (В), *PnEXPA3* (Б), *AtEXPA10* (Г) и *XTHs*: *NiEXGT* (Д), *PtrXTH1* (Е) в корнях трансгенных растений табака полуколичественным методом. *EF-1α* – референсный ген.

Таким образом, выявлено, что только часть линий трансгенных растений имело повышенное содержание транскриптов исследуемых генов в корнях и данные линии были в дальнейшем использованы для получения проростков второго поколения (T_2) для последующих экспериментов по морфометрии, микроскопии и оценке компонентов антиоксидантной системы в корневой системе.

2. Морфометрический анализ корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* при нормальных условиях и при действии абиотических стресс-факторов

При изучении роста корней довольно часто используют почвенные условия, что создает ряд неудобств. В первую очередь это связано с невозможностью постоянного наблюдения за ростом корня. Поэтому для

оценки морфометрии корневой системы был применен подход с использованием вертикально-ориентированных чашек Петри с агаризованной средой МС, который является относительно легким в исполнении, сохраняет стерильность растений и позволяет визуально наблюдать за ростом корней. При измерении длины корней осуществлялся замер корней до начала эксперимента и после завершения эксперимента и оценивался прирост корней.

При выращивании на твердой питательной среде МС в нормальных условиях трансгенные растения со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* (рис. 2А) и *NtEXPA5* (рис. 2Д) характеризовались более высокими темпами роста корней по сравнению с диким типом (ДТ). У трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *AtEXPA10* достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ не наблюдалось (рис. 2Б). Увеличение длины корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PnEXPA3* при нормальных условиях по сравнению с ДТ было выявлено у линий 2, 4, 5, 6 и 8 (рис. 2Г). У трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ было выявлено только у линии 17 (рис. 2Е), а у растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ было выявлено у линий 3, 17 и 25 (рис. 2В).

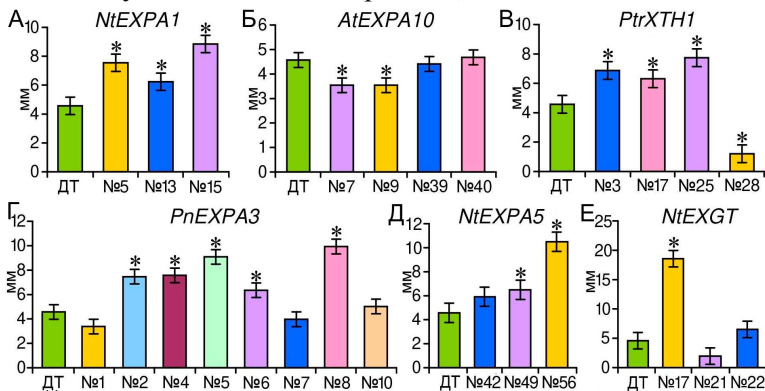


Рисунок 2. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях. n = 14. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Засоление почв является одним из самых распространенных загрязнений, которое отрицательно сказывается на росте и урожайности большинства сельскохозяйственных растений, а так как NaCl попадает непосредственно в почву и водные слои, то данный стресс-фактор оказывает свой отрицательный эффект напрямую на рост корневой системы растений. У трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXPA5* при выращивании на среде с добавлением 50 мМ NaCl улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линий 49 и 56 (рис. 3А). Улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линий 1, 2, 4, 5, 6 и 10 трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PnEXPA3* (рис. 3Б). При выращивании на среде с добавлением 50 мМ NaCl улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней трансгенных растений с геном *AtEXPA10* были обнаружены у линий 7, 9 и 39 (рис. 3В). При действии 100 мМ NaCl более быстрыми темпами роста корней, чем у ДТ характеризовались линии 21 и 22 трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* (рис. 3Г) и линии 3, 17 и 25 у растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* (рис. 3Д). Часть линий трансгенных растений со сверхэкспрессией изучаемых генов не показали по сравнению с ДТ достоверного улучшения роста корней при влиянии различных концентраций засоления, поэтому в автореферате не представлены.

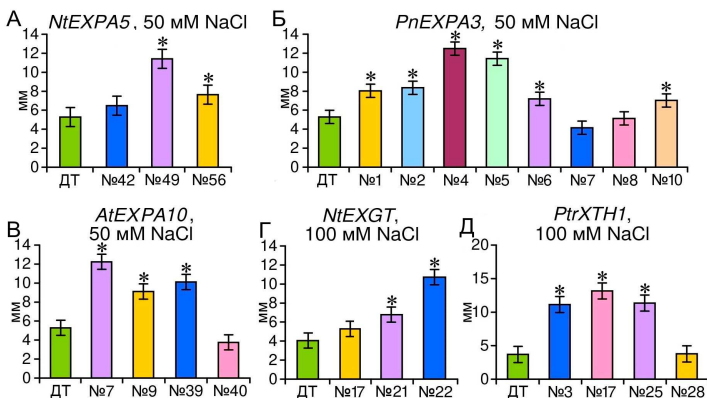


Рисунок 3. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA5* (А), *PnEXPA3* (Б), *AtEXPA10* (В) и *PtrXTH1* (Г) при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при различных концентрациях NaCl. n = 14. Звездочками (*)

обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Таким образом, можно сделать вывод, что сверхэкспрессия генов *EXPs* и *XTHs* способствует улучшению роста корней при засолении, что говорит о большей стрессоустойчивости трансгенных растений по сравнению с диким типом.

Способность корневой системы расти в условиях гипотермии (низкие положительные температуры) является важным признаком для сельскохозяйственных растений, особенно в условиях России. Был оценен прирост корней у всех анализируемых трансгенных растений табака при действии гипотермии (+12 °C). Было показано, что при действии такой низкой положительной температуры прирост корней замедлился и уменьшился в два раза у растений дикого типа и у большинства линий трансгенных растений (на рис. 4А приведен пример растений *35S::NtEXPA5*), но кроме трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* (рис. 4Б).

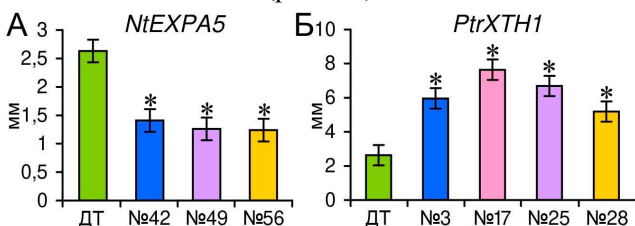


Рисунок 4. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA5* (А) и *PtrXTH1* (Б) при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при влиянии гипотермии (+12 °C). n = 14. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Гипотермия (+12 °C) оказывала негативный эффект на рост корней всех анализируемых растений табака, при этом сверхэкспрессия генов *EXPs* и *XTHs* чаще всего отрицательно сказывалась на росте корней при +12 °C. Исключением был лишь ген *PtrXTH1*, положительно повлиявший на устойчивость к гипотермии.

Кадмий и его соединения являются одними из самых токсичных и распространенных химических элементов, которые входят в список антропогенных загрязнителей почвы и оказывают существенное влияние на важнейшие физиологические и биохимические процессы жизни растительного организма. В рамках диссертационной работы были

проведены эксперименты по изучению прироста корней трансгенных растений табака при добавлении различных концентраций ацетата кадмия (CdAc) в среду МС. При выращивании трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* (рис. 5А), *AtEXPA10* (рис. 5Б), *NtEXGT* (рис. 5В) и *PtrXTH1* (рис 5Г) на среде с добавлением CdAc в концентрациях 200 и 400 мкМ все проанализированные линии трансгенных растений имели повышенные показатели роста корней по сравнению с ДТ. Остальные трансгенные растения (со сверхэкспрессией генов *NtEXPA5* и *PnEXPA3*) также показали больший, чем у ДТ, прирост корней у большинства линий при влиянии кадмия в концентрации 200 мкМ.

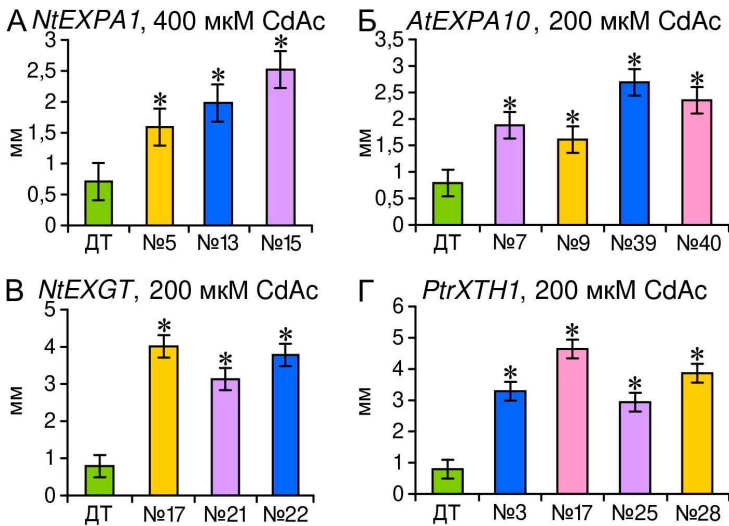


Рисунок 5. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *EXPs*: *NtEXPA1* (А), *AtEXPA10* (Б) и *XTHs*: *NtEXGT* (В), *PtrXTH1* (Г) при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при различных концентрациях CdAc. n = 14. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

В результате проведенных экспериментов было выяснено, что при нормальных условиях прирост корней трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* существенно выше прироста корней растений ДТ. Полученные нами данные доказывают участие продуктов генов *EXPs* и *XTHs* в обеспечении роста корней не только при нормальных условиях, но и при действии кадмиевого стресса и засоления. При этом исследованные гены, кроме *PtrXTH1*, оказывали

негативное влияние на рост корней при гипотермии. Это значит, что созданные нами генно-инженерные конструкции с генами *EXPs* и *XTHs* могут быть предложены для генетической трансформации сельхозкультур для повышения их устойчивости к засолению и кадмию. Результаты, полученные на трансгенных растениях табака подтверждают, что одна из функций продуктов генов *EXPs*, так и *XTHs* заключается в увеличении устойчивости растений к влиянию абиотических стресс-факторов, таких как засоление и воздействие кадмия. Таким образом, сверхэкспрессия каждого из изучаемых генов может позитивно влиять на улучшение роста корней трансгенных растений по сравнению с ДТ, но при разных абиотических стрессах (рис. 6).

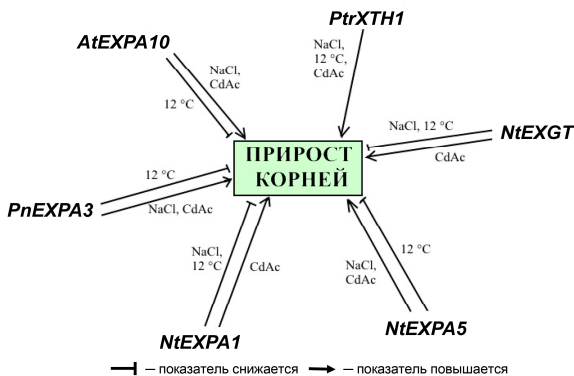


Рисунок 6. Общая схема влияния генов *EXPs* и *XTHs* на прирост корней трансгенных растений табака при действии различных абиотических стресс-факторов.

3. Микроскопический анализ корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* при нормальных условиях и действии абиотических стресс-факторов

На основе морфометрического анализа корней трансгенных растений было выявлено, что существенные различия между трансгенными растениями и ДТ наблюдаются при влиянии засоления в концентрации 50 мМ NaCl и воздействии CdAc в концентрации 200 мкМ, поэтому была поставлена задача определить размеры паренхимных клеток корней при действии этих стресс-факторов. Измерения клеток проводилась в зоне всасывания, т.к. именно в данной зоне паренхимные клетки достигли максимального размера, завершали рост, что в свою очередь является результатом функционирования *EXPs* и *XTHs*. При

нормальных условиях, засолении и действия кадмия форма клеток корней табака ДТ и трансгенных растений с генами *NtEXPA5*, *NtEXGT* и *PtrXTH1* была цилиндрическая вытянутая и визуальных изменений в толщине клеточных стенок не было, а у растений с геном *NtEXPA1* форма клеток при действии кадмия изменилась с цилиндрической на кубическую (рис. 7).

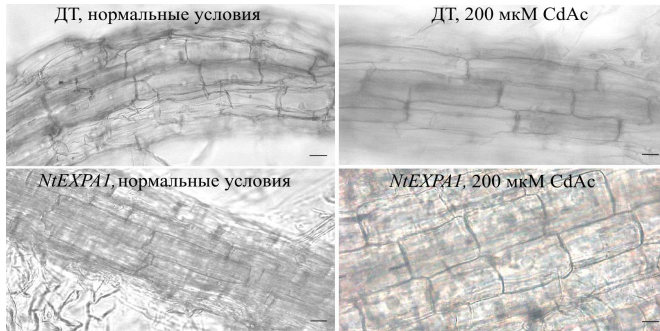


Рисунок 7. Форма клеток корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXPA1* при нормальных условиях и при влиянии CdAc в концентрации 200 мкМ. n = 150. Увеличение 160x. Масштаб: 50 мкм

Площадь клеток трансгенных растений при засолении существенно не изменяется при сравнении с ДТ. Однако, при действии кадмия площадь клеток трансгенных растений с генами *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *PtrXTH1* была больше по сравнению с ДТ (табл. 1).

Таблица 1 – Площадь клеток корней табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и при влиянии абиотических стресс-факторов, мкм²

Растения	Нормальные условия	50 мМ NaCl	200 мкМ CdAc
ДТ	2836.8±873.3	2669.3±1080.2	2959.5±755.2
35S:: <i>NtEXPA1</i>	2670.4±806.6	2774.5±750.4	3826.1±655.8*
35S:: <i>NtEXPA5</i>	2731.4±812.4	2641.2±695.7	3912.3±785.4*
35S:: <i>NtEXGT</i>	2227.3±693.2	2095.1±684.3	2283.5±675.8
35S:: <i>PtrXTH1</i>	2777.4±662.2	2537.2±677.2	3930.3±1077.7*

n = 150. *P ≤ 0.05

На основе результатов микроскопического анализа, можно предположить, что улучшение роста корней при действии кадмия происходило благодаря увеличению размеров их клеток. Схожие данные, показывающие увеличение размеров клеток корней были показаны на примере трансгенных растений с генами экспансинов *GmEXP1* (Lee et al., 2003) и *OsEXPA8* (Ma et al., 2013). Таким образом, сверхэкспрессия генов *EXPs* и *PtrXTH1* положительно влияет на рост корневых клеток посредством стимуляции растяжения в условиях кадмиевого стресса. Корни трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT*

также росли быстрее, чем корни ДТ, как при нормальных условиях, так и при кадмиевом стрессе, однако, именно у этих трансгенных растений корреляции роста корней и размеров их паренхимных клеток не наблюдалось и, возможно, ген *NtEXGT* в данном случае стимулировал не только растяжение клеток корня, но и способствовал увеличению их числа в результате деления.

Причина изменения формы клеток на кубическую в случае сверхэкспрессии гена *NtEXPA1* остается неизвестной. Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью программы String-db показывает связь гомолога этого гена из арабидопсиса *AtEXP24* с геном *WAC3*, который кодирует серин/треонин-протеинкиназу, ассоциированную с клеточной стенкой. Серин/треонин-протеинкиназа при связывании с пектином имеет большое значение при контроле клеточного растяжения, морфогенеза и развития, что может оказывать влияние на форму клеток корней.

4. Оценка состояния компонентов антиоксидантной системы и содержания белка в корнях табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* при нормальных условиях и при действии кадмия

В результате морфометрического анализа было выявлено, что большие различия в длине корней трансгенных растений табака по сравнению с ДТ наблюдаются при влиянии CdAc в концентрации 200 мкМ. Также микроскопические исследования показали, что размеры паренхимных клеток корней трансгенных растений табака были больше при влиянии 200 мкМ CdAc, чем при засолении. Поэтому дальнейшие исследования по оценке антиоксидантной системы корней было решено провести при влиянии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ.

При действии кадмия увеличение общей антиоксидантной способности (ОАС) было выявлено в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией исследуемых генов (рис. 8А). Активность каталазы (КАТ) при нормальных условиях и влиянии кадмия была выше в корнях трансгенных растений с генами *XTHs* по сравнению с ДТ (рис. 8Б). Активность аскорбатпероксидазы (АПОК) при нормальных условиях была выше в корнях большинства изучаемых трансгенных растений по сравнению с ДТ (рис. 8В). Активность гваяколпероксидазы (ГПОК) была

выше у трансгенных растений со сверхэкспрессией *NtEXPA5* и *NtEXGT* по сравнению с ДТ при нормальных условиях (рис. 8Г).

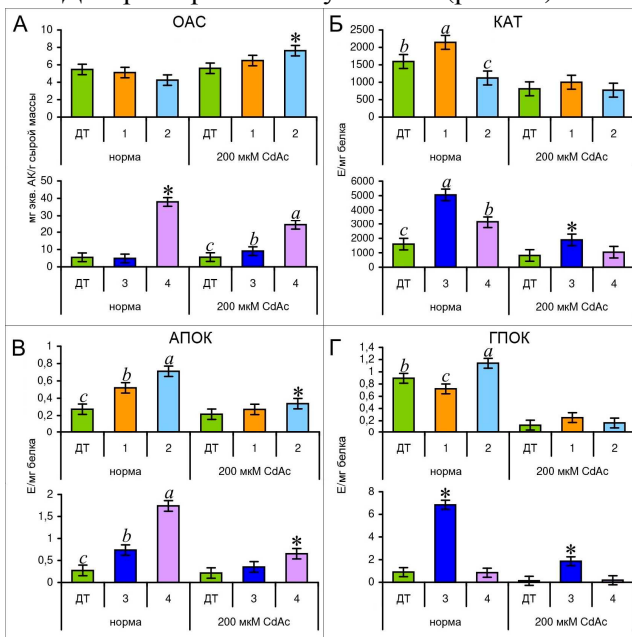


Рисунок 8. Общая антиоксидантная способность (А) и активность антиоксидантных ферментов: Б – каталазы, В – аскорбатпероксидазы, Г – гваяколпероксидазы в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc. 1 – трансгенные растения *35S::NtEXPA1*, 2 – трансгенные растения *35S::NtEXPA5*, 3 – трансгенные растения *35S::NtEXGT*, 4 – трансгенные растения *35S::PtrXTH1*. $n = 15$. Буквами и звездочками обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) была выше в корнях трансгенных растений с генами *EXPs* и *NtEXGT* по сравнению с ДТ при нормальных условиях и при влиянии кадмия (рис. 9А). В трансгенных растениях с генами *EXPs* содержание окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона было на уровне ДТ при нормальных условиях и ниже при влиянии кадмия. Содержание GSSG было существенно выше в корнях трансгенных растений с генами *XTHs* по сравнению с ДТ, как при нормальных условиях, так и при действии кадмия (рис. 9В), а содержание GSH в корнях с геном *PtrXTH1* было выше по сравнению с ДТ, как при нормальных условиях, так и при действии кадмия (рис. 9Б). Содержание общего растворимого белка (ОРБ) при нормальных условиях и влиянии кадмия было выше в корнях

трансгенных растений с геном *PtRXTH1* по сравнению с ДТ, а растения с генами *EXPs* и *NtEXGT* отличались меньшим или на уровне ДТ содержанием ОРБ при норме и стрессе (рис. 9Г).

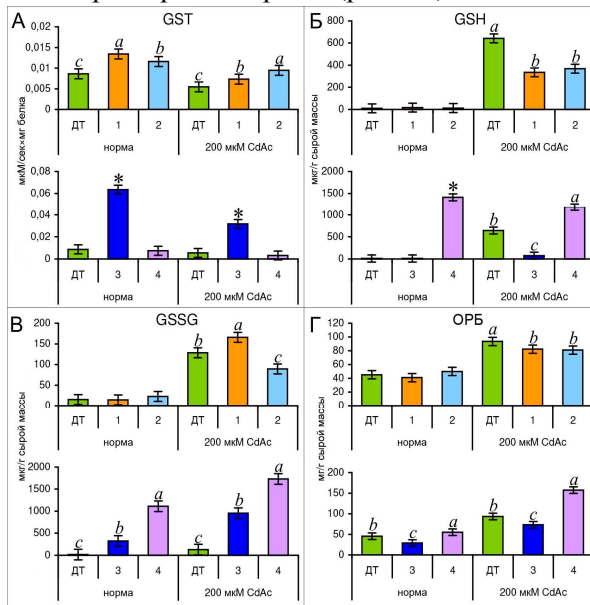


Рисунок 9. Активность глутатион-S-трансферазы (А) и содержание глутатиона: Б – восстановленного, В – окисленного, Г – содержание общего растворимого белка в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAs. 1 – трансгенные растения *35S::NiEXPA1*, 2 – трансгенные растения *35S::NiEXPA5*, 3 – трансгенные растения *35S::NiEXGT*, 4 – трансгенные растения *35S::PtRXTH1*. n = 15. Буквами и звездочками обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan (P ≤ 0.05).

Активность СОД, содержание пролина и ВРС при влиянии кадмия в корнях всех изучаемых трансгенных растений находилось на уровне или ниже ДТ.

Из полученных результатов видно, что происходит не только увеличение определенных показателей АОС при влиянии генов *EXPs* и *XTHs*, но и снижение некоторых компонентов. Например, гены *XTHs* снижают содержание ВРС, а *EXPs*, в свою очередь, снижают содержание восстановленного глутатиона. Гены *NtEXPA5* и *NtEXGT* снижают содержание пролина, а ген *PtRXTH1* способствуют снижению активности СОД (рис. 10). Снижение этих показателей с одновременным улучшением ростовых параметров при действии стрессовых факторов говорит о функционировании различных компенсаторных и

гомеостатических механизмов. К примеру, у трансгенных растений повышается стрессоустойчивость за счет стимуляции роста клеток в условиях дефицита влаги и позитивного влияния на некоторые компоненты АОС, и повышение концентрации пролина может уже не требоваться.

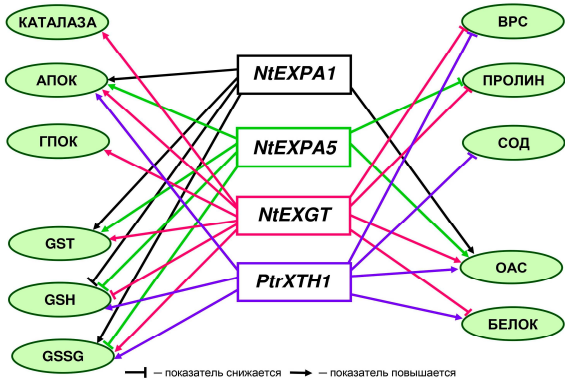


Рисунок 10. Обобщенные результаты влияния сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs* на компоненты антиоксидантной системы корней трансгенных растений табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что сверхэкспрессия генов экспансинов *NiEXPA1*, *NiEXPA5*, *PnEXPA3*, *AtEXPA10* и генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NiEXGT*, *PtrXTH1* способствует увеличению длины корней трансгенных растений при нормальных условиях и при действии кадмия.

2. Выявлено, что сверхэкспрессия генов экспансинов *PnEXPA3* и *AtEXPA10* способствует увеличению длины корней трансгенных растений при засолении, тогда как трансген *PtrXTH1* оказывает позитивный эффект на рост корней не только при засолении, но и при гипотермии.

3. Показано, что повышенный рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в условиях кадмиевого стресса обеспечивается за счет стимуляции роста клеток растяжением.

4. Показано, что в трансгенных растениях по генам экспансинов *NiEXPA1* и *NiEXPA5* при действии кадмия увеличена общая антиоксидантная способность и активности глутатион-S-трансферазы и аскорбатпероксидазы, а активность каталазы, содержание пролина и восстановленного глутатиона снижено, по сравнению с диким типом.

5. Установлено, что в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *NtEXGT* при действии кадмия увеличена общая антиоксидантная способность, активность каталазы, глутатион-S-трансферазы, гваяколпероксидазы и окисленного глутатиона по сравнению с диким типом.

6. Выявлено, что в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtXTH1* при действии кадмия увеличена общая антиоксидантная способность, активность аскорбатпероксидазы, содержание общего растворимого белка, окисленного и восстановленного глутатиона по сравнению с диким типом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях Web of Science и Scopus

1. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Mikhaylova E.V., Nikonorov Y.M., **Berezhneva Z.A.**, Chemeris A.V. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response // Journal of Plant Physiology. 2016. V. 206. P. 1-12.

2. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., **Berezhneva Z.A.**, Nikonorov Y.M., Postrigan B.N., Kudoyarova G.R., Chemeris A.V. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco *NtEXGT* gene and its involvement in abiotic stress response // Plant Physiology and Biochemistry. 2017. V. 111. P. 203–215.

3. Кулуев Б.Р., **Бережнева З.А.**, Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Участие генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *PtXTH1* и *PnXTH1* в регуляции роста и адаптации растений к стресс-факторам // Физиология растений. 2018. Т. 65, № 1. С. 34–45.

4. Кулуев Б.Р., **Бережнева З.А.**, Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Рост трансгенных растений табака с измененной экспрессией генов экспансинов при действии стрессовых факторов // Физиология растений. 2018. Т. 65. №2. С. 121–132.

5. **Бережнева З.А.**, Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в условиях кадмиевого стресса // Физиология растений, 2022, Т. 69, № 5, стр. 522-530.

Публикации в изданиях, входящих в перечень РИНЦ

6. **Бережнева З.А.**, Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *PnEXPA3* при действии стрессовых факторов // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 545-551.



Подписано в печать 08.04.2024 г.
Бумага офсетная. Формат 210x297.
Отпечатано на цифровом оборудовании в типографии ООО «Принт+»,
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71.
Заказ № 654. Тираж 150 экз.