

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук

На правах рукописи

Бер

БЕРЕЖНЕВА ЗОЯ АЛЕКСАНДРОВНА

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

1.5.21. Физиология и биохимия растений (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Кулуев Б. Р.

УФА – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 8 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 17 |
| 1.1. Морфофизиологические особенности корневой системы растений..... | 17 |
| 1.2. Механизмы регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов..... | 22 |
| 1.2.1. Фитогормональная регуляция роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов | 24 |
| 1.2.2. Генетическая регуляция роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов | 29 |
| 1.3. Влияние абиотического стресса на рост корней растений | 33 |
| 1.3.1. Рост корней при действии засоления..... | 34 |
| 1.3.2. Рост корней при действии гипотермии..... | 36 |
| 1.3.3. Рост корней при действии тяжелых металлов | 37 |
| 1.4. Роль генов экспансинов в регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов | 39 |
| 1.5. Роль генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов... | 43 |
| 1.6. Взаимосвязь экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз с антиоксидантной системой растений..... | 49 |
| 1.7. Заключение к главе 1..... | 51 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 53 |
| 2.1. Объекты исследования | 53 |
| 2.2. Реактивы..... | 53 |
| 2.3. Составы использованных стандартных растворов..... | 56 |
| 2.4. Получение, отбор и анализ трансгенных растений табака..... | 59 |
| 2.5. Выделение и очистка тотальной ДНК растений методом солевой экстракции | 61 |
| 2.6. Гель-электрофорез ДНК..... | 61 |
| 2.7. Полимеразная цепная реакция..... | 62 |

| | |
|--|----|
| 2.8. Выделение РНК и построение кДНК..... | 62 |
| 2.9. Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени..... | 63 |
| 2.10. Стерилизация и выращивание семян трансгенных растений табака на селективной среде..... | 63 |
| 2.11. Оценка параметров роста корней трансгенных растений табака на вертикально-ориентированных чашках Петри | 64 |
| 2.12. Фиксация и микроскопический анализ корней..... | 65 |
| 2.13. Определение содержания общего растворимого белка..... | 65 |
| 2.14. Анализ состояния компонентов антиоксидантной системы трансгенных растений табака | 66 |
| 2.14.1. Определение активности супероксиддисмутазы..... | 67 |
| 2.14.2. Определение активности каталазы | 68 |
| 2.14.3. Определение активности аскорбатпероксидазы..... | 68 |
| 2.14.4. Определение активности гваяколпероксидазы..... | 69 |
| 2.14.5. Определение активности глутатион-S-трансферазы | 70 |
| 2.14.6. Определение содержания восстановленного и окисленного глутатиона..... | 71 |
| 2.14.7. Определение содержания пролина | 72 |
| 2.14.8. Определение содержания водорастворимых сахаров..... | 73 |
| 2.14.9. Определение общей антиоксидантной способности..... | 73 |
| 2.15. Статистический анализ и программное обеспечение | 74 |
| 2.16. Дизайн исследования..... | 74 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..... | 76 |
| 3.1. Анализ содержания транскриптов и ПЦР-анализ генов <i>EXPs</i> и <i>XTHs</i> в корнях трансгенных растений табака | 76 |
| 3.2. Морфометрический анализ корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов <i>EXPs</i> и <i>XTHs</i> при нормальных условиях и при действии абиотических стресс-факторов..... | 78 |
| 3.2.1. Морфометрический анализ корней трансгенных растений при действии засоления..... | 79 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2. Морфометрический анализ корней трансгенных растений при действии гипотермии..... | 86 |
| 3.2.3. Морфометрический анализ корней трансгенных растений при действии кадмия..... | 89 |
| Обсуждение результатов исследования по параграфу 3.2..... | 96 |
| 3.3. Микроскопический анализ корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов <i>EXPs</i> и <i>XTHs</i> при нормальных условиях и при действии абиотических стресс-факторов..... | 98 |
| Обсуждение результатов исследования по параграфу 3.3..... | 102 |
| 3.4. Оценка состояния компонентов антиоксидантной системы и содержания белка в корнях табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов <i>EXPs</i> и <i>XTHs</i> при нормальных условиях и при действии кадмия..... | 103 |
| 3.4.1. Содержание общего растворимого белка в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 104 |
| 3.4.2. Активность супероксиддисмутазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 105 |
| 3.4.3. Активность каталазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 106 |
| 3.4.4. Активность аскорбатпероксидазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 107 |
| 3.4.5. Активность гваяколпероксидазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 108 |
| 3.4.6. Активность глутатион-S-трансферазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 109 |
| 3.4.7. Содержание восстановленного и окисленного глутатиона в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса.. | 111 |
| 3.4.8. Содержание пролина в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса..... | 113 |

| | |
|---|-----|
| 3.4.9. Содержание водорастворимых сахаров в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса | 114 |
| 3.4.10. Общая антиоксидантная способность в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса | 115 |
| Обсуждение результатов исследования по параграфу 3.4..... | 116 |
| 3.5. Заключение к главе 3 | 128 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 130 |
| ВЫВОДЫ | 133 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ | 134 |

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AtEXPA10 – ген экспансина *Arabidopsis thaliana* L.

NtEXPA1, *NtEXPA5* – гены экспансинов табака *Nicotiana tabacum* L.

NtEXGT – ген ксилоглюканэндотрансгликозилазы табака *N. tabacum*

PnEXPA3 – ген экспансина тополя черного *Populus nigra* L.

PttXTH1 – ген ксилоглюканэндотрансгликозилазы осины *Populus tremula* L.

CdAc – (CH₃COO)₂Cd / ацетат кадмия

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфаты

EXPs – expansins / экспансины

GSH – восстановленный глутатион

GSSG – окисленный глутатион

GST – глутатион-S-трансфераза

Na₂ЭДТА – динатриевая соль ЭДТА

SDS – додецилсульфат натрия

XTHs – ксилоглюканэндотрансгликозилазы

АБК – абсцизовая кислота

АК – аскорбиновая кислота

АО – антиоксидантный (ые/ая)

АОС – антиоксидантная система

АПОК – аскорбатпероксидаза

АФК – активные формы кислорода

ВРС – водорастворимые сахара

ГПОК – гваяколпероксидаза

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

ДТ – дикий тип

ДМСО – диметилсульфоксид

ИУК – индолилуксусная кислота

КАТ – каталаза

мкг – микрограмм

мкМ – микромоль

мМ – миллимоль
МС – Мурасиге-Скуга (питательная среда)
нМ – наномоль
НСТ – н-Нитросиний тетразолий
 α -НУК – α -нафтилуксусная кислота
НЭМ – N-этилмалеимид
ОАС – общая антиоксидантная способность
ОРБ – общий растворимый белок
ОФА – ортофталдальдегид
ПВП – поливинилпирролидон
пМ – пикомоль
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПЦР – полимеразная цепная реакция
СОД – супероксиддисмутаза
ТБК – тиобарбитуровая кислота
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид
ХДНБ – 1-хлор-2,4-динитробензолом
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Абиотические стрессы, являющиеся основными ограничивающими факторами в сельском хозяйстве, вызываются такими условиями, как засуха, засоление, высокие или низкие температуры, свет, недостаток или избыток питательных веществ, тяжелые металлы. Все эти факторы отрицательно влияют на рост, развитие и продуктивность сельскохозяйственных растений (Madhava Rao et al., 2006). Поэтому создание и использование сортов растений, устойчивых к абиотическим стрессовым воздействиям имеет большое экономическое значение.

Растения, подверженные различным абиотическим стресс-факторам, проявляют множественные морфофизиологические изменения, которые часто являются результатом реструктуризации клеточной стенки растительного организма. Клеточная стенка растений построена на основе целлюлозы и связующих гликанов, 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 приводит к росту клетки и органа в целом (McQueen-Mason, Cosgrove, 1995; Lee, Kende, 2001; Cosgrove, 2000, 2015). Данная группа белков ассоциирована с ростом как органов побега (Kuluev et al., 2013, 2017), так и корней (Lin et al., 2011; Кулуев и др., 2018).

Помимо EXPs в регуляции роста клеток растяжением участвует большое количество других генов, кодирующих ферменты, и наиболее важные из них, ксилоглюканэндотрансгликозилазы (XTHs) (Nishikubo et al., 2007), которые

осуществляет реакцию трансгликозилирования ксилоглюканов, когда одна цепочка ксилоглюкана расщепляется и снова присоединяется к передующему концу другого ксилоглюкана (Smith, Fry, 1991). ХТНs участвуют при удлинении гипокотилей, инициации роста корневых волосков и других процессах, 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, таких как засуха, засоление, гипотермия и другие (Uga et al., 2013). Для дальнейшего повышения урожайности сельскохозяйственных культур, а также улучшения их устойчивости к абиотическим стресс-факторам необходимо продолжение исследований генетических детерминант корневой системы, которые могут быть использованы в качестве мишеней для генно-инженерных манипуляций (Tikhonovich, Provorov, 2011; 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 (Полеская, 2007; Mittler et al., 2011; Pucciariello et al., 2012). При этом существует меньше исследований направленных на изучение компонентов АОС в

корневой системе растительного организма, особенно в связке с компонентами клеточной стенки, 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 их 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 молекулярных механизмов повышения стрессоустойчивости у растений с повышенной экспрессией *EXPs* и *XTHs*.

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 исследования:

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 ксиланэстеразы, при нормальных условиях и при кадмиевом стрессе.

Объекты исследования: 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 ксиланэстеразы *NtEXGT* (клонирован из *N. tabacum*), *PtrXTH1* (клонирован из *Populus tremula* L.) (Кулуев и др., 2013; 2014; 2017; 2018). Все трансгенные растения табака, использованные в работе, получены ранее в ИБГ УФИЦ РАН д.б.н. Кулуевым Б.Р. совместно с Князевым А.В. и Бережневой З.А. В качестве контроля использовались растения табака дикого типа (ДТ) сорта Petit Havana линии SR1.

Предметом исследования являлись особенности изменения морфологических, микроскопических и биохимических параметров корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* при нормальных условиях и при влиянии засоления, гипотермии и ацетата кадмия.

Положения, выносимые на защиту:

1. Трансгенные растения табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксиланэстеразы 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 соответствуют уже имеющимся данным 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 использовался тест Duncan для независимых выборок 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 осуществлении роста растительных организмов, а также данные об их рецепции, особенностях сигналинга и регуляции экспрессии могут способствовать разработке стратегии создания хозяйственно-ценных растений с увеличенной корневой системой, способных расти лучше 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, однако молекулярные механизмы такого взаимодействия требуют дальнейших фундаментальных исследований. Испытанные в работе трансгенные растения табака могут быть предложены в качестве модельных для исследований функций экспансинов и ксилоглюканэндотрангликозилаз. 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 выполнены эксперименты по оценке содержания транскриптов изучаемых генов, по морфометрии корней, по микроскопии и сбору результатов 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 в рамках 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 и объем 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфофизиологические особенности корневой системы растений

Корень – один из основных вегетативных органов покрытосеменных, голосеменных и высших споровых растений (за исключением отдела Bryophyta), выполняющий разнообразные функции:

- 1) опорная – закрепление растения в почве;
- 2) абсорбционная – обеспечивает почвенное питание;
- 3) запасающая;
- 4) синтетическая – синтез аминокислот, алкалоидов, фитогормонов (большое количество цитокининов);
- 5) симбиоз с другими корнями, бактериями, грибами;
- 6) вегетативное размножение (Коровкин, 2016).

Корни растений отличаются друг от друга по происхождению, характеру ветвления, форме и длине. В зависимости от среды обитания растений, корни могут приобретать большой ряд специфических морфологических и физиологических особенностей. В зависимости от происхождения корни можно разделить на главный, боковые и придаточные. Развитие главного корня происходит из зародышевого корня. В течение всего жизненного цикла главный корень сохраняется у представителей класса Dicotyledones отдела Magnoliophyta и надотдела Gymnospermae, в то время как у класса Monocotyledones и высших споровых растений происходит быстрое отмирание главного корня. Совокупность всех корней одного растения называется корневой системой, форма и характер которой определяется соотношением в росте главного и боковых корней, выделяя при этом стержневую, мочковатую и смешанную корневую системы (Коровкин, 2016).

В корнях обычно выделяют четыре зоны: деления, растяжения, всасывания и проведения. Зона деления представлена клетками, находящимися за корневым чехликом, размер данной зоны составляет около 1 мм. Длина зоны растяжения может достигать 15 мм, но чаще всего она варьирует в диапазоне 1,2-10 мм. Зона всасывания характеризуется наличием

корневых волосков, длина данной зоны варьирует в диапазоне 1-2 см. За зоной всасывания находится зона проведения, которая представлена боковыми корнями, которые в зависимости от возраста могут быть белого, коричневого или черного цвета (Рожков и др., 2008).

Морфолого-анатомические особенности корней:

- 1) наличие сложного радиального проводящего пучка определяет радиальную симметрию строения корня;
- 2) в жизненном цикле рост корня в длину осуществляется с помощью пролиферации клеток в верхушечной точке роста;
- 3) точка роста покрыта корневым чехликом;
- 4) способность ветвиться;
- 5) эндогенное закладывание боковых корней;
- 6) для питания на корне образует корневые волоски, представляющие собой выросты эпидермальных клеток (Коробко, Касаткин, 2014).

Кончик корня чаще всего прикрыт корневым чехликом, который представляет собой многоклеточную паренхиматическую структуру. В процессе отмирания и разрушения поверхностных клеток корневого чехлика, происходит возобновление данных клеток в процессе деятельности точки роста, находящейся под чехликом. За счет этого процесса образуются новые слои клеток корневого чехлика взамен разрушающихся внешних клеток, благодаря этому происходит рост корня в длину (Коровкин, 2016). Таким образом, рост корней регулируется двумя основными процессами, происходящими в области корневого чехлика (деление клеток) и в зоне растяжения (рост клеток растяжением) (Beemster, Baskin, 1998; Casamitjana-Martínez et al., 2003; Dello Ioio et al., 2007).

Длина корней и корневой системы в целом, а также ее архитектура напрямую зависят от деления и растяжения клеток. При увеличении длины корней растяжение клеток является центральным процессом и играет решающую роль, т.к. клетки корня вырастают в длину в 30-40 раз больше исходных меристематических клеток у злаков и в 10-20 раз – у растений

класса Dicotyledones. К тому же развитие корней растений характеризуется не только их длиной, но и числом боковых корней и степенью ветвления корневых систем, которые в свою очередь зависят от деления клеток, а длина каждого порядка и плотность ветвления определяется растяжением клеток. Таким образом, корни растений охватывают большой объем почвы, чем и обеспечивается достижение корнями водоносных слоев. Растяжение клеток также играет важную роль непосредственно в поглощении корнями воды за счет удлинения клеток корневых волосков, появляющихся из эпидермальных клеток корня в зоне дифференцировки и в десятки раз превышающих клетки эпидермиса корня (Обручева, 2008).

После деления базальные клетки во всех тканях корня одновременно переходят к растяжению и увеличиваются до окончательных размеров на протяжении всей зоны растяжения. Таким образом, процессы деления и растяжения клеток корня разделены и во времени, и в пространстве. То, что зоны деления и растяжения имеют небольшой размер, но относительно быструю скорость роста, помогает корню преодолевать механическое сопротивление почвы при росте вглубь (Иванов, 1978).

Для организованного роста корневой системы растений необходимо, чтобы клетки в корневом чехлике делились в определённой плоскости и в определённое время. Плоскость деления клеток корня обуславливается строением цитоскелета и структурой полярности этих клеток. Форма корневой системы определяется вариациями в относительных соотношениях плоскостей деления клеток корневого чехлика в сочетании с растяжением поделившихся клеток корня в определённом направлении. Различают три типа деления клеток относительно условной оси клетки: поперечное (происходит рост корня в длину), периклиналильное (приводит к утолщению корня) и антиклиналильное (увеличение площади поверхности корня) (Негробов, 2010).

В корневой системе растений механизм клеточного деления, как и в других клетках включает фазы репликации и сегрегации ДНК, которые

представлены четырьмя основными этапами клеточного цикла: G1 (пресинтетический), S (синтетический), G2 (постсинтетический) и M (митотический). Далее происходит разделение цитоплазмы и плазматической мембраны, в результате данного процесса возникают две одинаковые дочерние клетки. В целом, клеточное деление в корнях включает два важнейших процесса: интерфаза, во время которой происходит редупликация ДНК и образование двойного набора хромосом, и процесс митоза, при котором происходит равномерное распределение хромосом между дочерними клетками (Медведев, 2004).

Процесс деления клеток корня зависит от фитогормональной регуляции, в котором задействованы, прежде всего, ауксины и цитокинины. Циклинзависимые протеинкиназы являются самыми важными растительными ферментами, которые регулируют клеточное деление, а также непосредственно влияют на смену стадий клеточного цикла (G1-S-G2-митоз). Фитогормоны, рецепторы, различные транскрипционные факторы, Ca^{2+} , протеиназы, протеинфосфатазы участвуют в клеточной сигнализации в процессе деления клеток корневой системы (Кулуев, 2017). Процесс растяжения клеток корня сопровождается важнейшими структурными и физиологическими изменениями в клетке, приводящими к увеличению объема цитоплазмы и центральной вакуоли и создающими тургорное давление на клеточную стенку, что как раз и способствует растяжению клеточной стенки растения в зоне растяжения (Негробов, 2010). В апикальной зоне корня располагается покоящийся центр, в котором клетки делятся реже остальных, за покоящимся центром находятся активно делящиеся клетки, которые составляют зону деления. Между зоной деления и зоной растяжения еще выделяют переходную зону (Baluška et al., 2010). Разделение зоны деления и переходной зоны связано с возрастанием скорости роста клеток (Ivanov, Dubrovsky, 1997). В зоне растяжения клетки корня приобретают свой максимальный размер, после зоны растяжения расположена зона корневых волосков и протоксилемы (Филин, 2015).

Рост растяжением клеток корня включает следующие процессы:

- 1) разрыхление связей между такими компонентами клеточной стенки, как целлюлозные микрофибриллы и волокна связующих гликанов, а также увеличение пластичности клеточной стенки из-за снижения рН, что способствует разрыву водородных и ковалентных связей между компонентами клеточной оболочки;
- 2) усиленное поступление воды в цитоплазму и вакуоль с последующим давлением на клеточную стенку, что вызывает растяжение и необратимое увеличение объема клеток корня;
- 3) рост клеточной стенки благодаря образованию новых составляющих клеток корня.

Механизм растяжения клеток корневой системы контролируется фитогормонами ауксинами, в частности активностью индолилуксусной кислоты (ИУК). Показано, что концентрация 0.1-1.0 нМ, вызывает активацию фермента плазматической мембраны H^+ -АТФазы и подкисление апопласта, в дальнейшем приводящее к их размягчению и последующему растяжению (Гольд и др., 2008).

Расхождение микрофибрилл целлюлозы при клеточном растяжении корней достигается следующими механизмами:

- 1) гидролиз связующих гликанов клеточной стенки ферментами эндогликаназами с последующим образованием целлоолигосахаридов и уменьшением степени полимеризации целлюлозы;
- 2) нарушения водородных связей между связующими гликанами и микрофибриллами целлюлозы, что обеспечивается белками экспансинами;
- 3) разрезание и последующее сшивание связующих гликанов гидролитическими ферментами ксилоглюканэндотрансгликозилазами /гидролазами (ХЕТ/ХТНs) (Горшкова, 2007; Park, Cosgrove, 2012).

Наличие тургорного давления играет существенную роль в осуществлении процессов роста клеток корня (Cosgrove, 1993), однако данное давление не является единственно необходимым фактором (Iraki et al.,

1989). К тому же при действии абиотических стресс-факторов, процесс растяжения стенок корня может контролироваться свойством растяжимости клеточной стенки, а не непосредственным влиянием тургорного давления (Cosgrove, 1993). Увеличение размеров клеток корня растений происходит за счет увеличения размеров вакуоли и поверхности самих клеток, но при этом объем цитоплазмы сильно не меняется.

Механизмы клеточного деления и роста клеток растяжением играют важнейшую роль в регуляции роста и размеров корневой системы, что непосредственно влияет на продуктивность растений в условиях воздействия различных абиотических стресс-факторов, вызывающих дефицит влаги, так как активация роста способствует достижению корнями глубоко залегающих водоносных слоев. Поэтому изучение молекулярных механизмов регуляции клеточного деления и растяжения в корнях необходимо для разработки методов повышения урожайности растений, прежде всего, при произрастании их в неблагоприятных условиях почвенного грунта и при влиянии абиотических стресс-факторов, прежде всего таких, как засуха, засоление, гипотермия и воздействие тяжелых металлов, которые наиболее актуальны для возделываемых территорий всего мира (Кулуев, 2017).

1.2. Механизмы регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов

Главная отличительная особенность растительных клеток – это способность к быстрому увеличению их объема благодаря механизму растяжения клеточной стенки с поглощением воды. В условиях воздействия абиотических стресс-факторов для растения особенно важна способность поддерживать рост растяжением посредством изменения свойств клеточных стенок корневой системы (Serpe, Matthews, 1992; Abozeid et al., 2017).

Клеточная стенка растений в своем строении имеет большую сложную сеть из микрофибрилл целлюлозы, которая насквозь пронизана молекулами связующих гликанов (ранее назывались гемицеллюлозами) (Scheller, Ulvskov,

2010; Han et al., 2017). Первичная клеточная стенка присутствует у делящихся и молодых растущих клеток корня, в ее составе присутствует много воды, связующих гликанов и пектина, но целлюлозы при этом очень мало. Во вторичной клеточной стенке содержание воды, связующих гликанов (ксилоглюканы, арабиноксиланы, галактуронаны и др.), пектина меньше, но количество целлюлозы значительно увеличивается, а стенки также могут быть усилены лигнином (Endler, Persson, 2011). Также растительная клеточная стенка может содержать в своем составе большое количество белков для выполнения структурных и ферментативных функций (Михайлова, 2007).

Мультимерные комплексы, состоящие из субъединиц целлюлозосинтазы синтезируют микрофибриллы целлюлозы (Kumar, Turner, 2015), в то время как связующие гликаны клеточных стенок имеют в своем составе остатки пентоз и гексоз. При взаимодействии связующих гликанов, целлюлозы и иногда лигнина происходит укрепление клеточных стенок корневых систем растений (Endler, Persson, 2011; Pauly et al., 2013).

В середине 30-х годов прошлого века немецкие исследователи С. Штруггер и У. Ругге установили, что регуляция роста клеток осуществляется посредством изменения концентрации ионов водорода, которые влияют на набухание пектиновых веществ клеточных стенок и в результате чего происходит разрыхление целлюлозного каркаса с последующим влиянием на растяжение клеточной стенки. Данная концепция получила название «кислого роста» (Luthen et al., 1990). Смысл данной теории заключается в том, что фитогормон ауксин активирует работу протонной помпы плазматической мембраны клеточной стенки, происходит уменьшение pH, в связи с чем усиливается активность гидролитических ферментов, которые провоцируют разрыхление клеточной оболочки, что является важнейшим условием для роста клеток корня с помощью механизма растяжения (Хаблак, Абдуллаева, 2013). Однако в 80-90 годах XX века было определено, что зависимость между активацией протонной помпы, зависимой от ауксинов и

ростом клеток растяжением наблюдается не во всех случаях и поэтому концепция «кислого роста» требует дальнейшего изучения (Kutschera, Schopfer, 1985).

В клетках растущих корней механизмы деления и растяжения осуществляются раздельно и последовательно, и меристематическая клетка корня начинает свое растяжение только после определенного времени пребывания в меристеме, не зависящее от того, было ли деление клеток или нет (Иванов, 1974; Ivanov, 1997; Che et al., 2016).

Прекращение растяжения клеточных стенок корня связано с неполной инактивацией мембранного фермента H^+ -АТФазы, в результате которой происходит подщелачивание оболочек (De Cnodder et al., 2006). В дальнейшем происходит снижение разветвленности связующих гликанов с последующим увеличением поперечных водородных связей между гликанами и целлюлозой клеточной стенки, а также появление диферулатных сшивок между молекулами самих связующих гликанов (Шарова, 2004; Nan et al., 2017).

Дополнительно растяжение клеток способно ингибироваться гормоном абсцизовой кислотой (АБК) (Evans, 1978) и данный процесс запускается при дефиците воды под действием различных абиотических стресс-факторов и при влиянии растительных фитогормонов, таких как гиббереллины и этилен (Обручева, 2008). Изучение механизмов, благодаря которым происходит разрыхление клеточных стенок корней, представляет большой интерес, так как полученные знания могут быть использованы для увеличения продуктивности и стрессоустойчивости растений.

1.2.1. Фитогормональная регуляция роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов

К фитогормонам растений, прежде всего, относятся следующие биологические соединения: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота, brassinosteroids, этилен, стриголактоны, а также производные

жасмоновой и салициловой кислот. Реакции растительных клеток-мишеней начинаются со связывания фитогормона с его рецептором и последующей ответной реакции клеток, зависящей от их специфичности, которая определяется набором генов, экспрессирующихся во время влияния этого фитогормона и от количества других сигнальных молекул, находящихся в растительном организме в этот момент (Кулуев, 2017).

Фитогормоны участвуют в большом количестве разнообразных физиологических процессов в растительном организме и свое важное влияние они оказывают на механизмы роста и деления клеток корневой системы, а также на адаптацию растений в условиях влияния различных абиотических стресс-факторов (Чайлахян, 1982; Кулуев, 2017).

Ауксины регулируют механизмы деления и роста клеток корня, а также их дифференцировку, но ауксины должны быть при этом в очень малых концентрациях (Burström, 1957; Taiz, Zeiger, 2002; Медведев, Шарова, 2011), также действие ауксинов приводит к заметному ветвлению корневой системы. Одним из главных ауксинов является индолилуксусная кислота (ИУК), которая непосредственно участвует в регуляции морфогенеза корня и поддержании пула стволовых клеток (Sabatini et al., 1999; Vanneste, Firml, 2009; Overvoorde et al., 2010). В корнях механизм растяжения работает быстрее по сравнению с растяжением в других органах растения, а рост корня зависит от скорости перехода новых молодых клеток к процессу растяжения, которая в свою очередь зависит от интенсивности деления этих клеток и от длины клеток, закончивших свой рост (Иванов, 1974, 2011). Разные физиологические процессы, которые непосредственно отвечают за рост корня, при экзогенной обработке растительными ауксинами и синтетическим ауксином 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д), начинают изменяться неодинаково (Burström, 1942, 1950). Было выявлено, что α -ИУК в концентрации 3×10^{-7} М тормозит рост корней из-за уменьшения длины закончивших рост клеток, при этом число клеток не менялось (Beemster, Baskin, 2000). При влиянии 2,4-Д в концентрации 30 нМ

происходит замедление роста корня благодаря удлинению продолжительности времени клеточного цикла и незначительному сокращению длины закончивших рост клеток, но при этом время жизни клеток в меристеме увеличивается (Филин, Иванов, 2016). При влиянии нитратов на корневую систему наблюдается корреляция между уровнем ауксинов в корнях и ветвлением этих корней (Walch-Liu et al., 2006; Иванов, 2009; Zang et al., 2020).

Цитокинины регулируют рост и дифференцировку корней, а также индуцируют переход от деления к растяжению в клетках корневой системы (Hartig, Beck, 2006). Однако в трансгенных растениях с уменьшенной выработкой данного фитогормона, наблюдается усиленный рост и ветвление корней, что свидетельствует об отрицательном действии цитокининов на корнеобразование (Площинская и др., 2002). Также существует зависимость уровня цитокининов с механизмом формирования зачатков боковых корней. В корневой системе в разный период жизни растения происходит неравномерное распределение цитокининов (Brovko et al., 2007). Данная неравномерность в распределении цитокининов в корневой системе растений показывает то, что данные фитогормоны необходимы только на определенных стадиях формирования боковых корней (Высоцкая и др., 2014). Цитокинины регулируют клеточное деление (Romanov, 2009; Kieber, Schaller, 2014) через участие в переходе от стадии G1 к S фазе и от стадии G2 к митотическому делению. У мутантных форм растений, со всеми выключенными цитокининовыми рецепторами, апикальная меристема корней значительно меньше по сравнению с диким типом из-за происходящей редукции клеточного деления (Kieber, Schaller, 2014).

Во время роста первичного корня цитокинины ингибируют этот рост путем влияния на деление клеток в меристеме корня, а также на рост клеток в зоне растяжения. Ауксины и цитокинины проявляют свое действие на регуляцию размера апикальной меристемы корневой системы противоположным образом. Цитокинины участвуют в изменении размера

апикальной меристемы корня посредством влияния на скорость дифференцировки клеток, находящихся в зоне растяжения (Dello Ioio et al., 2012).

Другая группа фитогормонов – гиббереллины регулируют многие процессы развития растений, включая клеточное деление и растяжение, а также рост корневой системы (Sun, 2011). Чувствительность к гиббереллинам корней выражена сильнее, чем у стеблей, в связи с чем рост корневой системы активируется более низкими концентрациями гибберелловой кислоты, недостаточными для роста побега, в то время как большое содержание гиббереллинов улучшает растяжение стеблей и подавляет рост корней. Таким образом, гиббереллины участвуют в контроле формы растений посредством влияния на соотношение роста побега и корневой системы (Tanimoto, 2012).

АБК является важнейшим фитогормоном, отвечающим за торможение роста растений и главным антагонистом таких ростстимулирующих гормонов, как ауксины, цитокинины и гиббереллины (Кулуев и др., 2017, Kuluev et al., 2018). Также АБК тормозит деление клеток камбия, что влияет как на первичный, так и на вторичный рост, однако, в некоторых случаях АБК может действовать как стимулятор роста, убирая ингибирующее влияние на рост корневой системы гибберелловой кислоты, а в период засухи активировать механизм всасывания воды корнями (Безуглова, 2009). АБК выступает антагонистом фитогормона ауксина в регуляции ветвления корневой системы (Hooker, Thorpe, 1998). На примере трансгенных растений с нарушением синтеза АБК было выявлено, что у них отсутствует подавление удлинения боковых корней в условиях роста в присутствии нитратов, что указывает на участие АБК в данном процессе (Signora et al., 2001, Zang et al., 2022).

Брассиностероиды в очень малых концентрациях активируют ростовые процессы в растениях, участвуя в регуляции деления и растяжения клеток. Данные фитогормоны активно действуют на корневую систему, ингибируя

образование боковых корней (Кулуев и др., 2017). Регуляция процессов роста растений brassиностероидами происходит посредством brassиностероид-чувствительных генов (Шакирова, 2001).

Фитогормон этилен участвует в регуляции клеточного растяжения, способствует активному развитию корневых волосков, а также является важнейшим фактором в регуляции роста корневой системы в целом (Pitts et al., 1998). У *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. при влиянии тяжелых металлов (в особенности кадмия) этилен улучшает развитие корней посредством модулирования концентрации O_2^- (Abozeid et al., 2017). Так же этилен способствует образованию аэренхимы и придаточных корней у семейства Poaceae в условиях затопления и недостатка кислорода. Самая важная функция этилена заключается в торможении роста главного корня с дальнейшей активацией образования боковых корней (Кулаева, 1995).

Жасмоновая кислота и ее метиловый эфир регулирует процессы роста, а также механизмы формирования корней и корнеплодов, но также жасмонаты могут ингибировать рост корневой системы. А при экзогенной обработке метилжасмонатом в концентрации 10^{-7} М пшеницы происходит увеличение активности деления клеток апикальной меристемы корневой системы (Сахабутдинова и др., 2009).

Салициловая кислота в присутствии высокой концентрации зеатина ингибирует рост корней томатов, в то же время становится стимулятором роста корней при низкой концентрации цитокинина (Бабоша, Комарова, 2013).

Стриголактоны – фитогормоны, вырабатываемые корнями растений, они участвуют при взаимодействии корней с микоризными грибами, также эти фитогормоны регулируют ветвление корней. В корнях стриглактоны вырабатываются в ответ на низкие концентрации фосфатов или на большое количество поступающего из побега ауксина (Umehara et al., 2015; Humphreys, Smith, 2021).

Таким образом, в регуляции клеточного деления и клеточного

растяжения корней фитогормоны играют важную роль, влияя на процессы корнеобразования, ветвления, первичного и вторичного роста корневой системы, развития корневых волосков как стимулируя, так и ингибируя эти процессы в ходе жизнедеятельности растений. Фитогормоны вместе с многочисленными регуляторными генами участвуют в регуляции и обеспечении роста и растяжения корневой системы растений. К тому же фитогормоны помогают быстро реагировать корням растений на абиотические стресс-факторы в течение всей жизни. Получаемые в этой области знания важны для решения задач сельского хозяйства и получения стрессоустойчивых растений, а также для улучшения свойств корневой системы (Кулаева, 1995).

1.2.2. Генетическая регуляция роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов

За последние годы изучены десятки семейств генов, белковые продукты которых принимают участие в реализации механизмов регуляции и обеспечения клеточного деления и роста клеток растяжением в корнях. Большое количество генов участвует в регуляции деления и растяжения клеток в корнях при нормальных условиях и при воздействии абиотических стресс-факторов, однако в регуляцию данных процессов также вовлечены молекулы небелковой природы и эпигенетические факторы. Экспрессия генов-регуляторов роста и развития корней регулируется внутренними и внешними факторами, к которым относятся фитогормоны, сахароза, минеральные элементы и гены, содержащие промоторы, специфичные и чувствительные к фитогормонам, а также световые и температурные абиотические факторы среды. Гены, активность которых зависит от фитогормональной регуляции, в составе своих промоторов имеют цис-регуляторные элементы, которые могут определять гормональную специфичность процессов роста растительного организма (Медведев, Шарова, 2010). Прежде всего, в регуляции развития корня и корневой

системы растений участвуют представители различных семейств транскрипционных факторов: гомеодоменсодержащие белки (Hake, Ori, 2002), MADS-белки (Медведев, Шарова, 2010), MYB-белки (Chen et al., 2006), белки bHLH (Serna, 2007), GRAS (Bolle, 2004). Например, транскрипционный фактор SCARECROW из семейства GRAS принимает участие в образовании боковых корней посредством индукции периклиналильных делений меристематических клеток в организующих центрах перицикла (Goh et al., 2016), а гетеродимеры LHW-T5L1 bHLH-белков участвуют в регуляции клеточных делений перицикла в сосудистых клетках в зоне апикальной меристемы корневой системы и регулируют дифференциацию ксилемы (Katayama et al., 2015).

Белок GATA23 и мембрано-ассоциированный регулятор киназ MAKR4 являются важнейшими факторами, необходимыми для образования локальной компетенции клеток зоны перицикла с инициацией зоны зачатка бокового корня (De Rybel et al., 2010; Xuan et al., 2015). Также GATA23 является важнейшей мишенью ауксинов для опосредованного действия транскрипционных факторов ARF в клетках-основательницах боковых корней (Rogg et al., 2001; Brady et al., 2007; De Rybel et al., 2010). Экспрессия трансфактора GATA23 происходит во всех клетках перицикла в зоне растяжения корня, а в клетках-основательницах он экспрессируется перед первым ассиметричным делением в процессе инициации боковых корней. В то же время транскрипционный фактор E2F стимулирует переход клеток-основательниц к ассиметричному клеточному делению (De Smet et al., 2010). Регуляция экспрессии транскрипционного фактора E2Fa происходит с помощью димера трансфакторов LBD18/LBD33, который ассоциирован с ауксинами и является связующим звеном между механизмом образования боковых корней и активацией транскрипции E2Fa (Berckmans et al., 2011). Семейство транскрипционных факторов GRF, участвующее в регуляции процессов клеточного деления, активно экспрессируется также и в молодых растущих тканях корней (Kim et al., 2003). Трансфактор ANAC017

экспрессируется преимущественно в корнях растений *A. thaliana*, но его экспрессия и накопление продукта подавляется влиянием тяжелых металлов, а также алюминия. Уменьшение активности этого транскрипционного фактора повышает толерантность к алюминию по сравнению с диким типом и сопровождается более низким содержанием алюминия в корнях и стенках клеток корня (Che et al., 2016). У мутантных по гену *ANAC017* форм *A. thaliana* происходит уменьшение содержание связующих гликанов (ксилоглюканов), что может указывать на влияние транскрипционного фактора *ANAC017* на экспрессию генов биосинтеза и метаболизма этих соединений. Также *ANAC017* положительно регулирует экспрессию гена *XTH31* *A. thaliana* посредством прямого связывания с промоторной областью гена *XTH31*, что влияет на толерантность корней *A. thaliana* к алюминию (Tao et al., 2022).

Гены *KNAT1-5* (из семейства *KNOX*) экспрессирующиеся в корневой системе растений *A. thaliana*, являются гомологами побеговых генов *STM*. Ген *KNAT1* активно экспрессируется в зоне зачатка в основании бокового корня, а в зрелом корне в зонах кортекса, перицикла и эндодермы наблюдается наибольшая активность гена *KNAT3*. Повышенная активность гена *KNAT4* обнаруживается в корневой системе в зонах растяжения, дифференцировки, во флоэме, кортексе, перицикле и эндодерме. Ген *KNAT5* проявляет свое действие в эпидермальных клетках, находящихся на границе зон деления и растяжения корневой системы (Truemit, 2006). Ген корневой системы *QNB*, являющийся гомологом гена *WUS* в побегах, отвечает за поддержание необходимого количества стволовых клеток в меристеме при процессах деления клеток корня (Kamiya et al., 2003). А ген *STIMPY/WOX9* у растений *A. thaliana* участвует в поддержании клеточных делений в апикальных меристемах корня (Wu et al., 2005). Ген *KOR2* кодирует локализованные в мембране эндогликаназы, и он экспрессируется в зоне дифференцировки корневых волосков развивающихся корней (Molhoj et al., 2001). Гены *AIL3* и *AIL4* у растений *A. thaliana* участвуют в регуляции

механизмов клеточного деления в апикальной меристеме корневой системы (Aida et al., 2004).

Пептид CLE40 в корнях (гомолог побегового пептида CLV3) участвует в регуляции клеточной пролиферации стволовых клеток в апикальной меристеме, а пептиды CLE41 и CLE44 отвечают за контроль развития камбия и прокамбия (Додуева и др., 2013). Сверхэкспрессия пептидов CLE14 и CLE20 *A. thaliana* блокирует клеточное деление и ингибирует рост корневой системы, а возвращение роста корней в нормальное состояние происходит при добавлении экзогенных цитокининов (Meng, Feldman, 2010). CLE-пептиды корней контролируют экспрессию белка U-бокс E3 убиквитин лигаза PUB4, который отвечает за асимметричное клеточное деление в меристеме корней посредством активации экспрессии гена *CYCD6;1* (Kinoshita et al., 2010).

Помимо пептидов, транскрипционных факторов и других белков в регуляции морфогенеза корневой системы растений принимают участие также микроРНК (Chuck et al., 2009).

Таким образом, у растений существует система контроля роста корневой системы, в результате которой происходят существенные изменения в экспрессии генов, отвечающих за регулирование деления и растяжения клеток корня, что позволяет растениям продолжать процессы жизнедеятельности как при нормальных условиях, так и при воздействии различных абиотических стресс-факторов, таких как засуха, гипотермия, засоление и влияние тяжелых металлов, которые снижают поступление воды и питательных веществ из почвы. Однако не до конца остаются изученными участники клеточного деления и растяжения корневой системы, а также механизмы их активации, поэтому полученные знания в данном направлении внесут существенный вклад в фундаментальные исследования, генную инженерию и селекцию растений и помогут в создании стрессоустойчивых растений с хозяйственно-ценными признаками и получении новых сортов культурных растений.

1.3. Влияние абиотического стресса на рост корней растений

Корневая система оказывает определяющее влияние на развитие и рост всего растительного организма, в том числе помогает сопротивлению засухе и гипотермии. В свою очередь рост и развитие корней напрямую зависит не только от поступления питательных веществ в растение, но и от влажности и температуры почвы, а также от концентрации молекул кислорода в почвенных слоях (Liu et al., 2019).

В естественных условиях растения подвергаются влиянию внешних абиотических стресс-факторов, таких как низкая температура, засоление, засуха, действие различных тяжелых металлов (Войников, 2013; Титов и др., 2014; Takahashi et al., 2020). Все эти стресс-факторы оказывают отрицательное влияние на рост, развитие и продуктивность растительных организмов (Boyer, 1982; Winfield et al., 2010; Clemens et al., 2013; Tiika et al., 2021), что также существенно сказывается на дифференциальном распределении видов растений в различных условиях окружающей среды (Chaves et al., 2003). В ответ на воздействие стресс-факторов у растений происходит активация защитно-приспособительных реакций и адаптационных механизмов, которые помогают растениям выживать в резко изменяющихся неблагоприятных условиях внешней среды.

У растений выделяют три фазы ответной реакции на воздействие стрессовых факторов: 1) первичная стрессовая реакция; 2) адаптация; 3) истощение ресурсов и гибель растительного организма. Результатом первой фазы становится торможение процессов деления и роста клеток, второй фазы – включение основных механизмов адаптации, что приводит к замедлению гидролитических реакций и катаболизма, а также усиление процессов синтеза (Ахмеджанов и др., 2015). После окончания фазы адаптации, растения продолжают развиваться. Если же влияние стрессовых факторов не заканчивается или усиливается, то растительный организм переходит в третью фазу, в которой происходит подавление большинства функций

жизнедеятельности и, в конечном итоге, растение погибает. Если же происходит прекращение влияния стресс-факторов и условия внешней среды приходят в норму, то у растения включается механизм восстановления организма (Федулов и др., 2015).

Сельскохозяйственные культуры при возделывании в процессе роста и развития постоянно испытывают влияние неблагоприятных факторов среды, поэтому повышение их стрессоустойчивости является очень важным для сельского хозяйства, так как способствует увеличению урожайности. Механизмы адаптации растительных организмов к различным абиотическим стресс-факторам включают в себя комплекс генов, экспрессия которых активируется при воздействии стресса, при этом гены имеют сложный механизм регуляции. Довольно часто эти механизмы изучаются с помощью трансгенных растений, которые являются толерантными к стрессам, что в дальнейшем позволит биотехнологам и селекционерам, используя полученные знания, создавать растения, устойчивые к засолению, гипотермии, засухе, влиянию тяжелых металлов (Jadamba et al., 2020).

Самыми распространенными абиотическими стресс-факторами, усложняющими растениям достижение их корнями глубоко залегающих водоносных слоев, являются засуха, экстремальные температуры (высокие и низкие температуры), засоление, снижение доступности питательных веществ в почве.

1.3.1. Рост корней при действии засоления

Засоление – распространенный абиотический стресс-фактор внешней среды, который в первую очередь вызывает дефицит влаги, при этом у каждого вида растения своя чувствительность к влиянию соли (Строгонов, 1962; Flowers, 2004; Xu et al., 2020). Засоление почв негативно отражается на жизнедеятельности растительных организмов, вследствие чего происходит уменьшение их продуктивности (Шихмурадов, 2009; Терлецкая и др., 2011; Кошкин, 2014; Куркиев и др., 2016). Влияние засоления проявляется, в

первую очередь, в изменениях морфометрических показателей растительных организмов, а также в существенных изменениях биохимических процессов. Высокие концентрации соли на растение оказывают также токсический эффект, при этом происходят нарушения азотного обмена и накопление продуктов распада белков (Белозерова, Лукашенко, 2010; Белозерова, Боме, 2014; Torabi, 2014; Жуков и др., 2016; Yan et al., 2019). Также засоление провоцирует изменения в осмотическом давлении клеток, в реакциях окислительного стресса, работе компонентов антиоксидантной системы, содержании пролина.

В ходе жизнедеятельности растительных организмов их корневая система абсорбирует множество химических элементов, поэтому она имеет специальные механизмы поглощения необходимых веществ и выброса токсичных, основывающиеся на работе ионных помп и антипортеров (Torabi, 2014; Иванищев, 2019). Повышенное содержание солей NaCl, Na₂SO₄, Na₂CO₃ в почве затрудняет поглощение воды корневой системой растений, а также существенно влияет на изменение физиологических и биохимических характеристик корней (Евграфкина и др., 2018, 2019, 2020). Также в корнях происходит повреждение плазмалеммы, что влияет на ее проницаемость, а в корнях молодых проростков тормозится рост меристематических клеток и их вступление в процесс митоза, в зонах деления и растяжения существенно изменяются размеры ядер и клеток. Засоление вызывает и усиливает асинхронность клеток корневой системы, которые приступают к митотическому делению (Луценко, 1979). У мягкой пшеницы при засолении в диапазоне концентраций NaCl от 85 до 200 мМ происходит ингибирование роста корней, а также уменьшение сухой и сырой массы корневой системы (Куркиев и др., 2017). Так же различные виды засолений приводили к тому, что у мягкой яровой пшеницы происходило уменьшение числа зародышевых корней (Хусаинов и др., 2014), а у мягкой озимой пшеницы снижалась длина корней (Омарова, 2014; Yan et al., 2019). Растения озимой тритикале также

снижали свой рост и биомассу при влиянии растворов NaCl в концентрациях 85 и 165 мМ (Куркиев и др., 2016, 2017).

1.3.2. Рост корней при действии гипотермии

Гипотермия является одним из наиболее распространенных стресс-факторов для растений приводящее прежде всего к дефициту влаги из-за перехода мембран в более жёсткое состояние (Кошкин, 2014). Для корневой системы растений, как и для побеговой части, существуют три температурные точки: минимальная, оптимальная и максимальная. Корень лучше всего развивается при оптимальной температуре, которая для каждого вида растений определяется индивидуально, однако описаны примеры, когда корневая система начинает лучше расти при небольшом уменьшении, а побег – при небольшом повышении относительно оптимальной температуры (Федулов и др., 2013; Liu et al., 2019).

Влияние низких положительных температур (гипотермия) в первую очередь вызывает у растений температурный стресс, который выражается в виде повреждения клеточных мембран, клеточных органелл и торможения процессов фосфорилирования (Миннибаева, 2003; Takahashi et al., 2020). При гипотермии происходит накопление АФК, различных метаболитов, а также нарушается последовательность и согласованность многих биохимических реакций. А продолжительное действие гипотермии приводит растение к гибели (Титов и др., 2006). У растений пшеницы по сравнению с контролем, происходит снижение накопления сырой биомассы корней при различных вариациях воздействия низких положительных температур (+4, +8 и +12 °С в течение 7 дней), а соотношение сухой и сырой биомассы корневой системы не изменяется при воздействии гипотермии (Венжик и др., 2020). Также устойчивость клеток корневой системы пшеницы при влиянии различных низких положительных температур непосредственно на корневую систему не только не улучшается, а даже во многих случаях скорее снижается, что указывает на то, что у корневой системы пшеницы существуют

ограничивающие физиологические факторы при адаптации и закаливании (Титов, Таланова, 2011).

Рост корневой системы любого растения начинается при определенной температуре почвенного слоя и ускоряется по мере достижения оптимальной, а затем рост замедляется, и полное прекращение роста корневой системы наблюдается при достижении температурного максимума. К влиянию высокой температуры корни более чувствительны, чем к холоду, и они растут при более низких температурах по сравнению с побегами. Например, рост корневой системы *Acer platanoides* L. начинается при минимальной температуре +7°C, а прекращается при +26°C. Для деревьев температурный оптимум роста корневой системы находится в диапазоне +15-19°C. Если температура почвы достигает +50°C, то корневая система погибает, что приводит к гибели всего растительного организма. Для начала роста корневой системы плодовых растений достаточно, чтобы почвенный грунт прогрелся до +4-5°C, а оптимальной температурой для роста корневой системы считается диапазон от +7 до +20°C, при увеличении температуры до +25-30°C рост корневой системы полностью прекращается (Черепяхин и др., 1991). Однако жизнеспособность корневой системы многих древесных растений может сохраняться и при температурах ниже нуля. В умеренных широтах при замерзании почвенного грунта в зимний период у древесных видов растений происходит полное прекращение роста корневой системы (Liu et al., 2019). В весенний период происходит процесс оттаивания и нагревания почвы, который ведет к началу роста корней, при этом раньше в рост идет та часть корневой системы, которая находится ближе к поверхности почвы, а осенью, следовательно, наоборот корневая система, расположенная в более глубоких слоях почвенного грунта дольше продолжает свой рост.

1.3.3. Рост корней при действии тяжелых металлов

Тяжелые металлы чаще всего вызывают у растений нарушения в фотосинтетическом аппарате (Титов и др., 2007), угнетение ростовых функций (Серегин, Иванов, 2001), усиление интенсивности перекисного окисления липидов (Zhanq et al., 2007), изменения в дыхательном аппарате (Караваев и др., 2001), водном обмене и минеральном питании (Титов и др., 2014). Однако, умеренные дозы некоторых тяжелых металлов могут оказать положительное влияние: они способны стимулировать рост растений (Титов и др., 2007), повышать содержание пигментов (Stiborova et al., 1986) и увеличивать биомассу корней (Ли и др., 2008).

Клеточные стенки растений и их катионообменная способность играют главную роль в поглощении корнями таких тяжелых металлов, как кадмий (Dabin et al., 1978; Khan et al., 1984; Zhang et al., 2018). У кадмия обменная способность в клеточных стенках выше, чем у цинка (Nishizono et al., 1987). Также она может различаться в зависимости от концентрации соединений тяжелых металлов (Титов и др., 2014).

Кадмий не является необходимым для растения элементом, но, тем не менее, он активно поглощается листьями и корневой системой (Кабата-Пендиас, Пендиас, 1989). Большая часть кадмия поглощается корнями пассивно и посредством метаболического пути (Smeyers-Verbeke et al., 1978; Nan et al., 2017). Ионы кадмия локализуются в корнях, в узлах стеблей, в черешках и главных жилках листьев (Cunningham et al., 1975). Кадмий и его соединения оказывают существенное токсическое воздействие на физиологические и биохимические процессы растения (Ерофеева, Наумова, 2010). В низких концентрациях кадмий может оказывать стимулирующее влияние на рост побегов, процессы корнеобразования и формирование листового аппарата (Кузнецова и др., 2008; Abozeid et al., 2017). Однако при более высоких концентрациях однозначно является стрессором.

Кадмий вызывает реакцию параллельных и/или последовательных событий, быстрых физиологических и медленных морфологических процессов, в которых каждый механизм может быть одновременно причиной

и следствием метаболических изменений, прямо или косвенно связанных с «управлением» кадмиевым стрессом, что представлено в виде мульти-компонентной модели интегративного ответа, называемого «веерообразным ответом» (Sanita di Toppi, Gabbrielli, 1999; Zang et al., 2022). Признаки избыточного накопления тяжелых металлов в корневой системе проявляются в замедлении ее развития и роста, а также в недоразвитости и уродливости корней (Давыдова, Тагасов, 2002).

1.4. Роль генов экспансинов в регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов

Экспансины – неферментативные белки, вызывающие обратимое разрушение водородных связей между микрофибриллами целлюлозы и связующими гликанами (Шарова, 2007; Cosgrove, 2015; Chen et al., 2018), что приводит к ослаблению клеточных стенок и их последующему растяжению у растущих клеток. Так как ослабление клеточных стенок определяет клеточное растяжение корневой системы, то экспансины играют важную роль в увеличении длины корней растений и регуляции механизма растяжения клеточных стенок корневой системы. Экспансины встречаются во всех изученных видах растений (Cosgrove, 2000a, 2000b), но впервые они были обнаружены в колеоптилях огурца *Cucumis sativus* L. в 1990-х годах (McQueen-Mason et al., 1992).

В растениях часто выделяют 4 класса экспансинов: α -экспансины (EXPA), β -экспансины (EXPB), экспансин-подобные белки А (EXLA) и экспансин-подобные белки В (EXLB) (Sampedro, Cosgrove, 2005). Фитогормоны и абиотические стресс-факторы регулируют транскрипцию и активность экспансинов, при этом α -экспансины наиболее активны при кислой среде клеточных стенок, а β -экспансины – менее зависимы от кислотности среды (Шарова, 2007; Jadamba et al., 2020).

Все экспансины кодируются большими семействами генов, но необходимость большого числа разнообразных экспансинов у растений пока

не объяснено, хотя очевидно, что они различаются по локализации и функциональности. Для некоторых экспансинов и их генов показана корнеспецифичность экспрессии и участие в регуляции роста и развития корней. Например, у растений *A. thaliana* выявлены гены экспансинов *AtEXPA5* и *AtEXPA7*, которые влияют на их корневую систему (Chen et al., 2018). Трансгенные растения с геном *AtEXPA5* имели более короткие корни по сравнению с контролем (Park et al., 2010), в то время как РНК-интерференция гена *AtEXPA7* способствовала уменьшению длины корневых волосков в трансгенных растениях по сравнению с диким типом (Lin et al., 2011; Liu et al., 2019), что указывает на то, что экспансины играют существенную роль в механизмах регуляции роста корневой системы растений, причем это действие может быть разнонаправленным.

В растениях *Oryza sativa* L. выявлено пять α -экспансинов, которые экспрессируются только в корневой системе – это *OsEXP11*, *OsEXP12*, *OsEXP13*, *OsEXP15*, *OsEXP17* (Lee, Kende, 2002; Ren et al., 2018). Экспрессия мутантного гена *OsEXPA17* вызывает укорачивание корневых волосков у растений риса (ZhiMing et al., 2011).

У растений *Glycine max* L. Merr. изучен ген экспансина *GmEXP1* ответственный за рост клеток корневой системы экспрессирующийся в клетках корневого чехлика, эпидермиса и слоях первичного и вторичного корня, которые отвечают за рост клеток корневой системы, но транскрипты данного гена полностью отсутствуют в зоне растяжения (Lee et al., 2003). А в растениях *Rumex palustris* Sm. экспрессия некоторых генов экспансинов зависит от типа корня в корневой системе и повышенная экспрессия наблюдалась в камбии главного корня и в апикальной меристеме придаточных корней, в то время как в боковых корнях активность экспансинов была существенно ниже (Colmer et al., 2004; Chen et al., 2018).

В корневой системе моркови *Daucus carota* L. выявлена экспрессия 30 генов экспансинов *DcEXP*, которые во время развития корня разделяют клетки сосудистого камбия, вторичной ксилемы и флоэмы в различных

направлениях, что непосредственно приводит к увеличению размера корней моркови, которые становятся корнеплодами, употребляемыми в пищу, однако на разных этапах скорость роста не постоянна, что связано с экспрессией различных экспансинов на каждой стадии развития (Wang et al., 2019).

В растительных организмах существует запрограммированный ответ на стресс, который при влиянии абиотических факторов на растение активирует экспрессию экспансинов, что способствует изменению структуры клеточной стенки (Кнох, 2008). В условиях засоления и дефицита воды скорость роста корневой системы увеличивается, в первую очередь, за счет растяжения клеточных стенок корня благодаря высокой активности белков экспансинов и повышенной чувствительности этих стенок к экспансинам (Wu et al., 1996; Chen et al., 2018). Сверхэкспрессия генов белков экспансинов улучшает рост корневой системы путем активации механизма растяжения клеточных стенок (Lin et al., 2011; Kuluev et al., 2018). Все это доказывает участие экспансинов в регуляции стрессоустойчивости растительных организмов при влиянии абиотических стресс-факторов, таких как засуха, гипотермия и засоление за счет поддержания роста клеток корневой системы в условиях дефицита влаги (Zhao et al., 2011; Xu et al., 2014; Kuluev et al., 2016). Сверхэкспрессия генов экспансинов *NtEXPA1* (Кулуев и др., 2014) и *NtEXPA5* (Кулуев и др., 2013) положительно влияла на параметры роста этих трансгенных растений табака по сравнению с растениями дикого типа в условиях гипотермии, засоления и засухи. Также трансгенные растения табака со сверхэкспрессией генов экспансинов тополя *PtoEXPA12* (Zhang et al., 2018) и пшеницы *TaEXPA2* (Ren et al., 2018) были более устойчивыми к кадмию. Сверхэкспрессия гена экспансина розы *RhEXPA4* у арабидопсиса обеспечивает высокую толерантность растений к засухе, засолению, а также способствует увеличению числа боковых корней (Dai et al., 2012; Lü et al., 2013), а сверхэкспрессия гена экспансина пшеницы *TaEXPB23* повышает устойчивость трансгенного табака к этим же абиотическим стресс-факторам

(Li et al., 2011; Han et al., 2012). В условиях солевого стресса (150 мМ NaCl) трансгенные растения табака с экспрессией гена *TaEXPB23* имеют более длинные первичные корни, чем у дикого типа, а при сильном солевом стрессе (300 мМ NaCl) молодые и старые растения дикого типа погибают, в то время как трансгенные растения с геном *TaEXPB23* демонстрируют жизнеспособность (Han et al., 2012). Сверхэкспрессия гена озимой пшеницы *TaEXPA8* в растениях арабидопсиса повышает устойчивость к влиянию низких температур (Peng et al., 2019).

При влиянии засоления на корневую систему растений происходит укорочение зоны растяжения корня и снижение интенсивности роста клеток за счет уменьшения скорости роста клеточных стенок (Bernstein, Kafkafi, 2002). Однако в солеустойчивом гибриде кукурузы при засолении в корневой системе происходит накопление фитогормонов ауксинов и АБК, которые повышают экспрессию экспансинов и поддерживают рост корней в этих условиях (Zorb et al., 2013). У мхов *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch&Schimp. также присутствуют α и β -экспансины, на экспрессию которых влияют фитогормоны и окружающая среда, поэтому в этих растениях при действии стресс-факторов происходит дифференцировка клеточных стенок в ответ на стресс благодаря большому количеству различных экспансинов в растительном организме (Schipper et al., 2002; Jadamba et al., 2020). В верхушке корневой системы кукурузы при влиянии низкого водного потенциала также происходило увеличение уровня транскриптов экспансинов *ZmEXP1*, *ZmEXP5*, *ZmEXPB2* и *ZmEXPB8*, которое коррелировало с улучшением свойств растяжения клеточной стенки, а также с усилением активности экспансинов. Таким образом, паттерн экспрессии генов экспансинов коррелирует с положением зоны роста в корнях кукурузы, и регуляция экспрессии гена экспансина является частью механизма, используемого для регуляции характера роста кончика корня (Wu et al., 2001a; 2001b). Считается, что данная реакция роста корней является адаптивной, так как при ограниченном водоснабжении корни могут концентрировать свое

использование ресурсов и могут удлиняться с минимальными затратами, для поиска воды в новых объемах почвы (Sharp et al., 1990; Voetberg and Sharp, 1991; Liang et al., 1997; Liu et al., 2019).

1.5. Роль генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы (XTHs) — апопластические гидролитические ферменты, которые осуществляют реакции трансгликозилирования и расщепления связующих гликанов, прежде всего ксилоглюканов (Van Sandt et al., 2007; Takahashi et al., 2020). Они были описаны и проанализированы одновременно в двух лабораториях: Fry с коллегами в Великобритании (Smith, Fry, 1991) и Nishitani с командой исследователей в Японии (Nishitani, Tominaga, 1991).

Ферменты ксилоглюканэндотрансгликозилазы, наряду с экспансинами, выполняют важнейшую роль в процессе растяжения клеточных стенок корневой системы растений, совмещая при этом одновременно функции гидролаз и трансгликозилаз. Как гидролаза, фермент расщепляет молекулы ксилоглюканов, а как трансгликозилаза – присоединяет синтезированные ксилоглюканы к остову клеточной стенки, а также катализирует реконструкцию имеющихся ксилоглюканов посредством трансгликозилирования (Catala et al., 2001). При этом во время соединения двух молекул между собой, происходит разрыв гликозидной связи у молекулы-донора и происходит присоединение к невозстанавливаемому концу молекулы-акцептора (Rose et al., 2002). У ксилоглюканэндотрансгликозилаз довольно широкий оптимум pH (от 5.0 до 6.5), который позволяет этим ферментам быть активным в большом диапазоне физиологических условий (Van Sandt et al., 2006; Tiika et al., 2021). Эндотрансгликозилазное действие ферментов XTHs локализовано в корнях различных сосудистых растений: плаунов, папоротников, голосеменных,

однодольных и двудольных растений. Наибольшая активность ферментов наблюдается в клеточной стенке эпидермиса в зоне растяжения и в трихобластах в зоне дифференцировки (Vissenberg et al., 2003). У *A. thaliana* действие ХТНs ограничено зоной удлинения корня (Vissenberg et al., 2000) и местом закладки будущего корневого волоска (Vissenberg et al., 2001).

Механизм действия ферментов ХТНs играет существенную роль в процессах изменения длины полимеров, благодаря включению ксилоглюканов в клеточную стенку с последующей регуляцией их размеров. Активность ксилоглюканэндотрансгликозилаз *in vivo* определена в экстрактах тканей *A. thaliana*, которая коррелирует с делением и растяжением клеток в меристематических тканях (Xu et al., 1996; Han et al., 2017). У растений ферменты ксилоглюканэндотрансгликозилазы кодируются мультигенным семейством генов. В геноме *A. thaliana* имеются 33 открытых рамок считывания, которые кодируют ферменты с активностью ХТНs, в *O. sativa* насчитывается 29 ORFs, а в геноме *Populus trichocarpa* Torr. & A.Gray ex Hook. – 41 ORFs для ХТНs (Yokoяama, Nishitani, 2001; Geisler-Lee et al., 2004; Yokoяama et al., 2004). В исследовании генов ХТНs растения *Solanum lycopersicum* L. выявлен различный уровень содержания мРНК гена *LeEXT* (повышенный уровень) и *LeXET2* (пониженный уровень) при обработке ауксином, что свидетельствует о том, что эти два гена выполняют различные функции в клеточной стенке, а также индуцируются различными фитогормонами: *LeEXT* – ауксином, а *LeXET2* – гиббереллином. Ген *LeEXT* участвует в расщеплении ксилоглюканов при растяжении первичной клеточной стенки, а ген *LeXET2* отвечает за трансгликозилирование между ксилоглюканами для включения новых ксилоглюкановых полисахаридов в клеточную стенку (Catala et al., 2001). Ксилоглюканэндотрансгликозилазы активны в областях удлинения корней и волосковых клеток сосудистых растений (Vissenberg et al., 2003). Было обнаружено, что семь генов ХТНs у растений *O. sativa* специфически экспрессируются в корнях проростков (Yokoяama et al., 2004).

В экспериментах с трансгенными растениями томатов с экспрессией гена *SIXTH1* выявлена прямая корреляция между активностью ХТН и растяжением клеточной стенки: при повышенной экспрессии показатели растяжимости выше, а у растений со сниженной экспрессией гена растяжение клеток соответственно ниже. Это свидетельствует об активном участии ксилоглюканэндотрансгликозилаз в реструктуризации клеточных стенок в зонах роста растений (Miedes et al., 2011; Xu et al., 2020). Также существенная роль ксилоглюканов в растяжении клеточных стенок была доказана на трансгенных мутантах *A. thaliana xtt1/xtt2* с дефицитом ксилоглюканов (Park, Cosgrove, 2011; Yan et al., 2019).

Анализ растений табака, трансформированных фрагментом гена *NtXET-1* в антисмысловой ориентации показал, что снижение экспрессии этого гена может вызывать укрепление клеточных стенок за счет уменьшения скорости метаболизма и гидролиза ксилоглюканов (Herbers et al., 2001).

В корнях петрушки *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss. были идентифицированы две формы ксилоглюканэндотрансгликозилаз, отличающиеся показателями изоэлектрических точек. Форма с показателем изоэлектрической точки 4.6 (высокоактивная форма) была обнаружена в экстракте клеточной стенки и цитозоле, также она обладала способностью расщеплять ксилоглюканы или растворимые производные целлюлозы и переводить их части в ксилоглюкановые олигосахариды или целлоолигосахариды. Вторая форма (низкоактивная форма) имела показатель изоэлектрической точки равный 4.75 и была представлена в меньшем количестве в клеточных стенках по сравнению с высокоактивной формой. Однако активность и стабильность обеих форм имела широкий диапазон pH с двумя оптимумами: в кислой среде при pH 5.8 и в щелочной при pH 8.8, при этом каждая из форм представляла собой трансгликозилазу. При исследовании фракционирования корней петрушки выявлено, что основная часть активности ХТН ($\approx 89\%$) локализуется в клеточных стенках. Около 10% от общей активности обнаруживается в цитозоле. Оставшийся 1%

активности обнаруживался в субклеточных фракциях, которые включают пластиды, митохондрии и микросомальные мембраны (Garajová et al., 2008).

ХТНs и их гены играют существенную роль при ответе растительного организма на воздействие абиотических стрессов. К примеру, сверхэкспрессия гена *CaXTH3* *Capsicum annuum* L. в трансгенных растениях *A. thaliana* повышала их устойчивость к засухе и засолению. Быстрая индукция транскриптов *CaXTH* (клоны кодирующие гомологи ХТНs: *pCaXTH1*, *pCaXTH2* и *pCaXTH3*) была обнаружена уже после 10-минутной обработки тканей корня *A. thaliana* раствором 200 мМ NaCl (Cho et al., 2006). А трансгенные растения *S. lycopersicum* с повышенной экспрессией гена *CaXTH3* имели улучшенные параметры роста корней при влиянии NaCl в концентрации 100 мМ (Choi et al., 2011; Xu et al., 2020).

Выявлено, что пониженная экспрессия гена *AtXTH31* в *A. thaliana* уменьшает содержание поглощенных ионов Al^{3+} и улучшает устойчивость к алюминиевому стрессу (Zhu et al., 2012; Che et al., 2016). В то же время сверхэкспрессия генов *AtXTH17* и *AtXTH15* увеличивает толерантность к алюминию у трансгенных растений *A. thaliana* по сравнению с диким типом (Zhu et al., 2012; 2013). В мутациях с потерей функции гена *AtXTH30* растения становятся толерантными к засолению. Кроме того, продукт гена *AtXTH30* модулирует структуру ксилоглюканов, содержание целлюлозы и деполимеризацию микротрубочек в ответ на солевой стресс (Yan et al., 2019). Трансгенные растения *A. thaliana* с повышенной экспрессией гена *AtXTH19* имеют пониженную устойчивость к замерзанию как после холодной (выше 0 °C), так и после минусовой акклиматизации по сравнению с *A. thaliana* дикого типа, что связано с различиями в составе и структуре клеточной стенки. Это связано с тем, что эпитопы ксилоглюкан-специфического антитела LM25 имеются в большом количестве в сосудистой сети растений *A. thaliana* дикого типа после минусовой акклиматизации, однако они отсутствуют у мутантных растений с геном *AtXTH19* (Takahashi et al., 2020). Экспрессия генов *AtXTH19* и *AtXTH23* в растениях *A. thaliana* повышается

под действием солевого стресса и воздействия brassиностероидов, при этом при засолении нарушается рост боковых корней, а увеличенная экспрессия данных генов повышает толерантность растений к действию соли и увеличивает инициацию боковых корней (Xu et al., 2020). Дефицит бора индуцирует экспрессию гена *AtXTH22* в трансгенных растениях *A. thaliana*. Растения *A. thaliana* с повышенной экспрессией гена *AtXTH22* проявляют большую чувствительность к дефициту бора, чем растения *A. thaliana* дикого типа, в то время как растения с пониженной экспрессией данного гена были более устойчивы к низкому содержанию бора (Zhang et al., 2022). Гены *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* и *AtXTH20* *A. thaliana* дикого типа имеют похожие последовательности нуклеотидов промоторных и кодирующих областей, филогенетически тесно связаны и экспрессируются преимущественно в корневой системе (Yokoуama, Nishitani, 2001b). *AtXTH17* и *AtXTH18* экспрессируются во всех типах тканей в зоне удлинения и дифференцировки корневой системы, а экспрессия *AtXTH19* обнаруживается во всех типах тканей во всех зонах корня. Ген *AtXTH20* экспрессируется в сосудистых тканях в базальной области зоны дифференцировки корней. *AtXTH17* и *AtXTH18* нарабатываются во всех типах клеток в зонах растяжения и дифференцировки корня, тогда как *AtXTH19* – в апикальной делящейся и зоне растяжения, а также в зоне дифференцировки, и активируется ауксином. А ген *AtXTH20* экспрессируется специфически в сосудистых тканях в базальной зрелой области корня (Vissenberg et al., 2005). Ген *AtXTH21* у *A. thaliana* играет основную роль в росте первичных корней, изменяя отложение целлюлозы и удлинение клеточной стенки (Liu et al., 2007; Zang et al., 2022). Гены *AtXTH14* и *AtXTH26* *A. thaliana* являются специфичными для корневой системы, их экспрессия локализуется в зоне дифференцировки, около места соединения корня с побегом, корневых волосках, однако не обнаруживаются в зоне удлинения корня (Besnel et al., 2006). *AtXTH14* и *AtXTH26* уменьшают растяжение в модельной системе изолированных клеточных стенок, инактивированных нагреванием, а при

введении в растущие корни любого из них происходит снижение удлинения клеток в зависимости от концентрации, что вызывает аномальную морфологию корневых волосков. Это редкий случай, когда рекомбинантные и очищенные XTHs, добавленные к растущим корням, показали явное влияние на растяжение клеток корневой системы посредством снижения удлинения, поскольку гены *AtXTH14* и *AtXTH26* играют роль в укреплении боковых стенок корневых волосков и клеточных стенок в зоне дифференцировки корней после завершения роста клеток (Maris et al., 2009; Tiika et al., 2021).

Сверхэкспрессия гена *DkXTH1* хурмы в трансгенных растениях *A. thaliana* повышает их устойчивость к засолению, засухе и воздействию АБК, а также позитивно влияет на рост корней и листьев (Han et al., 2017). Экспрессия гена *NtEXGT* табака увеличивается в условиях засоления, засухи и низких положительных температур и трансгенные растения табака с повышенной экспрессией данного гена имеют увеличенные размеры стеблей, листьев и корней при воздействии абиотических стрессов (Kuluev et al., 2017). Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PnXTH1* характеризуются увеличенными размерами листьев при воздействии засоления по сравнению с растениями дикого типа (Кулуев и др., 2018). Сверхэкспрессия гена *PeXTH* *Populus euphratica* Oliver. в трансгенных растениях табака повышает солеустойчивость за счет улучшения мясистости листьев (Han et al., 2013).

Все гены семейства *XTHs* *Salicornia europaea* L. имели дискретные паттерны экспрессии в разных тканях, в разное время и при влиянии различных абиотических стрессов. Гены *SeXTH27* и *SeXTH15* экспрессировались при солевом стрессе в побегах и корнях при действии 200 мМ NaCl в течение 24 ч, а ген *SeXTH34* экспрессировался при 48-часовом влиянии засухи в побегах и корнях (Tiika et al., 2021). Протеомный анализ кукурузы показывает, что экспрессия генов XTHs дифференцированно регулируется при засухе (Zhu et al., 2007). Некоторые гены

ксилоглюканэндотрансгликозилаз китайской капусты (*Brassica rapa* L.) активируются при тепловом стрессе (Yang et al., 2006), а ген *OsXET9* риса индуцируется при холодовом стрессе (Dong et al., 2011; Takahashi et al., 2020). Дифференциальная экспрессия генов *NtXTHs* табака наблюдалась при различных стрессовых условиях, и экспрессия почти всех *NtXTHs* была повышена после влияния различных стрессовых факторов, таких как засоление, защелачивание, засуха, гипотермия (Wang et al., 2018). Засуха также влияла на экспрессию и активность ксилоглюканэндотрансгликозилаз 3-дневных проростков различных сортов твердой пшеницы (Iurlaro et al., 2016).

1.6. Взаимосвязь экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз с антиоксидантной системой растений

При действии абиотических стресс-факторов в клетках растительного организма происходит окислительный стресс, вызванный влиянием активных форм кислорода (АФК) ($O_2^{\bullet-}$ – супероксидный анион-радикал, O_2^{\bullet} – синглетный кислород, H_2O_2 – перекись водорода, OH^{\bullet} – гидроксидный радикал, HO_2^{\bullet} – гидропероксидный радикал) и зависящие от скорости образования и разрушения этих форм (Foyer, Noctor, 2015). В свою очередь, окислительный стресс вызывает серьезные изменения в метаболических реакциях растения, существенные повреждения и некроз тканей побегов и корней, что в дальнейшем приводит к гибели растительного организма. В ответ на АФК у растений активируется антиоксидантная система, которая состоит из различных ферментов и ряда низкомолекулярных соединений, служащих для нейтрализации АФК, что предотвращает гибель растительных тканей (Полесская, 2007).

Участие активных форм кислорода в регуляции механизмов деления и растяжения клеток корневой системы различается в зависимости от вида АФК и места их образования. Например, супероксид-анион необходим корням для роста растяжением, а продукты распада перекиси водорода

взаимозависимы с появлением сшивок в клеточных стенках, что вызывает торможение растяжения корневой системы. В то же время накопление различных видов АФК в корневой системе соответствует зонам корней: $O_2^{\cdot-}$ – в зоне растяжения, H_2O_2 – в зоне дифференцировки и в клеточных стенках во время образования корневых волосков (Dunand et al., 2007). Так же выявлено, что гидроксильный радикал принимает непосредственное участие в разрыхлении клеточных стенок, что существенно влияет на процесс растяжения первичного корня. Данный радикал появляется при взаимодействии супероксидного анион-радикала с апопластическими пероксидазами. Таким образом, рост корневой системы напрямую зависит от влияния различных АФК на апопласт корня (Liszka et al., 2004). Активные формы кислорода помогают разрыву ковалентных связей между компонентами клеточных стенок корневой системы, улучшая их разрыхление и способствуя их растяжению (Schmidt et al., 2016). Также АФК регулирует удлинение клеток корней при гравитропизме (Krieger et al., 2016), способствуя образованию боковых корней и их активному ветвлению (Manzano et al., 2014; Mei et al., 2017). Растения *A. thaliana*, имеющие мутацию в гене НАДФН-оксидазы характеризуются сниженным уровнем АФК в клетках корневых волосков по сравнению с диким типом, так как для их образования необходим кислород (Foreman et al., 2003). Также рост клеток растяжением, опосредованный гиббереллинами связан с тем, что НАДФН-оксидазы плазмалеммы продуцируют АФК (Achard et al., 2008). Таким образом, активные формы кислорода играют важную роль в процессах роста и развития корневой системы, непосредственно влияя на механизмы деления клеток корня, растяжения клеточных стенок, а также образования корневых волосков и боковых корней (Стриж, 2009).

Накапливается все больше данных о том, что сверхэкспрессия генов экспансинов и ХТНs действует на продуктивность и стрессоустойчивость растительных организмов посредством влияния не только на деление и растяжение клеток, но и через антиоксидантную систему. К примеру,

растения со сверхэкспрессией гена экспансина риса *OsEXPA7* имели меньшее количество АФК и повышенную антиоксидантную активность при сравнении с диким типом (Jadamba et al., 2020), а сверхэкспрессия гена экспансина пшеницы *TaEXPA2* увеличивала устойчивость к хлориду кадмия непосредственно увеличивая активность компонентов антиоксидантной системы (Ren et al., 2018). Повышенная экспрессия ХТНs положительно влияет на антиоксидантную систему за счет повышения активности некоторых ее компонентов, что напрямую воздействует на рост корней при действии абиотических стресс-факторов (Бережнева и др., 2022).

Таким образом, АФК и сверхэкспрессия генов экспансинов и ХТНs оказывают большое влияние на рост и растяжение клеточных стенок корневой системы за счет улучшения процессов деления и растяжения, а также активации компонентов антиоксидантной системы. Однако механизмы взаимодействия экспансинов и ХТНs с антиоксидантной системой в регуляции роста и развития остаются малоизученными и требуют новых экспериментальных исследований с привлечением трансгенных и редактированных растений.

1.7. Заключение к главе 1

Главная особенность растительных организмов заключается в том, что они ведут полностью прикрепленный образ жизни, поэтому механизмы регуляции роста и растяжения органов играют важную роль в жизнедеятельности растений при влиянии различных абиотических стресс-факторов, таких как засоление, гипотермия и воздействие тяжелых металлов. Белки экспансины и гидролитические ферменты ксилоглюканэндотрансгликозилазы являются важнейшими элементами, отвечающими за растяжение клеток в побегах, междоузлиях, гипокотильях, плодах, однако участие экспансинов и ХТНs в растяжении клеток корневой системы изучено в меньшей степени. В настоящее время выявлено и изучено большое количество экспансинов и ХТНs, экспрессирующихся в побеге и

помогающих растению выживать в условиях стресса, при этом экспансины и XTHs, работающие в корневой системе и отвечающие за растяжение клеточных стенок и стрессоустойчивость при дефиците влаги остаются малоизученными. Корень из-за своей зональности является хорошим объектом изучения механизмов роста и растяжения, поэтому большинство имеющихся работ по экспансинам и XTHs сделаны на таких модельных объектах, как *N. tabacum* и *A. thaliana*, в которые часто переносят гены экспансинов и XTHs из других растений. Однако до сих пор функции многих экспансинов и XTHs в корневой системе остаются малоизученными, но при этом существует ряд работ, доказывающих, что экспрессия экспансинов и XTHs помогает растениям в регуляции роста и растяжения клеток при влиянии абиотических стресс-факторов, в том числе, за счет улучшения показателей антиоксидантной системы. В литературе очень мало исследований, направленных на оценку влияния генов экспансинов и XTHs на компоненты антиоксидантной системы растений при воздействии различных абиотических стресс-факторов. Здесь требуются комплексные исследования большого числа биохимических маркеров антиоксидантной системы.

Многие гены экспансинов и XTHs могут заменять друг друга по механизму влияния на рост растяжением, который компенсируется в случае утраты определенных генов, первоначальная работа которых заключается во влиянии на рост растяжением корневой системы. Данная диссертационная работа направлена на поиск ответов на вопрос, как сверхэкспрессия генов экспансинов и XTHs влияет на рост и растяжение корневой системы растений в условиях дефицита влаги, который возникает при влиянии различных абиотических стресс-факторов, таких как засоление, воздействие низких положительных температур и кадмия, а также на изучение происходящих изменений в компонентах антиоксидантной системы при действии абиотических факторов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 второго поколения со сверхэкспрессией генов экспансинов *NtEXPA1* (Кулуев и др., 2014) и *NtEXPA5* (Кулуев и др., 2013) (клонированы из *N. tabacum*), *PnEXPA3* (Кулуев и др., 2013) (клонирован из *Populus nigra* L.), *AtEXPA10* (Кулуев и др., 2013) (клонирован из *Arabidopsis thaliana* L.) и со сверхэкспрессией ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT* (Kuluev et al., 2017) (клонирован из *N. tabacum*), *PtrXTH1* (Кулуев и др., 2018) (клонирован из *Populus tremula* L.). Все трансгенные растения созданы ранее в ИБГ УФИЦ РАН Кулуевым Б.Р. совместно с с.н.с. Князевым А.В. и диссертантом Бережневой З.А. (Кулуев и др., 2013, 2014, 2015, 2017, 2018).

В качестве контроля использовались растения табака дикого типа (ДТ) сорта Petit Havana линии SR1.

2.2. Реактивы

Агар для микроклонального размножения растений (Диаэм, Россия)

Агароза для электрофореза (Sigma, США)

Альбумин бычий сывороточный (Sigma, США)

Аскорбиновая кислота (АК) ($C_6H_8O_6$) (Диаэм, Россия)

Ацетат кадмия ($(CH_3COO)_2Cd$) (РЕАХИМ, Россия)

Белизна (Башхим, Россия)

Борная кислота (H_3BO_3) (Химреактивснаб, Россия)

Гваякол (Sigma-Aldrich, Германия)

Гигромицин (Invitrogen, Китай)

Гидроксид калия (КОН) (Диаэм, Россия)

Гидроксид натрия (NaOH) (Диаэм, Россия)

Глицерин (Химреактивснаб, Россия)

Глутатион восстановленный (GSH) (Helicon, Россия)

Глутатион окисленный (GSSG) (Helicon, Россия)

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP):

дАТФ (МВІ Fermentas, Литва; Силекс, Россия)

дЦТФ (МВІ Fermentas, Литва; Силекс, Россия)

дГТФ (МВІ Fermentas, Литва; Силекс, Россия)

дТТФ (МВІ Fermentas, Литва; Силекс, Россия)

Диметилсульфоксид (ДМСО) (Helicon, Россия)

Динариевая соль ЭДТА ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) (Химреактивснаб, Россия)

Додецилсульфат натрия (SDS) (Servicebio Technology, Китай)

Изопропиловый спирт ($\text{C}_3\text{H}_8\text{OH}$) (ЭКОС-1, Россия)

Иодид калия (KI) (Химреактивснаб, Россия)

Калий фосфорнокислый двузамещенный ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (РеаХим, Россия)

Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) (РеаХим, Россия)

Кальций хлорид 2-водный ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (Химреактивснаб, Россия)

Краситель SYBR Green I (Lumiprobe, Россия)

Кумасси бриллиантовый синий G-250 (Диаэм, Россия)

Магний сернокислый 7-водный ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) (Диаэм, Россия)

Меркаптоэтанол (Helicon, Россия)

Метафосфорная кислота (HPO_3) (Sigma-Aldrich, Германия)

Молибдат аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) (РеаХим, Россия)

Молибдат натрия ($\text{Na}_2(\text{MoO}_4)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (PanReasAppliChem, Германия)

Нингидрин (Диаэм, Россия)

Нитрат аммония (NH_4NO_3) (Химреактивснаб, Россия)

Нитрат калия (KNO_3) (PanReasAppliChem, Германия)

n-Нитросиний тетразолий (НСТ) (Диаэм, Россия)

Олиго(dT)праймер (Евроген, Россия)

Ортофосфат натрия водный ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) (Компонент-Реактив, Россия)

Ортофосфорная кислота (H_3PO_4) (Sigma-Aldrich, Германия)

Ортофталальдегид (ОФА) (Диаэм, Россия)

Парамолибдат аммония водный ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times \text{H}_2\text{O}$) (РеаХим, Россия)

Перекись водорода (H_2O_2) (РусбиоАгроФарм, Россия)

Поливинилпирролидон (ПВП) (Диаэм, Россия)

Пролин-L (Диаэм, Россия)

Протеиназа К (Евроген, Россия)

Ревертаза M МуLV (NEB, США)

Ревертазный буфер (5x) (NEB, США)

Рибофлавин (Фармстандарт Уфа-ВИТА, Россия)

Сахароза (Химприбор-СПб, Россия)

Серная кислота (H_2SO_4) (Химреактивснаб, Россия)

Соляная кислота (HCl) (Химреактивснаб, Россия)

Сульфат железа 7-водный ($FeSO_4 \times 7H_2O$) (Химреактивснаб, Россия)

Сульфат марганца ($MnSO_4 \times H_2O$) (Химреактивснаб, Россия)

Сульфат меди 5-водный ($CuSO_4 \times 5H_2O$) (Химреактивснаб, Россия)

Сульфосалициловая кислота ($C_7H_6O_6S$) (Химреактивснаб, Россия)

Тиобарбитуровая кислота (ТБК) (РеаХим, Россия) (Диаэм, Россия)

Тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3$) (Purex, Китай)

Толуол (Диаэм, Россия)

Тризол (Thermo FS, США)

Трис-гидроксиэтиламинометан (Трис) (Sigma, США)

Трис-гидрохлорид (Трис-HCl) (Promega, США)

Тритон X-100 (Диаэм, Россия)

Трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Диаэм, Россия)

Уксусная кислота (CH_3COOH) (Химреактивснаб, Россия)

Фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) (Helicon, Россия)

Фенол (Химреактивснаб, Россия)

Формалин (БиоХим-НН, Россия)

1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) (РЕАХИМ, Россия)

Хлорид кобальта 6-водный ($CoCl_2 \times 6H_2O$) (PanReasAppliChem, Германия)

Хлорид натрия (NaCl) (Химреактивснаб, Россия)

Хлороформ (ЭКОС-1, Россия)

Цефотаксим (АО Биохимик, Россия)

Цинк сернокислый ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) (Химреактивснаб, Россия)

Эндонуклеазы рестрикции *PstI*, *EcoRI*, *HindIII* (MBI Fermentas, Литва)

Этидиум бромид ($C_{21}H_{20}BrN_3$) (Fluka, Швейцария)

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Helicon, Россия)

HS-Taq ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* (Биолабмикс, Россия)

N-этилмалеимид (НЭМ) (Диаэм, Россия)

SE-Буфер ДНК полимераза T4 (СибЭнзим, Россия)

2.3. Составы использованных стандартных растворов

Состав компонентов среды Мурасиге-Скуга (МС):

| | |
|---------------------------|--|
| Концентрат макросолей 20x | 0.4 М NH_4NO_3 , 0.37 М KNO_3 , 24 мМ KH_2PO_4 , 30 мМ $MgSO_4 \times 7H_2O$ |
| $CaCl_2$ 20x | 60 мМ $CaCl_2 \times 2H_2O$ |
| Концентрат микросолей 20x | 40 мМ H_3BO_3 , 40 мМ $MnSO_4 \times H_2O$, 12 мМ $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 2 мМ KI, 0.04 мМ $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0.04 мМ $CoCl_2 \times 6H_2O$, 0.26 мМ $Na_2(MoO_4)_2 \times H_2O$ |
| Fe-EDTA | 20 мМ $FeSO_4 \times 7H_2O$, 22 мМ $Na_2ЭДТА$ |

Составы растворов:

| | |
|-------------------|--|
| Реактив Брэдфорда | 2.5 мл C_2H_5OH , 5 мл 85% H_3PO_4 , 1 мл $HCl_{конц.}$, 41.5 мл $H_2O_{дист.}$, краситель Кумасси G250 |
| 0.015 М GSH | 23 мг GSH, 5 мл деионизированной $H_2O_{дист.}$ |
| 0.015 М ХДНБ | 15 мг ХДНБ, 5 мл 80% C_2H_5OH |
| 100 мМ ФМСФ | 34 мг ФМСФ, 2 мл C_3H_8OH |
| 17 мМ АК | 30 мг АК, 10 мл $H_2O_{дист.}$ |
| 5 мМ ЭДТА | 20 мг ЭДТА, 10 мл $H_2O_{дист.}$ |
| 0.06 % H_2O_2 | 200 мкл 3 % H_2O_2 , 9.8 мл $H_2O_{дист.}$ |
| 9 мМ гваякол | 183 мг гваякола, 50 мл $H_2O_{дист.}$ |

| | |
|---|---|
| 0.025 % рибофлавин | 2.5 мг рибофлавин, 10 мл кипящей H ₂ O _{дист} |
| 0.05 % НСТ | 5 мг НСТ, 10 мл H ₂ O _{дист} |
| 0.24 % Na ₂ ЭДТА | 24 мг Na ₂ ЭДТА, 10 мл H ₂ O _{дист} |
| Реактив для определения общей антиоксидантной способности | 1635 мкл H ₂ SO ₄ (конц.), 0.247 г (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ×H ₂ O, 0.532 г Na ₃ PO ₄ ×12H ₂ O, 50 мл H ₂ O _{дист} |
| Нингидриновый реактив | 140 mM нингидрин, 5 M CH ₃ COOH, 2.4 M H ₃ PO ₄ |
| 3 % сульфосалициловая кислота | 3 г сульфосалициловой кислоты, 100 мл H ₂ O _{дист} |
| 20 % ТХУ | 20 мл ТХУ, 80 мл H ₂ O _{дист} |
| 0,05 % ТБК | 50 мг ТБК, 100 мл 20 % ТХУ |
| 25 % метафосфорная кислота | 25 г метафосфорной кислоты, 100 мл H ₂ O _{дист} |
| 0.1 н NaOH | 0.04 г NaOH, 100 мл H ₂ O _{дист} |
| 0.04 М НЭМ | 25 мг НЭМ, 5 мл H ₂ O _{дист} |
| 0.1 % ОФА | 5 мг ОФА, 5 мл C ₂ H ₅ OH |
| Раствор GSH (стандарт) | 2.3 мг GSH, 1 мл 0.1 М К-фосфатный буфер pH 8.0 |
| Раствор GSSG (стандарт) | 2 мг GSSG, 1 мл 0.1 н NaOH |
| 20 % SDS | 20 г SDS, 100 мл H ₂ O _{дист} |
| 6 М NaCl | 35 г NaCl, 100 мл H ₂ O _{дист} |
| 1% агароза | 1 г агарозы, 2 мл 50x TAE, 98 мл H ₂ O _{дист} |
| Раствор для проведения ПЦР (для 1 образца) | 10x SE-Буфер ДНК полимеразы T4 (3 мкл), 10 пМ праймера F (1 мкл), 10 пМ праймера R (1 мкл), по 200 мкМ dNTP (3 мкл) |
| Смесь для проведения ОТ-ПЦР (для 1 образца) | 4 мкл ревертазного буфера (5x), 6 мкл dNTP (2.5mM), 1 мкл ревертазы, 2 мкл олиго-dT-праймера, довести до 17 мкл H ₂ O _{стер} |

Составы буферов:

| | |
|---|---|
| Солевой буфер для выделения ДНК | 0.4 М NaCl, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-HCl, довести до 30 мл H ₂ O _{дист} (стер.), pH 8.0 |
| 1x TAE буфер | 40 мМ Трис, 20 мМ CH ₃ COOH, 2 мМ ЭДТА, довести до 1000 мл H ₂ O _{дист} , pH 7.6 |
| 0.05 М К-фосфатный буфер | 0.0308 М K ₂ HPO ₄ , 0.0192 М KH ₂ PO ₄ , довести до 100 мл H ₂ O _{дист} , pH 7.2 |
| 0.1 М К-фосфатный буфер | 0.0935 М K ₂ HPO ₄ , 0.0065 М KH ₂ PO ₄ , 0.005 М ЭДТА, довести до 100 мл H ₂ O _{дист} , pH 8.0 |
| 50 мМ Na-фосфатного буфера | 0.028 М Na ₂ HPO ₄ , 0.021 М NaH ₂ PO ₄ , довести до 100 мл H ₂ O _{дист} , pH 7.0 |
| 50 мМ К, Na-фосфатный буфер | 0.2 М KH ₂ PO ₄ , 0.2 М NaOH, довести до 100 мл H ₂ O _{дист} , pH 6.5/7.0/7.8 |
| 60 мМ К-фосфатный буфер | 0.0322 М K ₂ HPO ₄ , 0.0278 М KH ₂ PO ₄ , довести до 100 мл H ₂ O _{дист} , pH 7.0 |
| Экстрагирующий буфер для определения содержания растворимого белка | 50 мМ Na-фосфатного буфера, 0.1 мМ ЭДТА, 0.1% тритон X-100, 10 мМ меркаптоэтанол, pH 7.0 |
| Экстрагирующий буфер для определения активности каталазы и гваяколпероксидазы | 60 мМ К-фосфатный буфер, 0.1 % тритон X-100, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.0 |
| Экстрагирующий буфер для определения активности глутатион-S-трансферазы | 680 мг K ₂ HPO ₄ , 4 г ПВП, 3 мг ЭДТА, 280 мкл Тритон X-100, 100 мл H ₂ O _{дист} |
| Экстрагирующий буфер для определения активности аскорбатпероксидазы | 500 мг ПВП, 50 мл 50 мМ К, Na-фосфатного буфера (pH 7.8), 7.5 мл 17 мМ раствора АК, 500 мкл 100 мМ раствора ФМСФ |

| | |
|---|---|
| Экстрагирующий буфер для определения активности супероксиддисмутазы | 2 мл 50 мМ К, Na-фосфатного буфера (pH 7.8), 20 мкл 100 мМ ФМСФ |
| Экстрагирующий буфер для определения содержания GSH и GSSG | 13 мл 25 % метафосфорной кислоты, 11.25 мл 0.1 М К-фосфатного буфера pH 8.0 |

2.4. Получение, отбор и анализ трансгенных растений табака

Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 со сверхэкспрессией всех исследуемых генов были получены ранее с помощью метода агробактериальной трансформации листовых дисков (Кулуев и др., 2013, 2014, 2015, 2017, 2018). В каждом случае для регуляции экспрессии трансгена использовался конститутивный промотор вируса цветной капусты 35S CaMV. Отбор трансгенных растений табака проводили на основании результатов ПЦР-анализов на наличие исследуемых генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз, гистохимического анализа на активность фермента β -глюкуронидазы, а также селективной устойчивости к антибиотику гигромицину трансформантов (T_1). Морфометрический анализ корней проводили на трансгенных растениях второго поколения (T_2), которые были выращены на среде Мурасиге-Скуга (МС) при добавлении гигромицина для элиминации нетрансгенных растений на стадии проростков.

Тотальная РНК из корней табака со сверхэкспрессией исследуемых генов была выделена с использованием тризола, при этом цепи кДНК строили с использованием олиго(dT)-праймера и MMuLV-ревертазы. Благодаря методу ОТ-ПЦР в режиме реального времени определяли количественное содержание мРНК исследуемых генов с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I, ставя реакцию в термоциклере Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Research, Австралия). Ген фактора элонгации *EF-*

1α (AF120093.1) табака использовали в качестве стандарта, уровень экспрессии которого считали за 100%. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР всех исследуемых генов представлены в таблице 2.1.

Для последующих экспериментов были отобраны линии трансгенных растений с относительно высоким содержанием транскриптов исследуемых генов в корнях.

Таблица 2.1

Исследованные гены и последовательности праймеров для ОТ-ПЦР

| Ген | Номер доступа в GenBank | Последовательность праймеров |
|-----------------|-------------------------|---|
| <i>EF-1α</i> | AF120093.1 | 5'-GAATTGGTACTGTCCCTGTT-3' 5'-TTGCCAATCTGTCCTGAAT-3' |
| <i>NtEXPA1</i> | AF049350 | 5'-AACATTGGCATTACAGAGGTG-3' 5'-AAGGGTTGGCCATTGAGATA-3' |
| <i>NtEXPA5</i> | AF049354 | 5'-TGGTGCAATCCCCCTCTC-3' 5'-GACATTGTTTGCCATCCAGTATTA-3' |
| <i>PnEXPA3</i> | AY435101.1 | 5'-GTGCGTGAATGACCCGAAATGG-3' 5'-CTGTGAACCTTATGCCTCCTCTCC-3' |
| <i>AtEXPA10</i> | NM_102440.4 | 5'-ATGGGTCATCTTGGGTTCTT-3' 5'-TTAACGGAACCTGTCCACCGG-3' |
| <i>NtEXGT</i> | AB017025.1 | 5'-ATTTACTGCCTCCTACACATCATTC-3' 5'-ATCTCTGTCCTTAGTGCATTCTGGTG-3' |
| <i>PtrXTH1</i> | JX431932.1 | 5'-TTCCAATCAAAAGGTTCATACT-3' 5'-ATCATCGGCATTCCATAGG-3' |

2.5. Выделение и очистка тотальной ДНК растений методом солевой экстракции

Для выделения тотальной ДНК использовали метод экстракции с применением стерильного солевого буфера (Aljanabi, Martinez, 1997). Проводили гомогенизацию 100 мг листа в 400 мкл солевого буфера, далее добавляли 40 мкл 20% SDS и 8 мкл протеиназы К (концентрация фермента в растворе 400 мкг/мл), а затем перемешивали. Образцы в течение часа инкубировали при 55-65 °С, затем к ним добавляли 300 мкл 6М NaCl, смесь перемешивали на вортексе и центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 30 мин. Полученный супернатант переносили в новую микропробирку с добавлением равного количества изопропилового спирта, затем перемешивали и инкубировали в течение 1 часа в морозилке (-20°С). Далее образцы центрифугировали в холодной центрифуге (+4°С) при 12 тыс. об/мин в течение 20 мин. Полученный осадок промывали 70% C₂H₅OH 2 раза и растворяли в 100 мкл аптечной стерильной воды для инъекций.

2.6. Гель-электрофорез ДНК

Электрофоретическое фракционирование ДНК проводили с использованием 1% агарозного геля (с учетом напряжения по 8-10 V на 1 см длины геля) (Sealey et al., 1982) на приборах модели SubCell GT WIDI MINI (приборы модели Bio-Rad 250/2,5 (США). При проведении гель-электрофореза был использован 1хТАЕ-буфер, а для сравнения размеров, в качестве ДНК маркеров, применялись фрагменты ДНК λ-фага, которые были получены после расщепления ДНК фага с помощью рестрикционных эндонуклеаз *Pst*I, *Eco*RI, *Hind*III, а также 1 kb маркер (Евроген, Россия).

После электрофореза гели окрашивали этидиум бромидом (5 мкг / мл) в течение 10 мин. Флуоресценцию нуклеиновых кислот наблюдали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 302 нм в гель-документационной системе GelDoc EZ Imager. Гели были сфотографированы с помощью Gel Camera System (UVP, Inc. США).

2.7. Полимеразная цепная реакция

ДНК исследуемых генов была амплифицирована с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Mullis, Faloona, 1987) на приборе терцик (ДНК-технология, Россия) и с добавлением в конечную смесь HS-Taq ДНК-полимеразы и праймеров, синтезированных в ООО «Синтол» (Москва). Часто также использовали обычную Taq-полимеразу.

Реакция проходила в 30 мкл раствора для проведения ПЦР с добавлением 0.1 мкг ДНК и 1 единицы HS-Taq ДНК-полимеразы по следующей схеме: начальная денатурация (3 мин при +94 °С), затем 30 циклов амплификации при денатурации (40 сек при +94 °С), отжиге (40 сек в диапазоне температур от +49 °С до +60 °С) и синтезе (1-2 мин при +72 °С), и заканчивается амплификация инкубацией в течение 2 мин при +72 °С.

Результаты проведения амплификации проверяли на агарозном горизонтальном гель-электрофорезе (см. глава 2.6).

2.8. Выделение РНК и построение кДНК

Для выделения РНК в замороженной микропробирке пестиком растирали растительную ткань, затем добавляли 1 мл холодного тризола, перемешивали на вортексе и встряхивали в течение 10 мин в Intelli-Mixer RM-1L (SIA «ELMI», Латвия). Далее центрифугировали при 14.5 тыс. об/мин в течение 10 мин, а полученный супернатант отбирали в новые микропробирки и добавляли хлороформ с последующим встряхиванием 10 мин и дальнейшим центрифугированием в течение еще 10 мин. Этап с добавлением хлороформа повторяли 2-3 раза до исчезновения интерфазы. РНК осаждали добавлением эквивалентного количества изопропанола в морозильнике (-20 °С) минимум 1 час. Далее раствор центрифугировали в течение 20 минут при 14.5 тыс. об/мин и осадок промывали 70 % этиловым спиртом и центрифугировали при 9000 об/мин в течение 10 мин. Эту процедуру повторяли еще 2 раза, а полученный осадок подсушивали на воздухе и растворяли в стерильной воде для инъекций (Chomczynski et al.,

1987).

Для построения кДНК использовали смесь для проведения ОТ-ПЦР с добавлением 2-3 мкл РНК, реакцию проводили в течение 1 часа при +37 - +40 °С. Полученную кДНК непосредственно перед ПЦР разбавляли в 2 раза и прогревали в термостате при +65 °С в течение 2 мин.

Для амплификации исследуемых генов использовали Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, а также стандартную Taq-полимеразу (Myers, Gelfand, 1991).

2.9. Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Количественное содержание мРНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I (интеркалирующего красителя) (Nolan et al., 2006) на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). Полученные результаты анализировались по методу $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak et al., 2001), для сравнения полученных результатов, в качестве контроля использовался ген фактора элонгации *EF-1 α* , уровень экспрессии которого принимали за 100 %. Для проведения реакции амплификации использовали 200 мкл микропробирки (AXYGEN, Inc., США) с общим объемом реакционной смеси 25 мкл и применением стандартного набора реактивов (Синтол, Россия).

2.10. Стерилизация и выращивание семян трансгенных растений табака на селективной среде

Семена исследуемых трансгенных растений табака были стерилизованы и посажены в чашки Петри с неполной агаризованной средой МС с добавлением гигромицина (МС без инозитола и витаминов Гамборга), рН 5.7. Семена контрольных растений (дикий тип, ДТ) выращивали на среде МС без антибиотиков.

Перед посадкой семена промывали 1 мин 70% этанолом, а затем стерилизовали 15% белизной (стандартная белизна, 15% гипохлорит натрия)

в течение 8 мин. После стерилизации семена промывали 5 раз стерильной водой MilliQ.

Стерилизованные семена с помощью бактериологической петли высаживали на чашки Петри и выращивали в камере роста Binder (Германия) с фотопериодом 16 часов день / 8 часов ночь, освещенности около 140 мкмоль/(м²с) в течение 10±1 дней для последующих опытов.

2.11. Оценка параметров роста корней трансгенных растений табака на вертикально-ориентированных чашках Петри

Трансгенные растения проращивали в камере роста Binder (Германия) при температуре +25 °С, освещенности около 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде с гиргоницином отбирали проростки с одинаковыми размерами корней и переносили их на вертикально-ориентированные чашки Петри (табл. 2.2). Для вертикально-ориентированных чашек Петри использовали агаризованную среду МС без антибиотиков, инозитола и витаминов Гамборга.

Таблица 2.2

Составы сред и условия, используемые для экспериментов на вертикально-ориентированных чашках Петри

| Общий состав среды МС | Добавление реактива/температура | | Эксперимент |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------|--------------------|
| макросоли 1x CaCl ₂ 1x | – / +25 °С | | нормальные условия |
| | – / +12 °С | | гипотермия |
| микросоли 1x Fe-EDTA 1x | NaCl / +25 °С | 50 мМ | солевой стресс |
| | | 100 мМ | |
| 0.65 % агар 1.5 % сахара | CdAc / +25 °С | 100 мкМ | воздействие кадмия |
| | | 200 мкМ | |
| | | 400 мкМ | |

При проведении экспериментов растения табака сажали в 2 ряда по центру чашки, направляя их корни в одну сторону. В одну чашку Петри ($d=10$ см) помещается около 14 растений с учетом того, чтобы растения не мешали друг другу расти. Чашки Петри располагали вертикально, соблюдая направление корней по принципу геотропизма.

Перед началом эксперимента проводили измерение длины корней табака, а по окончании 10 дней эксперимента определяли прирост корней при норме и при действии различных стресс-факторов, по сравнению с изначальной длиной.

2.12. Фиксация и микроскопический анализ корней

Корни табака фиксировали в 4% формалине на фосфатном буфере (pH 7.2) в течение 4 ч при комнатной температуре. Далее корни переносили в 30% глицерин, приготовленный на 2% диметилсульфоксиде, и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем корни перекладывали в «просветляющий раствор» для подготовки к просмотру препаратов под микроскопом. Состав «просветляющего раствора»: 3.7 М KI и 12.5 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в 100 мл 2% диметилсульфоксиде. Далее 35 мл этого раствора смешивали с 65 мл 100% глицерина. Корни табаков выдерживали в «просветляющем растворе» не меньше 1.5 ч, после этого готовили временные препараты в 50% глицерине (Филин, Иванов, 2016).

Размеры клеток корней измеряли в вариантах: нормальные условия, 50 мМ NaCl, 200 мкМ CdAc. Каждая повторность включала в себя по 10 корней и по 150 клеток на каждую вариацию опыта в каждой исследуемой линии ($n=150$). Измерения размеров клеток паренхимы проводили в зоне всасывания корневой системы. Площадь клеток измеряли на флуоресцентном микроскопе Biozero BZ-8100 (Япония).

2.13. Определение содержания общего растворимого белка

Для определения содержания общего растворимого белка (ОРБ) 50 мг корней табака растирали с помощью пестика в 1 мл экстрагирующего буфера pH 7.0, далее проводили экстракцию в холодильнике при +3 °С в течение 20 мин, а затем центрифугировали в микроцентрифуге MicroCL 17R (Thermo Scientific, США) 15 мин при 13.5 тыс. об/мин. В лунку плашки вносили 200 мкл реактива Брэдфорда и 10 мкл полученного ранее экстракта, выдерживали 15 мин и измеряли оптическую плотность при $\lambda = 590$ нм с помощью спектрофотометра EnSpire 2300 Multilabel Reader Perken (x3) («PerkinElmer», США) (Bradford, 1976). Концентрацию белка C_1 (мкг/мл) определяли по калибровочной кривой, которую строили по растворам БСА в концентрациях 0.1, 0.2, 0.4 и 0.6 мг/мл.

Содержание ОРБ в образцах рассчитывали по формуле 2.1:

$$C_{\sigma} = \frac{C_1 \times K_{разб} \times V_{экстр}}{m} \times 1000, \quad (2.1)$$

где C_{σ} – содержание ОРБ в навеске (мг/г), C_1 – количество белка в аликвоте (мкг/мл), $K_{разб}$ – коэффициент разбавления экстракта, $V_{экстр}$ – объем экстракта (мл), m – масса навески (г), 1000 – коэффициент пересчета (1000 мкг = 1 мг).

2.14. Анализ состояния компонентов антиоксидантной системы трансгенных растений табака

Перед проведением биохимического анализа антиоксидантной системы растений табака при нормальных условиях и действии стрессовых факторов (влияние 200 мкМ ацетата Cd), растения выращивали на вертикально-ориентированных чашках Петри в течение 10 ± 1 дней при температуре +25 °С, освещенности около 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 часов (свет/темнота) на питательной среде МС в в камере роста Binder (Германия). Для экспериментов использовали корни растений, которые были зафиксированы после окончания эксперимента. Активность ферментов рассчитывали на 1 мг общего растворимого белка, в то время как другие показатели пересчитывали на 1 г сырой массы. Для анализа показателей

антиоксидантной системы использовали спектрофотометр EnSpire 2300 Multilabel Reader Perkin (x3) («PerkinElmer», США). Для определения активности антиоксидантной системы брали по 15 растений для каждой повторности (n=15) и по 6 повторов для каждого опыта.

2.14.1. Определение активности супероксиддисмутазы

Навеску (50 мг) корней трансгенных растений с помощью пестика измельчали в микропробирках с добавлением 200 мкл экстрагирующего буфера, далее объем доводили до 1 мл, затем гомогенат центрифугировали при 12 тыс. об/мин в течение 5 мин, а готовый экстракт хранили при +4 °С.

Реакционная смесь состояла из 20 мкл 0.05 % раствора НСТ, 200 мкл 50 мМ К, Na-фосфатного буфера (рН 7.8), 10 мкл 0.24 % раствора Na-ЭДТА и 10 мкл экстракта. Эксперимент проводился в двух вариантах: световой и темновой фазах, поэтому плашки с реакционной смесью дублировались. Для контроля использовали ту же самую реакционную смесь, но вместо экстракта вносили буфер, он нужен для расчета максимального образования формазана. Реакцию запускали добавлением 10 мкл 0.025 % рибофлавина на 15 мин, а затем останавливали выключением света. Оптическую плотность измеряли при $\lambda = 560$ нм (Giannopolitis, Ries, 1977; Полеская и др., 2004).

За единицу активности супероксиддисмутазы (СОД) принимали такое количество фермента, которое может подавить реакцию восстановления НСТ на 50 %. Для этого сначала высчитывали оптическую плотность максимального образования формазана по формуле 2.2:

$$a = 1 - \frac{D_{\text{образца}} \times 0.5}{\frac{D_{\text{формазана}}}{2}}, \quad (2.2)$$

где a – относительная единица активности, D – оптическая плотность (образца и формазана).

Общую активность СОД рассчитывали по формуле 2.3:

$$E = \frac{a \times V \times X}{C \times L}, \quad (2.3)$$

где E – активность фермента (нМ/сек×мг белка), a – относительная единица активности, рассчитанная по формуле 2.2, V – объем полученного экстракта (мл), X – конечное разведение экстракта в лунке, L – толщина слоя (мм), C – количество белка в данной навеске (мг).

2.14.2. Определение активности каталазы

Для определения активности фермента каталазы (КАТ) 50 мг корней табака растирали с помощью пестика в микропробирках с добавлением 100 мкл специального экстрагирующего буфера, далее гомогенат доводили до 1 мл (Panchuck et al., 2002). Микропробирки с экстрактами выдерживали 15 минут в холодильнике (+4°C), а затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин, далее для определения активности использовали супернатант. В лунку плашки наливали 150 мкл 0.03%-го раствора H_2O_2 и добавляли 10 мкл экстракта для запуска реакции. В холостую пробу вместо экстракта добавляли $H_2O_{дист.}$, в качестве контроля использовался раствор, в котором вместо H_2O_2 была использована вода. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 4% раствора $(NH_4)_2MoO_4$. Интенсивность получившейся окраски измеряли на спектрофотометре при $\lambda = 410$ нм (Королюк и др., 1988). Активность КАТ рассчитывали по формуле 2.4:

$$E = (A_{хол} - A_{он}) \times V \times t \times K, \quad (2.4)$$

где E – активность КАТ (Е/мг белка), $A_{хол}$ – экстинция холостой пробы, $A_{он}$ – экстинция опытной пробы, V – объем вносимой пробы (0.01 мл), t – время инкубации (600 сек), K – коэффициент миллимолярной экстинции H_2O_2 ($22.2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.14.3. Определение активности аскорбатпероксидазы

Навеску корней (50 мг) табака растирали в микропробирках в 200 мкл экстракционного буфера (рН 7.8) и общий объем доводили до 1 мл, далее

гомогенат центрифугировали 5 мин при 12 тыс. об/мин, а полученный супернатант хранили в холодильнике при +4 °С и использовали для оценки активности аскорбатпероксидазы (АПОК).

Реакционная смесь для анализа состояла из 20 мкл 50 мМ К, Na-фосфатного буфера (рН 7.0), 30 мкл раствора аскорбиновой кислоты (АК), 30 мкл раствора ЭДТА и 10 мкл супернатанта. Реакция активировалась путем внесения в лунку с реакционной смесью 30 мкл 0.06% раствора H₂O₂. Анализ оптической плотности полученного раствора проводили при $\lambda = 290$ нм через каждые 10 сек в течение 150 сек (Verma, Dubey, 2003). Активность фермента АПОК рассчитывалась по формуле 2.5:

$$E = \frac{\frac{\Delta D}{T} \times X}{L \times C}, \quad (2.5)$$

где E – активность фермента (Е/мг белка), ΔD – изменение оптической плотности ($D_{кон.} - D_{нач.}$), X – конечное разведение вытяжки в кювете (отношение объема реакционной смеси к количеству вносимого экстракта), T – время реакции (сек), L – длина оптического пути (см), равная 0.1435 см, C – содержание белка в пробе (мг).

2.14.4. Определение активности гваяколпероксидазы

Для определения активности гваяколпероксидазы (ГПОК) навеску корней табака (50 мг) растирали в 200 мкл экстрагирующего буфера (рН 7.0), потом доводили объем до 1 мл. Полученный гомогенат выдерживали в холодильнике при +4°С в течение 15 мин, а затем центрифугировали при 10 тыс. об/мин 15 мин. Для определения активности ГПОК использовали чистый супернатант.

В лунку плашки наливали 200 мкл экстрагирующего фосфатного буфера, 20 мкл 9 мМ гваякола и 10 мкл экстракта. Для контрольных образцов вместо экстракта добавляли 10 мкл воды. Реакцию запускали посредством добавления 20 мкл 0.15 % раствора H₂O₂ и через 20 сек детектировали первое

измерение, далее показатели спектрофотометра фиксировали через каждые 20 сек в течение 2 мин. Измерения оптической плотности раствора проводили при $\lambda = 436$ нм (Kronfuss et al., 1996). Активность ГПОК рассчитывали по формуле 2.6:

$$E = \frac{(D_2 - D_1) \times V \times V_2 \times 60}{(t_2 - t_1) \times V_1 \times H}, \quad (2.6)$$

где E – активность фермента (Е/мг белка), D_1 – первое измерение оптической плотности, D_2 – конечное измерение оптической плотности, V – общий объем исходной вытяжки (см³), V_1 – объем экстракта, взятый для опыта (см³), V_2 – общий объем раствора в лунке (см³), t_1 – время начала опыта (сек), t_2 – время окончания опыта (сек), H – масса навески (г), 60 – коэффициент перевода в минуты.

2.14.5. Определение активности глутатион-S-трансферазы

Корни табака (50 мг) растирали с помощью пестика в 100 мкл экстракционного буфера, затем доводили объем до 1 мл. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 5 мин при 10 тыс. об/мин. Для оценки активности фермента глутатион-S-трансферазы (GST) использовали полученный супернатант.

Реакционная смесь состояла из 200 мкл 0.1 М К, Na-фосфатного буфера, 200 мкл 0.015 М раствора GSH и 100 мкл супернатанта. Реакция начиналась после внесения в кювету 200 мкл 0.015 М раствора ХДНБ (см. глава 2.3). Контрольная проба состояла из тех же растворов, но без добавления ХДНБ (Habig et al., 1974).

В ходе реакции происходит увеличение количества глутатион-S-конъюгатов, которые образуются между GSH и ХДНБ, которые регистрируются спектрофотометрически при $\lambda = 340$ нм каждые 3 сек в течение 1.5 мин при температуре +25 °С. Расчет активности GST осуществляли по формуле 2.7:

$$E = \frac{\frac{\Delta D}{T} \times V_{\text{реакц. смеси}} \times X}{e \times V_{\text{пробы}} \times C \times L}, \quad (2.7)$$

где E – активность фермента (мкМ/сек×мг белка), ΔD – изменение оптической плотности ($D_{\text{кон.}} - D_{\text{нач.}}$), T – время реакции (мин), X – разведение используемого объёма вытяжки в реакционной смеси, e – коэффициент молярной экстинкции при 340 нм ($9.6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), C – содержание белка в пробе (мг), $V_{\text{пробы}}$ – объём пробы, используемый для определения активности GST (мл), $V_{\text{реакц. смеси}}$ – объём реакционной смеси в кювете (мл), L – длина оптического пути (см), равная 0.1435 см.

2.14.6. Определение содержания восстановленного и окисленного глутатиона

Навеску корней (50 мг) растирали с помощью пестика в 800 мкл экстрагирующего буфера, далее центрифугировали в течение 10 мин при 13 тыс. об/мин, а после отбирали супернатант, который использовался для определения глутатионового пула.

Для определения восстановленного глутатиона (GSH) делали смесь из 100 мкл супернатанта и 900 мкл 0.1 М К-фосфатного буфера (рН 8.0). Затем в ячейку плашки вносили 180 мкл буфера, 10 мкл смеси и 10 мкл 0.1 % ортофталдальдегида (ОФА) и проводили флуоресцентную спектрофотометрию реакции при длине волны $\lambda = 420$ нм в течение 5 мин ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм).

Для определения содержания окисленного глутатиона (GSSG) использовали 100 мкл супернатанта, который смешивали с 40 мкл 0.04 % N-этилмалеимида и проводили инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем в раствор добавляли 860 мкл 0.1 н NaOH и получали необходимую смесь. В ячейку плашки вносили 180 мкл 0.1 н NaOH, 10 мкл ранее полученной смеси и 10 мкл 0.1 % ОФА. Флуоресцентную

спектрофотометрию проводили при $\lambda = 420$ нм в течение 5 мин ($\lambda_{\text{возб}} = 350$ нм) (Шалыго и др., 2007).

По графику интенсивности флуоресценции продуктов реакции с течением времени находили максимальное значение. С использованием калибровочной кривой выявляли содержание окисленного (GSSG) и восстановленного (GSH) глутатиона в аликвоте и по формуле 2.8 рассчитывали их содержание в растительных тканях:

$$C_{\text{глут}} = \frac{C_{\text{ол}} \times K \times V}{m}, \quad (2.8)$$

где $C_{\text{глут}}$ – содержание глутатиона GSH или GSSG (мкг/г сырой массы), $C_{\text{ол}}$ – содержание глутатиона GSH или GSSG в аликвоте, K – коэффициент разбавления, V – объем экстракта (мл), m – масса образца (г).

2.14.7. Определение содержания пролина

Навеску корней табака (50 мг) гомогенизировали в 200 мкл раствора 3 % сульфосалициловой кислоты, затем общий объем доводили до 1 мл. Полученный экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 10 тыс. об/мин. Затем смешивали 300 мкл экстракта, 300 мкл ледяной CH_3COOH и 300 мкл нингидринового реактива, и полученную смесь нагревали в термостате при $+96$ °С в течение 60 мин, потом быстро охлаждали. В охлажденную смесь добавляли 1 мл толуола, перемешивали и после разделения раствора на отдельные фракции, окрашенный толуоловый слой спектрофотометрировали при $\lambda = 520$ нм по сравнению с чистым толуолом.

Для определения концентрации пролина сначала строили калибровочную кривую, используя стандарт L-пролина в навесках от 10 до 60 мг. Содержание пролина в исследуемых образцах рассчитывали по формуле 2.9:

$$C_n = \frac{n \times V}{P}, \quad (2.9)$$

где C_n – содержание пролина (мкг/г сырой массы), n – значение по калибровочной кривой, V – объем разведения (мл), P – масса навески (г). Данный метод определения содержания пролина был разработан Bates с коллегами (1973), а модифицирован Khedr с соавторами (2003).

2.14.8. Определение содержания водорастворимых сахаров

Растительный материал (50 мг) растирали в 200 мкл 80 % этанола, затем доводили общий объем до 1 мл и центрифугировали в течение 15 минут при 10 тыс. об/мин. Далее 200 мкл полученного экстракта переносили в новую микропробирку, выпаривали спирт в термостате при +80 °С в течение 2 ч, затем добавляли 400 мкл $H_2O_{дист}$ и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. По истечению этого времени экстракт центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 15 мин, а затем отбирали по 100 мкл в отдельную микропробирку и добавляли 0.5 мл 4 % фенола и 2.5 мл концентрированной H_2SO_4 . Содержание водорастворимых сахаров (ВРС) определяли путем измерения оптической плотности получившихся растворов при $\lambda = 490$ нм. В качестве контроля использовался раствор фенола и серной кислоты, а для построения калибровочной кривой использовали раствор сахарозы в концентрации 1 мг/мл в диапазоне объема от 5 до 50 мкл (Dubois et al., 1956).

Расчет ВРС проводился по формуле 2.10:

$$C_{сах} = \frac{C_{ол} \times V_{экстр}}{m_{обр}}, \quad (2.10)$$

где $C_{сах}$ – содержание ВРС (мг/г сырой массы), $C_{ол}$ – содержание ВРС в аликвоте, $V_{экстр}$ – объем экстракта (мкл), $m_{обр}$ – масса навески (г).

2.14.9. Определение общей антиоксидантной способности

Корни растений табака (50 мг) растирали в 100 мкл 80 % этанола в микропробирках с помощью пестиков, затем доводили объем до 1 мл. Инкубировали экстракт в течение 10 мин, при этом встряхивая пробирки

каждые 2 мин, далее центрифугировали в течение 15 мин при 13.5 тыс. об/мин при температуре +4 °С.

Реактив для определения общей антиоксидантной способности (ОАС) (см. глава 2.3) в объеме 2 мл смешивали с 200 мкл экстракта и инкубировали в термостате «Термит» (ДНК-Технология, Россия) в течение 60 мин при +95 °С. По истечению этого времени микропробирки охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность полученного раствора при $\lambda = 695$ нм на спектрофотометре. В качестве контроля использовался 80 % этанол, а калибровочную кривую строили по концентрациям АК (Boestfleisch et al., 2014). Результат ОАС выражали в количестве мг эквивалентов АК на 1 грамм сырой массы.

2.15. Статистический анализ и программное обеспечение

Средний прирост корней всех растений табака был рассчитан в программе Microsoft Excel 2003, там же были построены гистограммы. Графическую компиляцию гистограмм и фотографий проводили в программе Adobe Photoshop CC 2019. Результаты оценки представляли в виде арифметических средних показателей с планками погрешностей в виде ошибок среднего. Статистическое различие данных показателей анализировали с применением теста Duncan для независимых выборок (Duncan, 1955) в программе Statistica 10 (русифицированная версия).

2.16. Дизайн исследования

Исследование направлено на комплексное изучение роли генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции и обеспечении роста корней трансгенных растений *N. tabacum* L. при воздействии стрессовых факторов, таких как гипотермия, засоление и кадмий. Исходя из этой задачи исследование было разделено на 4 основных блока (рис. 2.1).

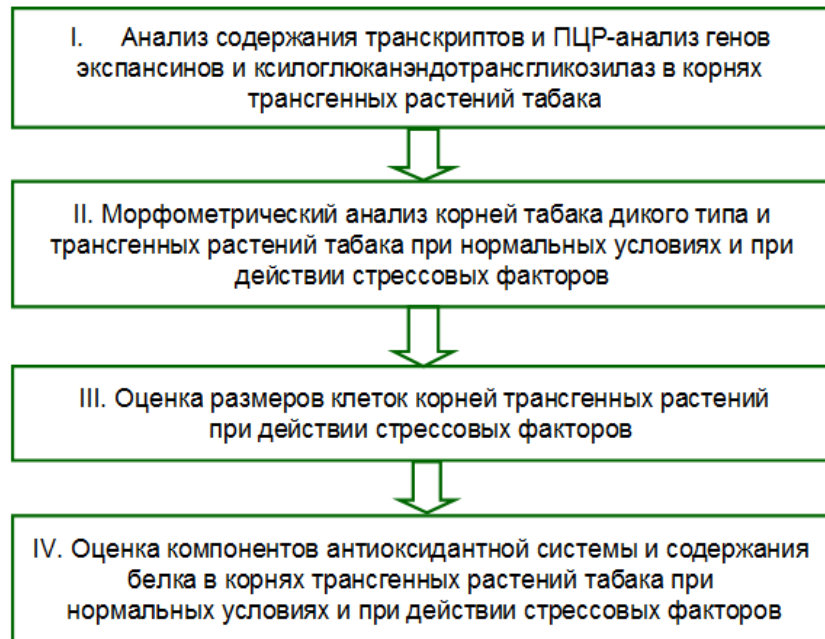


Рисунок 2.1. Дизайн исследования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ содержания транскриптов и ПЦР-анализ генов *EXPs* и *XTHs* в корнях трансгенных растений табака

В полученных нами ранее 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 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 побегах и корнях трансгенных растений с исследуемыми генами. Измерения проводили полуколичественно, оценивая результаты гель-электрофореза с помощью программы Total Lab, соотнося с содержанием транскриптов референсного гена *EF-1 α* (см. глава 2.4).

По результатам оценки содержания транскриптов генов было выяснено, что не во всех трансгенных линиях, в которых уровень экспрессии генов *EXPs* и *XTHs* было высоким в побегах, оно проявлялось и в корнях.

Из 15 ранее полученных растений с геном *NtEXPA1* (Кулуев и др., 2014) при анализе содержания транскриптов гена *EXPA1* было выявлено, что 11 растений имеют повышенное содержание транскрипта гена в побегах, из них только в образцах 5, 13 и 15 наблюдалось повышенное содержание транскрипта гена *EXPA1* в корнях (рис. 3.1А).

Из 56 ранее полученных растений с геном *NtEXPA5* (Кулуев и др., 2013) 15 имели повышенную экспрессию трансгена в побегах и только в линиях 42, 49 и 56 наблюдалось повышенное содержание транскриптов *NtEXPA5* в корнях (рис. 3.1В).

Из 14 ранее полученных растений с геном *PnEXPA3* (Кулуев и др., 2013) только 11 имели повышенную экспрессию трансгена в побегах и из них 8 линий имели высокое содержание транскрипта *PnEXPA3* в корнях (рис. 3.1Б).

Из 40 ранее полученных табаков с геном *AtEXPA10* (Кулуев и др., 2013) только 5 растений имели повышенную экспрессию гена *AtEXPA10* в побегах, из них только в образцах 7, 9, 39 и 40 обнаружилось повышенное содержание транскрипта трансгена в корнях (рис. 3.1Г).

Из 25 ранее полученных растений с геном *NtEXGT* (Kuluev et al., 2017) 12 растений имели повышенное содержание транскриптов этого гена в побегах и только в образцах 17, 21 и 22 обнаружился повышенный уровень его экспрессии в корнях (рис. 3.1Д).

Из 37 ранее полученных растений с геном *PtrXTH1* (Кулуев и др., 2018), только 14 растений имели повышенное содержание транскриптов в побегах, а в образцах 3, 16, 17, 23, 25 и 28 обнаруживалось также увеличенное содержание транскрипта исследуемого гена в корнях (рис 3.1Е).

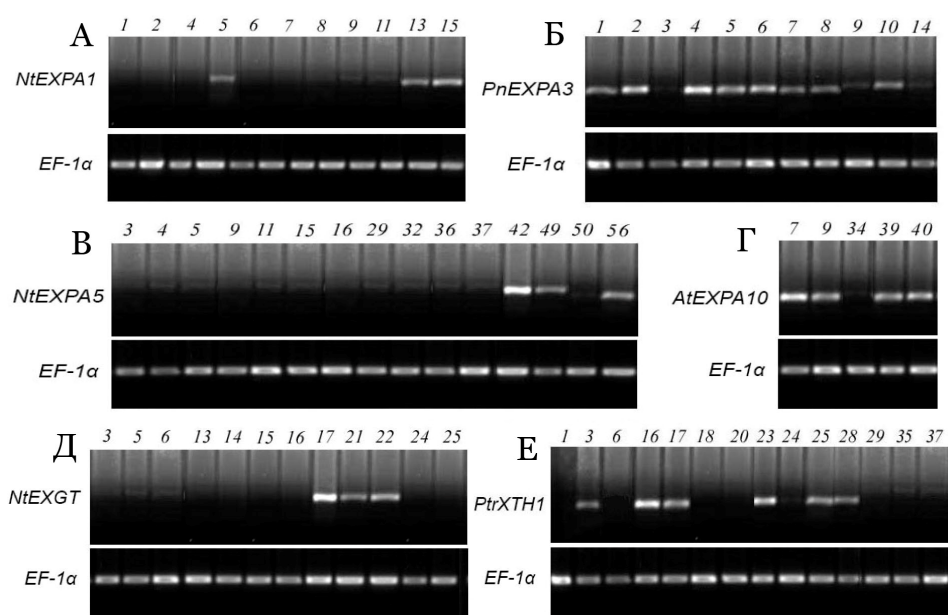


Рисунок 3.1. Электрофоретические спектры ПЦР-продуктов при анализе содержания транскриптов генов экспансинов *NtEXPA1* (А), *NtEXPA5* (В), *PnEXPA3* (Б), *AtEXPA10* (Г) и ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT* (Д), *PtrXTH1* (Е) в корнях трансгенных растений табака полуколичественным методом. *EF-1α* – 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 для последующих опытов по морфометрии, микроскопии и оценке компонентов антиоксидантной системы в корневой системе (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Отбор линий трансгенных растений табака с высоким уровнем экспрессии генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корнях

| Ген | Линии трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов | |
|---------------------------------|---|-------------------------|
| | в побегах | в корнях |
| экспансины | | |
| <i>NtEXPA1</i> | 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15 | 5, 13, 15 |
| <i>NtEXPA5</i> | 3, 4, 5, 9, 11, 15, 16, 29, 32, 36, 37, 42, 49, 50, 56 | 42, 49, 56 |
| <i>PnEXPA3</i> | 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14 | 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 |
| <i>AtEXPA10</i> | 7, 9, 34, 39, 40 | 7, 9, 39, 40 |
| ксилоглюканэндотрансгликозилазы | | |
| <i>NtEXGT</i> | 3, 5, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 21, 22, 24, 25 | 17, 21, 22 |
| <i>PtrXTH1</i> | 1, 3, 6, 16, 17, 18, 20, 23, 24, 25, 28, 29, 35, 37 | 3, 16, 17, 23, 25, 28 |

Для последующих экспериментов было взято по 3 линии со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*, 4 линии – с *AtEXPA10*, 6 линий – с *PtrXTH1* и 8 линий – с *PnEXPA3*. Основным принципом отбора линий – наличие высокого уровня экспрессии исследуемых трансгенов в корнях (табл. 3.1).

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

Для оценки физиологических и морфологических характеристик влияния генов на растения, важнейшую роль играет изучение их корневых

систем, т.к. знание их морфофизиологии дает возможность всесторонне оценить влияние различных трансгенов и стрессовых факторов на растение в целом. Довольно часто применимым является метод изучения корней растений в почвенных условиях, что создает ряд неудобств в лабораторных условиях. Поэтому для оценки морфометрии корневой системы был использован подход с использованием вертикально-ориентированных чашек Петри, который является легким в исполнении, сохраняет стерильность растений, а также позволяет визуально контролировать весь эксперимент (рис. 3.2).

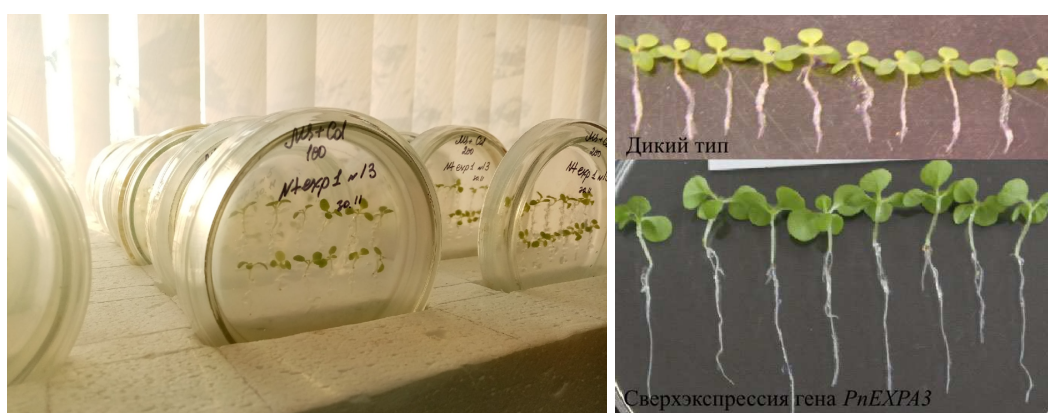


Рисунок 3.2. Постановка эксперимента по выращиванию растений на вертикально-ориентированных чашках Петри и сравнение длины корней табака ДТ и трансгенных растений (для примера показаны трансгенные растения со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* и *PnEXPA3*).

При измерении длины корней осуществлялся замер корней до начала эксперимента и после завершения эксперимента. Далее оценивался прирост длины корня по окончанию срока проведения опыта.

3.2.1. Морфометрический анализ корней трансгенных растений при действии засоления

Засоление почвенного грунта 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

проявляет свой отрицательный эффект напрямую на рост корневой системы растений.

Для выявления оптимальных концентраций NaCl, при которых видна существенная разница в росте корневой системы, был проведен эксперимент на растениях табака ДТ с использованием следующих концентраций NaCl: 25, 50, 100, 150, 200 и 400 мМ. При концентрации соли 25 мМ наблюдалось небольшое улучшение роста корней табака ДТ по сравнению с нормой, при концентрации соли в 50 мМ у растений ДТ был выявлен еще больший прирост корневой системы, по сравнению с нормой. Однако, при концентрациях 100, 150 и 200 мМ прирост корней был примерно одинаковый при каждой концентрации, но меньший, чем при норме. При концентрации 400 мМ NaCl листья табаков становились желтыми, и прироста корней вообще не было. Поэтому было решено оставить минимальную действующую негативно концентрацию 100 мМ, при которой наблюдалось существенное ухудшение роста корней табака в условиях *in vitro*. Таким образом, разница в приросте корней наблюдалась при концентрациях 50 (улучшение роста) и 100 мМ NaCl (чаще всего замедление роста), которые и были использованы для дальнейших опытов на трансгенных растениях. Мы предположили, что при 50 мМ NaCl активируются нативные *EXPs* и *XTHs*, которые и способствовали улучшению роста, тогда как при действии 100 мМ NaCl вероятнее всего могут оказать позитивное влияние трансгены (Kuluev et al., 2017).

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов EXPs при засолении

При выращивании на твердой питательной среде МС в нормальных условиях трансгенные растения со сверхэкспрессией *NtEXPA1* характеризовались более высокими темпами роста корней по сравнению с ДТ (рис. 3.3А).

При действии 50 мМ большой прирост корней наблюдался только у линии 13, а линии 5 и 15 наоборот имели меньший прирост при засолении по сравнению с ДТ (рис. 3.3Б), а при влиянии 100 мМ NaCl прирост корней наблюдался у линий 5 и 13 по сравнению с ДТ (рис. 3.3В).

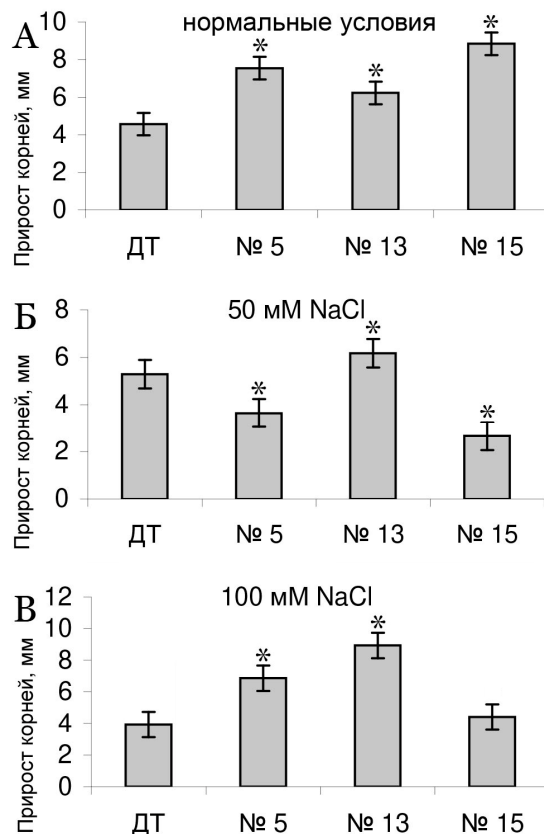


Рисунок 3.3. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *NtEXPA1*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях NaCl: Б) 50 мМ, В) 100 мМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Длина корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXPA5* при выращивании на вертикально-ориентированных чашках Петри была проанализирована у трех линий. При нормальных условиях достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ наблюдалось у линий 49 и 56 (рис. 3.4А). При выращивании на среде с добавлением 50 мМ

NaCl и 100 мМ NaCl улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линий 49 и 56 (рис. 3.4Б, В).

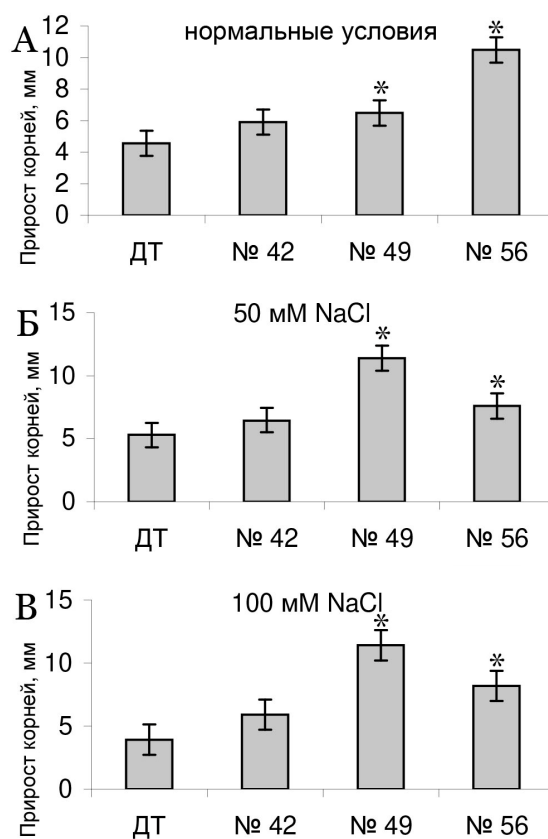


Рисунок 3.4. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *NtEXPA5*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях NaCl: Б) 50 мМ, В) 100 мМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

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. 3.5А). При выращивании на среде с 50 мМ NaCl улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линий 1, 2, 4, 5, 6 и 10 (рис. 3.5Б). При действии 100 мМ NaCl более быстрыми темпами роста корней, чем у ДТ характеризовались линии 2, 4, 5, 6, 7, 8 и 10 (рис. 3.5В).

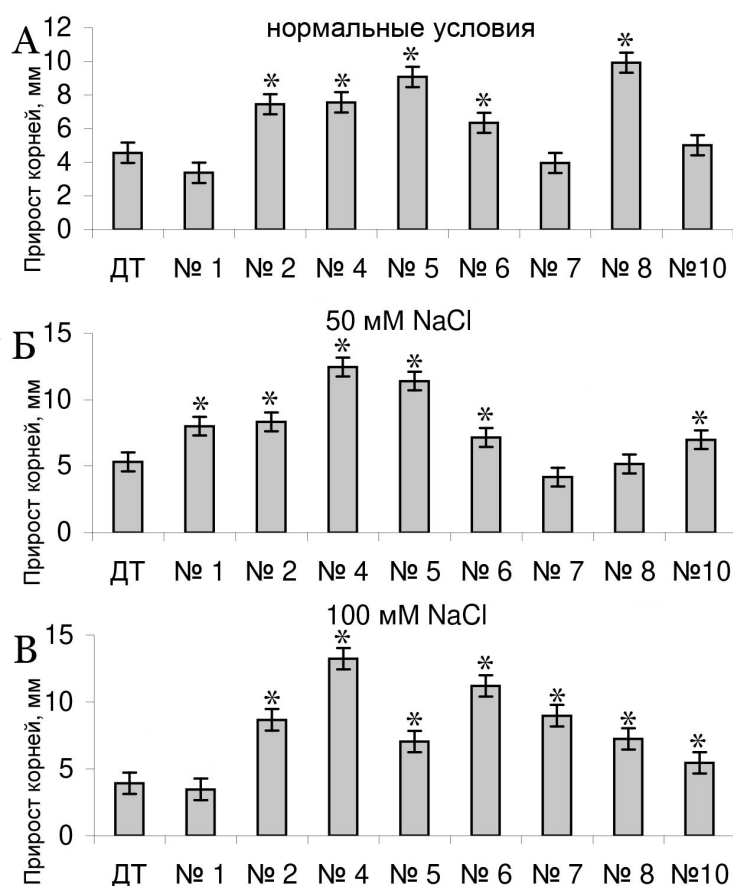


Рисунок 3.5. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *PnEXPA3*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях NaCl: Б) 50 мМ, В) 100 мМ. n = 14. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

У трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *AtEXPA10* при нормальных условиях достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ не наблюдалось (рис. 3.6А). При выращивании на среде с добавлением 50 мМ NaCl улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линий 7, 9 и 39 (рис. 3.6Б). При действии 100 мМ NaCl более быстрыми темпами роста корней, чем у ДТ, характеризовались линии 39 и 40 (рис. 3.6В).

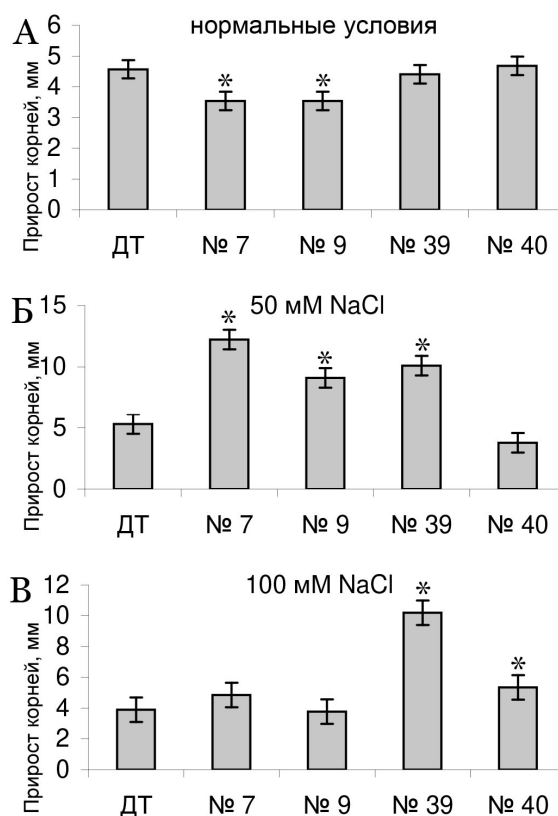


Рисунок 3.6. Приrost корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *AtEXPA10*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях NaCl: Б) 50 мМ, В) 100 мМ. n = 14. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов XTHs при засолении

У трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* при выращивании на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ было выявлено только у линии 17 (рис. 3.7А). При выращивании на среде с добавлением 50 мМ NaCl увеличение ростовых параметров корней по сравнению с ДТ было выявлено только у линии 22, а у линии 21 наблюдалось уменьшение роста корней при действии 50 мМ соли (рис. 3.7Б). При

действии 100 мМ NaCl более быстрыми темпами роста корней, чем у ДТ, характеризовались линии 21 и 22 (рис. 3.7В).

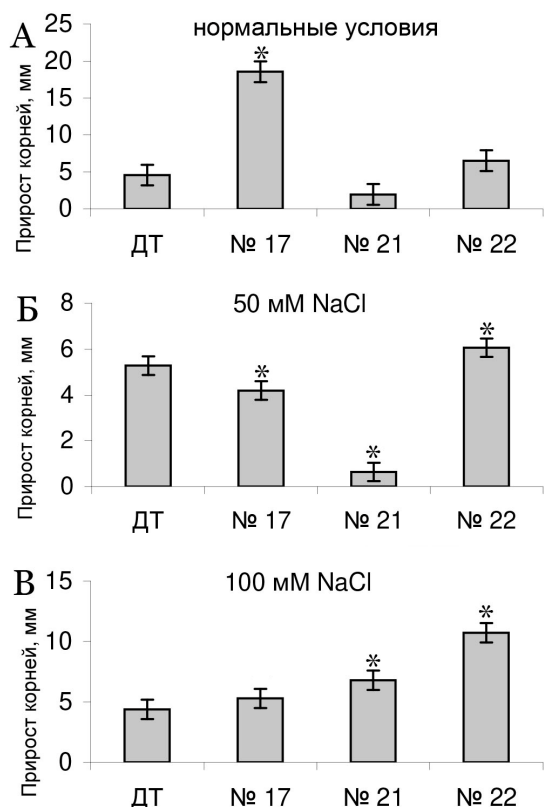


Рисунок 3.7. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *NtEXGT*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях NaCl: Б) 50 мМ, В) 100 мМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

У трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* достоверное увеличение длины корней по сравнению с ДТ при нормальных условиях было выявлено у линий 3, 17 и 25 (рис. 3.8А). При выращивании на среде с 50 мМ NaCl улучшение ростовых параметров корней наблюдалось у линий 3 и 17 (рис. 3.8Б). При действии 100 мМ NaCl более быстрыми темпами роста корней, чем у ДТ характеризовались линии 3, 17 и 25 (рис. 3.8В).

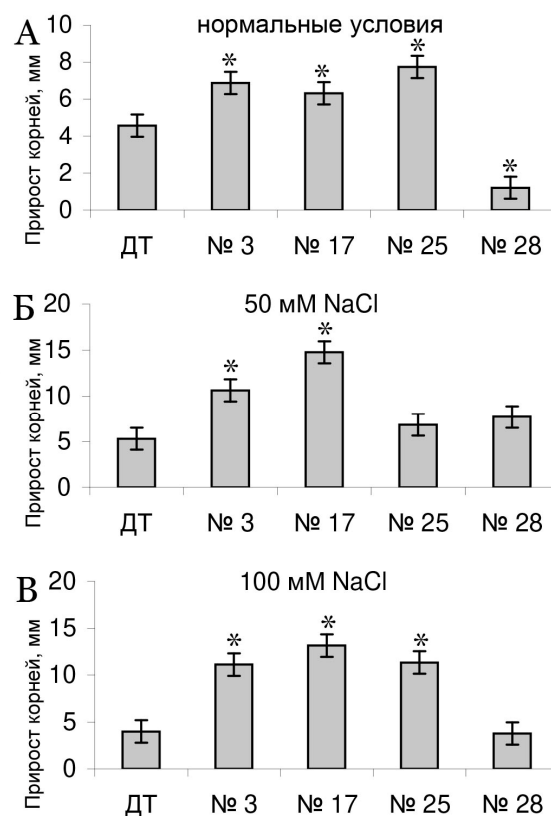


Рисунок 3.8. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях NaCl: Б) 50 мМ, В) 100 мМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.2.2. Морфометрический анализ корней трансгенных растений при действии гипотермии

Способность корневой системы расти в условиях гипотермии (низкие положительные температуры) является важным признаком для сельскохозяйственных растений, особенно в условиях России. В то же время табак (исследуемый объект) является теплолюбивым растением, которое можно использовать как модельный объект при оценке влияния низких положительных температур на морфофизиологию корневой системы

теплолюбивых растений. Предварительно был проанализирован прирост корней табака ДТ при нормальных условиях (+25 °С) и при действии различных низких положительных температур, таких как +10, +12 и +15 °С. При влиянии гипотермии +10 °С прироста корней вообще не было, а при +15 °С прирост корней был существенно больше, чем при +12 °С, поэтому эксперименты на трансгенных растениях ставились при влиянии гипотермии +12 °С, которая очень сильно сдерживала рост корней, но полностью его не останавливала. Исходя из этого, предполагалось, что EXPs и XTHs могут проявить свою активность именно при такой температуре, когда рост еще полностью не прекратился.

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов EXPs при гипотермии

При действии низких положительных температур (гипотермия +12 °С) превышения прироста корней над ДТ у большинства трансгенных растений со сверхэкспрессией генов экспансинов зафиксировано не было. Все линии трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* при влиянии гипотермии имели более низкие показатели прироста корней, чем ДТ (рис. 3.9Б, Г). Линии 9, 39 и 40 трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *AtEXPA10* показали ухудшение роста по сравнению с корнями табака ДТ (рис. 3.9Е). Только линии 4 и 5 трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PnEXPA3* показали небольшое увеличение длины корней при влиянии гипотермии по сравнению с ДТ (рис. 3.9З). Гистограммы с приростом корней при нормальных условиях добавлены для сравнения с приростом при влиянии гипотермии по генам экспансинов: *NtEXPA1* (рис. 3.9А), *NtEXPA5* (рис. 3.9В), *AtEXPA10* (рис. 3.9Д) и *PnEXPA3* (рис. 3.9Ж).

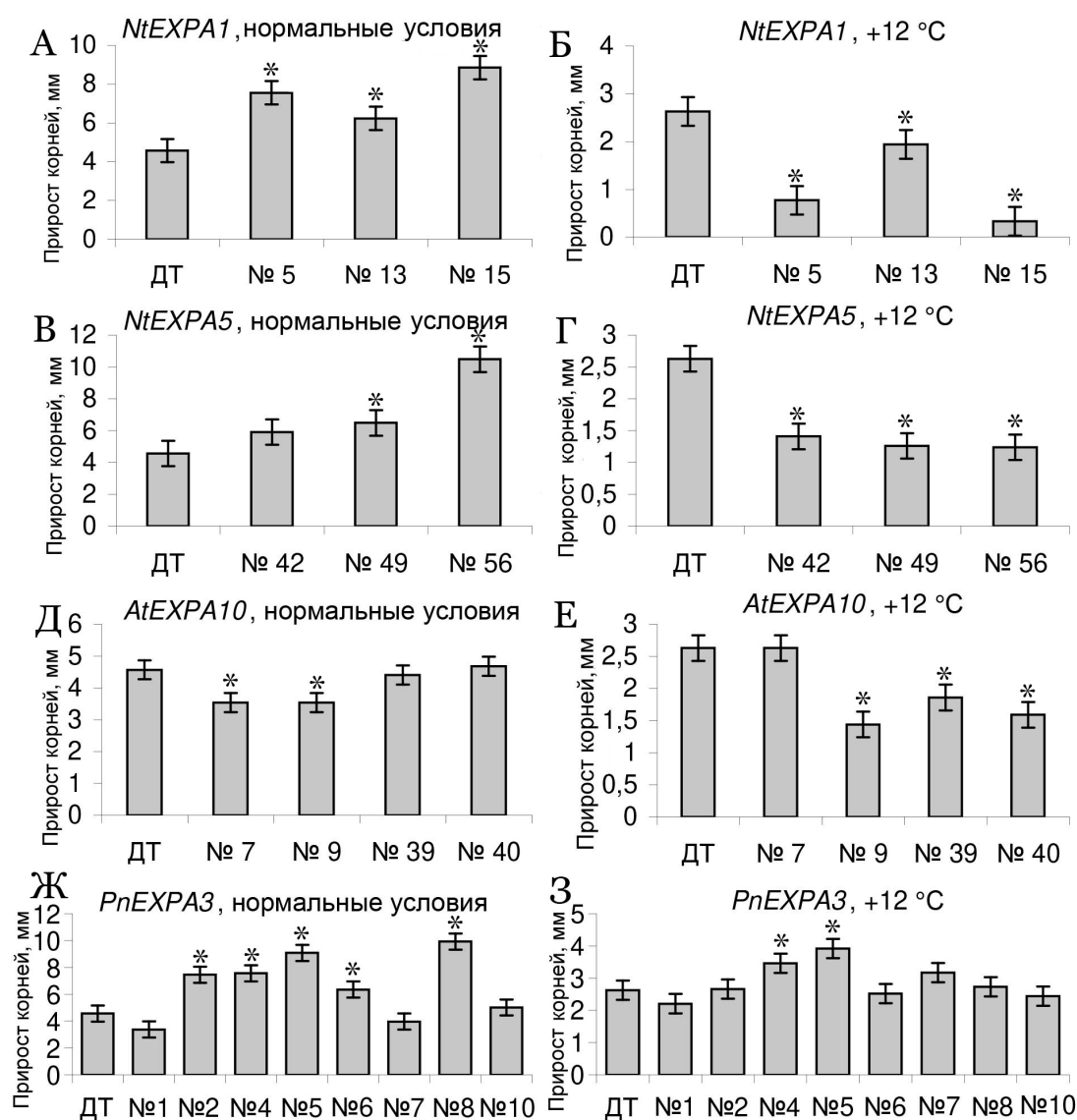


Рисунок 3.9. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA5*, *PnEXPA3*, *AtEXPA10* при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А, В, Д, Ж) и гипотермии (+12 °C) (Б, Г, Е, З). $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов XTHs при гипотермии

Трансгенные растения табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* показали достоверное увеличение прироста корней при влиянии гипотермии, по сравнению с ДТ (рис. 3.10Г). Однако, у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* только линия 17 показала больший прирост по сравнению с ДТ при влиянии гипотермии (рис. 3.10Б). Гистограммы с приростом корней при нормальных условиях добавлены для сравнения с приростом при влиянии гипотермии по генам ксилоглюканэндотрансгликозилаз: *NtEXGT* (рис. 3.10А) и *PtrXTH1* (рис. 3.10В).

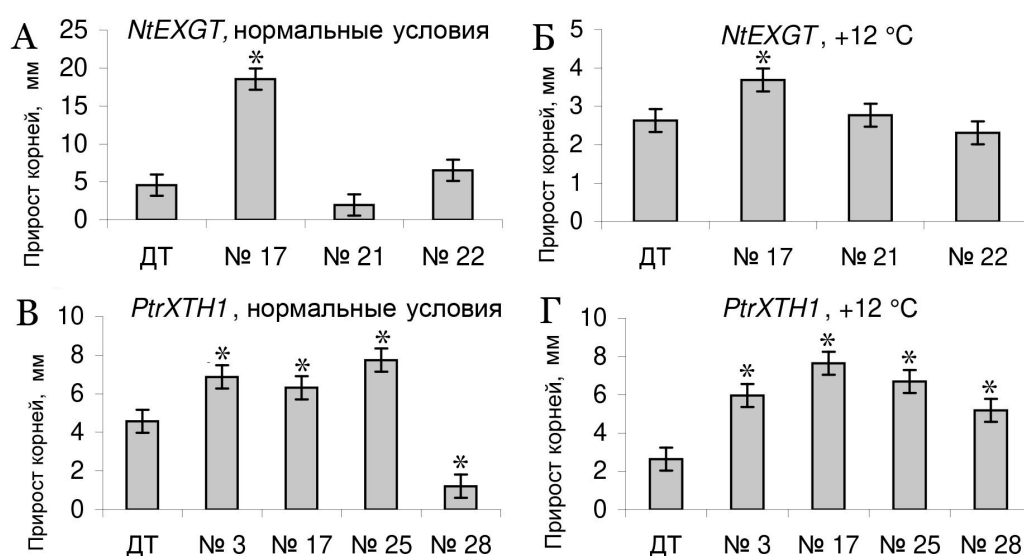


Рисунок 3.10. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT* и *PtrXTH1*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А, В) и гипотермии (Б, Г). $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.2.3. Морфометрический анализ корней трансгенных растений при действии кадмия

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.

Для выявления концентраций CdAc, при которых наблюдались существенные различия в росте корневой системы, был проведен предварительный эксперимент на растениях табака ДТ с использованием следующих концентраций CdAc: 50, 100, 150, 200, 300, 400 и 500 мкМ. Выявлено, что существенная разница в приросте корней наблюдалась при концентрациях 100, 200 и 400 мкМ CdAc. Прирост корней табака ДТ при добавлении кадмия в концентрации 50 мкМ не отличался от прироста корней при нормальных условиях, при концентрациях 100 и 150 мкМ CdAc прирост корней был одинаковый, поэтому было решено в качестве минимальной взять концентрацию 100 мкМ, при которой видно негативное влияние на рост. При концентрациях 300 и 400 мкМ прирост корней был ниже по сравнению с ростом корней при 200 мкМ CdAc, но при этом растения оставались живыми, поэтому было также решено выбрать максимальную концентрацию CdAc в 400 мкМ, когда еще проявлялись признаки роста и гены *EXPs* и *XTHs* могли оказать позитивный эффект. При концентрации 500 мкМ CdAc растения табака уже погибали.

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов EXPs при действии кадмия

При выращивании трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *NtEXPA1* на среде с добавлением 100 мкМ CdAc ростовые параметры корней оставались на уровне или ниже ДТ (рис. 3.11Б). С

добавлением CdAc в концентрации 200 мкМ и 400 мкМ, все три проанализированные линии трансгенных растений имели повышенные показатели роста корней по сравнению с ДТ (рис. 3.11В, Г).

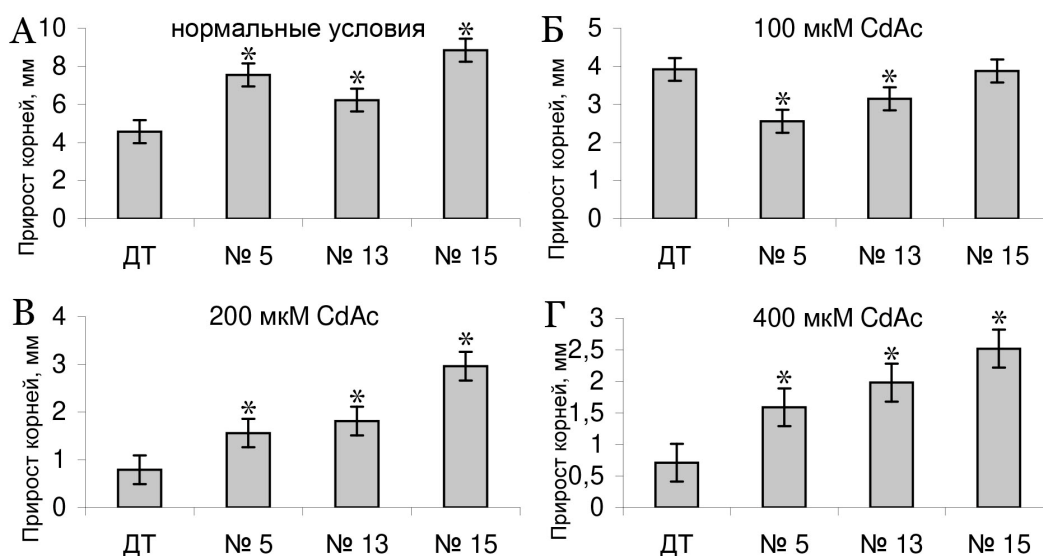


Рисунок 3.11. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *NtEXPA1*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях CdAc: Б) 100 мкМ, В) 200 мкМ, Г) 400 мкМ. n = 14. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Линии 49 и 56 трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXPA5*, выращенные при нормальных условиях показали больший прирост корней по сравнению с ДТ (рис. 3.12А). А при концентрации 100 мкМ кадмия только линия 49 имела улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней (рис. 3.12Б). При выращивании на среде МС с добавлением CdAc в концентрациях 200 мкМ и 400 мкМ улучшенные показатели роста корней по сравнению с ДТ имели все анализируемые линии трансгенных растений (рис. 3.12В, Г).

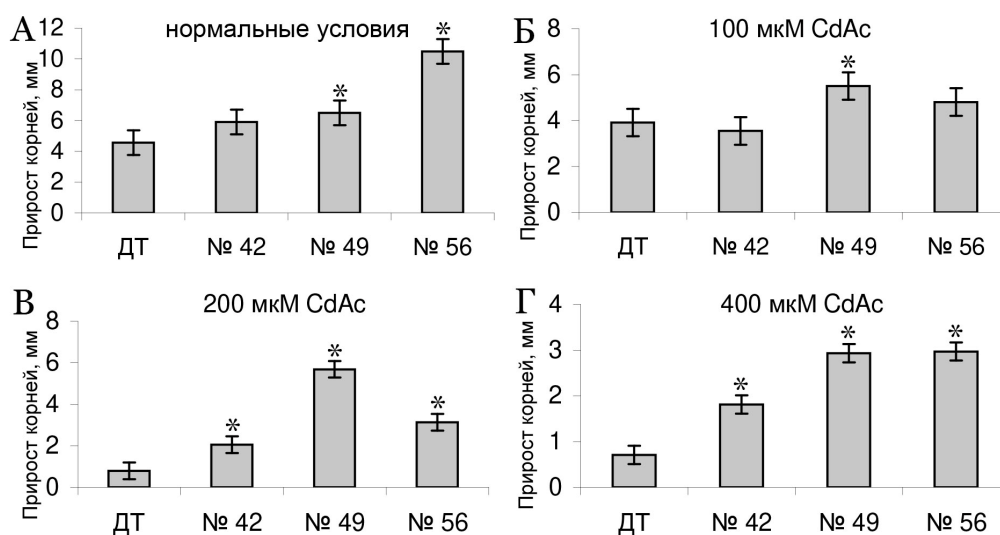


Рисунок 3.12. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *NtEXPA5*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях CdAc: Б) 100 мкМ, В) 200 мкМ, Г) 400 мкМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

При выращивании трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PnEXPA3* на среде МС с добавлением CdAc в концентрации 100 мкМ кадмия только линии 4 и 5 имели улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней (рис. 3.13Б). При концентрации 200 мкМ улучшенные показатели роста корней по сравнению с ДТ наблюдались у линий 4, 5, 6, 7, 8 и 10 трансгенных растений табака (рис. 3.13В). При действии 400 мкМ CdAc более быстрыми темпами роста корней характеризовались линии 1, 4, 5, 6, 8 и 10 (рис. 3.13Г).

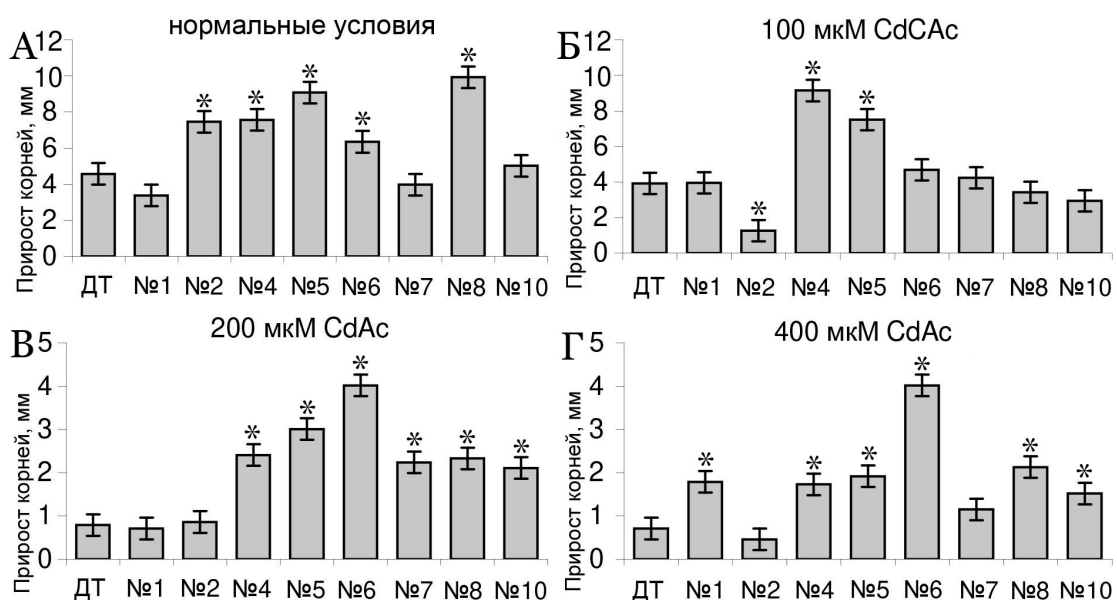


Рисунок 3.13. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *PnEXPA3*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях CdAc: Б) 100 мкМ, В) 200 мкМ, Г) 400 мкМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

При выращивании трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *AtEXPA10* на среде с добавлением 100 мкМ CdAc улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены только у линии 7, а самые низкие показатели роста были у линии 40 (рис. 3.14Б). При выращивании на среде МС с добавлением CdAc в концентрации 200 мкМ улучшенные показатели роста корней по сравнению с ДТ наблюдались у всех анализируемых линий трансгенных растений (рис. 3.14В). При действии 400 мкМ CdAc более быстрыми темпами роста корней характеризовались линии 7, 39 и 40, а линия 9 показала наименьший прирост корней при влиянии кадмия по сравнению с ДТ (рис. 3.14Г).

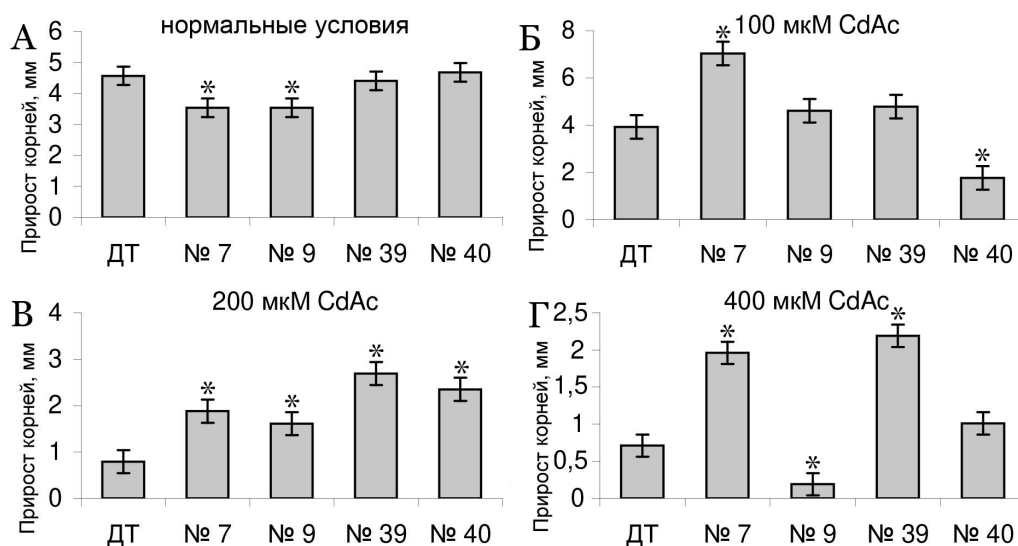


Рисунок 3.14. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *AtEXPA10*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях CdAc: Б) 100 мкМ, В) 200 мкМ, Г) 400 мкМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Морфометрический анализ корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов XTHs при действии кадмия

При нормальных условиях больший по сравнению с ДТ прирост корней у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* наблюдался только у линии 17 (рис. 3.15А). При выращивании трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* на среде с добавлением 100 мкМ CdAc улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линий 17 и 21, а линия 22 показала самый низкий прирост корней среди изучаемых линий трансгенных растений с данным геном (рис. 3.15Б). При выращивании на среде МС с добавлением CdAc в концентрации 200 мкМ улучшенные показатели роста корней по сравнению с ДТ наблюдались у всех анализируемых линий трансгенных растений (рис.

3.15В). При действии 400 мкМ CdAc более быстрыми темпами роста корней характеризовались линии 17 и 21 (рис. 3.15Г).

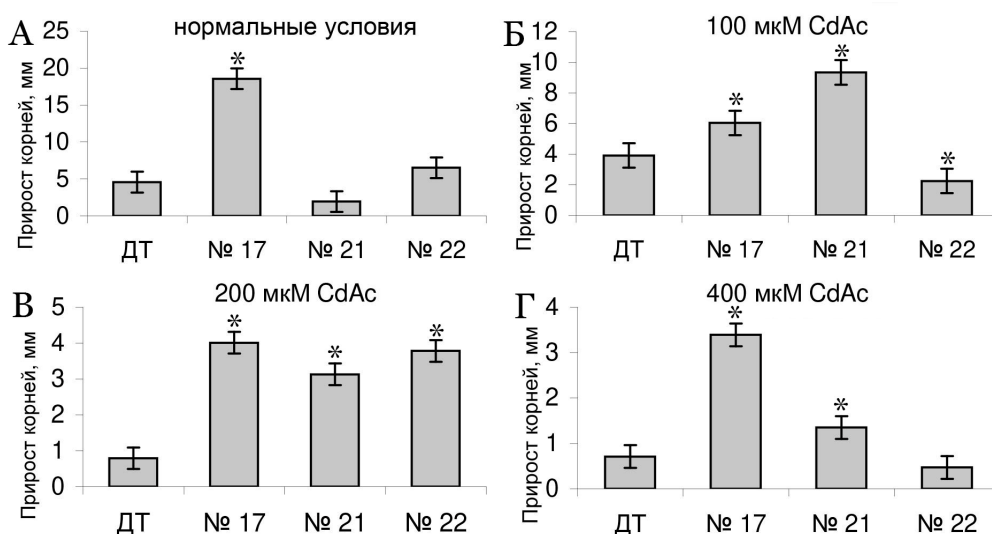


Рисунок 3.15. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях CdAc: Б) 100 мкМ, В) 200 мкМ, Г) 400 мкМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

При нормальных условиях наибольший прирост корней у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* наблюдался у линий 3, 17, 25, а самый низкий – у линии 28 (рис. 3.16А). При выращивании трансгенных по *PtrXTH1* гену растений табака на среде со 100 мкМ CdAc улучшенные по сравнению с ДТ ростовые параметры корней были обнаружены у линии 28, а самый худший прирост корней был у линии 17 (рис. 3.16Б). При выращивании на среде МС с добавлением CdAc в концентрации 200 мкМ улучшенные показатели роста корней по сравнению с ДТ наблюдались у всех анализируемых линий трансгенных растений (рис. 3.16В). При действии 400 мкМ CdAc наиболее быстрыми темпами роста корней характеризовались линии 3 и 28 (рис. 3.16Г).

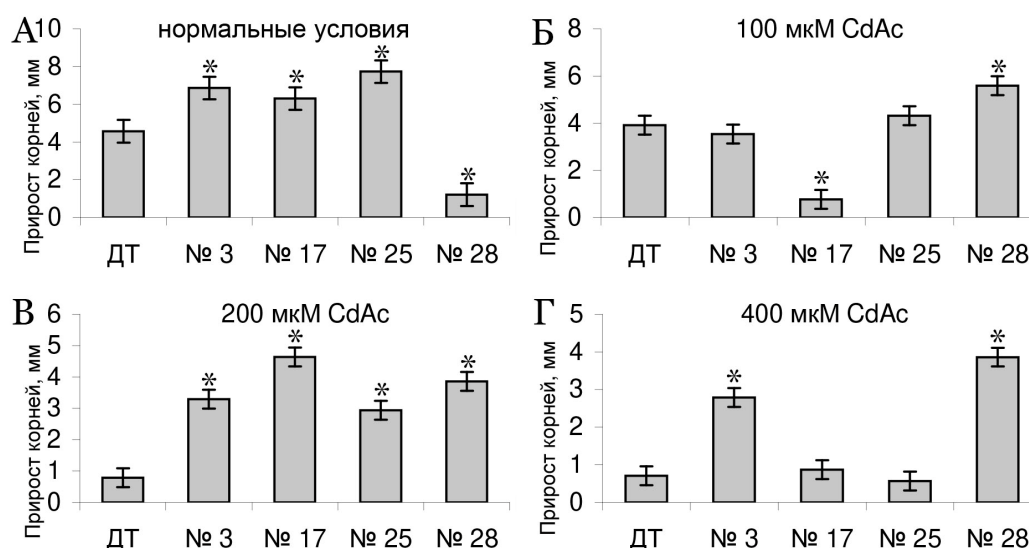


Рисунок 3.16. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1*, при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри при нормальных условиях (А) и различных концентрациях CdAc: Б) 100 мкМ, В) 200 мкМ, Г) 400 мкМ. $n = 14$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Обсуждение результатов исследования по параграфу 3.2

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. Опубликовано большое количество статей, подтверждающих влияние генов *EXPs* и *XTHs* на рост побега (см. обзор Кулуев, Сафиуллина, 2015), при этом работ, в которых изучается влияние генов на рост корней на порядок меньше. Важная роль экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз заключается в том, чтобы обеспечить рост корней и побегов, как при нормальных условиях, так и при влиянии различных абиотических стресс-факторов, к примеру, таких как засуха, засоление и гипотермия (Cosgrove, 2015). В исследованиях Che с

сотрудниками (2016) показано, что ген *OsEXPA10* удлиняет клетки кончиков корней при влиянии алюминия, а нокаут данного гена приводит к значительному снижению удлинения клеток корней в отсутствие Al. Полученные нами данные доказывают участие генов *EXPs* и *XTHs* в обеспечении роста корней, прежде всего, при действии кадмиевого стресса, а также засоления. Судя по всему, исследованные гены оказывали негативное влияние на рост корней при гипотермии. Похожие данные были получены в экспериментах Ren с коллегами (2018): растения табака со сверхэкспрессией гена экспансина пшеницы *TaEXPA2* имели высокую скорость прорастания, удлинения корней и накапливали большое количество биомассы по сравнению с растениями ДТ после обработки CdCl_2 . Сообщалось, что с увеличением концентрации кадмия в среде происходит усиление ингибирования роста корневой системы бобовых и злаковых культур, которое, в свою очередь, связано с накоплением данного металла в тканях растительного организма, при этом Cd в концентрации 10^{-6}M положительно влияет на ростовые процессы озимой тритикале, узколистного люпина и ярового ячменя (Ивашковец, Артемук, 2012). Нам удалось получить трансгенные растения с улучшенными показателями роста при действии кадмия и полученные нами генно-инженерные конструкции могут быть предложены для генетической трансформации сельхозкультур с целью повышения устойчивости к засолению и кадмию.

Результаты, полученные на трансгенных растениях табака, подтверждают, что одна из функций генов *EXPs*, так и *XTHs* заключается в увеличении устойчивости растений к влиянию абиотических стресс-факторов, таких как засоление и воздействие кадмия. По гипотермии однозначные выводы делать нельзя, так как некоторые *EXPs* и *XTHs* могут участвовать и в обеспечении роста при действии этого стресс-фактора.

3.3. Микроскопический анализ корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* при нормальных условиях и при 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. Для экспериментов были выбраны растения со сверхэкспрессией *NtEXPA1* (линия 15) и *NtEXPA5* (линия 49), т.к. все исследованные экспансины работали в корнях примерно одинаково и ростовые параметры при засолении в 50 мМ и влиянии кадмия также были примерно равны у всех анализируемых трансгенных растений со сверхэкспрессией *EXPs*. Также для микроскопии были взяты трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* (линия 17), так как у них были очень низкие показатели роста по сравнению с ДТ при засолении и существенный прирост при влиянии CdAc среди изучаемых генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз, что было интересно для исследования влияния *XTHs* на рост клеток корней. Также было решено проанализировать размеры клеток корней трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* (линия 17), так как у них обнаруживался существенный прирост корней по сравнению с ДТ, как при нормальных условиях, так и при влиянии абиотических стресс-факторов. Результаты микроскопического исследования по трансгену *NtEXPA5* получились схожими с результатами по *NtEXPA1*, поэтому в микрофотографиях продемонстрированы паренхимные клетки корней трансгенных растений только со сверхэкспрессией *NtEXPA1*.

Проведен анализ размеров клеток паренхимы корней в зоне всасывания (рис. 3.17) табака ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5*, *NtEXGT* и *PtrXTH1* при нормальных условиях, при воздействии засоления 50 мМ и ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ.

Анализ и фиксация клеток проводились через 10 дней после посадки на вертикально-ориентированные чашки Петри. Зона всасывания была выбрана с учетом того, что в данной зоне паренхимные клетки достигли максимального размера, что в свою очередь является результатом функционирования *EXPs* и *XTHs*.

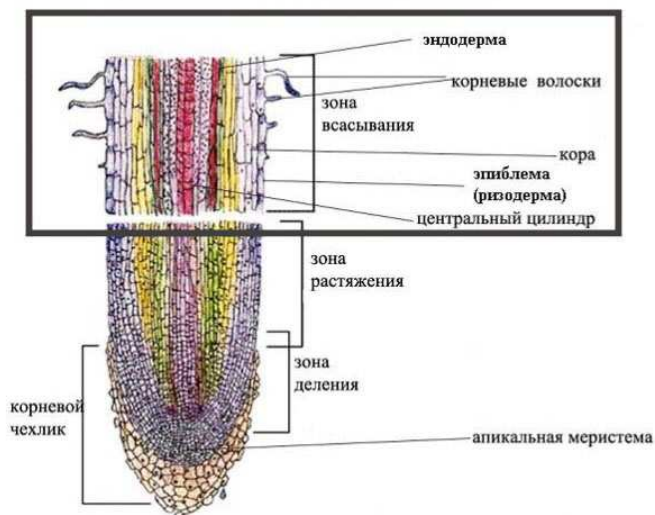


Рисунок 3.17. Зона всасывания корней табака ДТ и трансгенных растений, в которой проводилось измерение размера паренхимных клеток (отмечена прямоугольником).

При влиянии засоления площадь клеток трансгенных растений существенно не изменялась при сравнении с ДТ. Выявлено, что на среде МС с добавлением CdAc площадь клеток у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *PtrXTH1* была больше по сравнению с площадью паренхимных клеток ДТ (табл. 3.2). У трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* площадь клеток паренхимы корней была меньше, чем у ДТ, как при нормальных условиях, так и при действии CdAc (табл. 3.2). В таблице 3.2 представлены результаты измерения площади клеток после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P < 0.05$).

Таблица 3.2

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

| Образец | Нормальные условия | 50 mM NaCl | 200 мкМ CdAc |
|----------------|--------------------|---------------|----------------------|
| Дикий тип | 2836.8±873.3 | 2669.3±1080.2 | 2959.5±755.2 |
| <i>NtEXPA1</i> | 2670.4±806.6 | 2774.5±750.4 | 3826.1±655.8 |
| <i>NtEXPA5</i> | 2731.4±812.4 | 2641.2±695.7 | 3912.3±785.4 |
| <i>NtEXGT</i> | 2227.3±693.2 | 2095.1±684.3 | 2283.5±675.8 |
| <i>PtrXTH1</i> | 2777.4±662.2 | 2537.2±677.2 | 3930.3±1077.7 |

***Жирным шрифтом** выделены варианты, у которых выявлено достоверное увеличение площади клеток по сравнению с ДТ. $n = 150$. $P \leq 0.05$.

При нормальных условиях форма клеток корней табака ДТ (рис. 3.18А) и трансгенных растений (рис. 3.18Б, В, Г) была цилиндрическая, вытянутая и визуальные изменения в толщине клеточных стенок не наблюдались.

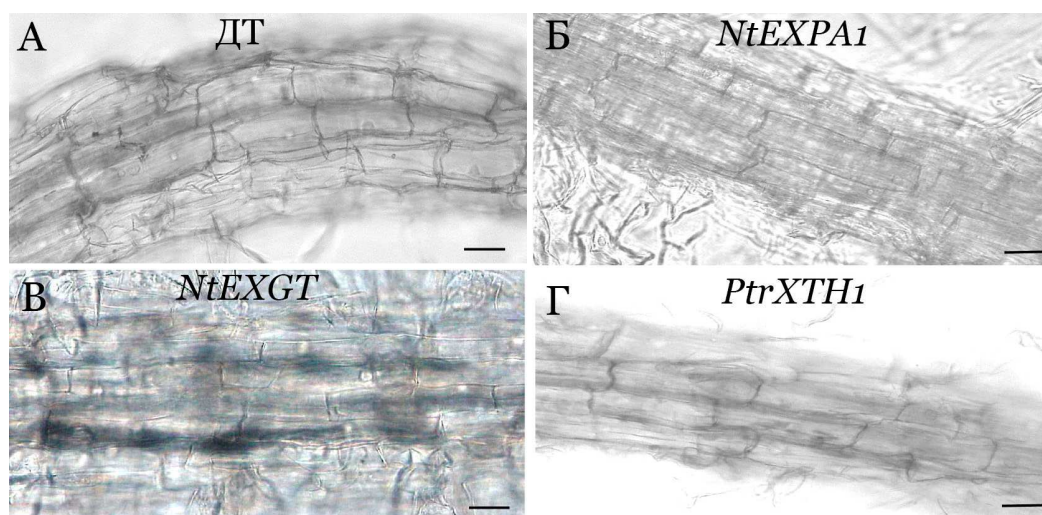


Рисунок 3.18. Размеры и форма клеток корней табака дикого типа (А) и трансгенных растений, со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* (Б), *NtEXGT* (В) и *PtrXTH1* (Г) при нормальных условиях. $n = 150$. Увеличение 160х. Масштаб: 50 мкм.

При действии засоления в концентрации 50 mM NaCl и в корнях табака ДТ (рис. 3.19А) и всех изучаемых трансгенных растений (рис. 3.19Б, В, Г) форма клеток была такая же цилиндрическая вытянутая без изменений в толщине клеточных стенок.

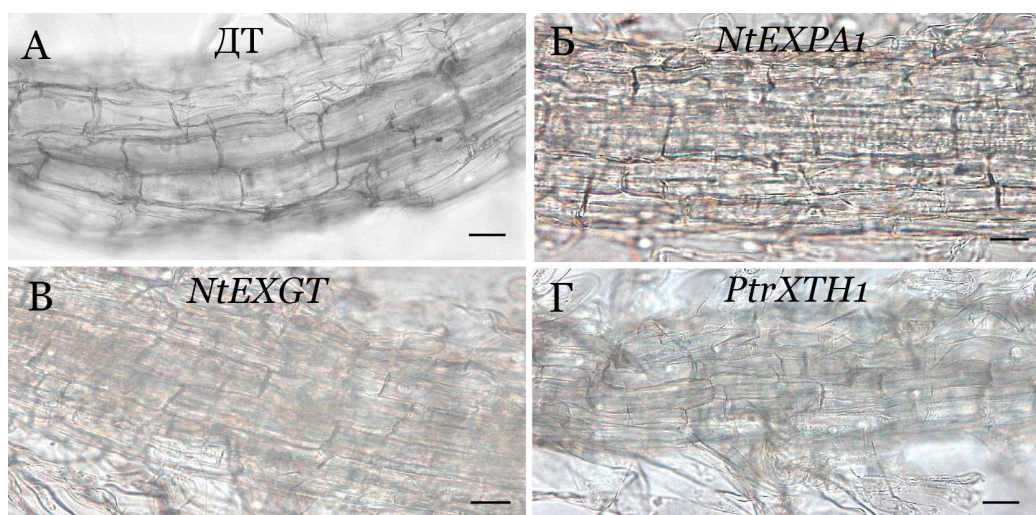


Рисунок 3.19. Размеры и форма клеток корней табака дикого типа (А) и трансгенных растений, со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* (Б), *NtEXGT* (В) и *PtrXTH1* (Г) при действии 50 мМ NaCl. $n = 150$. Увеличение 160х. Масштаб: 50 мкм.

При влиянии CdAc в концентрации 200 мкМ форма клеток корней ДТ (рис. 3.20А) и трансгенных растений с генами *NtEXGT* (рис. 3.20В) и *PtrXTH1* (рис. 3.20Г) не менялась по сравнению с нормальными условиями и оставалась цилиндрической вытянутой, в то время как у трансгенных растений табака с геном *NtEXPA1* форма клеток изменилась на кубическую (рис. 3.20Б). Однако, существенных изменений в толщине клеточных стенок, при сравнительно большой разнице площадей клеток трансгенных растений и ДТ в случае воздействия кадмия, не выявлено.

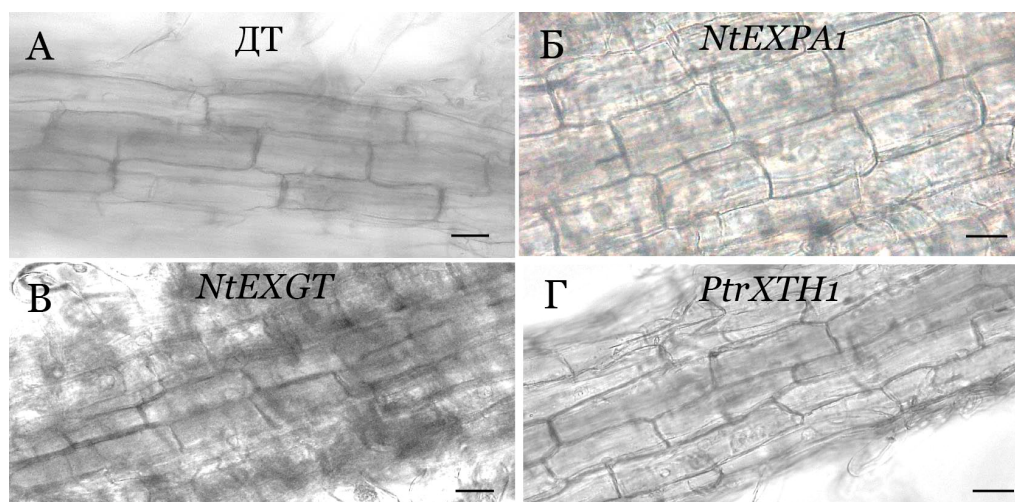


Рисунок 3.20. Размеры и форма клеток корней табака дикого типа (А) и трансгенных растений, со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* (Б), *NtEXGT* (В) и *PtrXTH1* (Г) при влиянии CdAc в концентрации 200 мкМ. n = 150. Увеличение 160х. Масштаб: 50 мкм.

Обсуждение результатов исследования по параграфу 3.3

Трансгенные растения табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *PtrXTH1* имели увеличенную длину корней по сравнению с ДТ, как при нормальных условиях, так и при влиянии CdAc в концентрации 200 мкМ. Судя по результатам микроскопического анализа, можно предположить, что улучшение роста происходило благодаря увеличению размеров клеток корня. Схожие данные получили Lee с коллегами (2003), которые обнаружили корреляцию между сверхэкспрессией гена экспансина *GmEXPI* и удлинением клеток кончика корня у сои. В другой работе сверхэкспрессия корнеспецифичного гена риса *OsEXPA8* улучшала рост корня, посредством стимуляции растяжения его клеток (Ma et al., 2013). Так же сообщалось, что ген экспансина риса *OsEXPA10* непосредственно влиял на удлинение клеток корневой системы риса при действии алюминия (Che et al., 2016). Сверхэкспрессия гена экспансина розы *RhEXPA4* придает устойчивость к абиотическим стрессам путем увеличения размеров клеток (Lü et al., 2013).

Молекулярные механизмы регуляции формы клеток корней растений являются крайне малоизученной областью, потому остается неясным, почему у трансгенных растений *35S::NtEXPA1* происходят выявленные изменения в клетках паренхимы корней. Нами был проведен анализ белок-белковых взаимодействий для генов *EXPs* в растениях арабидопсиса с помощью программы String-db на ортологах гена *NtEXPA1* (ген *AtEXPA24 A. thaliana*). Полученная сеть белок-белковых взаимодействий по *EXPA24* (рис. 3.21) для *A. thaliana* показала, что данный ген может быть связан с геном *WAC3*, который кодирует серин/треонин-протеинкиназу, ассоциированную с клеточной стенкой. Этот фермент при связывании с пектином участвует в

контроле клеточного растяжения, морфогенеза и развития, что может способствовать изменению формы клеток корневой системы.

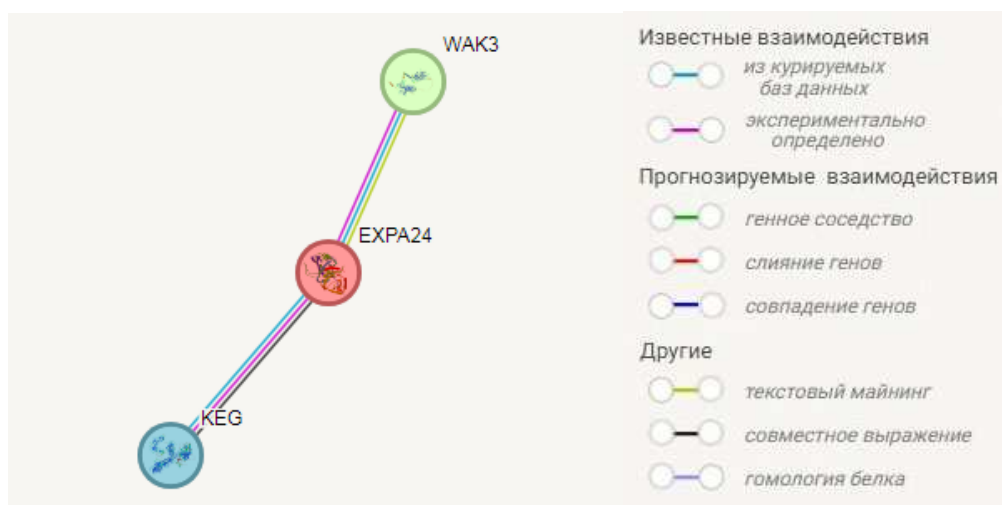


Рисунок 3.21. Сеть белок-белковых взаимодействий для гена *EXPA24* в растениях *A. thaliana*, построенная с использованием программы String-db (<https://string-db.org/>).

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 растяжение клеток корня, а способствовал увеличению их числа в результате деления. Действительно, при нормальных условиях у растений *NtEXGT* было зафиксировано уменьшение размеров клеток по сравнению с ДТ.

3.4. 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 в концентрации 50 мМ. Поэтому дальнейшие исследования по оценке антиоксидантной системы корней было решено провести при влиянии ацетата кадмия. Были выбраны растения со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* (линия 15) и *NtEXPA5* (линия 49), *NtEXGT* (линия 17) и *PtrXTH1* (линия 17), у которых прирост корней был примерно в 3 раза больше по сравнению с ДТ.

3.4.1. Содержание общего растворимого белка в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Содержание общего растворимого белка (ОРБ) в корнях табака ДТ и трансгенных растений с генами *EXPs* и *XTHs* при нормальных условиях находилось приблизительно на одном уровне, то есть существенно не различалось. При влиянии CdAc фиксировалось увеличение содержания белка примерно в 2 раза у табака ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией *EXPs* (рис. 3.22А). У трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* при влиянии CdAc произошло увеличение содержания белка в 2.5 раза, при этом по сравнению с ДТ у этих трансгенных растений белка было меньше в 1.3 раза. Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* показали увеличение содержания белка в 3 раза при влиянии кадмия, причем в 1.7 раза больше по сравнению с ДТ при тех же условиях (рис. 3.22Б).

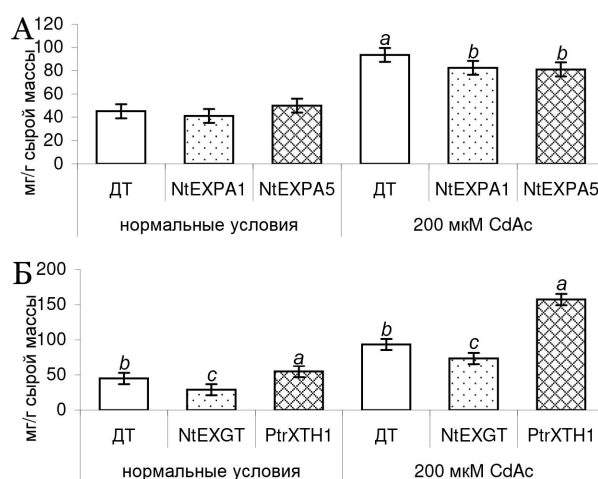


Рисунок 3.22. Содержание ОРБ в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение содержания ОРБ ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение содержания ОРБ ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. $n = 15$. Буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.2. Активность супероксиддисмутазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Активность супероксиддисмутазы (СОД) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией *EXPs* находилась на уровне активности СОД в корнях ДТ (лишь у растений с *NtEXPA5* немного ниже, чем у ДТ) (рис. 3.23А), а у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* активность фермента была выше в 2 раза. У растений с геном *PtrXTH1* активность СОД была ниже в 2 раза по сравнению с активностью СОД в корнях ДТ (рис. 3.23Б). При влиянии CdAc во всех корнях растений происходило снижение активности СОД по сравнению с активностью фермента при нормальных условиях: у растений у ДТ – в 2 раза, у *35S::NtEXPA5* – в 1.2 раза, у *35S::NtEXPA1* и *35S::PtrXTH1* – в 2.5 раза, у *35S::NtEXGT* – в 3 раза. При влиянии Cd активность СОД в трансгенных растениях со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *NtEXGT* находилась на уровне

активности ферментов в ДТ, а у растений с геном *PtrXTH1* активность СОД была ниже в 2.7 раза по сравнению с активностью СОД в корнях ДТ.

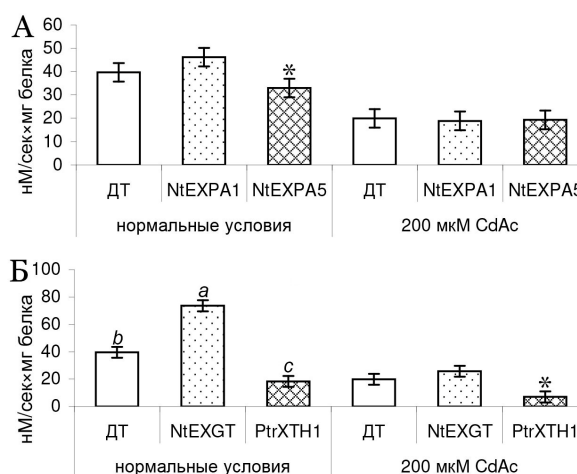


Рисунок 3.23. Активность СОД в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение активности СОД ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение активности СОД ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. $n = 15$. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.3. Активность каталазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Активность каталазы (КАТ) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений с геном *NtEXPA1* была выше в 1.3 раза по сравнению с ДТ, в то время как у трансгенных растений с геном *NtEXPA5* активность КАТ была ниже в 1.3 раза по сравнению с активностью фермента в корнях ДТ (рис. 3.24А). В трансгенных растениях со сверхэкспрессией генов *XTHs* при нормальных условиях активность КАТ была выше по сравнению с ДТ: с геном *NtEXGT* – в 3 раза, а с геном *PtrXTH1* – в 1.9 раза (рис. 3.24Б). При влиянии кадмия происходило снижение активности КАТ в 1.5-2 раза у растений ДТ и со сверхэкспрессией *EXPs* и в 2.5-3 раза у растений со сверхэкспрессией *XTHs* по сравнению с активностью при нормальных

условиях. При этом активность КАТ при влиянии CdAc у трансгенных растений *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *PtrXTH1* находилось на уровне активности КАТ в корнях ДТ, а у трансгенных растений со сверхэкспрессией *NtEXGT* активность КАТ была в 2.3 раза выше, чем активность КАТ в корнях ДТ.

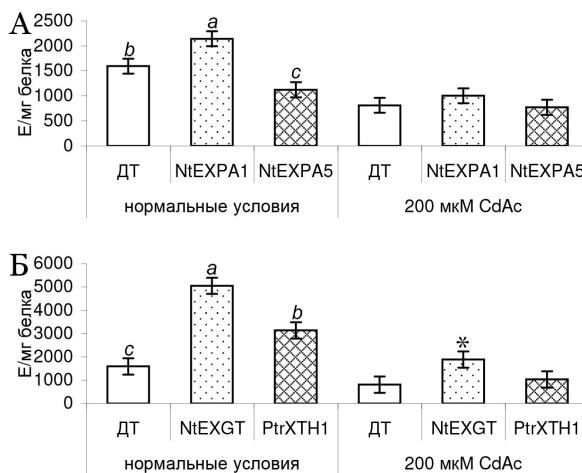


Рисунок 3.24. Активность КАТ в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение активности КАТ ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение активности КАТ ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. $n = 15$. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.4. Активность аскорбатпероксидазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Активность аскорбатпероксидазы (АПОК) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений была выше по сравнению с ДТ: у *35S::NtEXPA1* – в 1.8 раза, у *35S::NtEXPA5* (рис. 3.25А) и *35S::NtEXGT* – в 2.7 раза, у *35S::PtrXTH1* – в 6.3 раза (рис. 3.25Б). При влиянии 200 мкМ CdAc активность АПОК у растений ДТ оставалась почти без изменений по сравнению с активностью фермента при нормальных условиях. В трансгенных растениях же при влиянии кадмия активность АПОК была ниже в среднем в 2 раза (у растений *PtrXTH1* в 2.8 раза) по сравнению с

активностью АПОК в этих же трансгенных растениях при нормальных условиях. При влиянии CdAc уровень активности АПОК в трансгенных растениях *35S::EXPs* и *35S::NtEXGT* находился на уровне активности АПОК ДТ, а у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* активность АПОК была выше в 3 раза по сравнению с активностью АПОК в ДТ в тех же условиях.

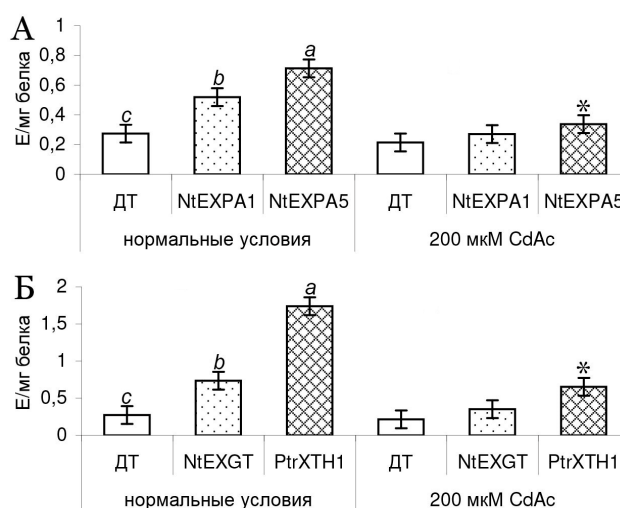


Рисунок 3.25. Активность АПОК в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение активности АПОК ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение активности АПОК ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. n = 15. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.5. Активность гваяколпероксидазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Активность гваяколпероксидазы (ГПОК) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* находилась на уровне активности ГПОК ДТ (рис. 3.26Б), а в корнях с геном *NtEXPA1* активность ГПОК была ниже уровня ДТ в 1.2 раза (рис. 3.26А). В корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *NtEXPA5* и *NtEXGT* при

нормальных условиях активность ГПОК была выше активности этого же фермента в ДТ: у *35S::NtEXPA5* – в 1.2 раза, у *35S::NtEXGT* – в 7.6 раза. При влиянии CdAc активность фермента в корнях ДТ и трансгенных растений была ниже по сравнению с активностью фермента при нормальных условиях: у ДТ – в 6.8 раза, у *35S::NtEXPA1* – 2.8 раза, у *35S::NtEXPA5* – в 7 раз, у *35S::NtEXGT* – в 3.6 раза, у *35S::PtrXTH1* – 4.7 раза. При влиянии Cd активность ГПОК в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *NtEXPA5* и *PtrXTH1* находилось на уровне активности этих ферментов в ДТ. Активность ГПОК у трансгенных растений с геном *NtEXPA1* была выше ДТ в 2 раза, а у растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* в 14.6 раза выше активности ГПОК в корнях табака ДТ при кадмиевом стрессе.

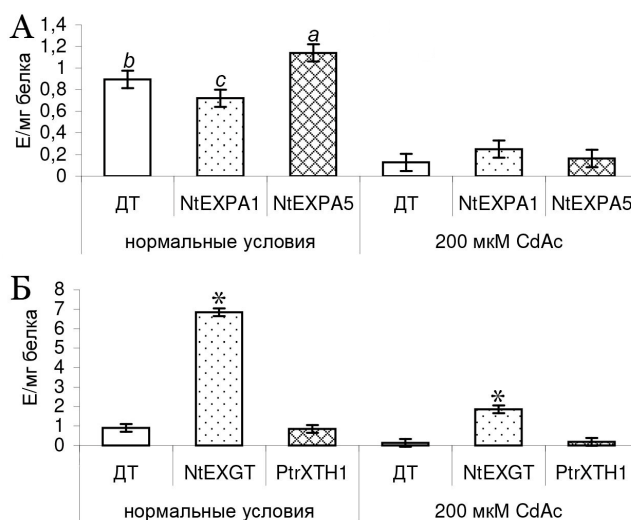


Рисунок 3.26. Активность ГПОК в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение активности ГПОК ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение активности ГПОК ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. $n = 15$. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.6. Активность глутатион-S-трансферазы в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Активность глутатион-S-трансферазы (GST) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений с генами *EXPs* по сравнению с активностью данного фермента в корнях ДТ была выше в 1.6 раза с трансгеном *NtEXPA1* и в 1.3 раза с трансгеном *NtEXPA5* (рис. 3.27А). Активность GST в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией *PtrXTH1* находилось на уровне ДТ при нормальных условиях, а у трансгенных растений *NtEXGT* активность фермента была выше, чем у ДТ в 7 раз (рис. 3.27Б). При влиянии кадмия активность фермента GST падала в корнях всех изучаемых трансгенных растений от 1.2 раза до 2.3 раз ниже по сравнению с активностью фермента при нормальных условиях. Однако при сравнении активности GST при влиянии кадмия по сравнению с ДТ у трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* активность GST была выше в 1.4-1.8 раза. В корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* активность фермента GST была в 6.4 раза выше, а в корнях растений с геном *PtrXTH1* активность этого фермента была ниже в 1.6 раза по сравнению с ДТ.

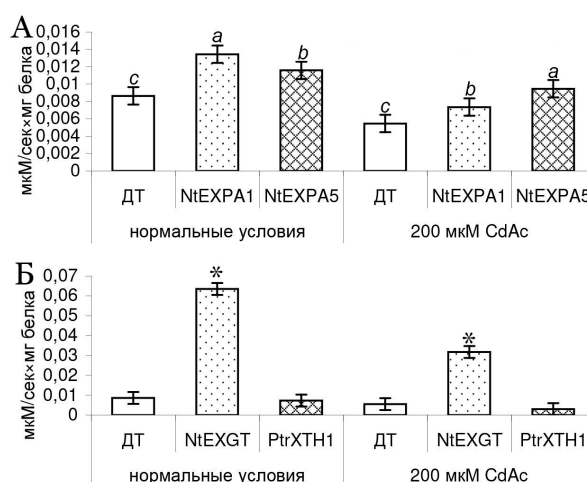


Рисунок 3.27. Активность GST в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение активности GST ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение активности GST ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. n = 15. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.7. Содержание восстановленного и окисленного глутатиона в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Содержание восстановленного (GSH) глутатиона в корнях трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* (рис. 3.28А) и *NtEXGT* при нормальных условиях находилось на уровне содержания GSH в корнях ДТ, при этом в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* содержание восстановленного глутатиона было в 160 раз выше по сравнению с ДТ (рис. 3.28В). А содержание окисленного (GSSG) глутатиона в корнях табака со сверхэкспрессией экспансинов находилось на уровне содержания GSSG в ДТ при нормальных условиях (рис. 3.28Б), однако содержание окисленного глутатиона у трансгенных растений со сверхэкспрессией *XTHs* было существенно выше, чем в корнях ДТ и растений с генами *EXPs*: *NtEXGT* – в 21 раз и *PtrXTH1* – в 74 раза (рис. 3.28Г).

При влиянии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ в корнях табака ДТ происходило увеличение содержания GSH в 73 раза, а GSSG – в 8.5 раз по сравнению с нормальными условиями. Содержание восстановленного глутатиона в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *NtEXGT* было выше по сравнению с содержанием GSH в этих же трансгенных растениях, но при нормальных условиях: *NtEXPA1* – в 20 раз, *NtEXPA5* – в 31 раз, *NtEXGT* – в 8 раз, при этом содержание GSH в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* понизилось в 1.2 раза по сравнению с нормальными условиями (рис. 3.28А, В). Содержание окисленного глутатиона при влиянии CdAc было выше в корнях всех изучаемых трансгенных растений: *NtEXPA1* – в 11.7 раз, *NtEXPA5* – в 4 раза, *NtEXGT* – в 3 раза, *PtrXTH1* – 1.5 раза, по сравнению с содержанием GSSG при нормальных условиях в этих же трансгенных растениях (рис. 3.28Б, Г).

Содержание GSH в корнях трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* было ниже в 1.5-2 раза и в 8.8 раз меньше в корнях трансгенных растений с геном *NtEXGT* по сравнению с ДТ при

влиянии кадмия. При этом в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* содержание восстановленного глутатиона было выше в 1.8 раза по сравнению с ДТ при влиянии CdAc (рис. 3.28А, В). Содержание окисленного глутатиона было выше в корнях табака с генами: *NtEXPA1* – в 1.3 раза, *NtEXGT* – в 7.4 раза, *PtrXTH1* – в 13.5 раза и ниже в 1.4 раза с геном *NtEXPA5*, по сравнению с ДТ при влиянии кадмия (рис. 3.28Б, Г).

При сравнении содержания восстановленного глутатиона при нормальных условиях между растениями с генами экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз видно, что содержание GSH в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* в 94 раза выше содержания GSH в корнях растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, а содержание GSH в корнях табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* находится на уровне содержания восстановленного глутатиона в трансгенных растениях со сверхэкспрессией *EXPs* (рис. 3.28А, В). При этом содержание окисленного глутатиона при нормальных условиях в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией *XTHs* было существенно выше по сравнению с содержанием GSSG в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией *EXPs*: у растений с *NtEXGT* – в 17 раз, а у растений с *PtrXTH1* – в 62 раза (рис. 3.28Б, Г).

При влиянии кадмия содержание GSH в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* было ниже в 4.8 раза по сравнению с содержанием GSH в корнях с генами *EXPs*, а в корнях с геном *PtrXTH1* в 3.4 раза выше содержания GSH в корнях растений с генами *EXPs* (рис. 3.28А, В). Содержание окисленного глутатиона при влиянии кадмия в корнях трансгенных растений с геном *NtEXPA1* было ниже содержания GSSG в корнях растений со сверхэкспрессией генов *NtEXGT* в 5.7 раза и *PtrXTH1* в 10.4 раза. А содержание GSSG в корнях трансгенных растений с геном *NtEXPA5* также было ниже содержания GSSG в трансгенных растениях со

сверхэкспрессией генов *XTHs*: *NtEXGT* – в 10.7 раза, а *PtrXTH1* – в 19.4 раза (рис. 3.28Б, Г).

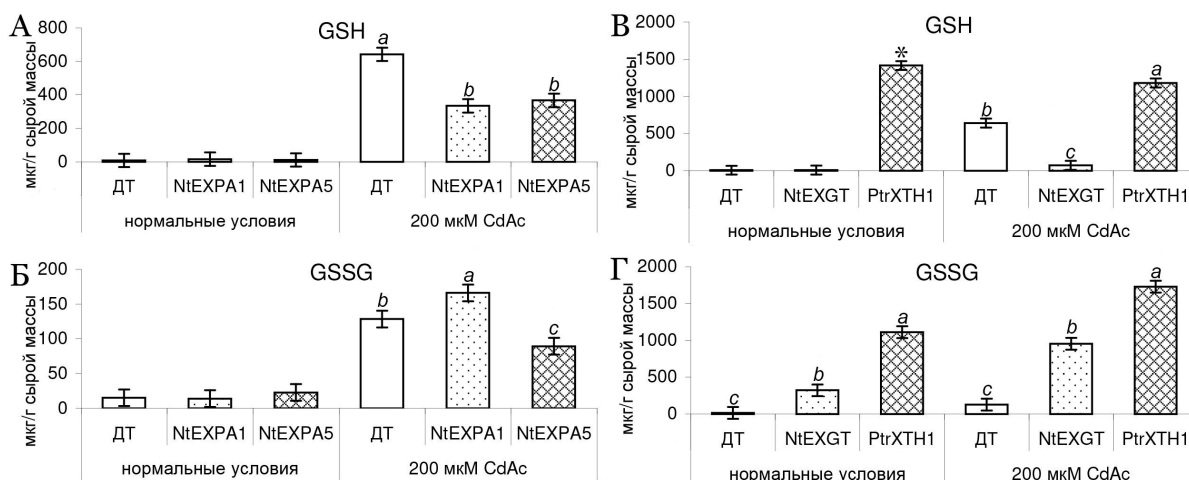


Рисунок 3.28. Содержание GSH и GSSG в корнях табака ДТ и трансгенных растений при влиянии 200 мкМ CdAc. А – содержание GSH в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*; Б – содержание GSSG в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*; В – содержание GSH в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*; Г – содержание GSSG в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. n = 15. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.8. Содержание пролина в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Содержание пролина при нормальных условиях в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* (рис. 3.29А) и *NtEXGT* находилось на уровне содержания пролина в корнях ДТ, в то же время в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях уровень содержания пролина был в 3.2 раза выше по сравнению с ДТ (рис. 3.29Б). При влиянии кадмия происходило увеличение содержания пролина в корнях ДТ в 3 раза, *35S::NtEXPA1* – в 3.8 раза, *35S::NtEXPA5* – в 2 раза, а *35S::NtEXGT* – в 2.5 раза, при этом содержание пролина у трансгенных

растений *PtrXTH1* оставалось на уровне содержания пролина в корнях этих растений при нормальных условиях. По сравнению с ДТ при влиянии кадмия содержание пролина в корнях растений с генами *NtEXPA1* и *PtrXTH1* находилось на уровне пролина в ДТ, а в корнях растений с генами *NtEXPA5* и *NtEXGT* была ниже в 1.3-1.8 раза (рис. 3.29).

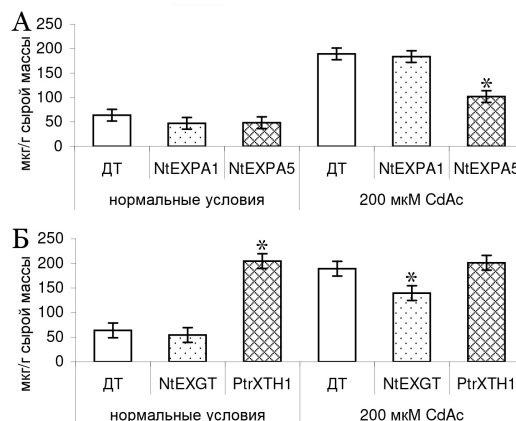


Рисунок 3.29. Содержание пролина в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение содержания пролина ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение содержания пролина ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. $n = 15$. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.9. Содержание водорастворимых сахаров в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Содержание водорастворимых сахаров (ВРС) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXPA1* находилось на уровне содержания ВРС в корнях табака ДТ. В корнях табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA5* (рис. 3.30А) и *PtrXTH1* содержание ВРС было ниже в 1.3 раза по сравнению с ДТ, а в корнях растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* содержание ВРС было ниже ДТ в 6.2 раза (рис. 3.30Б). При влиянии кадмия содержание ВРС увеличилось в 1.2-1.6 раза в корнях табака ДТ и корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией

генов *EXPs* и *NtEXGT* по сравнению с содержанием ВРС при нормальных условиях, при этом в корнях с геном *PtrXTH1* содержание ВРС уменьшилось в 1.3 раза по сравнению с нормальными условиями. Содержание ВРС при влиянии CdAc в корнях ДТ и в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* существенных изменений не показали, а в корнях с геном *NtEXGT* выявлено меньшее содержание ВРС в 4.5 раза, а с геном *PtrXTH1* – в 2 раза, по сравнению с ДТ.

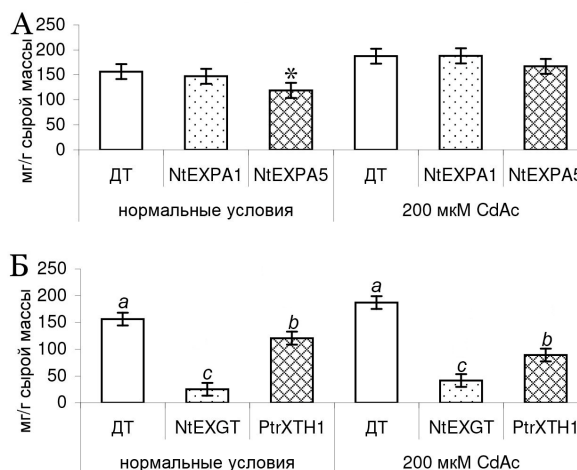


Рисунок 3.30. Содержание ВРС в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение содержания ВРС ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение содержания ВРС ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. n = 15. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

3.4.10. Общая антиоксидантная способность в корнях табака при нормальных условиях и при действии кадмиевого стресса

Общая антиоксидантная способность (ОАС) при нормальных условиях в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs* (рис. 3.31А) и *NtEXGT* находилась на уровне ОАС корней растений ДТ, при этом в корнях табака с геном *PtrXTH1* ОАС была больше чем у ДТ в 7 раз (рис. 3.31Б). В корнях табака ДТ и трансгенных растений с геном *NtEXPA1* изменений в

ОАС при влиянии кадмия не наблюдалось по сравнению с нормальными условиями. При влиянии CdAc происходило увеличение ОАС в корнях трансгенных растений с генами *NtEXPA5* и *NtEXGT* в 1.8 и 2 раза соответственно. В корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* ОАС уменьшилась в 1.5 раза по сравнению с ОАС растений с этим же геном при нормальных условиях. По сравнению с ДТ при влиянии кадмия ОАС была выше в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXPA5*, а в корнях растений со сверхэкспрессией генов *NtEXGT* и *PtrXTH1* ОАС была выше по сравнению с ДТ в 2 и 4.3 раза, соответственно.

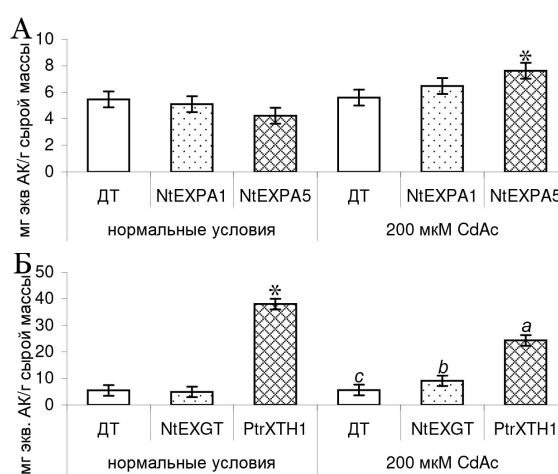


Рисунок 3.31. Общая антиоксидантная способность в корнях табака ДТ и трансгенных растений при нормальных условиях и влиянии 200 мкМ CdAc: А – сравнение ОАС ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *EXPs*, Б – сравнение ОАС ДТ и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *XTHs*. $n = 15$. Звездочками (*) и буквами обозначены достоверно различающиеся результаты после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P \leq 0.05$).

Обсуждение результатов исследования по параграфу 3.4

Абиотические стресс-факторы постоянно воздействуют на растения в естественной среде обитания и интегральным процессом, запускаемым на фоне стресса, является накопление АФК, которое, в свою очередь, может приводить к разрушению липидных мембран, белков, ДНК и блокировать

работу многих ферментов и процессов жизнедеятельности (Gill, Tuteja, 2010). Антиоксидантная система растений защищает их от воздействия АФК благодаря специальным ферментам, таким как СОД, каталаза и различные пероксидазы, а также низкомолекулярным метаболитам: АК, глутатион, пролин, ВРС и др. (Самусик и др., 2022). Повышенное содержание АФК в растительных организмах в ответ на влияние различных абиотических стресс-факторов, таких как засуха, засоление, гипотермия и воздействие тяжелых металлов, описано в большом количестве исследований и при этом АФК изучают и рассматривают как маркеры стрессового состояния растительного организма и как сигнальные посредники развития адаптивного ответа на стресс (Mittler et al., 2011; Pucciariello et al., 2012; Самусик и др., 2022). Ранее уже сообщались некоторые разрозненные данные об изменениях в антиоксидантной системе растений при сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs*. Нами впервые проведены комплексные исследования антиоксидантной системы трансгенных растений, сверхэкспрессирующих эти гены. В итоге были получены данные о том, на какие именно компоненты антиоксидантной системы оказывают свое влияние экспансины и ксилотрансглюканэндотрансглюкозилазы.

Общий растворимый белок

В результате экспериментов было выяснено, что ОРБ в корнях трансгенных растений находится на уровне ДТ при нормальных условиях, а при влиянии Cd – у табаков *35S::EXPs* также остается на уровне ДТ, у табаков с геном *NtEXGT* содержание белка было ниже ДТ, а у растений с геном *PtrXTH1*, наоборот выше ДТ. В литературе имеются данные о том, что сверхэкспрессия генов пшеницы *TaEXPA8* (Peng et al., 2019) и *TaEXPA9* (Zhao et al., 2022) повышает содержание общего растворимого белка при влиянии стресса. В корневой системе растений при действии гипотермии происходит накопление легкорастворимых форм белков благодаря замедлению скорости белкового синтеза по сравнению со скоростью роста

корней (Родченко, 1988). При этом нет подобных данных при влиянии засоления или кадмиевого стресса, однако, тяжелые металлы при поступлении в клетки корня растения реагируют с функциональными группами белков и пептидов (металлотионеины и фитохелатины), что в таком случае является одним из механизмов детоксикации тяжелых металлов в растительном организме. Кадмий, свинец и цинк связываются в основном с SH-группами белков и накапливаются в апопласте клеток корневой системы (Серегин, 2015). Поэтому результаты содержания ОРБ в корнях изучаемых трансгенных растений не смогли подтвердить (но и исключить) стимуляцию механизма детоксикации кадмия через SH-группы белков и, согласно нашим результатам, защитный эффект реализовался, по крайней мере, через включение некоторых компонентов АОС.

Супероксиддисмутаза

Устойчивые к различным абиотическим стресс-факторам виды растений по сравнению с восприимчивыми растениями характеризуются высокой активностью СОД и меньшим количеством окислительных повреждений клеточных стенок и мембран. Например, трансгенные растения томата, которые имеют высокую активность фермента СОД, показывают большую устойчивость к действию абиотических стресс-факторов (Серенко и др., 2011). Также имеются сведения, что сверхэкспрессия генов экспансинов *TaEXPA8* (Peng et al., 2019) и *TaEXPA9* (Zhao et al., 2022) повышает активность СОД при влиянии стрессовых факторов. Следовательно, что раз в изучаемых трансгенных растениях со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* активность фермента супероксиддисмутаза находилась на уровне ДТ или ниже как при нормальных условиях, так и при действии кадмиевого стресса, то сверхэкспрессия данных генов, вероятно, не влияет на активность СОД.

Пероксидазы

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что в корнях трансгенных растений как при нормальных условиях, так и при влиянии кадмия имеется повышенная активность АПОК, при этом высокая активность КАТ и ГПОК при этих же условиях обнаруживалась только у трансгенных растений с геном *NtEXGT*. Устойчивость растений к стрессовым факторам связана с уровнем окислительно-восстановительных процессов, происходящих в растительном организме, который, в свою очередь, определяется по активности ферментов, таких как пероксидазы (Обручева и др., 1988). Многофункциональность пероксидаз проявляется в изменениях активности и в ходе онтогенеза растительного организма, и в результате влияния различных стрессовых факторов (Андреева, 1991; Passardi et al., 2005). Также устойчивость растений к различным абиотическим стресс-факторам определяется в большинстве случаев активностью ферментов, которые обладают пероксидазными свойствами (Thongsook T., Barrett, 2005; Алиева и др., 2010). Имеется информация о влиянии ионов кадмия и свинца на этиолированные проростки злаков и бобовых культур с последующим изменением активности каталазы и пероксидазы (Ивашковец, Артемук, 2012). Влияние засоления также стимулирует активность антиоксидантных ферментов, таких как АПОК и каталаза (Hernandez et al., 1999, Xiong et al., 2002). Действие ионов свинца на корни сеянцев сосны показывает, что низкие концентрации вызывают снижение, а высокие – повышение активностей растворимой ГПОК (Титов и др., 2014). Действие ионов кадмия увеличивает активность АПОК, ГПОК, каталазы, СОД и ферментов глутатионовой системы растений, однако не зависит от используемых концентраций Cd и вида растения (Титов и др., 2014), но зависит от продолжительности воздействия тяжелых металлов. Например, активность каталазы в проростках пшеницы при влиянии Zn и Cr в начале эксперимента повышается, а после четырех дней существенно снижается, при этом активность ГПОК увеличивается на шестой день, а снижается на восьмой (Panda et al., 2003).

АПОК совместно с компонентами аскорбат-глутатионового цикла защищает клетки растений от переизбытка перекиси в клетках (Asada, 1992, Mittler, 2002), при этом тилакоидно-связанная АПОК, участвуя в «water–water» цикле утилизирует АФК (Asada, 1999). Снижение активности фермента АПОК может быть связано с истощением пула АК, которое возникает при развитии окислительного стресса (De Pinto et al., 2002) в растениях табака ДТ, однако в изученных нами трансгенных растениях наблюдается увеличение активности АПОК при влиянии CdAc, что может быть связано с тем, что гены *EXPs* и *XTHs* каким-то образом способствуют увеличению объема пула аскорбиновой кислоты, что также подтверждается увеличением ОАС в трансгенных растениях. Также в литературе имеются исследования влияния сверхэкспрессии генов экспансинов *TaEXPA8* (Peng et al., 2019), *TaEXPA9* (Zhao et al., 2022) и *TaEXPB23* (Han et al., 2015) на увеличение активности пероксидаз, что подтверждается и нашими исследованиями. А сверхэкспрессия генов экспансинов *TaEXPA8* (Peng et al., 2019) и *TaEXPA9* (Zhao et al., 2022) также увеличивает активность каталазы при влиянии стресса, что согласуется с нашими результатами.

Глутатионовая система

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что активность ферментов GST в корнях табаков трансгенных растений с генами *EXPs* и *NtEXGT* при нормальных условиях и при влиянии Cd была выше, чем у ДТ. Содержание окисленного глутатиона находилось на уровне ДТ у растений с генами *EXPs*, при этом у растений с генами *XTHs* содержание GSSG было выше, чем у ДТ. Таким образом, повышенная активность ферментов GST как при нормальных условиях, так и при влиянии Cd наблюдается только в трансгенных растениях табака со сверхэкспрессией экспансинов (*NtEXPA1*, *NtEXPA5*) и ксилоглюканэндотрансгликозилазы *NtEXGT* и не наблюдается в растениях с геном *PtrXTH1*.

При влиянии абиотических стресс-факторов, особенно при воздействии тяжелых металлов, растительный организм поддерживает свой гомеостаз, например, благодаря синтезу фитохелатинов из глутатиона, которые связывают ионы тяжелых металлов для того, чтобы они не взаимодействовали с цитоплазматическими белками. Глутатион также сам участвует в детоксикации перекиси, превращаясь в форму GSSG при участии АК, а соотношение форм глутатиона GSH и GSSG является характеристикой окислительно-восстановительного состояния клетки при влиянии различных стресс-факторов (Han et al., 2013a; Han et al., 2013b; Загоскина, Назаренко, 2016). При воздействии тяжелых металлов глутатион при окислительном стрессе выполняет роль, как низкомолекулярного антиоксиданта, так и субстрата в реакциях с участием глутатионпероксидазы (Гришко, Сыщиков, 2012). При действии различных абиотических стресс-факторов в растениях меняются содержание глутатиона и соотношение между формами GSH и GSSG, которые зависят от продолжительности действия стресса и от его природы (Колупаев, Карпец, 2019). Например, в корнях гороха присутствуют изменения в содержании глутатиона в зависимости от концентраций ионов Cd и Ni (Гришко, Сыщиков, 2012), также существует прямая зависимость между содержанием глутатиона формы GSH и устойчивостью к Cd различных сортов гороха (Metwally et al., 2003). В литературе представлено большое количество работ о влиянии абиотических стрессов-факторов (в особенности влияния кадмия) на глутатионовый пул (Sharma, Dietz, 2006, Chen et al., 2010).

Известно, что увеличение АФК индуцирует повышение активности GST, которая инактивирует продукты ПОЛ, повреждающие ДНК и различные компоненты растительной клетки (Liu et al., 2013). Трансгенные растения табака с конститутивной экспрессией генов GST имеют повышенную устойчивость к окислительному стрессу, вызванному влиянием различных абиотических факторов (Roxas et al., 1997). Например, табак со сверхэкспрессией гена *PpGST* груши имеет повышенную активность

фермента GST и проявляет устойчивость к окислительному стрессу, который вызван засолением, недостатком влаги и влиянием ионов Cd (Liu et al., 2013). Также сверхэкспрессия генов GST влияет на активность не только своих ферментов, но и на активность ферментов АПОК и монодегидроаскорбатредуктазы в растениях табака (Roxas et al., 2000), а растения риса со сверхэкспрессией генов GST и KAT из *Suaeda salsa* имеют улучшенные показатели АОС при влиянии Cd и теплового шока. У растений увеличивалось соотношение GSH и GSSG форм глутатиона, аскорбата, а также активность СОД и ферментов аскорбат-глутатионового цикла (Zhao et al., 2009). А растения табака с геном GST из *Trichoderma virens* имели повышенную устойчивость к Cd и высокую активность ферментов СОД, KAT, АПОК и ГПОК (Dixit et al., 2011). В литературе почти нет исследований по влиянию сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs* на глутатионовую систему, лишь в опытах Nan с коллегами (2015) есть подтверждение влияния сверхэкспрессии гена экспансина *TaEXPB23* на активность фермента глутатионредуктазы. Таким образом, стрессоустойчивость трансгенных растений с генами *EXPs* и *XTHs*, обуславливается, в том числе, через увеличение активности GST. Механизм этого взаимодействия пока остается неизвестным. В то же время однозначные результаты по содержанию GSH и GSSG в трансгенных растениях нам получить не удалось. Их содержание сильно зависело от целевого гена, который был использован в работе.

Пролин

Пролин повышает стрессоустойчивость растений и их выживаемость в условиях влияния абиотических факторов за счет протекторной и осморегуляторной функций, а также он является синглентным гасителем АФК, снижает уровень H_2O_2 в клетках, стабилизирует ферменты АОС, т.е. по количеству свободного пролина судят о степени повреждения клеток и активности работы АОС (Szabados, Savoure, 2009). Пролин является

полифункциональным биологическим соединением, которое поддерживает клеточное равновесие и помогает растениям адаптироваться к новым стрессовым условиям (Кузнецов, Шевякова, 1999). При солевом стрессе в растениях проса количество пролина в листьях увеличивалось, однако в корнях его содержание не менялось (Колупаев, Карпец, 2019). Трансгенные растения с повышенным содержанием пролина были устойчивы к высоким концентрациям солей тяжелых металлов (Szabados, Savoure, 2009). То, что содержание пролина у исследованных нами растений ДТ сильно увеличивается в ответ на воздействие Cd показывает, что растения чувствительны к этому стрессу (Ben Rejeb et al., 2012). Однако у трансгенных растений пролина было меньше, чем у ДТ, что может говорить о включении других защитных механизмов при сверхэкспрессии генов *EXPs* и *XTHs* при кадмиевом стрессе (Ren et al., 2018). Возможно, трансгенным растениям для преодоления стресса было нужно гораздо меньше пролина. В литературе имеется информация об увеличении содержания пролина при влиянии стресса у трансгенных растений с генами *TaEXPA8* (Peng et al., 2019), *TaEXPA9* (Zhao et al., 2022) и *TaEXPB23* (Han et al., 2015)

В то же время увеличенное содержание пролина у трансгенных растений с геном *PtrXTH1* могло способствовать еще большему повышению неспецифической стрессоустойчивости за счет его антиоксидантной и осмопротекторной функций. Однако у большинства изученных трансгенных растений содержание пролина при влиянии кадмия не повышалось по сравнению с ДТ, следовательно, исследуемые гены на пролин существенного влияния не оказывают при окислительном стрессе.

Водорастворимые сахара

Большинство абиотических стресс-факторов косвенно или на прямую могут влиять на концентрацию, синтез, запасание, транспорт и обмен водорастворимых сахаров. В связи с чем, ВРС являются сигналами регуляции роста и развития растительного организма при влиянии

абиотических стресс-факторов, таких как свет, засуха или засоление, гипотермия, при этом у сахаров имеются антиоксидантные свойства, так как они способны связывать свободные радикалы (Аверьянов, Лапикова, 1989) или действовать через метаболическую регуляцию отдельных компонентов АОС. Также в литературе имеется информация о влиянии сверхэкспрессии гена экспансина *TaEXPA9* (Zhao et al., 2022) на увеличение содержания ВРС при влиянии стресса. Так как у трансгенных растений не было повышено содержание ВРС ни при нормальных условиях, ни при действии кадмия, следовательно, можно полагать, что у исследованных растений табака с генами *EXPs* и *XTHs* активированы другие компоненты АОС.

Общая антиоксидантная способность

В результате экспериментов было выявлено, что при нормальных условиях ОАС находится на уровне ДТ в корнях трансгенных растений с генами *EXPs* и *NtEXGT*, и выше, чем у ДТ у растений с геном *PtrXTH1*. Однако при влиянии кадмия ОАС повышается в корнях всех трансгенных растений. Трансгенные растения табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* показали повышенную ОАС в корнях при влиянии Cd, а также в них наблюдалась высокая аскорбатпероксидазная активность по сравнению с ДТ. В исследованиях Ren с коллегами (2018) также есть подтверждения влияния сверхэкспрессии гена экспансина пшеницы *TaEXPA2* на компоненты АОС при воздействии $CdCl_2$. Повышение ОАС трансгенных растений по сравнению с ДТ произошло, возможно, из-за того, что при влиянии кадмия у них поддерживалось увеличенное содержание АК благодаря действию генов *EXPs* и *XTHs*, что помогло растению преодолеть окислительный стресс. В литературе также есть информация о влиянии сверхэкспрессии гена экспансина *TaEXPA2* (Chen et al., 2016) на увеличение ОАС в трансгенных растениях при воздействии стресса.

При влиянии абиотических стресс-факторов главным механизмом устойчивости является активация биохимических компонентов АОС

(Газарян, 2006), что также свидетельствует об усилении окисления антиоксидантных веществ (Prieto et al., 1999). Наиболее распространенным низкомолекулярным антиоксидантом в растительном организме является аскорбиновая кислота и в присутствии тяжелых металлов содержание АК повышается, что является адаптационным механизмом к окислительному стрессу (Hu et al., 2009; Титов и др., 2014). Так же в обзоре Kaur и Nauyar (2014) говорится о влиянии АК на устойчивость растений к тяжелым металлам. Общая антиоксидантная способность оценивается по уровню содержания эквивалентов аскорбиновой кислоты, а аскорбат является производным АК (Чупахина, 1997).

Так же в литературе встречается информация про улучшение солеустойчивости при экзогенной обработке АК каллусов риса (Alhasnawi et al., 2016) с последующим повышением активности ферментов АОС, таких как АПОК, неспецифическая пероксидаза и каталаза, а также увеличение содержания пролина. А у проростков кукурузы экзогенная обработка АК способствует увеличению содержания пролина, GSH и ВРС, а также активности СОД и ГПОК при влиянии абиотических стресс-факторов, при этом аналогичная обработка аскорбатом приводит к снижению активности КАТ (Rady, Hemida, 2016).

Таким образом, при повышении экспрессии генов *EXPs* и *XTHs* происходит усиление механизмов роста и растяжения клеточных стенок, что приводит к росту корневой системы растения, которая растет благодаря увеличению экспрессии множества генов-регуляторов роста, также происходит одновременная активация деления клеток и растяжения клеточных стенок. Однако, при этом растению важно, чтобы при интенсивном росте не происходило чрезмерное накопление АФК, угнетающих его жизнедеятельность, поэтому растение, возможно, в этот период повышает свой антиоксидантный статус, прежде всего за счет увеличения активности пероксидазных ферментов (КАТ, АПОК, ГПОК),

содержания компонентов глутатионовой системы и ОАС, что, в целом, является показателем повышенного антиоксидантного статуса.

Так же в исследованиях Asada (1999) имеется информация о том, что для удаления перекиси водорода растению необходимо, чтобы уровень АК и глутатиона был достаточно высоким и для обезвреживания H_2O_2 есть аскорбат-глутатионовый цикл, в окислительно-восстановительные реакции которого как раз включаются аскорбат (ОАС), АПОК, компоненты глутатионовой системы и НАДФН⁺. Таким образом, трансгенные растения со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* видимо стимулируют аскорбат-глутатионовый цикл, который находится всегда в более активном состоянии, влияя на его компоненты, как при нормальных условиях, так и при воздействии различных абиотических стресс-факторов.

Нами был проведен анализ белок-белковых взаимодействий генов *EXPs* и *XTHs* с помощью программы String-db на ортологах исследуемых генах в растениях арабидопсиса, т.к. взаимодействия данных генов у табака с другими генами еще мало изучены и в базе String-db не представлены.

Полученные сети белок-белковых взаимодействий в программе String-db по генам *EXPs* (рис. 3.32А, Б) и *XTHs* (рис. 3.32В, Г) для *A. thaliana* соотносятся с результатами, полученными в данном исследовании, и показывают, что исследуемые гены связаны друг с другом и работают в тандеме, а также они связаны с генами, ответственными за некоторые компоненты АОС.

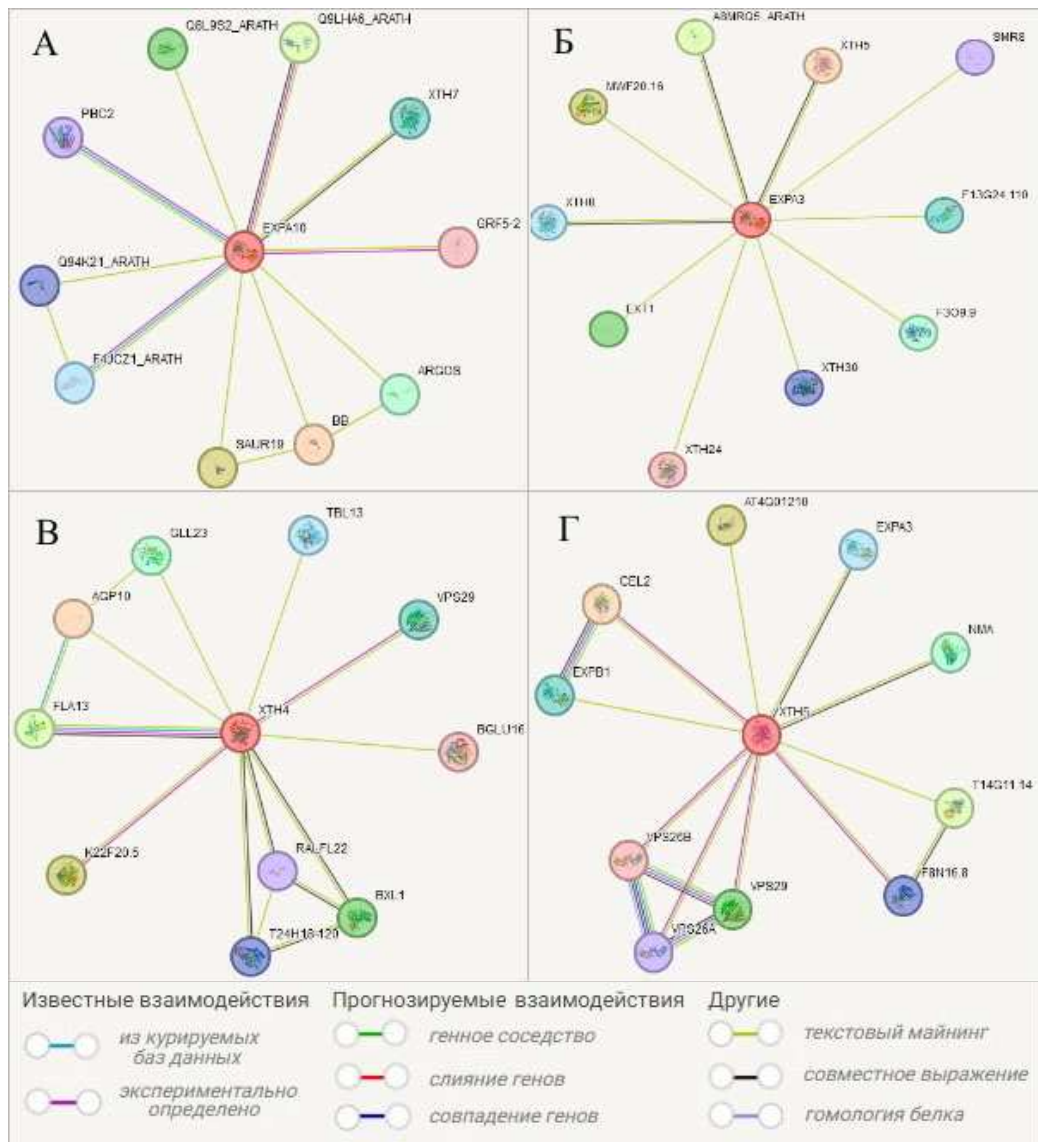


Рисунок 3.32. Сети белок-белковых взаимодействий для генов *EXPA10* (А), *EXPA3* (Б), *XTH4* (В) и *XTH5* (Г) в растениях *A. thaliana*, построенные с использованием программы String-db (<https://string-db.org/>). Данные гены являются близкими гомологами исследуемых генов табака.

Было выявлено, что гены *EXPs* коэкспрессируются с генами *XTHs*, *ARGOS*, а также генами *E3* убиквитин-протеинлигазы, ауксин-чувствительного белка *SAUR19*, богатого пролином белка семейства экстензинов и рострегулирующего фактора 5 (рис. 3.33), которые являются прямыми или косвенными регуляторами роста и стрессоустойчивости, что соотносится с нашими данными. В свою очередь, гены *XTHs* коэкспрессируются с генами *EXPs*, а также с генами бета-D-ксилозидазы 1, пролин-тРНК-лигазы, белка семейства *RALF*, эндоглюканазы 1, белка

семейства гликозилтрансфераз 1 и белка семейства полигалактуроназ, которые также прямо или косвенно участвуют в регуляции и обеспечении роста и стрессоустойчивости растений. Полученные в программе String-db данные коррелируют с полученными результатами. В анализируемых нами генных сетях пока не выявляются непосредственно гены белков антиоксидантной системы, поэтому исследования взаимодействия роста, стрессоустойчивости и антиоксидантной системы при сверхэкспрессии *EXPs* и *XTHs* в корнях должны быть продолжены.

3.5. Заключение к главе 3

На растения постоянно оказывают влияние различные абиотические стресс-факторы, вызывающие разнообразные биохимические изменения, которые могут существенно влиять на процессы роста и развития растительного организма.

Экспансины и ксилоглюканэндотрансгликозилазы в растениях кодируются множеством генов, причем они могут отличаться друг от друга по паттерну экспрессии во времени и пространстве и выполняемым функциям при росте и развитии растительного организма. У трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* наблюдается повышенная по сравнению с ДТ устойчивость к стрессам, которая проявляется более высокими параметрами роста корней при влиянии абиотических стресс-факторов. Также устойчивость растений к стрессовым факторам определяется системами обезвреживания АФК, благодаря увеличению активности отдельных ее компонентов, но чаще всего сразу нескольких, как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных антиоксидантов. У растений, устойчивых к абиотическим стрессам, процессы генерации АФК чаще всего заторможены, что обеспечивается активным функционированием систем детоксикации, например, аскорбат-глутатионовым циклом.

Таким образом, экспансины оказывают стимулирующее воздействие на рост корней в условиях кадмиевого стресса за счет усиления роста клеток растяжением, при этом происходит активация компонентов АОС. Ксилоглюканэндотрансгликозилазы также оказывают положительный эффект на рост корней при действии ионов Cd, что выражается схожими изменениями в антиоксидантной системе: повышением пероксидазной активности, ОАС, содержания компонентов глутатионовой системы. Следует также отметить, что механизмы действия *EXPs* и *XTHs* на компоненты АОС неизвестны, можно лишь предположить, что влияние это не прямое, а косвенное. Полученные нами результаты говорят о том, что гены *EXPs* и *XTHs* могут быть предложены в качестве целевых для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к кадмию и к другим абиотическим стресс-факторам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизм клеточного растяжения корневой системы представляет собой сложный процесс, задействующий большое количество разнообразных факторов роста и развития растительного организма как внутренних, так и внешних. Белки экспансины и ферменты ксилоглюканэндотрансгликозилазы вовлечены в ответные реакции растительного организма при влиянии абиотических стресс-факторов и участвуют в обеспечении роста растений как при норме, так и при изменяющихся условиях среды. В растениях они кодируются большим числом генов, отличающихся паттерном экспрессии по времени и области локализации, а также выполняемым функциям в растениях. Полученные нами результаты также подтверждают это, действительно было обнаружено множество различий в морфофизиологических эффектах каждого из изученных трансгенов.

В диссертационной работе представлены результаты исследования влияния нескольких генов *EXPs* и *XTHs* на рост корневой системы трансгенных растений табака при нормальных условиях и при воздействии абиотических стресс-факторов, а также выявлено влияние трансгенов на стрессоустойчивость не только через изменения состояния клеточной стенки, но и через воздействие на отдельные компоненты АОС.

Исследование генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в корневой системе модельных растений табака представляет интерес для фундаментальной науки, так как до сих пор мало исследований по механизмам влияния этих генов на рост корней при нормальных условиях, а также стрессоустойчивость растений при дефиците влаги и еще меньше исследований про участие при этом компонентов АОС, на которые могут влиять данные гены. В целом, полученные данные вносят существенный вклад в изучение регуляции роста клеток корневой системы, а также расширяют знания о взаимодействии компонентов клеточной стенки с АОС корней.

В данной диссертационной работе впервые изучается влияние генов *EXPs* и *XTHs*, участвующих в растяжении корневой системы, на компоненты АОС корней при нормальных условиях и при воздействии ионов кадмия. В работе была поставлена цель оценить вклад генов *EXPs* и *XTHs* в регуляцию и обеспечение роста, стрессоустойчивости и влияния на компоненты АОС корней. В результате, после проведения всех экспериментов и обработки полученных результатов, было выявлено, что трансгенные растения табака со сверхэкспрессией изучаемых генов имеют улучшенные параметры роста корневой системы по сравнению с растениями ДТ как при нормальных условиях, так и при воздействии абиотических стресс-факторов чаще всего благодаря увеличению размеров клеток, а также влиянию на ОАС, пероксидазную активность и компоненты глутатионовой системы. Конкретные молекулярные механизмы влияния *EXPs* и *XTHs* на компоненты АОС пока остаются неизвестными и должны стать предметом дальнейших исследований.

Очень интересными также являются результаты о том, что гены *EXPs* и *XTHs* при растяжении работают разнонаправленно, однако, влияя на одни и те же компоненты АОС при кадмиевом стрессе. В целом, у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *EXPs* и *XTHs* наблюдается повышенная по сравнению с ДТ стрессоустойчивость, которая проявляется более высокими показателями роста корневой системы и через позитивное влияние на АОС.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что стрессоустойчивость растений к влиянию абиотических стресс-факторов связана с большим спектром молекулярно-генетических и физиолого-биохимических механизмов, важное место среди которых занимает активация роста корневой системы благодаря генам экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз, а также одновременная активация как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных компонентов АОС.

Вопросы регуляции работы антиоксидантной системы посредством влияния генов *EXPs* и *XTHs*, отвечающих за рост корней растительного организма растяжением являются одними из важных и актуальных направлений фундаментальных и прикладных исследований в области физиологии растений. Полученные результаты открывают широкие перспективы для использования генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз с целью повышения продуктивности и стрессоустойчивости растений, что представляется весьма актуальным для физиологии и биотехнологии растений, а также сельского хозяйства и растениеводства в целом. Наиболее удачные варианты созданных нами генно-инженерных конструкций могут быть использованы для генетической трансформации культурных растений. Таковым, к примеру, является конструкция *35S::PtrXTH1*, которая на табаке способствовала улучшению роста корней при норме, засолении, гипотермии и действию кадмия. С другой стороны, наиболее сильно отклоняющиеся от ДТ по результатам комплексного морфофизиологического анализа линии трансгенных растений табака могут быть использованы в дальнейших фундаментальных исследованиях.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что сверхэкспрессия генов экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA5*, *PnEXPA3*, *AtEXPA10* и генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT*, *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 *NtEXPA1* и *NtEXPA5* 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 *PtrXTH1* при действии кадмия увеличена общая антиоксидантная способность, активность аскорбатпероксидазы, содержание общего растворимого белка, окисленного и восстановленного глутатиона по сравнению с диким типом.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Взаимодействие сахаров с гидроксильным радикалом в связи с фунгитоксичностью выделений листьев // Биохимия. – 1989, Т. 54, № 10. – С. 1646-1651.
2. Алиева Д.Р., Бабаев Г.Г., Азизов И.В. Активность и изоферментный состав пероксидазы клеток *Dunaliella salina* при солевом стрессе // Вестник Днепропетровского университета. Биология. Медицина. – 2010, Т. 1(1). – С. 16-21.
3. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений (от вирусной инфекции) // М.: Наука. – 1991. – 129 с.
4. Ахмеджанов И.Г., Тонких А.К., Хатамов М.М. Физиологические особенности неспецифической устойчивости растений к негативным факторам среды // Физиология растений и генетика. – 2015, Т. 47, № 3. – С. 207-212.
5. Бабоша А.В., Комарова Г.И. Концентрационные эффекты действия салициловой кислоты и зеатина на рост корня и гипокотилия проростков томатов и рапса // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2013, № 4 (1). – С. 145-152.
6. Безуглова О.С. Гуминовые удобрения и стимуляторы роста // Учебно-методическое пособие. Ростов-на-Дону. – 2009. – 54 с.
7. Белозерова А.А., Боме Н.А. Изучение реакции яровой пшеницы на засоление по изменчивости морфометрических параметров проростков // Фундаментальные исследования. – 2014, № 12. – С. 300-306.
8. Белозерова А.А., Лукашенко М.Г. Особенности развития растений яровой пшеницы в условиях засоления // Успехи современного естествознания. – 2010, № 7. – С. 18-19.
9. 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. – С. 522-530.

10. Венжик Ю.В., Холопцева Е.С., Игнатенко А.А., Таланова В.В. Адаптивные возможности *Triticum aestivum* L. (Poaceae) при низкотемпературных воздействиях разной интенсивности // Труды Карельского научного центра РАН. – 2020, № 11. – С. 104-112.
11. Войников В.К. Энергетическая и информационная системы растительных клеток при гипотермии // Новосибирск: Наука. – 2013. – 212 с.
12. Высоцкая Л.Б., Веселов Д.С., Фархутдинов Р.Г., Веселов С.Ю. Гормональная регуляция водного обмена и роста растений на разных фонах минерального питания и при дефиците воды: монография // Уфа: РИЦ БашГУ. – 2014. – 244 с.
13. Газарян И.Г. Особенности структуры и механизм действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. – 2006, Т. 46. – С. 303-322.
14. Гольд В.М., Гаевский Н.А., Голованова Т.И., Белоног Н.П., Горбанева Т.Б. Физиология растений: конспект лекций // Красноярск: ИПК СФУ. – 2008. – 148 с.
15. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка, как динамичная система // М.: Наука. – 2007. – 429 с.
16. Гришко В.Н., Сыщиков Д.В. Функционирование глутатион-зависимой антиоксидантной системы и устойчивость растений при действии тяжелых металлов и фтора // Киев: Наук. думка. – 2012. – 239 с.
17. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века (учеб. пособие) // М.: Изд-во РУДН. – 2002. – 140 с.
18. Додуева И.Е., Кирюшкин А.С., Юрлова Е.В., Осипова М.А., Бузовкина И.С., Лутова Л.А. Влияние цитокининов на экспрессию генов *CLE* редиса // Физиология растений. – 2013, Т. 60, № 3. – С. 399-407.
19. Евграшкина Т.Н., Иванищев В.В., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Влияние сульфатного засоления на ростовую активность и водный обмен тритикале озимого сорта «Трибун» // Вестник ВГУ. Химия. Биология. Фармация. – 2019, № 3. – С. 34-41.

20. Евграфкина Т.Н., Иванищев В.В., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Индукция окислительного стресса карбонатным засолением в проростках тритикале // Российская сельскохозяйственная наука. – 2020, № 1. – С. 11-14.
21. Евграфкина Т.Н., Иванищев В.В., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Проявления окислительного стресса в проростках тритикале в условиях сульфатного засоления // Бутлеровские сообщения. – 2018, Т. 54, № 4. – С. 128-133.
22. Ерофеева Е.А., Наумова М.М. Влияние сульфата кадмия в широком диапазоне концентраций на физиолого-биохимические показатели проростков пшеницы // Физико-химическая биология. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010, № 2 (2). – С. 508-512.
23. Жуков Н.Н., Бойкова О.И., Иванищев В.В. Физиолого-биохимические механизмы адаптации проростков тритикале при кратковременном NaCl-засолении (монография) // Тбилиси: МП «Полиграф». – 2016. – 125 с.
24. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник МГПУ. Серия «Естественные науки». – 2016, № 2. – С. 9-23.
25. Иванищев В.В. О механизмах солеустойчивости растений и специфике влияния засоления // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2019, №. 4. – С. 74-88.
26. Иванов В.Б. Клеточные механизмы роста растений // Москва: Наука. – 2011. – 104 с.
27. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений // М.: Наука. – 1974. – 223 с.
28. Иванов В.Б. Рост и размножение клеток в корне // Физиология корня. – 1978, Т. 1. – С. 7-58.
29. Иванов И.И. Эндогенные ауксины и ветвление корней при изолированном питании растений пшеницы // Физиология растений. – 2009, Т. 56. – С. 241-246.

30. Ивашковец Н.Е., Артемук, Е.Г. Антиоксидантная система защиты сельскохозяйственных растений при воздействии ионов тяжелых металлов // Сборник научных работ студентов Республики Беларусь «НИРС 2011»: Минск. – 2012. – С. 47.
31. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х., Микроэлементы в почвах и растениях // М.: Мир. – 1989. – 439 с.
32. Караваев В.А., Баулин А.М., Гордиенко Т.В. Изменение фотосинтетического аппарата листьев бобов в зависимости от содержания тяжелых металлов в среде выращивания // Физиология растений. – 2001, Т. 48, № 1. – С. 47-54.
33. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров // Киев: Логос. – 2019. – 277 с.
34. Коробко В.В., Касаткин М.Ю. Анатомическая организация вегетативных органов растений // Саратов. – 2014. – 99 с.
35. Коровкин О.А. Ботаника: учебник // М.: КНОРУС. – 2016. – 434 с.
36. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988, №1. – С. 16-19.
37. Кошкин Е.И. Физиологические основы селекции растений // М.: Аргамак-Медиа. – 2014. – 400 с.
38. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999, Т. 46, № 2. – С. 321-336.
39. Кузнецова Т.Ю., Титов А.Ф., Ветчинникова Л.В. Влияние кадмия на морфо-физиологические показатели березы *in vitro* // ИВУЗ. «Лесной журнал». – 2008, № 3. – С. 40-45.
40. Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений // Соросовский Образовательный Журнал. – 1995, № 1. – С. 20-28.

41. Кулуев Б.Р. Регуляторы деления и пролиферации клеток в растениях // Биомика. – 2017, Т. 9, № 2. – С. 119-135.
42. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Участие генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *PtrXTH1* и *PnXTH1* в регуляции роста и адаптации растений к стресс-факторам // Физиология растений. – 2018, Т. 65, № 1. – С. 34-45.
43. 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.
44. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Роль генов *NtEXPA1* и *NtEXPA4* в регуляции клеточного растяжения при росте листьев табака // Генетика. – 2014, Т. 50, № 5. – С. 560-569.
45. Кулуев Б.Р., Круглова Н.Н., Зарипова А.А., Фархутдинов Р.Г. Основы биотехнологии растений: учебное пособие // Уфа: РИЦ БашГУ. – 2017. – 244 с.
46. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Перенос трансгенов *ARGOS-LIKE* и *AtEXPA10* в нетрансгенные формы табака и фенотипические проявления их конститутивной экспрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013, Т.17, № 1. – С. 81-88.
47. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г. Регуляция роста клеток растяжением в растениях // Успехи современной биологии. – 2015, Т. 135, № 2. – С. 148-163.
48. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В. Влияние эктопической экспрессии гена *NtEXPA5* на размеры клеток и рост органов трансгенных растений табака // Онтогенез. – 2013, Т. 44, № 1. – С. 34-41.
49. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В. Морфологический анализ трансгенных растений табака экспрессирующих ген *PnEXPA3* тополя черного // Онтогенез. – 2013, Т. 44, № 3. – С. 166-173.

50. Куркиев К.У., Алиева З.М., Темирбекова С.К., Хабиева Н.А. Устойчивость мягкой пшеницы и тритикале к высокому уровню хлоридного засоления // Достижения науки и техники АПК. – 2017, Т. 31, № 2. – С. 26-28.
51. Куркиев К.У., Гасанова В.З., Кагирова Н.К. Влияние хлоридного засоления на признаки колоса тритикале // Труды института геологии Дагестанского научного центра РАН. – 2016, № 67. – С. 144-146.
52. Ли Т.К., Лу Л.Л., Жу Е., Гупта Д.К., Ислам Е., Янг Х.Е. Антиоксидантная система в корнях двух контрастных экотипов *Sedum alfredii* при повышенных концентрациях цинка // Физиология растений. – 2008, Т. 55, № 6. – С.886-894.
53. Луценко Э.К. Накопление ионов, рост и митотическая активность меристемы растений в условиях засоления // М. – 1979. – 143 с.
54. Медведев С.С. Физиология растений: Учебник. // СПб.: Изд-во С.-Петерб. Ун-та. – 2004. – 336 с.
55. Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны // СПб.: Изд-во СПбГУ. – 2010. – 247 с.
56. Медведев С.С., Шарова Е.И. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов (обзор) // Journal of Siberian Federal University. Biology. – 2010, V. 3, № 2. – P. 109-129.
57. Медведев С.С., Шарова Е.Ю. Биология развития растений. Т. 1. Начала биологии развития растений. Фитогормоны // Санкт Петербург: СПбГУ. – 2011. – 253 с.
58. Минибаева Ф.В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. – 2003, Т. 50. – С. 459-464.
59. Михайлова Р.В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии // Минск: Белорусская наука. – 2007. – 406 с.
60. Негроров В.В. Растительная клетка: учебное пособие // Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета. – 2010. – 171 с.

61. Обручева Н.В. Растяжение клеток как неотъемлемая составляющая роста наземных растений // Онтогенез. – 2008, Т. 39, № 1. – С. 15-27.
62. Обручева Н.В., Ковадло Л.С., Прокофьев А.А. Уровень оводненности как пусковой фактор мобилизации крахмала и белка при прорастании семян гороха // Физиология растений. – 1988, Т. 35, № 2. – С. 322-328.
63. Омарова З.А. Влияние хлорида натрия на морфометрические признаки проростков у сортов озимой мягкой пшеницы // Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1: Естественные науки. – 2016, № 4. – С. 97-105.
64. Площинская М.Е., Иванов В.Б., Салмин С.А., Быстрова Е.И. Анализ возможных механизмов регуляции ветвления корня // Общая биология. – 2002, Т. 63., № 1. – С. 68-74.
65. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода // М.: КДУ. – 2007. – 137 с.
66. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // Физиология растений. – 2004, № 5. – С. 686-691.
67. Родченко О.П, Маричева Э.А., Акимова Г.П. Адаптация растущих клеток корня к пониженным температурам // Новосибирск: Наука. Сиб. отделение. – 1988. – 146 с.
68. Рожков В.А., Кузнецова И.В., Рахматуллоев Х.Р. Методы изучения корневых систем растений в поле и лаборатории // Учеб.-методич. пособие., 2-е изд. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ. – 2008. – 51 с.
69. Самусик Е.А., Марчик Т.П., Головатый С.Е. Интенсивность окислительных процессов и активность антиоксидантной системы в листьях древесных растений, произрастающих в условиях техногенного загрязнения // Социально-экологические технологии. – 2022, Т. 12, № 4. – С. 418-438.

70. Сахабутдинова А.Р., Ласточкина О.В., Шакирова Ф.М. Влияние метилжасмоната на рост и гормональный статус проростков пшеницы // Агрохимия. – 2009, №7. – С. 48-53.
71. Серегин И.В. Роль тканей корня и побега в транспорте и накоплении кадмия, свинца, никеля и стронция // Физиология растений. – 2015, Т. 55. – С. 3-26.
72. Серегин И.В., Иванов В.Б. Физиологические аспекты токсического действия кадмия и свинца на высшие растения // Физиология растений. – 2001, Т. 48, № 4. – С. 606-630.
73. Серенко Е.Н., Баранова Е.Н., Балахнина Т.И., Куренина Л.В., Гулевич А.А., Кособрюхов А.А., Майсурян А.Н., Поляков В.Ю. Структурная организация хлоропластов растений томата *Solanum lycopersicum*, трансформированных геном Fe-супероксиддисмутазы // Биологические мембраны. – 2011, Т. 28. – С. 215-223.
74. Стриж И.Г. Участие активных форм кислорода в регуляции роста и развития корня // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2009, № 4. – С. 1-7.
75. Строгонов Б.П. Физиологические основы солеустойчивости растений // М.: АН СССР. – 1962. – 366 с.
76. Терлецкая Н.В., Хайленко Н.А., Исакова А.Б. Особенности реакции проростков аллоплазматических линий мягкой пшеницы на действие осмотического и солевого стресса // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2011, № 2 (83). – С. 244-249.
77. Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур // М.: Наука. – 2006. – 143 с.
78. Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В. В. Тяжелые металлы и растения // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. – 2014. – 194 с.
79. Титов А.Ф., Таланова В.В. Локальное действие высоких и низких температур на растения // Петрозаводск: КарНЦ РАН. – 2011. – 166 с.

80. Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам // Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. – 2007. – 172 с.
81. Федулов Ю.П., Котляров В.В., Доценко К.А. Устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды: учеб. пособие // Краснодар: КубГАУ. – 2015. – 64 с.
82. Федулов Ю.П., Котляров В.В., Доценко К.А., Барчукова А.Я., Тосунов Я.К., Подушин Ю.В. Рост и развитие растений: учебное пособие // Краснодар: КубГАУ. – 2013. – 85 с.
83. Филин А.Н. Клеточный анализ роста корней некоторых мутантов *Arabidopsis thaliana* // Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки. – 2015, № 4. – С. 37-45.
84. Филин А.Н., Иванов В.Б. Влияние 2,4-Д на пролиферацию и растяжение клеток в корнях *Arabidopsis thaliana* // Физиология растений. – 2016, Т. 63, № 1. – С. 174-179.
85. Хаблак С.Г., Абдуллаева Я.А. Теория ферментативного роста клеток растяжением // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2013, Т. 9. – С. 185-196.
86. Хусаинов А.Т., Сыздыкова Г.Т., Андреева Ю.А. Влияние степени сульфатного засоления на ростовые процессы генотипов яровой мягкой пшеницы // Аграрный вестник Урала. – 2014, № 1 (119). – С. 23-26.
87. Чайлахян М.Х. Гормональная регуляция роста и развития высших растений // Успехи современной биологии. – 1982, Т. 95, № 1. – С. 23-34.
88. Черепахин В.И., Бабук В.И., Карпенчук Г.К. Плодоводство // М.: Агропромиздат. – 1991. – 271 с.
89. Чупахина Г.Н. Система аскорбиновой кислоты растений // Калининград: Калинингр. ун-т. – 1997. – 120 с.
90. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция // Уфа: Гилем. – 2001. – С. 35-42.

91. Шалыго Н.В., Щербаков Р.А., Доманская И.Н., Радюк М.С. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007, Т. 39, № 3. – С. 264-270.
92. Шарова Е.И. Клеточная стенка растений // СПб.: Изд-во СПб. ун-та. – 2004. – 152 с.
93. Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. – 2007, Т. 54, № 6. – С. 805-819.
94. Шихмурадов А.З. Влияние среднего уровня засоления на элементы продуктивности сортообразцов твердой пшеницы // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009, № 2. – С. 36-37.
95. Abozeid A., Ying Z., Lin Y., Liu J., Zhang Z., Tang Z. Ethylene improves root system development under cadmium stress by modulating superoxide anion concentration in *Arabidopsis thaliana* // Front Plant Sci. – 2017, V. 8. – P. 1-15.
96. Achard P., Renou J-P., Berthome R., Harberd N.P., Genschik P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species // Current Biology. – 2008, V.18. – P. 656-660.
97. Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y.S., Amasino R., Scheres B. The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche // Cell. – 2004, V. 119. – P. 109-120.
98. Alhasnawi A.N., Che Radziah C.M.Z., Kadhimi A.A., Isahak A., Mohamad A., Yusoff W.M.W. Enhancement of antioxidant enzymes activities in rice callus by ascorbic acid under salinity stress // Biol. Plant. – 2016, V. 60. – P. 783-787.
99. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. – 1997, V. 25. – P. 4692-4693.
100. Asada K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzymes in plants // Physiol. Plant. – 1992, V. 85. – P. 235-241.

101. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999, V. 50. – P. 601-639.
102. Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P.W. Root apex transition zone: a signaling-response nexus in the root // *Trends in Plant Science.* – 2010, V. 15, № 7. – P. 402-408.
103. Bao Y., Aggarwal P., Robbins N.E., Sturrock C.J., Thompson M.C., Tan H.Q., Tham C., Duan L., Rodriguez P.L., Vernoux T., Mooney S.J., Bennett M.J., Dinneny J.R. Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water // *PNAS.* – 2014, V. 111, № 25. – P. 9319-9324.
104. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant Soil.* – 1973, V.39. – P. 205-207.
105. Becnel J, Natarajan M, Kipp A, Braam J. Developmental expression patterns of *Arabidopsis* XTH genes reported by transgenes and Genevestigator // *Plant Molecular Biology.* – 2006, V. 61. – P. 451-467.
106. Beemster G.T.S., Baskin T.I. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* – 1998, V. 116. – P. 1515-1526.
107. Beemster G.T.S., Baskin T.I. Stunted plant 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol.* – 2000, V. 124, № 4. – P. 1718-1727.
108. Ben Rejeb K., Abdelly C., Savouire A. Proline, a multifunctional amino-acid involved in plant adaptation to environmental constraints // *Biologie Aujourd'hui.* – 2012, V. 206, № 4. – P. 291-299.
109. Berckmans B., Vassileva V., Schmid S.P.C., Maes S., Parizot B., Naramoto S., Magyar Z., Kamei C.L.A., Koncz C., Bogre L., Persiau G., De Jaeger G., Friml J., Simon R., Beeckman T., De Veylder L. Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins // *Plant Cell.* – 2011, V. 23, № 10. – P. 3671-3683.

110. Bernstein N., Kafkafi U. Root growth under salinity stress // *Plant roots*. – 2002. – P. 1222-1250.
111. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., Papenbrock J. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // *AoB Plants*. – 2014, № 13. – P. 6-12.
112. Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development // *Planta*. – 2004, V. 218. – P. 683-692.
113. Boyer J.S. Plant productivity and environment // *Science*. – 1982, V. 218. – P. 443-448.
114. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem*. – 1976, V. 72. – P. 248-254.
115. Brady S.M., Orlando D.A., Lee J-Y., Wang J.Y., Koch J., Dinneny J.R., Mace D., Ohler U., Benfey P.N. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns // *Science*. – 2007, V. 318. – P. 801-806.
116. Brovko F.A., Vasil'eva V.S., Shepelyakovskaya A.O., Selivankina S.Y., Kudoyarova G.R., Nosov A.V., Moshkov D.A., Laman A.G., Boziev K.M., Kusnetsov V.V., Kulaeva O.N. Cytokinin-binding protein (70 kDa): localization in tissue and cells of etiolated maize seedlings and its putative function // *J. Exp. Bot.* – 2007, V. 58. – P. 2479-2490.
117. Burström H.G. Auxin and the mechanism of root growth // *Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1957, V. 11. – P. 44-62.
118. Burström H.G. Studies on growth and metabolism of root. IV. Positive and negative auxin effects on cell elongation // *Physiol. Plant.* – 1950, V. 3. – P. 277-292.
119. Burström H.G. The influence of heteroauxin on cell growth and root development // *Ann. Agricult. Coll. Sweden*. – 1942, V. 10. – P. 209-240.
120. Casamitjana-Martínez E., Hofhuis H.F., Xu J., Liu C.-M., Heidstra R., Scheres B. Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors

implicate a CLV-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance // *Curr. Biol.* – 2003, V. 13. – P. 1435-1441.

121. Catala C., Rose J.K., York W.S., Albersheim P., Darvill A.G., Bennett A.B. Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls // *Plant Physiol.* – 2001, V. 127. – P. 1180-1192.

122. Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant // *Functional Plant Biol.* – 2003, V. 30. – P. 239-264.

123. Che J., Yamaji N., Shen R.F., Ma J.F. An Al-inducible expansin gene, *OsEXPA10* is involved in root cell elongation of rice // *Plant J.* – 2016, № 88. – P. 132-142.

124. Chen Y, Han Y, Zhang M, Zhou S, Kong X, Wang W. Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA2* improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants // *PLoS ONE.* – 2016. – Dataset.

125. Chen F., Wang F., Wu F., Mao W., Zhang G., Zhou M. Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance // *Plant physiology and biochemistry.* – 2010, V. 48. – P. 663-672.

126. Chen L.J., Zou W.S., Wu G., Lin H.H., Xi D.H. Tobacco alpha-expansin *EXPA4* plays a role in *Nicotiana benthamiana* defence against Tobacco mosaic virus // *Planta.* – 2018, V. 247. – P. 355-368.

127. Chen Y.H., Yang X.Y., He K., Liu M.H., Li J.G., Gao Z.F., Lin Z.Q., Zhang Y.F., Wang X.X., Qiu X.M., Shen Y.P., Zhang L., Deng X.H., Luo J.C., Deng X.W., Chen Z.L., Gu H.Y., Qu L.J. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family // *Plant Molecular Biology.* – 2006, V. 60. – P. 107-124.

128. Cho S.K., Kim J.E., Park J-A., Eom T.J., Kim W.T. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in

- transgenic *Arabidopsis* plants // FEBS Letters. – 2006, V. 580, № 13. – P. 3136-3144.
129. Choi J.Y., Seo Y.S., Kim S.J., Kim W.T., Shin J.S. Constitutive expression of *CaXTH3*, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tolerance to salt and drought stresses without phenotypic defects in tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang) // Plant Cell Rep. – 2011, V. 30. – P. 867-877.
130. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Anal Biochem. – 1987, V. 162. – P. 156-159.
131. Chuck G., Candela H., Hake S. Big impacts by small RNAs in plant development // Current Opinion in Plant Biology. – 2009, V. 12. – P. 81-86.
132. Clemens S., Aarts M.G.M., Thomine S., Verbruggen N. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning // Trends in Plant Science. – 2013, V. 18, № 2. – P. 92-99.
133. Colmer T.D., Peeters A.J., Wagemaker C.A., Vriezen W.H., Ammerlaan A., Voesenek L.A. Expression of alpha-expansin genes during root acclimations to O₂ deficiency in *Rumex palustris* // Plant molecular biology. – 2004, V. 56. – P. 423-437.
134. Cosgrove D. J. Expansive growth of plant cell walls // Plant Physiol. Biochem. – 2000a, V. 38. – P. 109-124.
135. Cosgrove D.J. Growth of the plant cell wall // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2005, V.6. – P. 850-861.
136. Cosgrove D.J. Loosening of plant cell walls by expansions // Nature. – 2000, V. 407. – P. 321-326.
137. Cosgrove D.J. New genes and new biological roles for expansins // Curr. Opin. Plant Biol. 2000b, V. 3. – P. 73-78.
138. Cosgrove D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls // Curr. Opin. Plant Biol. – 2015, V. 25. – P. 162-172.

139. Cosgrove D.J. Wall extensibility: its nature, measurement and relationship to plant cell growth // *New Phytol.* – 1993, V. 124. – P. 1-23.
140. Cunningham F.M., Collins F.W., Hutchinson T.C. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity in soybean // *Int. Conf. on Heavy Metals in the Environment*, Toronto. – 1975. – P. 97.
141. Dabin P., Marafante E., Mousny J.M., Myttenaere C. Absorption, distribution and binding of cadmium and zinc in irrigated rice plants // *Plant Soil.* – 1978, V. 50, № 2. – P. 329-341.
142. Dai F., Zhang C., Jiang X., Kang M., Yin X., Lü P., Zhang X., Zheng Y., Gao J. *RhNAC2* and *RhEXPA4* are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals // *Plant Physiol.* – 2012. – V. 160. P. 2064-2082.
143. De Cnodder T., Verbelen J.-P., Vissenberg K. The control of cell size and rate of elongation in the *Arabidopsis* root // *The expanding cell*. Berlin: Springer Verlag. – 2006. – P. 249-269.
144. De Pinto M.C., Tommasi F., De Gara L. Changes in the antioxidant systems at part of the signalling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco blight-yellow 2 cells // *Plant Physiol.* – 2002, V. 130, № 2. – P. 698-708.
145. De Rybel B., Vassileva V., Parizot B., Demeulenaere M., Grunewald W., Audenaert D., Van Campehout J., Overvoorde P., Jansen L., Vanneste S., Möller B., Wilson M., Holman T., Van Isterdael G., Brunoud G., Vuylsteke M., Vernoux T., De Veylder L., Inzé D., Weijers D., Bennett M.J., Beeckman T. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity // *Curr. Biol.* – 2010, V. 20, № 19. – P. 1697-1706.
146. De Smet I., Lau S., Voß U., Vanneste S., Benjamins R., Rademacher E.H., Schlereth A., De Rybel B., Vassileva V., Grunewald W., Naudts M., Levesque M.P., Ehrismann J.S., Inzé D., Luschnig C., Benfey P.N., Weijers D., Van Montagu M.C.E., Bennett M.J., Jürgens G., Beeckman T. Bimodular auxin

response controls organogenesis in *Arabidopsis* // PNAS. – 2010, V. 107, № 6. – P. 2705-2710.

147. Dello Ioio R., Galinha C., Fletcher A.G., Grigg S.P., Molnar A., Willemsen V., Scheres B., Sabatini S., Baulcombe D., Maini P.K., Tsiantis M. A phabulosa/cytokinin feedback loop controls root growth in *Arabidopsis* // Curr. Biol. – 2012, V. 22. – P. 1699-1704.

148. Dello Ioio R., Scaglia Linhares F., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation // Curr. Biol. – 2007, V. 17. – P. 678-682.

149. Dixit P., Mukherjee P.K., Ramachandran V., Eapen S. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum* // PLOS ONE. – 2011, V. 6. – A. e16360.

150. Dong J.; Jiang Y.; Chen R.; Xu Z.; Gao X. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (*OsXET9*) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses // Afr. J. Biotechnol. – 2011, V. 10. – P. 17424-17434.

151. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances // Analyt. Chem. – 1956, V. 28. – P. 350-356.

152. Dunand C., Crevecoeur M., Penel C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases // New Phytologist. – 2007, V. 174. – P. 332-341.

153. Duncan D.B. Multiple range and multiple F-test // Biometrics. – 1955, V. 11. – P.1-5.

154. Endler A., Persson S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis* // Mol. Plant. – 2011, V. 4, № 2. – P. 199-211.

155. Evans M.L. Functions of hormones at the cellular level of organization // Encycl. Plant Physiol. – 1978, V. 10. – P. 23-79.

156. Flowers T.J. Improving crop salt tolerance // J. Exp. Bot. – 2004, V. 55. – P. 307-319.
157. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth // Nature. – 2003, V. 422. – P. 442-446.
158. Foyer C.H.; Noctor G. Defining robust redox signalling within the context of the plant cell // Plant, Cell and Environment. – 2015, V. 38. – P. 239-239.
159. Garajová S., Flodrová D., Ait-Mohand F., Farkaš V., Stratilová E. Characterization of two partially purified xyloglucan endotransglycosylases from parsley (*Petroselinum crispum*) roots // Biologia. – 2008, V. 63, № 3. – P. 313-319.
160. Geisler-Lee J., Geisler M., Coutinho P.M., Segerman B., Nishikubo N. Poplar carbohydrateactive enzymes. Gene identification and expression analyses // Plant Physiol. – 2006, V. 140. – P. 946-962.
161. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants // Plant Physiology. – 1977, V. 59. – P. 309-314.
162. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. – 2010, V. 48. – P. 909-930.
163. Goh T., Toyokura K., Wells D.M., Swarup K., Yamamoto M., Mimura T., Weijers D., Fukaki H., Laplaze L., Bennett M.J., Guyomarc'h S. Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor // Development. – 2016. – A. 143(18).
164. Grossman J.D., Rice K.J. Evolution of root plasticity responses to variation in soil nutrient distribution and concentration. Evolutionary Applications. – 2012, V. 5, № 8. – P. 850-857.
165. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974, V. 246. – P. 7130-7139.

166. Hake S., Ori N. Plant morphogenesis // *Nature Genetics*. – 2002, V. 31. – P. 121-122.
167. Han Y., Ban Q.Y., Hou Y.L., Meng K., Suo J.T., Rao J.P. Isolation and characterization of two persimmon xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) genes that have divergent functions in cell wall modification and fruit postharvest softening // *Frontiers in Plant Science*. – 2016, V. 7. – A. 624.
168. Han Y., Chaouch S., Mhamdi A., Queval G., Zechmann B., Noctor G. Functional analysis of arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H₂O₂ to activation of salicylic acid accumulation and signaling // *Antioxidants Redox Signal*. – 2013a, V. 18. – P. 2106-2121.
169. Han Y., Chen Y, Yin S., Zhang M., Wang W. Over-expression of *TaEXPB23*, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants // *Journal of Plant Physiology*. – 2015, V. 173. – P. 62-71.
170. Han Y., Han S., Ban Q., He Y., Jin M., Rao J. Overexpression of persimmon *DkXTH1* enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants // *Plant Cell Reports*. – 2017, V. 36, № 4. – P. 583-596.
171. Han Y., Li A., Li F., Zhao M., Wang W. Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation // *Plant Physiol Biochem*. – 2012, V. 54. – P. 49-58.
172. Han Y., Mhamdi A., Chaouch S., Noctor G. Regulation of basal and oxidative stress-triggered jasmonic acid-related gene expression by glutathione // *Plant Cell Environ*. – 2013b, V. 36. – P. 1135-1146.
173. Han Y., Wang W., Sun J., Ding M., Zhao R., Deng S., Wang F., Hu Y., Wang Y., Lu Y., Du L., Hu Z., Diekmann H., Shen X., Polle A., Chen S. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants // *Journal of Experimental Botany*. – 2013, V. 64. – P. 4225-4238.
174. Hartig K., Beck E. Crosstalk between auxin, cytokinins and sugars in the plant cell cycle // *Plant Biol*. – 2006, V. 8. – P. 389-396.

175. Herbers K., Lorences E.P., Barrachina C., Sonnewald U. Functional characterisation of *Nicotiana tabacum* xyloglucan endotransglycosylase (*NtXET-1*): generation of transgenic tobacco plants and changes in cell wall xyloglucan // *Planta*. – 2001, V. 212. – P. 279-287.
176. Hernandez J.A., Campillo A., Jimenez A. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants // *New Phytologist*. – 1999, V. 141. – P. 241-251.
177. Hooker T.S., Thorpe T.A. Effects of fluridone and abscisic acid on lateral root initiation and root elongation of excised tomato roots cultured in vitro // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 1998, V. 52. – P. 199-203.
178. Hu Y., Ge Y., Zhang C., Ju T., Cheng, W. Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxidase pretreatment // *Plant Growth Regul.* – 2009, V. 59. – P. 51-61.
179. Hufnagel B., de Sousa S.M., Assis L., Guimaraes C.T., Leiser W., Azevedo G.C., Negri B., Larson B.G., Shaff J.E., Pastina M.M., Barros B.A., Weltzien E., Rattunde H.F.W., Viana J.H., Clark R.T., Falcão A., Gazaffi R., Garcia A.A.F., Schaffert R.E., Kochian L.V., Magalhaes J.V. Duplicate and conquer: multiple homologs of PHOSPHORUS-STARVATION TOLERANCE1 enhance phosphorus acquisition and sorghum performance on low-phosphorus soils // *Plant Physiol.* – 2014, V. 166, № 2. – P. 659-677.
180. Humphreys J.L., Smith S.M. Strigolactone breakdown // *Nature Plants*. – 2021, V.7. – P. 1443-1444.
181. Iraki N.M., Bressan R.A., Carpita N.C. Extracellular polysaccharides and proteins of tobacco cell cultures and changes in composition associated with growth-limiting adaptation to osmotic stress // *Ibid.* – 1989, V.91. – P. 48-53.
182. Iurlaro A., De Caroli M., Sabella E., De Pascali M., Rampino P., De Bellis L., Perrotta C., Dalessandro G., Piro G., Fry S.C., Lenucci M.S. Drought and heat differentially affect XTH expression and XET activity and action in 3-day-old seedlings of durum wheat cultivars with different stress susceptibility // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. V. 7. – A. 1686.

183. Ivanov V.B. Relationship between cell proliferation and transition to elongation in plant roots // *Int. J. Devel. Biol.* – 1997, V. 41. – P. 907-915.
184. Ivanov V.B., Dubrovsky J.G. Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cellcycle duration, rate of cell production, and rate of root growth // *International J. of Plant Sciences.* – 1997, V. 158, № 6. – P. 757-763.
185. Jadamba C., Kang K., Paek N.C., Lee S.I., Yoo S.C. Overexpression of rice expansin 7 (*Osexpa 7*) confers enhanced tolerance to salt stress in rice // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020, № 21 (2). – A. 454.
186. Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A. Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem // *Plant J.* – 2003, V. 35. – P. 429-441.
187. Kano M., Inukai Y., Kitano H., Yamauchi A. Root plasticity as the key root trait for adaptation to various intensities of drought stress in rice // *Plant Soil.* – 2011, V. 342, № 1-2. – P. 117-128.
188. Katayama H., Iwamoto K., Kariya Y., Asakawa T., Kan T., Fukuda H., Ohashi-Ito K. A negative feedback loop controlling bHLH complexes is involved in vascular cell division and differentiation in the root apical meristem // *Curr Biol.* – 2015, V. 7. – P. 3144-3150.
189. Kaur R., Nayyar H. Ascorbic acid a potent defender against environmental stresses // *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling.* – 2014. – P. 235-287.
190. Kell D.B. Breeding crop plants with deep roots: their role in sustainable carbon, nutrient and water sequestration // *Ann. Bot.* – 2011, V. 108, № 3. – P. 407-418.
191. Khan D.I., Duckett J.G., Frankland B., Kirkham J.B. An X-ray microanalytical study of distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. // *Plant Physiol.* – 1984, V. 115. – P. 19-28.

192. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Abdel W.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // Journal of Experimental Botany. – 2003, V. 54, № 392. – P. 2553-2562.
193. Kieber J.J., Schaller G.E. Cytokinins // Arab. B. – 2014, V. 12. – A. e0168.
194. Kim J.H., Choi D., Kende H. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in Arabidopsis // Plant J. – 2003, V. 36. – P. 94-104.
195. Kinoshita A., Betsuyaku S., Osakabe Y., Mizuno S., Nagawa S., Stahl Y., Simon R., Yamaguchi-Shinozaki K., Fukuda H., Sawa S. RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis // Development. – 2010, V. 137. – P. 3911-3920.
196. Knox J.P. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls // Curr. Opin. Plant Biol. – 2008, V. 11. – P. 308-313.
197. Krieger G., Shkolnik D., Miller G., Fromm H. Reactive oxygen species tune root tropic responses // Plant Physiol. – 2016, V. 172, № 2. – P. 1209-1220.
198. Kronfuss G., Wieser G., Havranek W.M., Polle A. Effects of ozone and mild drought stress on total and apoplastic guaiacol peroxidase and lipid peroxidation in current-year needles of young Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.) // Journal of plant physiology. – 1996, V. 148, №. 1-2. – P. 203-206.
199. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Mikhaylova E.V., Chemeris A.V. Growth of transgenic tobacco plants with changed expression of genes encoding expansins under the action of stress factors // Russian Journal of Plant Physiology. – 2018, V. 65, № 2. – P. 211-221.
200. 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.
201. 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.
202. Kumar M., Turner S. Plant cellulose synthesis: CESA proteins crossing kingdoms // *Phytochemistry*. – 2015, V. 112. – P. 91-99.
203. Kutschera U., Schopfer P. Evidence against the acidgrowth theory of auxin action // *Planta*. – 1985, V. 163, № 4. – P. 483-493.
204. Lee D.K., Ahn J.H., Song S.K., Choi Y.D., Lee J.S. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean // *Plant Physiology*. – 2003, № 131. – P. 985-997.
205. Lee Y., Kende H. Expression of beta-expansins is correlated with internodal elongation in deepwater rice // *Plant Physiol.* – 2001, V. 127, № 2. – P. 645-654.
206. Lee Y., Kende H. Expression of α -expansin and expansin-like genes in deepwater rice // *Plant Physiol.* – 2002, V. 130. – P. 1396-405.
207. Li F., Xing S., Guo Q., Zhao M., Zhang J., Gao Q. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco // *J Plant Physiol.* – 2011, V. 168. – P. 960-966.
208. Liang B.M., Sharp R.E., Baskin T.I. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots: I. Spatial distribution of longitudinal, radial, and tangential expansion rates // *Plant Physiol.* – 1997, V. 115. – P. 101-111.
209. Lin C., Choi H.S, Cho H.T. Root hair-specific EXPANSIN A7 is required for root hair elongation in *Arabidopsis* // *Molecules and Cells*. – 2011, № 31. – P. 393-397.
210. Liskay A., van der Zalm E., Schopfer P. Production of reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and OH^{\cdot}) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth // *Plant Physiol.* – 2004, V. 136. – P. 3114-3123.
211. Liu L., Liu Y., Rao J., Wang G., Li H., Ge F., Chen C. Overexpression of the glutathione-S-transferase gene from *Pyrus pyrifolia* fruit improves tolerance to abiotic stress in transgenic tobacco plants // *Mol. Biol. (Mosk.)*. – 2013, V. 47. – P. 591-601.

212. Liu Y., Zhang Li., Hao W., Zhang L., Liu Y., Chen L. Expression of two α -type expansins from *Ammopiptanthus nanus* in *Arabidopsis thaliana* enhance tolerance to cold and drought stresses // International Journal of Molecular Sciences. – 2019, V. 20, № 21. – A. 5255.
213. Liu Y.B., Lu S.M., Zhang J-F., Liu S., Lu Y-T. A xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase involves in growth of primary root and alters the deposition of cellulose in *Arabidopsis* // Planta. – 2007, V. 226. – P. 1547-1560.
214. 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, V. 25. – P. 402-408.
215. Lü P., Kang M., Jiang X., Dai F., Gao J., Zhang C. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis* // Planta. – 2013. – A. 2.
216. Luthen H., Bigdon M., Bottger M. Reexamination of the acid growth theory of auxin action // Plant Physiol. – 1990, V. 93, № 1. – P. 931-939.
217. Lynch J. Root architecture and plant productivity // Plant Physiol. – 1995, V. 109, № 1. – P. 7-13.
218. Ma N., Wang Y., Qiu S., Kang Z., Che S., Wang G., Huang J. Overexpression of *OsEXPA8*, a root-specific gene, improves rice growth and root system architecture by facilitating cell extension // PLoS One. – 2013, № 8. – A. e75997.
219. Madhava Rao K., Raghavendra K., Janardhan Reddy A. Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants // Springer Science & Business Media. – 2006. – P. 13-35.
220. Manzano C., Pallero-Baena M., Casimiro I., De Rybel B., Orman-Ligeza B., Van Isterdael G., Beeckman T., Draye X., Casero P., Del Pozo J.C. The emerging role of reactive oxygen species signaling during lateral root development // Plant Physiol. – 2014, V. 165, № 3. – P. 1105-1119.
221. Maris A., Suslov D., Fry S.C., Verbelen J.-P., Vissenberg K. Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase

- (XTH) proteins of *Arabidopsis* and their effect on root growth and cell wall extension // Journal of Experimental Botany. – 2009, V. 60. – P. 3959-3972.
222. McQueen-Mason S., Durachko D., Cosgrove D. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants // Plant Cell Online. – 1992, V. 4. – P. 1425-1433.
223. McQueen-Mason S.J., Cosgrove D.J. Expansin mode of action cell-walls-analysis of wall hydrolysis, stress-relaxation, and binding // Plant Physiology. – 1995, V.107. – P. 87-100.
224. Mei Y., Chen H., Shen W., Shen W., Huang L. Hydrogen peroxide is involved in hydrogen sulfide-induced lateral root formation in tomato seedlings // BMC Plant Biol. – 2017, V. 17, № 1. – A. 162.
225. Meng L., Feldman L.J. CLE14/CLE20 peptides may interact with CLAVATA2/CORYNE receptor-like kinases to irreversibly inhibit cell division in the root meristem of *Arabidopsis* // Planta. – 2010, V. 232. – P. 1061–1074.
226. Metwally A., Finkemeier I., Georgi M., Dietz K.J. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings // Plant Physiol. – 2003, V. 132. – P. 272-281.
227. Miedes E., Zarra I., Hoson T., Herbers K., Sonnewald U., Lorences E.P. Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility // J Plant Physiol. – 2011, V. 168. – P. 196-203.
228. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002, V. 7. – P. 405-410.
229. Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V., Van Breusegem F. ROS signaling: the new wave? // Trends Plant Sci. – 2011, V. 16. – P. 300-309.
230. Molhoj M., Jorgensen B., Ulvskov P., Borkhardt B. Two *Arabidopsis thaliana* genes, KOR2 and KOR3, which encode membrane-anchored endo-1,4- β -glucanases are differentially expressed in developing leaf trichomes and their support cells // Plant Mol. Biol. – 2001, V. 46. – P. 263-275.

231. Mullis K.B., Faloona F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction // *Methods Enzymol.* – 1987, V. 155. – P. 335-350.
232. Myers T.W., Gelfand D.H. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase // *Biochemistry.* – 1991, V. 30. – P. 7661-7666.
233. Narayanan S., Mohan A., Gill K.S., Prasad P.V.V. Variability of root traits in spring wheat germplasm // *PLoS ONE.* – 2014, V. 9, № 6. A. e100317.
234. Nishikubo N., Awano T., Banasiak A. Xyloglucan endo-transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar—a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees // *Plant Cell Physiol.* – 2007, V. 48. – P. 843-855.
235. Nishitani K., Tominaga R. In vitro molecular weight increase in xyloglucan by an apoplastic enzyme preparation from epicotyls of *Vigna angularis* // *Physiol. Plantarum.* – 1991, V. 82. – P. 490-497.
236. Nishizono H., Ichikawa H., Suzuki S, Ishii F. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Anthyrium yokoscense* // *Plant Soil.* – 1987, V. 101. – P. 15-20.
237. Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR // *Nat. Protoc.* – 2006, V. 1. – P. 1559-1582.
238. Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. Auxin control of root development // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010, V. 2. – A. a001537.
239. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schoff F. Heat stress and heat shock transcription factor-depend expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2002, V.129. – P. 838-853.
240. Panda S.K., Chaudhury I., Khan M.H. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves // *Biol. Plant.* – 2003, V. 46. – P. 289-294.
241. Park C.H., Kim T.W., Son S.H. Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* // *Phytochemistry.* – 2010, V. 71. – P. 380-387.

242. Park Y.B., Cosgrove D.J. A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases // *Plant Physiol.* – 2012, V. 158. – P. 1933-1943.
243. Park Y.B., Cosgrove D.J. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient *xxt1/xxt2* mutant of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2011, V. 158. – P. 465-475.
244. Passardi E., Cosio C., Penel C., Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // *Plant Cell Rep.* – 2005, V. 24. – P. 255-265.
245. Pauly M., Gille S., Liu L.F., Mansoori N., De Souza A., Schultink A., Xiong G. Hemicellulose biosynthesis // *Planta.* – 2013, V. 238 (4). – P. 627-642.
246. Pawlowski K., Demchenko K.N. The diversity of actinorhizal symbiosis // *Protoplasma.* – 2012, V. 249 (4). – P. 967-979.
247. Peng L.N., Xu Y.Q., Wang X., Feng X., Zhao Q.Q., Feng S.S., Zhao Z.Y., Hu B.Z., Li F.L. Overexpression of paralogues of the wheat expansin gene *TaEXPA8* improves low-temperature tolerance in *Arabidopsis* // *Plant biology.* – 2019, V. 21, № 6. – P. 1119-1131.
248. Pitts R.J., Cernac A., Estelle M. Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis* // *Plant J.* – 1998, V. 16. – P. 553-560.
249. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // *Analytical Biochemistry.* – 1999, V. 269, № 2. – P.337-341.
250. Pucciariello C., Banti V., Perata P. ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses // *Plant Physiol. Biochem.* – 2012, V. 59. – P. 3-10.
251. Rady M.M., Hemida K.A. Sequenced application of ascorbate-proline-glutathione improves salt tolerance in maize seedlings // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* – 2016, V. 133. – P. 252-259.
252. Ren Y., Chen Y., An J., Zhao Z., Zhang G., Wang Y., Wang W. Wheat expansin gene *TaEXPA2* is involved in conferring plant tolerance to Cd toxicity // *Plant Science.* – 2018, № 270. – P. 245-256.

253. Rogg L.E., Lasswell J., Bartel B. A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development // *Plant Cell*. – 2001, V 13, № 3. – P. 465-480.
254. Romanov G.A. How do cytokinins affect the cell? // *Russ. J. Plant Physiol.* – 2009, V.56. P. 268–290.
255. Rose J.K.C., Braam J., Fry S.C., Nishitani K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature // *Plant Cell Physiol.* – 2002, V. 43. – P. 1421-1435.
256. Roxas V.P., Lodhi S.A., Garrett D.K., Mahan J.R., Allen R.D. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase // *Plant Cell Physiol.* – 2000, V. 41. – P. 1229-1234.
257. Roxas V.P., Smith R.K.Jr., Allen E.R., Allen R.D. Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress // *Nature Biotechnol.* – 1997, V. 15. – P. 988-991.
258. Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B. An auxin dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root // *Cell*. – 1999, V. 99. – P. 463-472.
259. Sampedro J., Cosgrove D. J. The expansin superfamily // *Genome Biol.* – 2005, V. 6. – A. 242.
260. Sanita di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants // *Environmental and Experimental Botany*. – 1999, № 41. – P. 105-130.
261. Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2010, V. 61. – P. 263-289.
262. Schipper O., Schaefer D., Reski R., Fleming A. Expansins in the bryophyte *Physcomitrella patens* // *Plant Molecular Biology*. – 2002, V. 50. – P. 789-802.
263. Schmidt R., Kunkowska A.B., Schippers J.H.M. Role of reactive oxygen species during cell expansion in leaves // *Plant Physiol.* – 2016, V. 172, № 4. – P. 2098-2106.

264. Sealey P.G., Southern E.M. Gel electrophoresis of DNA. In: gel electrophoresis on nucleic acids. A practical approach. (D. Rickwood, B.D. Hames, eds.) // IRL Press. Oxford, Washington DC. – 1982. – P. 39-76.
265. Serna L. bHLH protein know when to make a stoma // Trends in Plant Science. – 2007, V. 12. – P. 483-485.
266. Serpe M.D., Matthews M.A. Rapid changes in cell wall yielding of elongating *Begonia argenteo-guttata* L. Leaves in response to changes in plant water status // Plant Physiol. – 1992, V. 100. – P. 1852-1857.
267. Sharma S.S., Dietz K-J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // Journal of Experimental Botany. – 2006, V. 57, № 4. – P. 711-726.
268. Sharp R.E., Hsiao T.C., Silk W.K. Growth of the maize primary root at low water potentials: II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment // Plant Physiol. – 1990, V. 93. – P. 1337-1346.
269. Signora L., De Smet I., Foyer C.H., Zhang H. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis* // Plant J. – 2001, V. 28. – P. 655-662.
270. Smeyers-Verbeke J., De Graeve M., Francois M., De Jaegere R., Massart D.L. Cd uptake by intact wheat plants // Plant Cell Environ. – 1978, V. 1. – 291 p.
271. Smith R.C., Fry S.C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures // Biochem. J. – 1991, V. 15. – P. 529-535.
272. Stiborova M., Daubravova M., Brezninova A. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley *Hordenium vulgare* L. // Photosynthetica. – 1986, V. 20. – P. 418-425.
273. Sun T.P. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants // Curr Biol. – 2011, V. 21, № 9. – P. 338-345.
274. Szabados L., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends Plant Sci. – 2009, V. 15. – P. 89-97.
275. Taiz L., Zeiger E. Plant physiology // Sunderland: Sinauer Associates. – 2002. – 690 p.

276. Takahashi D., Johnson K.L., Hao P., Tuong T., Erban A., Sampathkumar A., Bacic A., Livingston III D.P., Kopka J., Kuroha T., Yokoyama R., Nishitani K., Zuther E., Hinch D.K. Cell wall modification by the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase *XTH19* influences freezing tolerance after cold and sub-zero acclimation // *Plant Cell and Environment*. – 2020. – P. 1-16.
277. Tanimoto E. Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin // *Ann. Bot.* – 2012, V. 110. P. 373-381.
278. Tao Y., Wan J.X., Song L.Y., Yang X.Z., Shen R.F., Zhu X.F. The NAC transcription factor ANAC017 regulates aluminum tolerance by regulating the cell wall-modifying genes // *Plant Physiology*. – 2022, V. 189. – P. 2517-2534.
- 284.
279. Thongsook T., Barrett D.M. Heat inactivation and reactivation of broccoli peroxidase // *J. Agric. Food Chem.* – 2005, V. 53. – P. 3215-3222.
280. Tiika R.J., Wei J., Cui G., Ma Y., Yang H., Duan H. Transcriptome-wide characterization and functional analysis of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) gene family of *Salicornia europaea* L. under salinity and drought stress // *BMC Plant Biology*. – 2021, V. 21. – P. 491-505.
281. Tikhonovich I.A., Provorov N.A. Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion // *Ann. Appl. Biol.* – 2011, V. 159, № 2. – P. 155-168.
282. Torabi M. Physiological and biochemical responses of plants to salt stress // *The 1st Intern Conf on New Ideas in Agricultural*. Islamic Azad University Khoragsan Branch. – 2014. – 25 p.
283. Truemit E. A map of KNAT gene expression in the *Arabidopsis* root // *Plant Molecular Biology*. – 2006, V. 60. – P. 1-20.
284. Uga Y., Sugimoto K., Ogawa S., Rane J., Ishitani M., Hara N., Kitomi Y., Inukai Y., Ono K., Kanno N., Inoue H., Takehisa H., Motoyama R., Nagamura Y., Wu J., Matsumoto T., Takai T., Okuno K., Yano M. Control of root system

architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions // Nat. Genet. – 2013, V. 45, № 9. – P. 1097-1102.

285. Umehara M., Cao M., Akiyama K., Akatsu T., Seto Y., Hanada A. Structural requirements of strigolactones for shoot branching inhibition in rice and *Arabidopsis* // Plant & Cell Physiology. – 2015, V. 56, № 6. – P. 1059–1072.

286. Van Sandt V.S., Suslov D., Verbelen J.P., Vissenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall // Annals of Botany. – 2007, V. 100. – P. 1467-1473.

287. Van Sandt V.S.T., Guisez Y., Verbelen J.P., Vissenberg K. Analysis of xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) from the lycopodiophyte *Selaginella kraussiana* suggests that XTH sequence characteristics and function are highly conserved during the evolution of vascular plants // J. Exp. Bot. – 2006, V. 57. – P. 2909-2922.

288. Vanneste S., Firml J. Auxin: a trigger for change in plant development // Cell. – 2009, V.136. – P. 1005-1016.

289. Verbelen J-P., Vissenberg K., Kerstens S., Le J. Cell expansion in the epidermis: microtubules, cellulose orientation and wall loosening enzymes // Journal of Plant Physiology. – 2001, V. 158. – P. 537-543.

290. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alert the activities of antioxidant enzymes in grooving rice plants // Plan. Sci. – 2003, V. 64. – P. 645-655.

291. Vissenberg K., Fry S.C., Verbelen J-P. Root hair initiation is coupled to a highly localized increase of xyloglucan endotransglycosylase action in *Arabidopsis* roots // Plant Physiology. – 2001, V. 127. – P. 1125–1135.

292. Vissenberg K., Martinez-Vilchez I.M., Verbelen J-P., Miller J.G., Fry S.C. In vivo colocalization of xyloglucan endotransglycosylase activity and its donor substrate in the elongation zone of *Arabidopsis* roots // The Plant Cell. – 2000, V. 12. – P. 1229-1237.

293. Vissenberg K., Oyama M., Osato Y., Yokoyama R., Verbelen J-P., Nishitani K. Differential expression of *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* and *AtXTH20* genes in

- Arabidopsis* roots. Physiological roles in specification in cell wall construction // Plant Cell Physiol. – 2005, V. 46, № 1. – P. 192-200.
294. Vissenberg K., Van Sandt V., Fry S.C., Verbelen J-P. Xyloglucan endotransglucosylase action is high in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from *Selaginella* to *Zea mays* // J Exp Bot. – 2003, V. 54, № 381. P. 335-344.
295. Voetberg G.S., Sharp R.E. Growth of the maize primary root at low water potential: III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment // Plant Physiol. – 1991, V. 96. – P. 1125-1130.
296. Walch-Liu P., Ivanov I.I., Filleur S., Gan Y., Remans T., Forde B.G. Nitrogen regulation of root branching.// Annals of Botany. – 2006, V. 97. – P. 875-881.
297. Wang M., Xu Z., Ding A., Kong Y. Genome-wide identification and expression profiling analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // Genes. – 2018, V. 9, № 6. – P. 273-295.
298. Wang Y-H., Que F., Wang G-L., Hao J-N., Li T., Xu Z-S., Xiong A-S. iTRAQ-based quantitative proteomics and transcriptomics provide insights into the importance of expansins during root development in carrot // Front. Genet. – 2019, V. 10. – A. 247.
299. Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D. Plant response to cold: transcriptome analysis of wheat // Plant Biotech. J. – 2010, V. 8. – P. 749-771.
300. Wu X., Dabi T., Weigel D. Requirement of homeobox gene STIMPY/WOX9 for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance // Current Biology. – 2005, V. 15. – P. 436-440.
301. Wu Y., Meeley R.B., Cosgrove D.J. Analysis and expression of the alpha-expansin and beta-expansin gene families in maize // Plant Physiol. – 2001a, V. 126. – A. 222e232.
302. Wu Y., Sharp R.E., Durachko D.M., Cosgrove D.J. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall

- extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins // *Plant Physiol.* – 1996, V. 111. – P. 765-772.
303. Wu Y., Thorne E.T., Sharp R.E., Cosgrove D.J. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials // *Plant Physiol.* – 2001b, V. 126. – P. 1471-1479.
304. Xu P., Fang S., Chen H., Cai W. The brassinosteroid-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19 (*XTH19*) and *XTH23* genes are involved in lateral root development under salt stress in *Arabidopsis* // *The Plant journal: for cell and molecular biology.* – 2020, V. 104. – P. 59-75.
305. Xu Q., Xu X., Shi Y., Xu J., Huang B. Transgenic tobacco plants overexpressing a grass *PpEXPI* gene exhibit enhanced tolerance to heat stress // *PLoS One.* – 2014, V. 9. № 7. – A. e100792.
306. Xu W., Campbell P., Vargheese A.K., Braam J. The arabidopsis XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression // *Plant J.* – 1996, V. 9. – P. 879-889.
307. Xuan W., Audenaert D., Parizot B., Möller B.K., Njo Maria F., De Rybel B., De Rop G., Van Isterdael G., Mähönen Ari P., Vanneste S., Beeckman T. Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the *Arabidopsis* root // *Curr. Biol.* – 2015, V. 25, № 10. – P. 1381-1388.
308. Yan J., Huang Y., He H., Han T., Di P., Sechet J., Fang L., Liang Y., Vibe Scheller H., Mortimer J.C., Ni L., Jiang M., Hou X., Zhang A. Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase30 negatively affects salt tolerance in *Arabidopsis* // *Journal of Experimental Botany.* – 2019, V. 70, № 19. – P. 5495-5506.
309. Yang K.A., Lim C.J., Hong J.K., Park C.Y., Cheong Y.H., Chung W.S., Lee K.O., Lee S.Y., Cho M.J., Lim C.O. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in *Chinese cabbage* // *Plant Science.* – 2006, V. 171. – P. 175-182.
310. Yokoyama R., Nishitani K. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-

regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of *Arabidopsis* // *Plant Cell Physiol.* – 2001, V. 42. – P. 1025-1033.

311. Yokoyama R., Rose J.K., Nishitani K. A surprising diversity and abundance of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases in rice. Classification and expression analysis // *Plant Physiol.* – 2004, V. 134. – P. 1088-1099.

312. Zhang C., He M., Jiang Z., Liu L., Pu J., Zhang W., Wang S., Xu F. The xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene *XTH22/TCH4* regulates plant growth by disrupting the cell wall homeostasis in *Arabidopsis* under boron deficiency // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022, V. 23. – A. 1250.

313. Zhang H., Ding Y., Zhi J., Li X., Liu H., Xu J. Over-expression of the poplar expansin gene *PtoEXPA12* in tobacco plants enhanced cadmium accumulation // *Int. J. Biological Macromolecules.* – 2018, № 116. – P. 676-682.

314. Zhanq F.Q., Wang Y.S., Lou Z.P., Donq J.D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) // *Chemosphere.* – 2007, V. 67, № 1. – P. 44-50.

315. Zhao F.Y., Liu W., Zhang S.Y. Different responses of plant growth and antioxidant system to the combination of cadmium and heat stress in transgenic and non-transgenic rice // *J. Integr. Plant Biol.* – 2009, V. 51, № 10. – P. 942-950.

316. Zhao M.R., Li F., Fang Y., Gao Q., Wang W. Expansin-regulated cell elongation is involved in the drought tolerance in wheat // *Protoplasma.* – 2011, № 248. – P. 313-323.

317. Zhao Z.Y., Hu B.Z., Feng X., Li F.L., He F.M., Wu J.W., Xu C.J., Li L., Xu Y.Q. Cloning and functional analysis of expansin *TaEXPA9* orthologs in winter wheat in frigid regions // *Biologia plantarum.* – 2022, № 66. – P. 272-286.

318. ZhiMing Y., Bo K., Xiao W.H., ShaoLei L., YouHuang B., WoNa D., Ming C., Hyung-Taeg C., Ping W. Root hair-specific expansins modulate root hair elongation in rice // *Plant J.* – 2011, V. 66. – P. 725-734.

319. Zhu J., Alvarez S., Marsh E.L., Lenoble M.E., Cho I.J., Sivaguru M., Chen S., Nguyen H.T., Wu Y., Schachtman D.P. Cell wall proteome in the maize primary

root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit // *Plant Physiol.* – 2007, V. 145. – P. 1533-1548.

320. Zhu X.F., Lei G.J., Wang Z.W., Shi Y.Z., Braam J., Li G.X. Coordination between Apoplastic and Symplastic detoxification confers plant aluminum resistance // *Plant Physiol.* – 2013, V. 162, № 4. – P. 1947-1955.

321. Zhu X.F., Shi Y.Z., Lei G.J., Fry S.C., Zhang B.C., Zhou Y.H., Braam J., Jiang T., Xu X.Y., Mao C.Z., Pan Y.J., Yang J.L., Wu P., Zheng S.J. *XTH31*, encoding an in vitro XEH/XET-active enzyme, regulates aluminum sensitivity by modulating in vivo XET action, cell wall xyloglucan content, and aluminum binding capacity in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2012, V. 24, № 11. – P. 4731-4747.

322. Zorb C., Geilfus C.M., Muhling K.H., Ludwig-Muller J. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance // *J Plant Physiol.* – 2013, V. 170. – P. 220-224.