

РОСТ КОРНЕЙ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА СО СВЕРХЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ ЭКСПАНСИНОВ И КСИЛОГЛЮКАНЭНДОТРАНСГЛИКОЗИЛАЗ В УСЛОВИЯХ КАДМИЕВОГО СТРЕССА¹

© 2022 г. З. А. Бережнева^а, Х. Г. Мусин^а, Б. Р. Кулуев^{а, *}

^аИнститут биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

*e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 28.12.2021 г.

После доработки 21.02.2022 г.

Принята к публикации 25.02.2022 г.

Экспансины и ксилоглюканэндотрансгликозилазы играют важную роль в регуляции роста растений при оптимальных и стрессовых условиях. Нами ранее были созданы трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие гены экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и ксилоглюканэндотрансгликозилазы *NtEXGT Nicotiana tabacum* L. Целью данной работы стал морфофизиологический анализ корней этих трансгенных растений табака в условиях кадмиевого стресса. Трансгенные растения табака характеризовались увеличенной длиной корней по сравнению с растениями дикого типа, как при оптимальных условиях, так и при воздействии кадмия. Площадь клеток паренхимы корней трансгенных растений табака, сверхэкспрессирующих гены экспансинов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* была больше по сравнению с диким типом, а в случае с трансгеном *NtEXGT* размеры клеток наоборот были меньше. Сверхэкспрессия генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* способствовала увеличению общей антиоксидантной способности, активности аскорбатпероксидаз и уменьшению содержания пролина в корнях при действии кадмия. В побегах трансгенных по генам экспансинов растений обнаруживалось меньшее содержание МДА как при оптимальных условиях, так и при действии кадмия. Таким образом, показано, что трансгены *NtEXPA1* и *NtEXPA5* оказывают стимулирующее действие на рост корней табака в условиях кадмиевого стресса за счет усиления роста клеток растяжением и позитивного влияния на компоненты антиоксидантной системы. Ген *NtEXGT* также вовлечен в обеспечение роста корней при действии кадмия, в том числе через влияние на антиоксидантную систему.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, кадмий, ксилоглюканэндотрансгликозилазы, рост корней, сверхэкспрессия гена, трансгенные растения, экспансины

DOI: 10.31857/S0015330322050037

ВВЕДЕНИЕ

Клеточная стенка растущей клетки растения представляет собой несколько слоев микрофибрилл целлюлозы, погруженных в матрикс, состоящий из связующих гликанов и пектиновых веществ. Экспансины — неферментативные белки, вызывающие обратимое разрушение водородных связей между гликанами и микрофибриллами целлюлозы [1, 2]. Ксилоглюканэндотрансгликозилазы (ХТНs) — апопластические ферменты, осуществ-

ляющие реакции расщепления и трансгликозирования связующих гликанов [3]. Суть процесса растяжения клеточных стенок заключается в тандемной и синергичной работе экспансинов, ХТНs и некоторых других ферментов путем модификации сети полимеров, представленной микрофибриллами целлюлозы и связующими гликанами.

Сверхэкспрессия экспансинов и ХТНs может позитивно влиять на продуктивность и стрессоустойчивость растений не только благодаря стимуляции роста клеток растяжением, но и через воздействие на антиоксидантную систему. Например, трансгенные растения с конститутивной экспрессией гена экспансина риса *OsEXPA7* характеризовались уменьшенным количеством АФК и

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0015330322050037 для авторизованных пользователей.

Сокращения: АПОК — аскорбатпероксидаза, ОАС — общая антиоксидантная способность, CdAc — ацетат кадмия, ХТН/ХТНs — ксилоглюканэндотрансгликозилаза/ы

увеличением общей антиоксидантной активности по сравнению с диким типом [4]. Однако, взаимодействие экспансинов и ХТНс с антиоксидантной системой, остается малоизученной областью.

Повышенная экспрессия генов экспансинов и ХТНс способствует улучшению роста корней благодаря стимуляции роста клеток растяжением [5–7]. Также показано участие экспансинов и ХТНс в реакциях стрессоустойчивости растений к засухе, холоду и засолению за счет поддержания роста клеток корней в условиях дефицита влаги [6, 8–10]. Содержание транскриптов генов экспансинов *NtEXPA1* [11], *NtEXPA5* [12] и ксилоглюканэндотрансглицозилазы *NtEXGT* [6] повышается в условиях засоления, засухи и низких положительных температур и трансгенные по данным генам растения табака имели улучшенные параметры роста при действии вышеперечисленных стрессовых факторов [6, 7]. Однако, как будут расти корни данных растений в условиях воздействия кадмия оставалось неизвестным.

Кадмий и его соединения оказывают серьезное негативное воздействие на все физиологические и биохимические процессы в растениях [13]. Об участии экспансинов и ХТНс в обеспечении устойчивости к кадмиевому стрессу известно очень мало. Например, сверхэкспрессия гена экспансина тополя *PtoEXPA12* в растениях табака [14] и гена экспансина пшеницы *TaEXPA2* [15] позитивно влияли на формирование устойчивости растений к кадмиевому стрессу. В этой связи представляется актуальным проведение дополнительных исследований вклада экспансинов и ХТНс в регуляцию и обеспечение устойчивости к кадмию.

Целью данного исследования являлся морфометрический и микроскопический анализ, а также оценка состояния антиоксидантной системы корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* при кадмиевом стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение трансгенных растений

Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 со сверхэкспрессией генов экспансинов *NtEXPA1* [11] и *NtEXPA5* [12] и ксилоглюканэндотрансглицозилазы *NtEXGT* [6] получены методом агробактериальной трансформации листовых дисков, протоколы описаны подробно в соответствующих публикациях [6, 11, 12]. Отбор трансгенных растений проводился по результатам ПЦР-анализа на наличие целевых генов экспансинов и *NtEXGT*, а также 35S_{CaMV} промотора. Морфометрический анализ проводился на трансгенных растениях второго поколения, выращенных на селективной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением антибиотика гигромицина для

элиминации нетрансгенных семян. Уровень содержания транскриптов трансгенов определяли в побегах и корнях полученных трансгенных растений методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для последующего анализа были отобраны линии трансгенных растений, характеризующиеся высоким уровнем содержания транскриптов трансгенов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT*. Было отобрано по 3 линии трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* и ксилоглюканэндотрансглицозилазы *NtEXGT*.

Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Тотальную РНК из корней и побегов исследуемых растений табака выделяли с помощью тризола, первую цепь кДНК строили при помощи олиго(dT) праймера и M_{Mu}LV-ревертазы (NEB, США). Количественное определение содержания мРНК генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* проводили методом ПЦР в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве референсного гена, как и в предыдущих наших исследованиях [6, 7, 10, 11] был использован ген *EF-1α N. tabacum*, характеризующийся наиболее стабильным уровнем экспрессии при изменении условий среды. Реакцию амплификации проводили в 0.2 мл пробирках (AXYGEN, Inc., США) в объеме 25 мкл, используя реакционную смесь для ПЦР-РВ (Синтол, кат. № М-427, Россия). Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР генов *EF-1α*, *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* представлены в дополнительных материалах (табл. 1).

Оценка параметров роста корней трансгенных растений табака при действии ацетата кадмия

Трансгенные растения проращивали в климатостатах Binder (Германия) при температуре +25°C, освещенности около 140 мкМ/(м² с) и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде с гигромицином проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС и через 10 дней определяли прирост корней (изменение длины) при норме (контроль) и при действии 100, 200 и 400 мкМ ацетата кадмия. Такие же концентрации ацетата кадмия были использованы в наших предыдущих исследованиях и, было показано, что они существенно ингибируют рост корней табака [16]. Измерение длины корней трансгенных растений проводили перед началом эксперимента и по истечению 10-дневного срока. В дальнейшем при обработке результатов экспе-

римента был учтен только прирост корней трансгенных растений за 10 дней. Контрольной линией выступали растения табака *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1 дикого типа. Выборка составила 60 растений для каждой линии. Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барями обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали по тесту Duncan ($P < 0.05$) [17].

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 их 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 Na₂S₂O₃ в 100 мл 2% диметилсульфоксида. 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 [18]. Размер клеток корней изучали в вариантах: оптимальные условия роста и рост при действии 200 мкМ CdAc. В обоих вариантах растения выращивали в течение 10 дней перед фиксацией корней. Каждая повторность включала в себя по 10 корней на вариант опыта в каждой исследуемой линии ($n = 10$). Измерения клеток паренхимы корней проводили в центральной части зоны роста. Зону роста корня определяли визуально в ходе микроскопического анализа по расположению между другими зонами, а также по характерному строению клеток. Размер и площадь клеток анализировали на флуоресцентном микроскопе Biozero VZ-8100 (Япония). Было проанализировано по 150 клеток на каждую вариацию опыта по каждой линии исследованных растений ($n = 150$).

Анализ антиоксидантной системы трансгенных растений табака в условиях кадмиевого стресса

Активность аскорбатпероксидаз (АПОК) определялась по методу, описанному Verma и Dubey [19]. Метод основан на расчете скорости разложения H₂O₂ ферментом аскорбатпероксидазой с образованием H₂O и дегидроаскорбата. Содержание малонового диальдегида (МДА) измеряли с использованием тиобарбитуровой кислоты по методу, описанному Taylor и Millar [20]. Методика определения количества пролина была взята из работы Bates с соавт. [21] с модификациями Khedr и соавт. [22]. Оценка общей антиоксидантной способности (ОАС) проводили на метанольных

(80%) экстрактах по восстановлению молибдена (VI) до молибдена(V) в кислой среде [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание транскриптов генов NtEXPA1, NtEXPA5 и NtEXGT в трансгенных растениях табака

В ходе ранее проведенных работ по агробактериальной трансформации было получено: 11 линий трансгенных растений с геном экспансина *NtEXPA1*, 15 линий трансгенных растений с геном экспансина *NtEXPA5* и 12 линий трансгенных растений с геном ХТН *NtEXGT*. Во всех полученных растениях экспрессия трансгена находилась под контролем конститутивного 35S_{CaMV} промотора. Трансгенность всех полученных линий была доказана при помощи ПЦР и ОТ-ПЦР анализа исследуемых генов. Высокое содержание транскриптов генов экспансинов и *NtEXGT* было выявлено в побегах всех исследуемых растений. Большое содержание транскриптов генов в корнях было выявлено только у нескольких полученных растений (Дополнительные материалы, табл. 2). Далее в экспериментах использовали линии трансгенного табака с повышенной в 3 и более раза экспрессией исследуемых генов в корнях по сравнению с диким типом (рис. 1, Дополнительные материалы, табл. 2).

Дополнительно был исследован прирост корней за 10 дней (рис. 2) этих линий при оптимальных условиях, который подтвердил взаимосвязь изменений содержания транскриптов с ростом корней трансгенных растений со сверхэкспрессией генов экспансинов *NtEXPA1* (рис. 2а) и *NtEXPA5* (рис. 2д). При оптимальных условиях прирост корней данных растений был в среднем в 1.7 раза больше прироста корней табака дикого типа. У трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* (рис. 2и) средний прирост корней при оптимальных условиях был в 1.9 раза по сравнению с диким типом.

Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов NtEXPA1, NtEXPA5 и NtEXGT при воздействии ацетата кадмия

Прирост корней при выращивании в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри был проанализирован у всех линий трансгенных растений табака, которые показали повышенное по сравнению с диким типом относительное содержание транскриптов генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* в корнях. При оптимальных условиях (+25°C) достоверное увеличение длины корней по сравнению с диким типом, было выявлено у всех линий трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXPA1* (рис. 2а), у линий 49 и 56 трансгенных растений табака со сверхэкспрессией

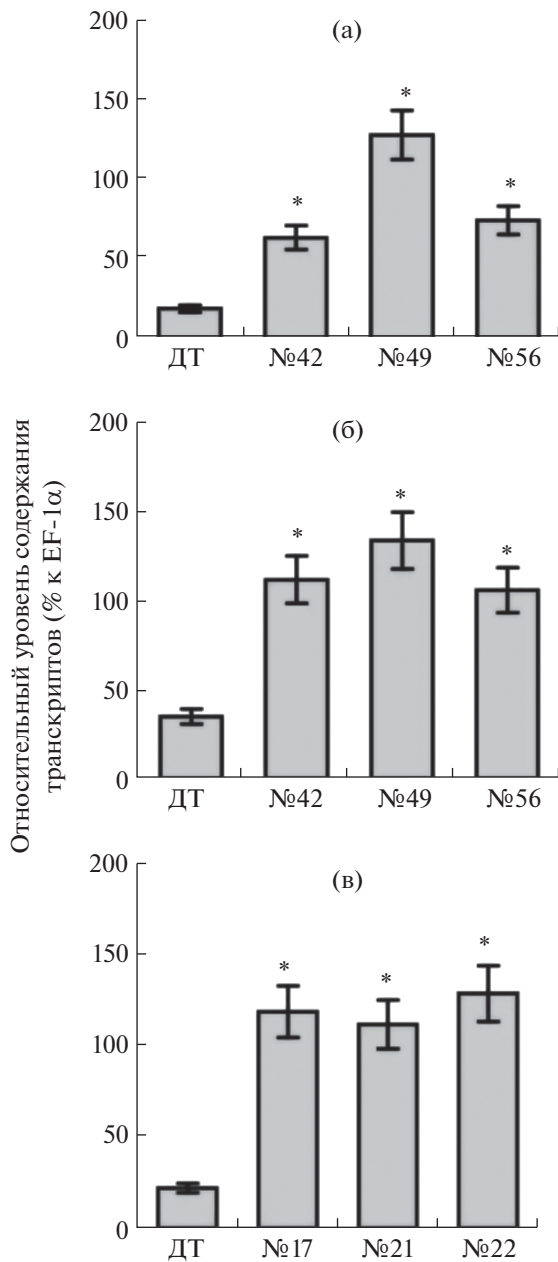


Рис. 1. Содержание транскриптов генов экспансинов *NtEXPA1* (а), *NtEXPA5* (б) и ксиланглюканэндотрансгликозилазы *NtEXGT* (в) в корнях трансгенных растений табака. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты содержания транскриптов между диким типом и трансгенными растениями после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P < 0.05$).

прессией гена *NtEXPA5*, у линии 17 трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* (рис. 2и).

При выращивании растений на среде МС с добавлением ацетата кадмия в концентрации 100 мкМ повышенные показатели прироста корней по сравнению с диким типом выявлены у трансген-

ных растений табака линии 49 с геном *NtEXPA5* (рис. 2е) и линий 17 и 21 трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* (рис. 2к). Линии 5 и 13 трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *NtEXPA1* (рис. 2б) и линия 22 трансгенных растений табака с геном *NtEXGT* показали снижение прироста корней относительно дикого типа при содержании ацетата кадмия в среде 100 мкМ. При действии 200 мкМ ацетата кадмия более быстрыми темпами роста корней характеризовались все линии изучаемых трансгенных растений (рис. 2в, ж, л), по сравнению с диким типом. При действии ацетата кадмия в концентрации 400 мкМ также почти все линии показали существенно больший прирост корней по сравнению с приростом корней дикого типа, за исключением линии 22 трансгенных растений табака с геном *NtEXGT* (рис. 2г, з, м).

Микроскопический анализ корней трансгенных растений табака при воздействии ацетата кадмия

Были проанализированы клетки паренхимы корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* при оптимальных условиях и при воздействии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ (рис. 3). Анализ и фиксация клеток проводились через 10 дней после посадки на вертикально-ориентированные чашки Петри. Форма клеток корней была цилиндрическая, вытянутая при оптимальных условиях и при воздействии ацетата кадмия. Только у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена экспансина *NtEXPA1* при воздействии ацетата кадмия 200 мкМ, клетки приобрели кубическую форму (рис. 3г). При этом визуальных изменений в толщине клеточных стенок не наблюдалось.

Было выявлено, что на питательных средах с ацетатом кадмия в концентрации 200 мкМ площадь клеток у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* была больше по сравнению с диким типом. У трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* площадь клеток паренхимы корней была меньше, чем у дикого типа, как при оптимальных условиях, так и при действии ацетата кадмия (табл. 1).

Анализ антиоксидантной системы в трансгенных растениях табака при воздействии ацетата кадмия

Кадмий негативно действует на растения через увеличение уровня окислительного стресса и образования активных форм кислорода (АФК) в клетках. АФК, в свою очередь, нарушают структуру и компоненты растительной клетки [24]. Так как кадмий воздействует на все растение, было принято решение провести анализ антиоксидант-

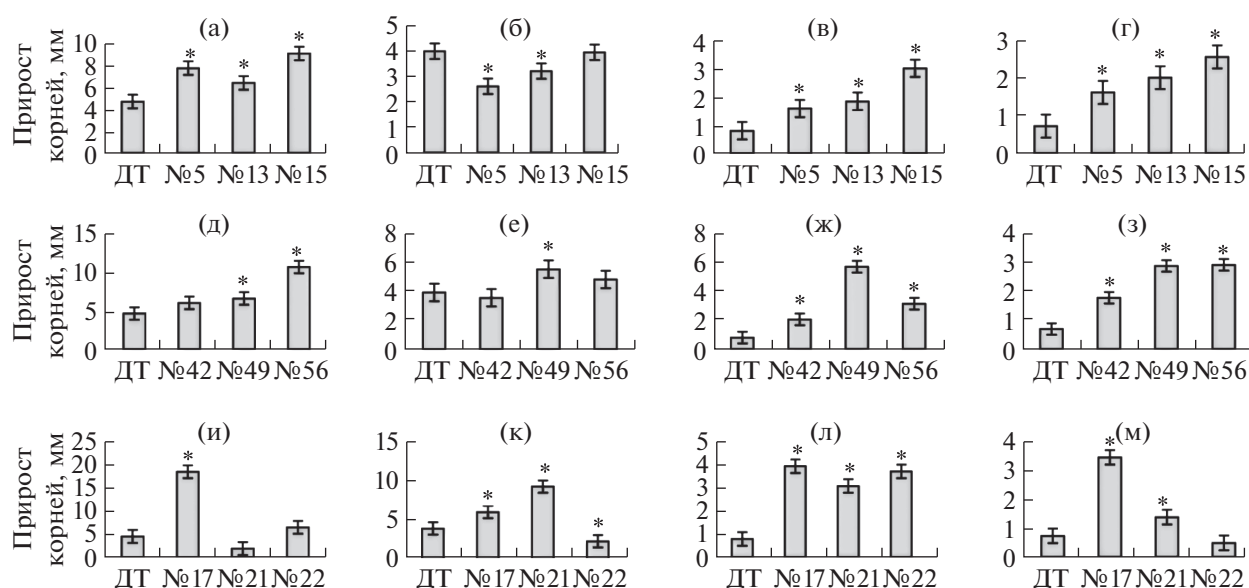


Рис. 2. Прирост за 10 дней корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов *NiEXPA1* (а-г), *NiEXPA5* (д-з) и *NiEXGT* (и-м). Оптимальные условия – (а), (д), (и), 100 мкМ CdAc – (б), (е), (к), 200 мкМ CdAc – (в), (ж), (л), 400 мкМ CdAc – (г), (з), (м). ДТ – дикий тип. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты прироста корней между диким типом и трансгенными растениями после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P < 0.05$).

ной системы и в корнях, и в побегах трансгенных растений табака со сверхэкспрессией исследуемых генов. Растения для опытов выращивали в течение 10 дней на вертикально-ориентированных чашках Петри, затем проводили соответствующие анализы.

Общая антиоксидантная способность (ОАС) побегов при воздействии кадмия в концентрации 200 мкМ у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией всех исследуемых генов была ниже, чем у дикого типа (рис. 4а). ОАС в корнях трансгенных по генам *NiEXPA5* и *NiEXGT* растений при воздействии ацетата кадмия была выше по сравнению с диким типом (рис. 4б).

В корнях большинства проанализированных трансгенных растений была обнаружена повышенная активность ферментов АПОК по сравнению с диким типом, причем как при оптимальных

условиях, так и при воздействии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ (рис. 4в, г).

У трансгенных растений со сверхэкспрессией генов экспансинов содержание МДА в побегах, как при оптимальных условиях, так и при воздействии ацетата кадмия было меньше по сравнению с диким типом (рис. 4д). А вот у трансгенных по гену *NiEXGT* растений в корнях и побегах, как при норме, так и при кадмиевом стрессе содержание МДА было больше, чем у дикого типа (рис. 4д, е).

Содержание пролина в побегах у всех трансгенных растений при действии ацетата кадмия (рис. 4ж) было больше по сравнению с диким типом. В корнях количество пролина при действии кадмия возрастало как у дикого типа, так и у всех линий растений, однако у трансгенных по генам *NiEXPA5* и *NiEXGT* растений в меньшей степени, чем у дикого типа (рис. 4з).

Таблица 1. Площадь клеток корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов экспансинов *NiEXPA1*, *NiEXPA5* и ксиллоглюканэндотрансгликозилазы *NiEXGT* при нормальных условиях и при воздействии 200 мкМ ацетата кадмия, мкм²

Растения	Нормальные условия	Ацетат кадмия
Дикий тип	2836.8 ± 873.3	2959.5 ± 755.2
<i>NiEXPA1</i>	2670.4 ± 806.6	3826.1 ± 655.8
<i>NiEXPA5</i>	2731.4 ± 812.4	3912.3 ± 785.4
<i>NiEXGT</i>	2227.3 ± 693.2	2283.5 ± 675.8

Примечание: жирным шрифтом выделены показатели трансгенных растений, достоверно различающиеся от дикого типа при действии ацетата кадмия ($P < 0.05$).

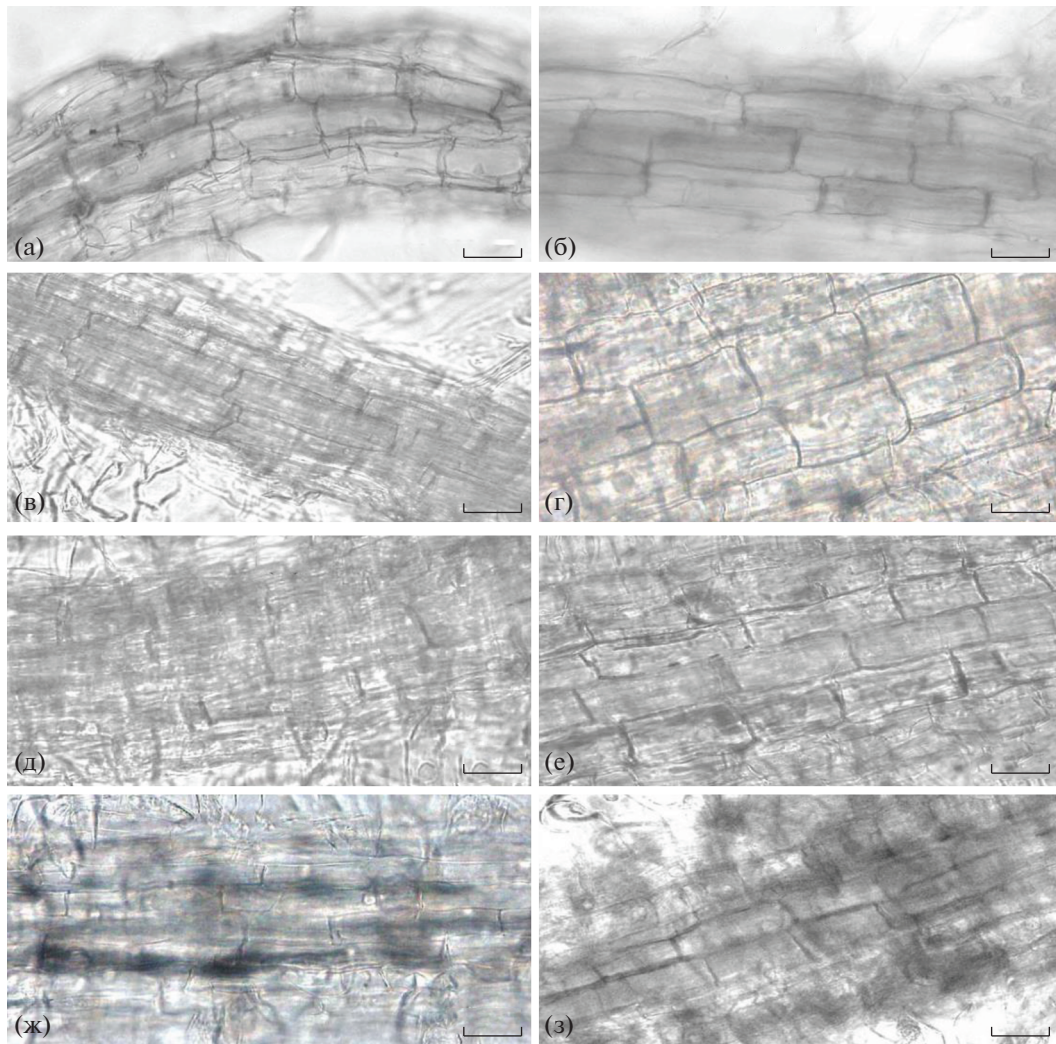


Рис. 3. Размеры и форма клеток корней табака дикого типа (а), (б) и трансгенных растений, сверхэкспрессирующих гены *NiEXPA1* (в), (г), *NiEXPA5* (д), (е) и *NiEXGT* (ж), (з) выросших при оптимальных условиях (а), (в), (д), (ж) и при воздействии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ (б), (г), (е), (з). Масштаб – 50 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Важная роль экспансинов и ХТНс заключается в обеспечении роста корней и побегов при действии таких абиотических стресс-факторов, как засуха, гипотермия и засоление [2]. Полученные нами данные доказывают участие экспансинов и ХТНс в обеспечении роста корней и побегов также при действии кадмия. Схожие данные были получены Rep с соавт. [15]: растения табака, сверхэкспрессирующие ген экспансина пшеницы *TaEXPA2*, имели более высокую скорость прорастания, удлинения корней и накапливали большую биомассу по сравнению с растениями дикого типа после обработки CdCl_2 . Для генов *ХТНс* таких результатов до наших исследований не было показано, хотя об активации экспрессии генов *ХТНс* при действии кадмия данные имеются [25]. Наши результаты, полученные на трансгенных растениях

табака, доказывают, что сверхэкспрессия генов как экспансинов, так и ХТНс увеличивают устойчивость растений к ацетату кадмия.

Полученные нами трансгенные растения табака, сверхэкспрессирующие гены *NiEXPA1* и *NiEXPA5* имели увеличенную длину корней по сравнению с диким типом, как при оптимальных условиях, так и при воздействии кадмия в концентрации 200 мкМ за счет увеличения размеров паренхимных клеток в зоне роста растяжением корней. Lee с соавт. [26] также обнаружили корреляцию сверхэкспрессии гена экспансина *GmEXP1* на кончиках корней сои с удлинением клеток. Сверхэкспрессия корнеспецифического гена риса *OsEXPA8* улучшала рост корня, за счет стимуляции роста клеток растяжением [27]. Показано, что ген экспансина риса *OsEXPA10* участвует в удлинении корневых клеток риса при воздействии алюминия [28]. Таким об-

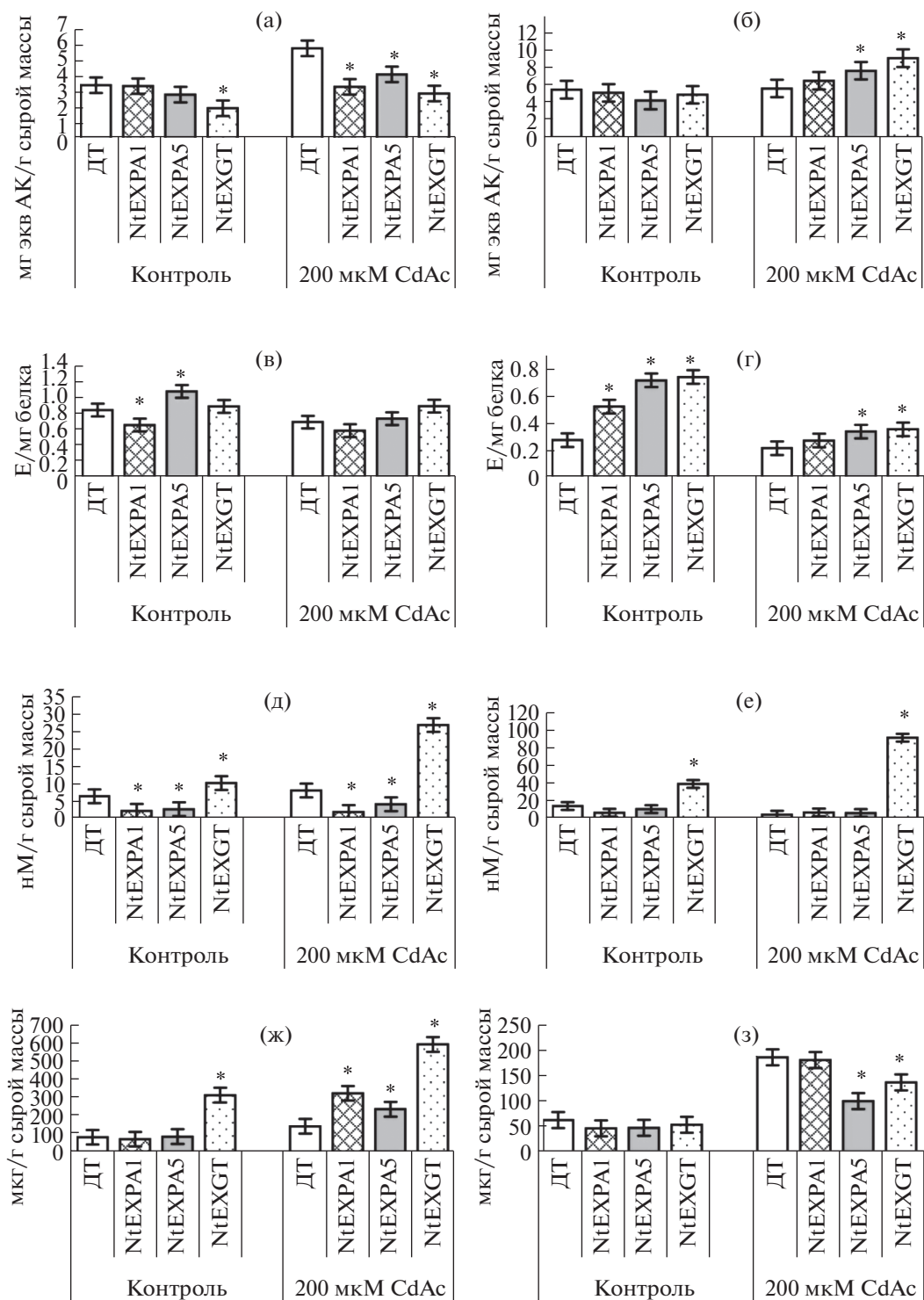


Рис. 4. Анализ антиоксидантной системы табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией генов *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* в нормальных условиях и при воздействии ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ через 10 дней после начала опыта на вертикально-ориентированных чашках Петри: (а) – ОАС в побегах; (б) – ОАС в корнях; (в) – активность АПОК в побегах; (г) – активность АПОК в корнях; (д) – содержание МДА в побегах; (е) – содержание МДА в корнях; (ж) – содержание пролина в побегах; (з) – содержание пролина в корнях. ДТ – дикий тип. Звездочками (*) обозначены достоверно различающиеся результаты между диким типом и трансгенными растениями после статистического анализа согласно тесту Duncan ($P < 0.05$).

разом, сверхэкспрессия генов экспансинов положительно влияет на рост растяжением корневых клеток при действии кадмия. Корни трансгенных растений *35S:NtEXGT* также росли быстрее, чем у дикого типа, как при норме, так и при кадмиевом стрессе. Однако, в данном случае корреляции роста корней с размерами клеток не прослеживалось. Наоборот, в случае со сверхэкспрессией гена *NtEXGT* возможно стимулировалось деление клеток (табл. 1).

Трансгенные по генам *NtEXPA5* и *NtEXGT* растения характеризовались повышенной ОАС в корнях при воздействии кадмия, по сравнению с диким типом (рис. 4б). В корнях анализируемых нами трансгенных растений также наблюдалась более высокая аскорбатпероксидазная активность, чем у дикого типа (рис. 4г). Rep с соавт. [15] также обнаружили, что трансгенные растения, сверхэкспрессирующие ген экспансина пшеницы *TaEXPA2* имеют повышенную устойчивость к воздействию $CdCl_2$ за счет увеличения активности компонентов антиоксидантной системы. Необходимо отметить, что в побегах трансгенных растений такие изменения в ОАС и пероксидазной активности не обнаруживались. Видимо, это связано с меньшей стрессовой нагрузкой в органах побега, по сравнению с корнями.

В побегах трансгенных по генам экспансинов растений было обнаружено меньшее содержание МДА, по сравнению с диким типом при кадмиевом стрессе (рис. 4д). Это может говорить о меньшей стрессовой нагрузке, которую испытывают трансгенные растения, возможно за счет защитного эффекта экспансинов [14]. Защитный эффект продукта гена *NtEXGT*, видимо реализовывался через другие механизмы, так как в корнях трансгенных растений *35S:NtEXGT* при кадмиевом стрессе накапливалось даже больше МДА, чем у дикого типа. Такое высокое накопление МДА в данном случае может объясняться более высокими темпами роста корней трансгенных растений, по сравнению с диким типом.

Количество свободного пролина многократно увеличивается в растениях в ответ на воздействие тяжелых металлов, что говорит о чувствительности растений к данному стрессору [29]. Однако, в корнях трансгенных по генам *NtEXPA5* и *NtEXGT* растений мы наблюдали меньшее содержание пролина, чем у дикого типа (рис. 4з). Эти данные также могут говорить о наличии защитного эффекта экспансинов и ХТНс при кадмиевом стрессе [15].

Изменения активности антиоксидантной системы при сверхэкспрессии генов экспансинов описывались и ранее [15, 30], при этом до сих пор остается без ответа весьма интригующий вопрос – каков конкретный механизм влияния этих белков клеточной стенки, которые известны в основном

лишь как регуляторы роста клеток растяжением, на антиоксидантную систему? Хорошо известно, что некоторые АФК, например, гидроксильный радикал, являются позитивными регуляторами роста клеток, непосредственно участвуя в расщеплении полисахаридов клеточной стенки, то есть действуют синергично с экспансинами и ХТНс [31]. Исходя из этого, можно предположить, что в корнях трансгенных растений со сверхэкспрессией генов экспансинов и ХТНс происходит компенсаторное уменьшение содержания АФК. Подтверждение этой гипотезы требует проведения дополнительных исследований.

Таким образом, экспансины оказывают стимулирующее действие на рост корней в условиях кадмиевого стресса за счет усиления роста клеток растяжением и позитивных сдвигов в антиоксидантной системе. Ксилоглюканэндотрансглюкозилазы также оказывают позитивный эффект на рост корней при действии кадмия, что выражается теми же изменениями в антиоксидантной системе: повышение пероксидазной активности и общей антиоксидантной способности. Гены *NtEXPA1*, *NtEXPA5* и *NtEXGT* могут быть предложены в качестве целевых для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к кадмию.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № АААА-А19-119021190011-0 при поддержке гранта Президента Российской Федерации МД-2304.2020.4.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием животных и людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений // Физиология растений. 2007. Т. 54. С. 805.
2. Cosgrove D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls // Curr. Opin. Plant Biol. 2015. V. 25. P. 162. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.014>
3. Van Sandt V.S., Suslov D., Verbelen J.P., Vissenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall // Ann. Bot. 2007. P. 1467. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm248>
4. 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 // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 454. <https://doi.org/10.3390/ijms21020454>
5. Lin C., Choi H.S., Cho H.T. Root hair-specific *EXPANSIN A7* is required for root hair elongation in *Arabidopsis* // Mol. Cells. 2011. V. 31. P. 393. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0046-2>
6. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Berezheva 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 Physiol. Biochem.* 2017. V. 111. P. 203. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.12.005>
7. *Kuluev B.R., Berezheva 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 // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 211. <https://doi.org/10.1134/S1021443718020036>
 8. *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. V. 248. P. 313. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0172-2>
 9. *Xu Q., Xu X., Shi Y., Xu J., Huang B.* Transgenic tobacco plants overexpressing a grass *PpEXP1* gene exhibit enhanced tolerance to heat stress // *PLoS One.* 2014. V. 9. e100792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100792>
 10. *Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Mikhaylova E.V., Nikonov Y.M., Berezheva Z.A., Chemeris A.V.* Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response // *J. Plant Physiol.* 2016. V. 206. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.09.001>
 11. *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. С. 560. <https://doi.org/10.1134/S1022795414010074>
 12. *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. С. 34. <https://doi.org/10.1134/S1062360413010049>
 13. *Титов А.Ф., Казнина Н.М., Таланова В.В.* Тяжелые металлы и растения. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2014. 194 с.
 14. *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. Biol. Macromol.* 2018. V. 116. P. 676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.053>
 15. *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 Sci.* 2018. V. 270. P. 245. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.022>
 16. *Бережнева З.А., Кашафутдинова А.Р., Кулуев Б.Р.* Рост корней трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтазы рапса *VnGSH* при действии стрессовых факторов // *Вестник защиты растений.* 2017. № 3(93). С. 55.
 17. *Duncan D.B.* Multiple range and multiple F-test // *Biometrics.* 1955. V. 11. P. 1. <https://doi.org/10.2307/3001478>
 18. *Филин А.Н., Иванов В.Б.* Влияние 2,4-Д на пролиферацию и растяжение клеток в корнях *Arabidopsis thaliana* // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. С. 174. <https://doi.org/10.7868/S0015330316010061>
 19. *Verma S., Dubey R.S.* Lead toxicity induces lipid peroxidation and alert the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // *Plant Sci.* 2003. V. 64. P. 645. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
 20. *Taylor N.L., Millar A.H.* Oxidative stress and plant mitochondria // *Methods in molecular Biology.* 2007. V. 372. P. 389. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_28
 21. *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. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
 22. *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 // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2553. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
 23. *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. V. 13. P. 6. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu046>
 24. *Сазанова К.А., Баишмаков Д.И., Лукаткин А.С.* Генерация супероксидного анион-радикала в листьях растений при хроническом действии тяжелых металлов // *Труды КарНЦ РАН. Серия: Экспериментальная биология.* 2012. № 2. С. 119.
 25. *Liu Y., Yu X., Feng Y., Zhang C., Wang C., Zeng J., Huang Z., Kang H., Fan X., Sha L., Zhang H., Zhou Y., Gao S., Chen Q.* Physiological and transcriptome response to cadmium in cosmos (*Cosmos bipinnatus* Cav.) seedlings // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 14691. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14407-8>
 26. *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 Physiol.* 2003. V. 131. P. 985. <https://doi.org/10.1104/pp.009902>
 27. *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. V. 8. e75997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075997>
 28. *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. V. 88. P. 132. <https://doi.org/10.1111/tpj.13237>
 29. *Кузнецов В.В., Шевякова Н.И.* Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // *Физиология растений.* 1999. Т. 46. С. 321.
 30. *Кулуев Б.Р., Мусин Х.Г., Якупова А.Б.* Ген экспансины *NtEXPA5* повышает стрессоустойчивость волосяных корней табака через влияние на антиоксидантную систему // *Экологическая генетика.* 2021. Т. 19. № 1. С. 5.
 31. *Liszka A., Zalm E., Schopfer P.* Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 3114.