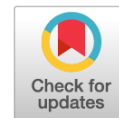


DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen44618>

Ген экспансина *NtEXPA5* повышает стрессоустойчивость волосовидных корней табака через влияние на антиоксидантную систему

© Б.Р. Кулуев*^{1, 2}, Х.Г. Мусин¹, А.Б. Якупова^{1, 2}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа;

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный университет», Уфа

Введение. Экспансины — это неферментативные белки, участвующие в размягчении клеточных стенок, механизм действия которых связан с ослаблением и разрывом водородных связей между ксиланоглюканами и микрофибриллами целлюлозы и направлен на обеспечение роста клеток растяжением.

Целью работы было получение волосовидных (бородатых) корней табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5*, их морфометрический анализ и оценка состояния их антиоксидантной системы при действии стрессовых факторов.

Материалы и методы. Волосовидные корни табака были получены из трансгенных растений с повышенной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5*.

Результаты. Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* способствовала увеличению длины и сухого веса волосовидных корней как при нормальных условиях, так и при действии засоления, сульфата меди, ацетата кадмия и маннитола. Как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов в трансгенных волосовидных корнях было зафиксировано увеличение активности супероксиддисмутазы и общей антиоксидантной активности.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют, что экспансины оказывают свой позитивный эффект на продуктивность и стрессоустойчивость растений не только через влияние на рост клеток растяжением, но и через воздействие на антиоксидантную систему.

Ключевые слова: экспансины; волосовидные корни; засоление; медь; кадмий; маннитол; супероксиддисмутаза; каталаза; пероксидаза; общая антиоксидантная активность.

Как цитировать:

Кулуев Б.Р., Мусин Х.Г., Якупова А.Б. Ген экспансина *NtEXPA5* повышает стрессоустойчивость волосовидных корней табака через влияние на антиоксидантную систему // Экологическая генетика. 2021. Т. 19. № 1. С. 5–12. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen44618>

DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen44618>

The expansin gene *NtEXPA5* increases stress tolerance of tobacco hairy roots through an effect on the antioxidant system

© Bulat R. Kuluev*^{1, 2}, Khalit G. Musin¹, Alfira B. Yakupova^{1, 2}¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia;² Bashkir State University, Ufa, Russia

BACKGROUND: Expansins are non-enzymatic proteins involved in the softening of cell walls, the mechanism of action of which is associated with the weakening and breaking of hydrogen bonds between xyloglucans and cellulose microfibrils and is aimed at ensuring cell expansion.

THE AIM of our work was to obtain hairy roots of tobacco with constitutive expression of the *NtEXPA5* expansin gene, their morphometric analysis and assessment of the state of their antioxidant system in response to stress factors.

MATERIALS AND METHODS: The hairy roots were obtained from transgenic tobacco plants expressing the *NtEXPA5* gene under the control of the 35S promoter.

RESULTS: Constitutive expression of the *NtEXPA5* gene promoted an increase in the length and dry weight of hairy roots both under normal conditions and under the action of salinity, copper sulfate, cadmium acetate, and mannitol. Both under normal conditions and under the action of stress factors in transgenic hairy roots, an increase in the activity of superoxide dismutase and the total antioxidant activity was recorded.

CONCLUSION: Expansins exert their positive effect on the productivity and stress tolerance of plants not only through their influence on cell expansion, but also through the effect on the antioxidant system.

Keywords: expansins; hairy roots; salinity; copper; cadmium; mannitol; superoxide dismutase; catalase; peroxidase; total antioxidant capacity.

To cite this article:

Kuluev BR, Musin KG, Yakupova AB. The expansin gene *NtEXPA5* increases stress tolerance of tobacco hairy roots through an effect on the antioxidant system. *Ecological genetics*. 2021;19(1):5–12. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen44618>

ВВЕДЕНИЕ

Экспансины — это неферментативные белки, участвующие в размягчении клеточных стенок, механизм действия которых связан с ослаблением и разрывом водородных связей между ксилоглюканами и микрофибриллами целлюлозы [1]. Повышенная экспрессия экспансинов способствует улучшению роста корней за счет стимуляции клеточного растяжения [2, 3]. Имеются многочисленные данные об участии экспансинов в реакциях стрессоустойчивости [4–6]. Ранее нами были созданы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* с конститутивной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5* [7]. Полученные растения характеризовались увеличением размеров листьев и стебля. Однако нами также был выявлен высокий уровень экспрессии этого гена в корнях табака дикого типа [6], и более того, трансгенные растения, сверхэкспрессирующие ген *NtEXPA5*, характеризовались улучшением роста корней как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов [3]. Исходя из полученных данных, было сделано предположение, что экспансины могут способствовать улучшению роста также у культур волосовидных корней (англ. hairy roots — HRs), являющихся перспективной биотехнологической системой для продуцирования ценных вторичных метаболитов и рекомбинантных белков. Культуры волосовидных корней в биотехнологическом производстве могут подвергаться отрицательному влиянию изменений состава среды, температуры и подобных явлений, поэтому создание не только высокопродуктивных, но и стрессоустойчивых волосовидных корней весьма актуально. Ранее был показан более высокий уровень экспрессии гена *NtEXPA5* в волосовидных корнях табака, по сравнению с обычными корнями [8], что говорит о важности его белкового продукта для роста HRs.

Исходя из этого, целью нашей работы было получение волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5*, их морфометрический анализ и оценка состояния их антиоксидантной системы при действии стрессовых факторов. Предполагалось, что трансген *NtEXPA5* будет способствовать повышению продуктивности и стрессоустойчивости волосовидных корней, что может сопровождаться изменениями в компонентах антиоксидантной системы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Семена ранее полученных трансгенных растений табака *35S::NtEXPA5* сорта Petit Havana линии SR1 поколения T₂ с единичной копией трансгена стерилизовали в 75 % этиловом спирте (~30 с) и в 2,5 % гипохлорите натрия (~5 мин), после чего промывали стерильной дистиллированной водой 5 раз и высаживали в чашки Петри с селективной (200 мг/л антибиотика гигромицина), твердой (7 г/л агара) питательной средой МС (0,5 соли МС,

14 г/л сахарозы, 60 мг/л инозитола, 2 мг/глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой кислоты). Спустя 20 дней проростки одинаковых размеров, не имеющих морфологических аномалий, высаживали в смесь почвы и вермикулита (3 : 1 соответственно). Растения выращивали в вегетационных сосудах объемом 500 мл при температуре воздуха 24 ± 1 °С, освещенности 120 мкмоль/м²с и фотопериоде 16 ч.

Культуры волосовидных корней были созданы из листовых эксплантов двухмесячных растений при помощи *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4. Агробактерии предварительно выращивали на жидкой селективной среде LB (100 мг/л рифампицина). Экспланты листьев табака стерилизовали с использованием 75 % раствора этилового спирта (~1 мин) и 2 % раствора гипохлорита натрия (~8 мин). Совместное культивирование листовых эксплантов и агробактерий проводили на твердой (7 г/л агара) среде МС (1 соли МС, 28 г/л сахарозы, 120 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, 1 мг/л тиамин и 1 мг/л никотиновой кислоты) в течение трех суток при температуре +26 °С, после чего листовые экспланты были перенесены на твердую среду МС, содержащую антибиотик (100 мг/л цефотаксим). Все образованные на эксплантах волосовидные корни фрагментами длиной по 1,5–2 см помещались в отдельные чашки Петри со средой МС и содержались при температуре воздуха 24 ± 1 °С, в темноте. Была проведена предварительная селекция, для отбора наиболее активно и стабильно растущих корней. После 2 мес. культивации на селективной среде МС фрагменты волосовидных корней вместе с апикальной меристемой (длиной ~1,2 см) были пересажены на свежую среду МС. В качестве контрольной линии, относительно которой делали выводы об эффектах трансгена, выступали линии волосовидных корней, созданные из нетрансгенных растений *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1.

ДНК из волосовидных корней выделяли стандартным методом с применением цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) [9]. Для подтверждения трансгенности созданных волосовидных корней использовали классический метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами CGTATGTTATTGCCGGGAAAGTG и CAGAACATTACATTGACGCAGGTGAT, подобранными к репортерному гену *uidA* (*GUS*).

Тотальную РНК из волосовидных корней выделяли при помощи тризола, первую цепь кДНК синтезировали с использованием олиго(dT)-праймера и M-MuLV-обратной транскриптазы (ОТ) (NEB, USA). Для ОТ-ПЦР гена *NtEXPA5* использовали праймеры TGGTGCAATCCSCCTCTC и GACATTGTTGCCATCCAGTATTA. В качестве референсного гена был использован ген *EF-1α* *N. tabacum* (AF120093.1), для амплификации которого использовали праймеры: GAATTGGTACTGTCCCTGTT и TTGCCAATCTGTCTGAAT. Полуколичественную ОТ-ПЦР для обоих генов проводили при следующих условиях: 94 °С — 1 мин, затем 94 °С — 30 с, 53 °С — 30 с, 72 °С — 1 мин — 30 циклов,

и финальная элонгация 72 °C — 5 мин. Для каждого эксперимента использовали по три контрольных и опытных растения ($n = 3$).

Волосовидные корни табака подвергали следующим стрессовым воздействиям: 150 мМ NaCl, 100 мкМ CuSO₄, 100 мкМ Cd(CH₃COO)₂ и 75 мМ маннитола в агаризованной питательной среде MC в условиях *in vitro*. Интенсивность стрессовых условий была подобрана в ходе предварительных исследований по отношению к волосовидным корням табака без трансгена *NtEXPA5* таким образом, чтобы она значительно (до 20 раз) замедляла рост, но вызывала гибель не более 10 % образцов корней. Морфометрический анализ заключался в измерении среднего прироста длины волосовидных корней на 30-й день культивации. Средний прирост рассчитывался как отношение суммы удлинения всех HRs к числу корней. Для оценки продуктивности также анализировали прирост сухого веса корней. Поскольку начальный сухой вес фрагментов корней очень мал (не более 1 мг) им было решено пренебречь. Для измерения сухого веса HRs высушивали в сухожаровом шкафу при 105 °C в течение 16 ч. Все испытания велись в 64 биологических повторностях ($n = 64$). Достоверность различий проверяли относительно контрольного варианта волосовидных корней без трансгена *NtEXPA5* по критерию Дункана [10].

Для проведения биохимического анализа опосредованных стрессом изменений антиоксидантной системы культуры волосовидных корней выращивали в течение 30 дней в условиях действия стресс-факторов. Активность ферментативных систем выражалась в мг общего растворимого белка. Общую антиоксидантную активность пересчитывали на г сырого веса HRs. Все биохимические исследования по определению активности антиоксидантной системы проводили в 15 биологических повторностях ($n = 15$). Достоверность различий рассчитывали относительно HRs без трансгена *NtEXPA5* (контрольный вариант) по критерию Дункана [10].

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) применяли метод, основанный на способности СОД конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксид-анионы [11]. Пероксидазную активность определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола [12]. Каталазную активность проверяли по скорости деградации молекул перекиси водорода [13]. Общая антиоксидантная активность (ОАА) оценивалась на метанольных (80 %) экстрактах по восстановлению Mo(VI) до Mo(V) при кислотном pH [14]. Содержание общего растворимого белка определяли по методу Бредфорда [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первая часть работы была посвящена отбору небольшого числа линий волосовидных корней с повышенной экспрессией гена *NtEXPA5*. Из 24 линий для морфометрического анализа были отобраны 6 линий волосовидных

корней, которые мы обозначили как E1–E6. Во всех этих шести линиях выявлялся наиболее высокий уровень транскрипционной активности трансгена *NtEXPA5*. При нормальных условиях трансгенные волосовидные корни росли в длину на 38 % быстрее в среднем для всех линий, чем контрольные варианты (дикий тип, WT). При действии хлорида натрия также трансгенные HRs росли лучше дикого типа на 28 %, в среднем для всех линий (рис. 1, а). Только волосовидные корни линии E1 росли в длину медленнее контроля. В условиях загрязнения среды сульфатом меди трансгенные HRs также росли лучше дикого типа на 36 %, в среднем для всех линий (рис. 1, а). На среде с ацетатом кадмия все линии трансгенных волосовидных корней были больше по длине, чем в контроле, на 39 % в среднем. При действии 75 мМ маннитола трансгенные волосовидные корни были длиннее контрольных вариантов также в среднем на 39 % (рис. 1, а).

Таким образом, волосовидные корни табака, сверхэкспрессирующие ген *NtEXPA5*, растут в длину быстрее дикого типа как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов. Однако наибольший интерес представляет продуктивность исследуемых линий HRs, что может и не коррелировать с их ростом в длину. Наиболее полно отражает наработку биомассы волосовидных корней их сухой вес. При нормальных условиях все трансгенные линии, кроме E3, накапливали больший сухой вес, чем дикий тип (рис. 1, б). В среднем разница с контролем составила 33 % для всех линий. В условиях засоления хлоридом натрия все линии трансгенных HRs набирали больше сухого веса на 50 %, в среднем для всех линий. При действии CuSO₄ сухой вес трансгенных HRs был больше контрольных вариантов в среднем на 49 %. В условиях кадмиевого загрязнения волосовидные корни *35S::NtEXPA5* росли лучше дикого типа на 296 %, в среднем для всех линий. При действии маннитола сухой вес трансгенных HRs был еще больше и превысил показатели контроля на 390 % в среднем для всех линий (рис. 1, б).

Исходя из полученных данных, следует, что волосовидные корни *35S::NtEXPA5* характеризуются не только повышенной продуктивностью, но и большей стрессоустойчивостью по сравнению с HRs дикого типа. Механизмы участия экспансинов в обеспечении роста растений в целом уже известны, однако как именно они влияют на стрессоустойчивость пока не совсем ясно. Безусловно, при повышении стрессоустойчивости должны быть затронуты компоненты антиоксидантной системы. Поэтому была поставлена задача определить в волосовидных корнях активность СОД, каталаз, пероксидаз и общую антиоксидантную активность при нормальных условиях и при действии стрессовых факторов. Для этих экспериментов случайным образом были отобраны линии HRs E1, E4 и E6.

При нормальных условиях волосовидные корни *35S::NtEXPA5* отличались от контрольных вариантов

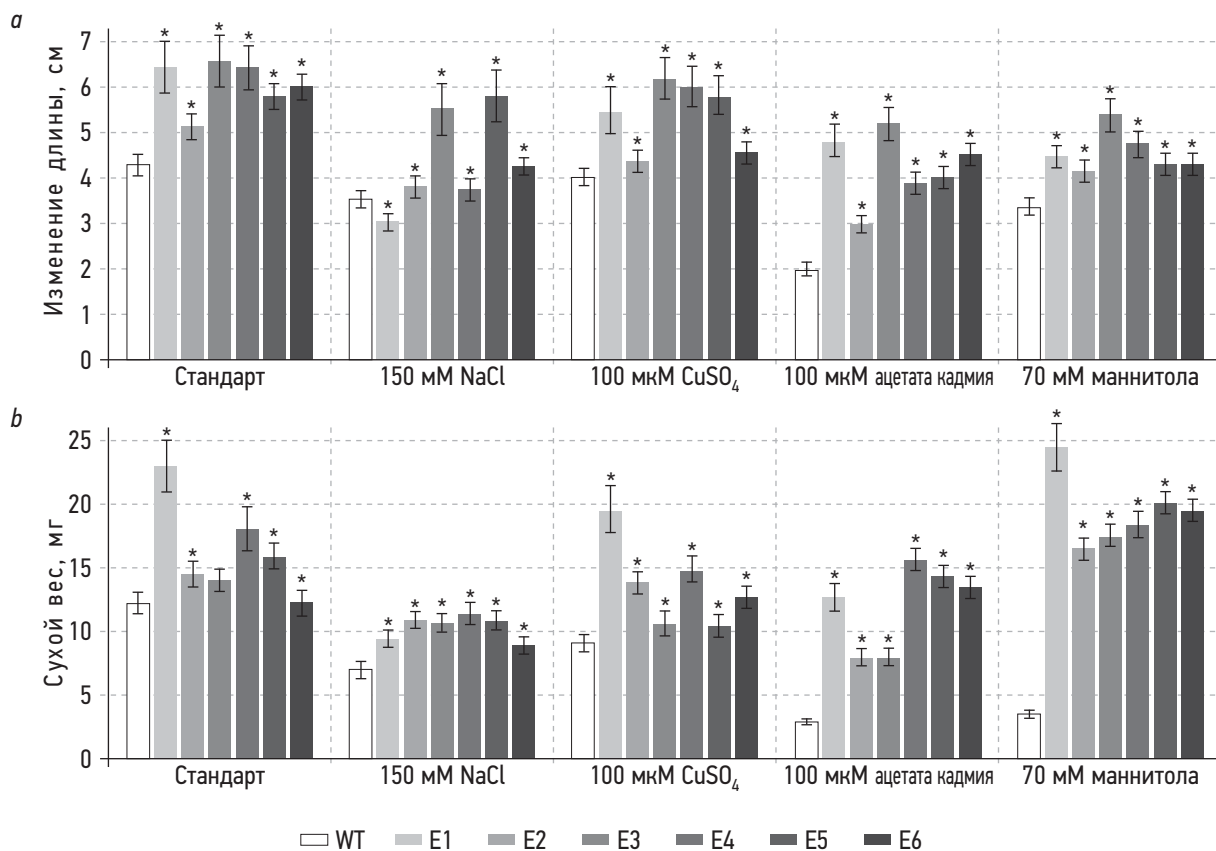


Рис. 1. Морфометрический анализ волосовидных корней с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5*: *a* — прирост корней в длину за 30 дней культивации; *b* — сухой вес корней через 30 дней культивации. WT — дикий тип (контроль), E1–E-6 — линии HRs. Звездочками обозначены достоверные различия от контроля согласно критерию Дункана ($p < 0,05$)

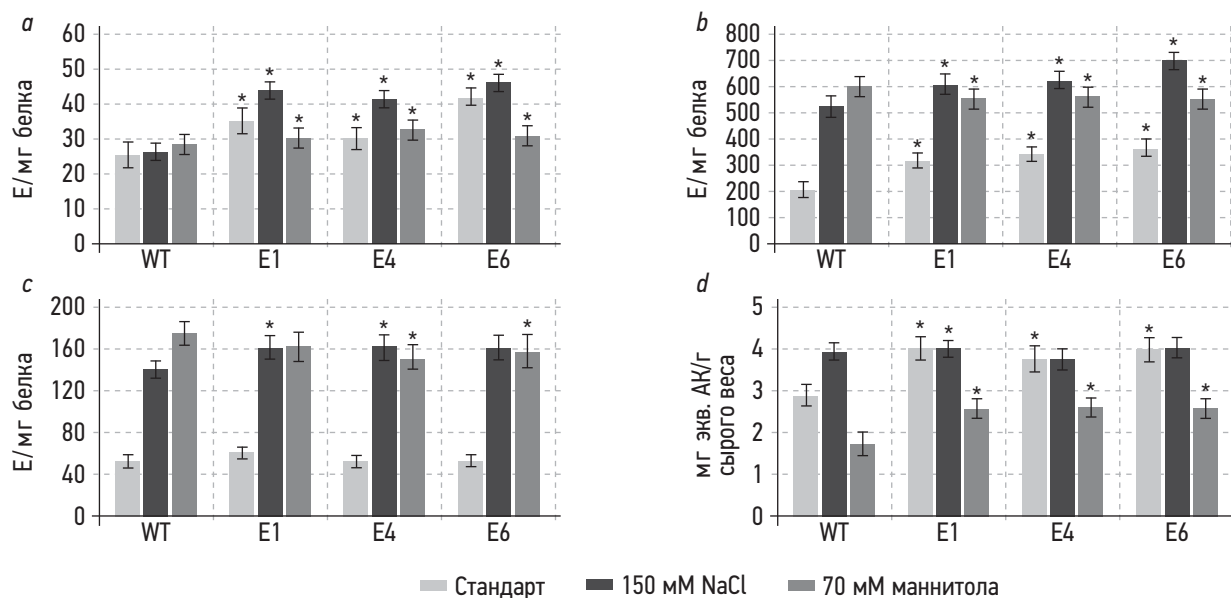


Рис. 2. Анализ антиоксидантной системы культур волосовидных корней с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5*: *a* — активность супероксиддисмутазы; *b* — каталазная активность; *c* — пероксидазная активность; *d* — общая антиоксидантная активность. Звездочками обозначены достоверные различия от контроля согласно критерию Дункана ($p < 0,05$)

повышенной активностью СОД, каталаз и общей антиоксидантной активности (рис. 2, *a*, *b*, *d*). Лишь по активности пероксидаз трансгенные HRs не отличались от дикого типа (рис. 2, *c*). В условиях засоления хлоридом натрия

для всех линий трансгенных волосовидных корней было характерно повышение активности СОД и каталаз. Повышение пероксидазной активности над контролем было характерно только для линий E1 и E4 (рис. 2, *c*).

При действии 75 мМ маннитола наблюдали повышенную активность СОД и общей антиоксидантной активности (ОАА) во всех анализируемых линиях по сравнению с контролем (рис. 2, *a, d*). При этом каталазная активность в трансгенных линиях была, наоборот, ниже контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ

Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* способствовала увеличению биомассы волосовидных корней как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов. Наибольшая разница с контролем выявлялась при действии кадмия и маннитола (рис. 1, *b*). В литературе имеются данные о повышении устойчивости волосовидных корней арахиса *Arachis hypogaea* сверхэкспрессирующего ген экспансина *AdEXLB8* к нематодам *Meloidogyne arenaria* [16]. Однако, судя по всему, на сегодняшний день эффекты конститутивной экспрессии генов экспансинов на устойчивость волосовидных корней к абиотическим стрессовым факторам не изучались. В то же время имеются работы по повышению стрессоустойчивости HRs при помощи ряда других трансгенов. К примеру, трансгенные по двум генам пероксидаз (*tpx1* и *tpx2*) HRs *N. tabacum* показали повышенную устойчивость к фенолу [17], а внедрение гена протеинкиназы *GmBIN2* в HRs сои повышало их устойчивость к соли и дефициту влаги [18]. Эти работы говорят об актуальности проводимых нами исследований по созданию стрессоустойчивых волосовидных корней. Таким образом, гены экспансинов можно использовать не только для повышения продуктивности HRs, но и для увеличения их стрессоустойчивости.

В нормальных условиях волосовидные корни *35S::NtEXPA5* характеризовались увеличением активности СОД, каталаз и повышением общей антиоксидантной активности (рис. 2). То есть трансгенные волосовидные корни были изначально готовы расти лучше контроля при действии стрессовых факторов. Ранее на примере трансгенных растений табака было показано, что сверхэкспрессия гена *TaEXPB23* способствует повышению пероксидазной активности [19]. Однако в трансгенных HRs *35S::NtEXPA5* пероксидазная активность не повышалась, ни при нормальных условиях, ни при действии стрессовых факторов (рис. 2). Наоборот, при действии маннитола активность пероксидаз в исследованных нами волосовидных корнях уменьшалась. В другой работе этих же авторов описаны трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *TaEXPB23*, под контролем корнеспецифического промотора [20]. В этом случае авторами уже были получены данные о повышении активности СОД и каталаз в корнях трансгенных растений, что в целом совпадает с нашими результатами. Такое совпадение может быть связано с особенностями проявления трансгенов экспансинов в корнях растений.

При засолении волосовидные корни *35S::NtEXPA5* характеризовались увеличением скорости роста, сухого веса, активности антиоксидантных ферментов и ОАА. Похожие данные были получены С. Jadamba и соавт. [21] на трансгенных растениях, которые показали, что сверхэкспрессия гена риса *OsEXPA7* способствует увеличению солеустойчивости, уменьшению количества активных форм кислорода (АФК) и увеличению общей антиоксидантной активности.

При действии маннитола волосовидные корни *35S::NtEXPA5* характеризовались увеличением скорости роста, сухого веса, активности СОД и ОАА. Хорошо известно, что маннитол, как и полиэтиленгликоль, вызывает в растениях дефицит влаги [20, 22]. Ранее было показано, что сверхэкспрессия гена экспансина *TaEXPA2* способствует увеличению устойчивости к дефициту влаги как в трансгенных растениях табака [22], так и в трансгенных растениях мягкой пшеницы [23]. Причем эти трансгенные растения характеризовались уменьшением содержания АФК, увеличением активности ряда антиоксидантных ферментов и ОАА.

Общим эффектом конститутивной экспрессии гена *NtEXPA5* как при нормальных условиях, так и при действии стрессовых факторов было увеличение активности СОД и ОАА во всех проанализированных линиях HRs. Полученные нами результаты в совокупности с данными литературы говорят, что экспансины оказывают свой позитивный эффект на продуктивность и стрессоустойчивость растений не только через влияние на рост клеток растяжением, но и через воздействие на антиоксидантную систему. Вероятнее всего, особенности влияния экспансинов на антиоксидантную активность связаны с регуляцией роста в общей сети клеточной сигнализации. К примеру, в нашем исследовании под влиянием экспансина *NtEXPA5* не повышалась только пероксидазная активность. Действительно, имеются данные о негативном влиянии пероксидаз на клеточное растяжение за счет стимуляции лигнификации [24], поэтому при регуляции роста экспансины и пероксидазы могут выступать в качестве антагонистов. Однако при этом до сих пор остается без ответа весьма интригующий вопрос: каков конкретный механизм влияния белков клеточной стенки — экспансинов, которые известны в основном лишь как регуляторы роста клеток растяжением, на антиоксидантную систему?

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания (№ АААА-А19-119021190011-0) при поддержке грантов Президента РФ (№ МД-2304.2020.4) и РФФИ (№ 18-04-00118 А).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cosgrove D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls // *Current Opinion Plant Biology*. 2015. Vol. 25. P. 162–172. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.05.014
2. Lin C., Choi H.S., Cho H.T. Root hair-specific *EXPANSIN A7* is required for root hair elongation in *Arabidopsis* // *Mol Cell*. 2011. Vol. 31. P. 393–397. DOI: 10.1007/s10059-011-0046-2
3. Kuluev B.R., Berezheva Z.A., Mikhaylova E.V., et al. Growth of transgenic tobacco plants with changed expression of genes encoding expansins under the action of stress factors // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018. Vol. 65. No. 2. P. 211–221. DOI: 10.1134/S1021443718020036
4. Zhao M.R., Li F., Fang Y., et al. Expansin-regulated cell elongation is involved in the drought tolerance in wheat // *Protoplasma*. 2011. Vol. 248. P. 313–323. DOI: 10.1007/s00709-010-0172-2
5. Xu Q., Xu X., Shi Y., et al. Transgenic tobacco plants overexpressing a grass *PpEXP1* gene exhibit enhanced tolerance to heat stress // *PLOS One*. 2014. Vol. 8. e100792. DOI: 10.1371/journal.pone.0100792
6. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Mikhaylova E.V., et al. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response // *Journal of Plant Physiology*. 2016. Vol. 206. P. 1–12. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.09.001
7. Kuluev B.R., Safiullina M.G., Knyazev A.V., et al. Effect of ectopic expression of *NtEXPA5* gene on cell size and growth of organs of transgenic tobacco plants // *Russ J of Dev Biol*. 2013. Vol. 44. P. 28–34. DOI: 10.1134/S1062360413010049
8. Gumerova G.R., Chemeris A.V., Nikonov Yu.M., et al. Morphological and molecular analysis of isolated cultures of tobacco adventitious roots obtained by the methods of biolistic bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018. Vol. 65. No. 5. P. 740–749. DOI: 10.1134/S1021443718050072
9. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol Biol*. 1985. Vol. 5. No. 2. P. 69–76. DOI: 10.1007/BF00020088.
10. Duncan D.B. Multiple range and multiple F-test // *Biometrics*. 1955. Vol. 11. P. 1–5. DOI: 10.2307/3001478
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лабораторное дело*. 1985. № 11. С. 678–681.
12. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.Р., и др. Методы биохимического исследования растений / под ред. А.И. Ермакова. 3 изд., перераб. и доп. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
13. 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 Physiology*. 2002. Vol. 129. P. 838–853. DOI: 10.1104/pp.001362
14. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., et al. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // *AoB Plants*. 2014. No. 13. P. 6–12. DOI: 10.1093/aobpla/plu046
15. 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. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
16. Guimaraes L.A., Pereira B.M., Araujo A.C.G., et al. Ex vitro hairy root induction in detached peanut leaves for plant-nematode interaction studies // *Plant Methods*. 2017. Vol. 13. P. 25. DOI: 10.1186/s13007-017-0176-4
17. Sosa A.L.G., Agostini E., Medina M.I. Antioxidant response of tobacco (*Nicotiana tabacum*) hairy roots after phenol treatment // *Plant Physiol Biochem*. 2011. Vol. 49. No. 9. P. 1020–1028. DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.07.009
18. Wang L., Chen Q., Xin D., et al. Overexpression of *GmBIN2*, a soybean glycogen synthase kinase 3 gene, enhances tolerance to salt and drought in transgenic *Arabidopsis* and soybean hairy roots // *J Integr Agric*. 2018. Vol. 17. No. 9. P. 1959–1971. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61863-X
19. Han Y., Chen Y., Yin S., et al. Over-expression of *TaEXPB23*, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants // *J Plant Physiol*. 2015. Vol. 173. P. 62–71. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.09.007
20. Li A.X., Han Y.Y., Wang X., et al. Root-specific expression of wheat expansin gene *TaEXPB23* enhances root growth and water stress tolerance in tobacco // *Environ Exp Bot*. 2015. Vol. 110. P. 73–84. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.10.002
21. Jadamba C., Kang K., Paek N.C., et al. Overexpression of rice expansin 7 (*Osexpa 7*) confers enhanced tolerance to salt stress in rice // *Int J Moc Sci*. 2020. Vol. 21. No. 2. P. 454. DOI: 10.3390/ijms21020454
22. Chen Y., Han Y., Zhang M., et al. Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA2* improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants // *PLoS One*. 2016. Vol. 11. No. 4. e0153494. DOI: 10.1371/journal.pone.0153494
23. Yang J., Zhang G., An J., et al. Expansin gene *TaEXPA2* positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Science*. 2020. Vol. 298. P. 110596. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110596
24. Passardi F., Penel C., Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // *Trends in Plant Sci*. 2004. Vol. 9. No. 11. P. 534–540. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.09.002

REFERENCES

1. Cosgrove DJ. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;25:162–172. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.05.014
2. Lin C, Choi HS, Cho HT. Root hair-specific *EXPANSIN A7* is required for root hair elongation in *Arabidopsis*. *Mol Cell*. 2011;31:393–397. DOI: 10.1007/s10059-011-0046-2
3. Kuluev BR, Berezheva ZA, Mikhaylova EV, Chemeris AV. Growth of transgenic tobacco plants with changed expression of genes encoding expansins under the action of stress factors. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(2):211–221. DOI: 10.1134/S1021443718020036
4. Zhao MR, Li F, Fang Y, et al. Expansin-regulated cell elongation is involved in the drought tolerance in wheat.

Protoplasma. 2011;248:313–323. DOI: 10.1007/s00709-010-0172-2

5. Xu Q, Xu X, Shi Y, et al. Transgenic tobacco plants overexpressing a grass *PpEXP1* gene exhibit enhanced tolerance to heat stress. *PLoS One*. 2014;8: e100792. DOI: 10.1371/journal.pone.0100792

6. Kuluev BR, Avalbaev AM, Mikhaylova EV, et al. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response. *J Plant Physiol*. 2016;206:1–12. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.09.001

7. Kuluev BR, Safiullina MG, Knyazev AV, Chemeris AV. Effect of ectopic expression of *NtEXPA5* gene on cell size and growth of organs of transgenic tobacco plants. *Rus J Devel Biol*. 2013;44:28–34. DOI: 10.1134/S1062360413010049

8. Gumerova GR, Chemeris AV, Nikonorov YuM, Kuluev BR. Morphological and molecular analysis of isolated cultures of tobacco adventitious roots obtained by the methods of biolistic bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2018;65(5):740–749. DOI: 10.1134/S1021443718050072

9. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*. 1985;5(2):69–76. DOI: 10.1007/BF00020088

10. Duncan DB. Multiple range and multiple F-test. *Biometrics*. 1955;11:1–5. DOI: 10.2307/3001478

11. Chevari S, Chaba I, Sekei I. Rol' superoksiddismutazy v okislitel'nykh protsessakh kletki i metod opredeleniya ee v biologicheskikh materialakh. *Laboratornoe delo*. 1985;(11):678–681. (In Russ.)

12. Ermakov AI, Arisimovich VV, Yarosh NP. Metody biokhimicheskogo issledovaniya rastenii. A.I. Ermakova, ed. 3 izd., pererab. i dop. Leningrad: Agropromizdat; 1987. 430 p.

13. Panchuck II, Volkov RA, Schoff F. Heat stress and heat shock transcription factor-depend expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2002;129:838–853. DOI: 10.1104/pp.001362

14. Boestfleisch C, Wagenseil NB, Buhmann AK, et al. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation. *AoB Plants*. 2014;(13):6–12. DOI: 10.1093/aobpla/plu046

15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

16. Guimaraes LA, Pereira BM, Araujo ACG, et al. *Ex vitro* hairy root induction in detached peanut leaves for plant-nematode interaction studies. *Plant Methods*. 2017;13:25. DOI: 10.1186/s13007-017-0176-4

17. Sosa ALG, Agostini E, Medina MI. Antioxidant response of tobacco (*Nicotiana tabacum*) hairy roots after phenol treatment. *Plant Physiol Biochem*. 2011;49(9):1020–1028. DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.07.009

18. Wang L, Chen Q, Xin D, et al. Overexpression of *GmBIN2*, a soybean glycogen synthase kinase 3 gene, enhances tolerance to salt and drought in transgenic *Arabidopsis* and soybean hairy roots. *J Integr Agric*. 2018;17(9):1959–1971. DOI: 10.1016/S2095-3119(17)61863-X

19. Han Y, Chen Y, Yin S, et al. Over-expression of *TaEXPB23*, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants. *J Plant Physiol*. 2015;173:62–71. DOI: 10.1016/j.jplph.2014.09.007

20. Li AX, Han YY, Wang X, et al. Root-specific expression of wheat expansin gene *TaEXPB23* enhances root growth and water stress tolerance in tobacco. *Environ Exp Bot*. 2015;110:73–84. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.10.002

21. Jadamba C, Kang K, Paek NC, et al. Overexpression of rice expansin 7 (*Osexpa 7*) confers enhanced tolerance to salt stress in rice. *Int J Moc Sci*. 2020;21(2):454. DOI: 10.3390/ijms21020454

22. Chen Y, Han Y, Zhang M, et al. Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA2* improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants. *PLoS One*. 2016;11(4): e0153494. DOI: 10.1371/journal.pone.0153494

23. Yang J, Zhang G, An J, et al. Expansin gene *TaEXPA2* positively regulates drought tolerance in transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci: Int J Exp Plant Biol*. 2020;298:110596. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110596

24. Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Sci*. 2004;9(11):534–540. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.09.002

ОБ АВТОРАХ

***Буллат Разяпович Кулеув**, д-р биол. наук, заведующий лабораторией геномики растений; адрес: Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, д. 71; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>; eLibrary SPIN: 8580-5347; e-mail: kuluev@bk.ru

Халит Галеевич Мусин, младший научный сотрудник лаборатории геномики растений; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7336-2027>; eLibrary SPIN: 8966-4290; e-mail: khalit.musin@yandex.ru

Альфира Буребаевна Якупова, канд. биол. наук; eLibrary SPIN: 1480-4353; e-mail: alfirm@yandex.ru

AUTHORS INFO

***Bulat R. Kuluev**, Dr. Sci. (Biol.); address: 71 October Av., 450054 Ufa, Russia; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>; eLibrary SPIN: 8580-5347; e-mail: kuluev@bk.ru

Khalit G. Musin, Junior research associate of the plant genomics laboratories; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7336-2027>; eLibrary SPIN: 8966-4290; e-mail: khalit.musin@yandex.ru

Alfira B. Yakupova, Cand. Sci. (Biol.); eLibrary SPIN: 1480-4353; e-mail: alfirm@yandex.ru