



ОСОБЕННОСТИ РОСТА ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ ТАБАКА С КОНСТИТУТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА ЭКСПАНСИНА *NtEXPA5*

^{1,2}Мусин Х.Г., ²Сербаева Э.Р., ²Федяев В.В., ¹Гумерова Г.Р., ^{1,2}Кулуев Б.Р.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, 450054, Проспект Октября, 71, Уфа, khalit.musin@yandex.ru

²Башкирский государственный университет, 450074, ул. З. Валиди, 32, Уфа, kuluev@bk.ru

Резюме

Экпансины – это белки, обеспечивающие рост растений за счет индукции расхождения микрофибрилл целлюлозы при росте клеток растяжением. Нами было получено и проанализировано 6 линий волосовидных корней (hairy roots) *Nicotiana tabacum* с конститутивной экспрессией гена экспансина табака *NtEXPA5*, которые характеризовались более высокими темпами роста и повышенной продуктивностью при нормальных условиях культивирования, по сравнению с контролем. Волосовидные корни табака сверхэкспрессирующие ген *NtEXPA5* отличались повышенной устойчивостью к действию NaCl, маннитола, ацетата кадмия и CuSO₄. Исходя из полученных данных испытанная нами генно-инженерная конструкция с геном *NtEXPA5* может быть предложена для получения волосовидных корней с улучшенными параметрами роста и повышенной продуктивностью как при нормальных, так и при стрессовых условиях культивирования. Обсуждается перспективность использования волосовидных корней табака как модельного объекта для быстрого тестирования целевых генно-инженерных конструкций, предназначенных для создания трансгенных растений.

Ключевые слова: экспансины, волосовидные корни, бородачатые корни, засоление, дефицит влаги, тяжелые металлы, кадмий, медь, рост, стрессоустойчивость, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium rhizogenes*

Цитирование: Мусин Х.Г., Сербаева Э.Р. Федяев В.В., Гумерова Г.Р., Кулуев Б.Р. Особенности роста волосовидных корней табака с конститутивной экспрессией гена экспансина *NtEXPA5* // Биомика. 2019. Т.11(4). С. 378-385. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-29

© Автор(ы)

FEATURES OF GROWTH OF HAIRY ROOTS OF TOBACCO WITH CONSTITUTIVE EXPRESSION OF *NtEXPA5* EXPANSIN GENE

¹Musin K.G., ²Serbaeva E.R., ²Fedyayev V.V., ¹Gumerova G.R., ^{1,2}Kuluev B.R.

¹Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054, Prospect Oktyabrya 71, khalit.musin@yandex.ru

²Bashkir State University, Ufa, 450074, Z. Valdi, 32, kuluev@bk.ru

Expansins are proteins that provide plant growth by stimulating the divergence of cellulose microfibrils during cell expansion. We obtained and analyzed 6 lines of hairy roots of *Nicotiana tabacum* with constitutive expression of the *NtEXPA5* tobacco expansin gene, which were characterized by higher growth rates and increased productivity under normal conditions, compared with the control. Hairy roots of tobacco overexpressing the *NtEXPA5* gene were characterized by increased tolerance to NaCl, mannitol, cadmium acetate, and CuSO₄. Based on the obtained data, the binary vector pCambia 1301 with the *NtEXPA5* gene can be proposed for creating hairy roots with increased growth parameters and productivity

under both normal and stress conditions. The prospect of using of hairy roots as a model object for rapid testing of targeted binary vectors is discussed.

Keywords: expansins, hairy roots, salinity, water deficit, heavy metals, cadmium, copper, growth, stress tolerance, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium rhizogenes*

Citation: Musin K.G., Serbaeva E.R., Fedyayev V.V., Gumerova G.R., ²Kuluev B.R. Features of growth of hairy roots of tobacco with constitutive expression of *NtEXPA5* expansin gene. *Biomics*. 2019. V.11(4). P. 378-385. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-29

© The Author(s)

Введение

Экпансины – это неферментативные белки участвующие в размягчении клеточных стенок, механизм действия которых связан с ослаблением и разрывом водородных связей между ксилоглоканами и микрофибриллами целлюлозы. Активность экспансинов наиболее важна в регуляции и обеспечении роста клеток растяжением [Cosgrove, 2015]. Эта группа белков ассоциирована с ростом как органов побега [Кулуев и др. (Kuluev et al.) 2013, 2013а, 2017], так и корней [Lin et al., 2011, Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2018]. Имеются также многочисленные данные о вкладе экспансинов в обеспечение устойчивости к абиотическим факторам среды за счет поддержания роста клеток в условиях дефицита влаги. К примеру, показана защитная роль экспансинов при действии таких стрессовых факторов как засуха, жара и засоление [Zhao et al., 2011, Xu et al., 2014, Kuluev et al., 2016].

Ранее нами были созданы трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* с конститутивной экспрессией генов экспансинов *NtEXPA1* [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2014] и *NtEXPA5* [Кулуев и др., 2013], а также с пониженной экспрессией гена *NtEXPA4* [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2014а]. Было показано, что конститутивная экспрессия генов экспансинов *NtEXPA1* и *NtEXPA5* способствует увеличению конечных размеров листьев и стебля при нормальных условиях произрастания [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2013, 2014]. В наших дальнейших исследованиях выяснилось, что повышенная экспрессия генов экспансинов способствует улучшению роста корней не только при нормальных условиях, но и при действии гипотермии и засолении [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2018]. Исходя из полученных нами данных было сделано предположение, что экспансины могут способствовать улучшению параметров роста также у культур волосовидных корней (hairy roots), являющихся перспективной биотехнологической системой для продуцирования ценных вторичных метаболитов [Михайлова и др. (Mikhaylova et al.), 2017, Мусин и др. (Musin et al.), 2017]. Использование

нами термина «волосовидные корни» для обозначения известного в биотехнологии растений феномена «hairy roots» или «бородатые корни» объясняется тем, что он был предложен еще в начале прошлого века специалистом в области бактериального патогенеза растений И.Л. Сербиновым [Serbinov, 1912] и видимо стоит к нему вернуться, поскольку похоже это был самый правильный перевод с научной точки зрения. Культуры волосовидных корней в биотехнологическом производстве могут подвергаться отрицательному влиянию изменений состава среды, температуры, и т.д., поэтому создание не только высокопродуктивных, но и стрессоустойчивых волосовидных корней весьма актуально. Ранее нами был показан повышенный уровень экспрессии хозяйского гена *NtEXPA5* в волосовидных корнях табака, по сравнению с обычными корнями [Гумерова и др. (Gumerova et al.), 2018], что говорит о важности его белкового продукта для роста hairy roots. Исходя из этого, целью настоящей работы стало получение волосовидных корней табака *N. tabacum* из трансгенных растений с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5* и оценка их параметров роста при нормальных условиях культивирования и при действии стрессовых факторов. Предполагалось, что волосовидные корни табака, сверхэкспрессирующие ген экспансина *NtEXPA5*, будут характеризоваться повышенной продуктивностью и стрессоустойчивостью по сравнению с обычными hairy roots.

Материалы и методы исследования

Для получения волосовидных корней использовали трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 с конститутивной экспрессией гена *NtEXPA5* поколения ТЗ, полученные нами ранее [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2013]. Данные табаки содержат в своем геноме Т-ДНК бинарного вектора pCambia 1301 с целевым геном *NtEXPA5* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты [Кулуев (Kuluev), 2012]. Эти трансгенные растения табака 35S::*NtEXPA5*

линий 1, 2, 3, 4, 5 и 6 выращивали на почве в течение двух месяцев без использования стадии прорастания в условиях *in vitro*. Для работы использовали трансгенные растения табака, несущие две копии трансгена *NtEXPA5* в гомологичных хромосомах (гомозиготные линии). Для получения стерильных листовых эксплантов свежесобранные листья табака выдерживали в растворе 70% этанола в течение 1 мин и в 10% растворе белизны с добавлением 5 мкл Tween 20 (на 100 мл общего объема) в течение 10 мин. Затем листья промывали 5 раз стерильной дистиллированной водой и нарезали их на отдельные экспланты размером 0.5 x 0.5 см. Для трансформации стерильных листовых эксплантов табака использовали штамм А4 *Agrobacterium rhizogenes*, который предварительно культивировали в жидкой среде LB с добавлением 100 мг/л рифампицина в течение суток. Затем культуры агробактерий центрифугировали при 4 тыс. об./мин в течение 10 минут при температуре 18°C, и осадок растворяли в 20 мл жидкой среды МС с добавлением 100 мкМ ацетосиригона. Суспензию агробактерий культивировали на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение получаса, после чего проводили инокуляцию листовых эксплантов совместно с *A. rhizogenes* по стандартной методике [Дрейпер и др. (Draper et al.), 1991]. Затем экспланты подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и в течение двух суток сокультивировали с агробактериями (при 23°C) на агаризованной среде МС без добавления антибиотиков; после этого экспланты пересаживали на среду, содержащую дополнительно 300 мг/л цефотаксима для избавления от агробактерий. Культуры корней выращивали на безгормональной твердой среде МС при температуре 25°C на свету.

Все образованные на эксплантах волосовидные корни фрагментами длиной по 1.5-2 см помещались в отдельные чашки Петри и содержались при температуре воздуха 24°C в темноте. Была проведена предварительная селекция, для отбора наиболее активно растущих корней. После двух месяцев культивации на селективной среде МС фрагменты волосовидных корней (~1.2 см) вместе с апикальной меристемой, были пересажены на свежую среду МС. Все полученные в ходе эксперимента линии волосовидных корней были подвергнуты ПЦР-анализу на наличие генов *rolA* и *rolB* при помощи праймеров ААТТГСТАСГАГГГГАСГТТТГТ и АСГСТССГССГТГГТКАТАСТТА, которые были подобраны нами ранее для амплификации фрагментов ДНК содержащих одновременно участки обоих *rol*-генов. Наличие целевой генно-инженерной конструкции проверяли ПЦР-анализом при помощи праймеров к гену гигромицинофосфотрансферазы:

СТАСАСАГССАТССГГТССАГА
ААГССГАСАСАГСАГТТТКАТС.

и

Интенсивность стрессовых факторов по отношению к волосовидным корням табака дикого типа была подобрана нами ранее таким образом, что они значительно (до 20 раз) замедляли рост, но вызывали гибель не более 10% корней. Для анализа стрессоустойчивости были использованы фрагменты волосовидных корней длиной ~1 см. Измерение параметров роста проводили на 30-й день изолированной культивации. Для каждой линии выборка составила 48 кончиков корней (n = 48). Все опыты проводили в комнатных условиях (24-26°C, отн. влажность 40-60%) без освещения. Во всех экспериментах использовали стандартную среду МС, для опытов с засолением в среду добавляли NaCl до 150 мМ. Также использовали среды МС с добавлением 100 мкМ ацетата кадмия, 100 мкМ CuSO₄ и 75 мМ маннитола. В качестве контрольной линии, относительно которой делались выводы о роли трансгена, выступали линии волосовидных корней, созданные из нетрансгенных растений *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1 (контроль, дикий тип).

Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи *U*-критерия Манна-Уитни.

Результаты исследования

В ходе работы были получены и размножены 6 линий волосовидных корней, соответствующих линиям 1 - 6 трансгенных растений табака *35S::NtEXPA5*, созданных и исследованных нами ранее [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2013]. Таким образом, в работе были использованы волосовидные корни от шести независимых трансформационных событий. Также были получены волосовидные корни из растений табака дикого типа, которые использовались в качестве контроля. По каждой из семи исследуемых линий корней были пересажены по 48 кончиков для экспериментов по морфометрическому анализу. Через 30 дней был измерен прирост корней по сравнению с изначальной длиной. Было показано, что в нормальных условиях все анализируемые линии волосовидных корней трансгенных растений росли быстрее, чем дикий тип (рис. 1А). В условиях засоления волосовидные корни трансгенных растений также росли лучше, чем в контроле (рис. 1Б). Лишь прирост линии 1 достоверно не превышал изменение длины корня дикого типа. При действии 75 мМ маннитола все линии волосовидных корней трансгенных растений достоверно превышали параметры роста контроля (рис. 1В).

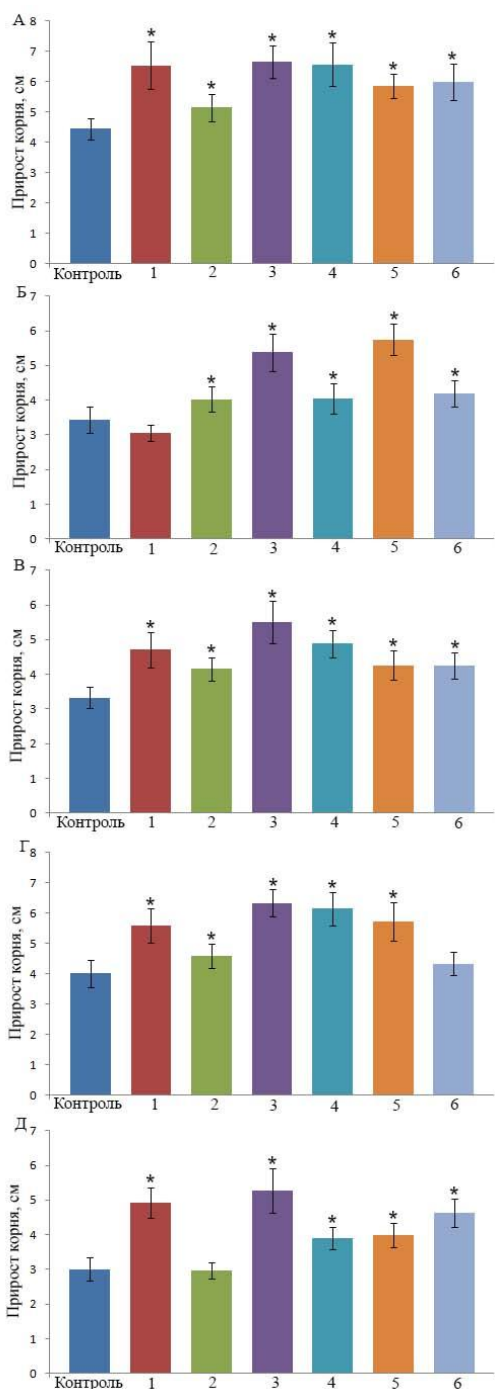


Рис. 1. Прирост волосовидных корней за 30 дней культивирования на среде МС при нормальных условиях (А), при действии 150 мМ NaCl (Б), при действии 75 мМ маннитола (В), при действии 100 мкМ CuSO₄ (Г) и при действии 100 мкМ ацетата кадмия (Д). n = 48. * - p < 0.01.

Fig. 1. The growth of hairy roots for 30 days of cultivation on MS medium under normal conditions (A), under the influence of 150 mM NaCl (Б), under the influence of 75 mM mannitol (В), under the action of 100 μM CuSO₄ (Г) and under the action of 100 μM cadmium acetate (Д). n = 48. * - p < 0.01.

Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* также способствовала повышению устойчивости к тяжелым металлам. На среде с медью, а также на среде с кадмием трансгенные волосовидные корни росли лучше контроля (рис. 1Г, Д). В целом наиболее стабильно высокие для всех трансгенных линий результаты прироста волосовидных корней по сравнению с контролем были характерны для среды с 75 мМ маннитолом. Наиболее высокие темпы роста во всех опытах было характерно для линии 3 волосовидных корней. К примеру, на среде с кадмием волосовидные корни табака линии 3 удлинились быстрее контроля на 77% (рис. 1Д).

Для биотехнологического производства волосовидных корней большой интерес представляет не скорость удлинения, а возможность увеличения продуктивности, поэтому все анализируемые культуры волосовидных корней высушивали и определяли их сухой вес. При нормальных условиях сухой вес был достоверно больше контроля в линиях 1, 4 и 5 (рис. 2А). При действии NaCl все линии корней трансгенных растений были больше по сухой массе, чем у контроля (рис. 2Б). На среде с маннитолом экспрессия гена *NtEXPA5* также способствовала увеличению сухой массы, причем это было характерно для всех шести линий волосовидных корней (рис. 2В). Волосовидные корни 35::*NtEXPA5* также характеризовались повышенной устойчивостью к ионам меди, что выражалось в их более высоком сухом весе, чем у контроля при выращивании на среде с солью этого металла (рис. 3Г). Только линия 5 при этом достоверно не отличалась от контроля.

Что касается кадмия, то в данном случае сухой вес от контроля достоверно не отличался у линий 2 и 3. В то же время линии 1, 4, 5 и 6 набирали больше сухого веса чем контрольные корни на среде со 100 мкМ ацетата кадмия (рис. 2Д). В целом по результатам измерения сухого веса наибольшую стрессоустойчивость ко всем использованным в работе абиотическим факторам продемонстрировали линии 1 и 4. Наиболее стабильную устойчивость волосовидные корни 35::*NtEXPA5* демонстрировали к засолению и дефициту влаги, вызванному маннитолом. Тогда как в нормальных условиях и действии тяжелых металлов более высокий по сравнению с контролем сухой вес набирали лишь часть линий анализируемых волосовидных корней.

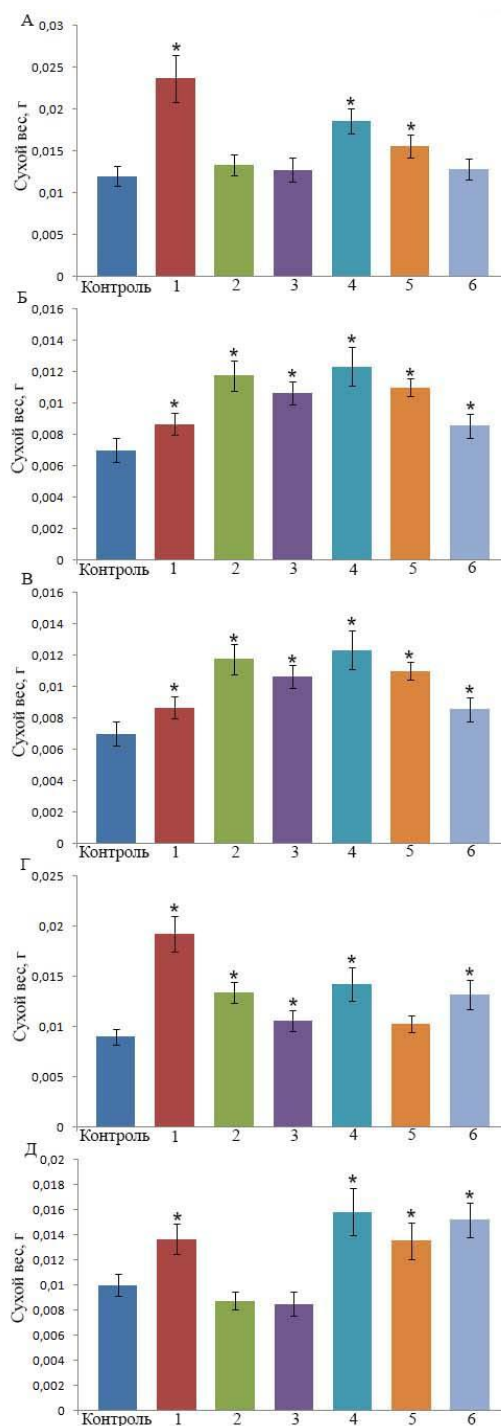


Рис. 2. Сухой вес волосовидных корней за 30 дней культивирования на среде МС при нормальных условиях (А), при действии 150 мМ NaCl (Б), при действии 75 мМ маннитола (В), при действии 100 мкМ CuSO₄ (Г) и при действии 100 мкМ ацетата кадмия (Д). n = 48. * - p<0.01.

Fig. 2. The dry weight of hairy roots for 30 days of cultivation on MS medium under normal conditions (A), with 150 mM NaCl (Б), with 75 mM mannitol (В), with 100 μM CuSO₄ (Г) and with 100 μM cadmium acetate (Д). n = 48. * - p < 0.01.

Обсуждение

Ген *NtEXPA5* проявляет свою наибольшую активность в листьях, однако нами ранее был обнаружен высокий уровень экспрессии этого гена также в обычных корнях [Кулуев и др. (Gumerova et al.), 2018]. Конститутивная экспрессия гена *NtEXPA5* способствовала улучшению роста обычных корней, как при нормальных условиях, так и при действии +12°C и 50 мМ NaCl [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2018]. Исходя из этих данных, мы предположили, что сверхэкспрессия гена *NtEXPA5* в волосовидных корнях также будет способствовать улучшению параметров их роста и стрессоустойчивости. В литературе отсутствовала информация о влиянии экспрессии экспансинов на рост волосовидных корней, поэтому планируемые нами исследования представлялись актуальными. В ходе проведенного исследования нами было доказано, что повышенная экспрессия гена *NtEXPA5* приводит не только к улучшению роста, но и содействует большей продуктивности волосовидных корней, особенно при действии засоления и дефицита влаги. Полученные нами данные вероятнее всего связаны с прямыми функциями экспансинов в растительном организме, которые заключаются в обеспечении роста клеток растяжением. Клеточное растяжение реализуется за счет двух основных механизмов, а именно осмотического давления на клеточную стенку, развиваемого протопластом и контролируемого расхождения микрофибрилл целлюлозы [Кулуев, Сафиуллина (Kuluev, Safiullina), 2015]. Последний процесс регулируется ксилоглюканэндотрансгликозилазами, эндогликоназами, экспансинами и др., причем именно экспансины вероятнее всего инициируют расхождение микрофибрилл целлюлозы за счет ослабления водородных связей между ними и ксилоглюканами, которые, наряду с пектиновыми веществами, являются основными компонентами первичных клеточных стенок двудольных растений [Горшкова (Gorshkova), 2007]. При дефиците влаги растительным тканям весьма затруднительно индуцировать высокое осмотическое давление на компоненты клеточной стенки для поддержания роста клеток растяжением. Возможно при более высоком уровне экспрессии экспансинов, эти белки накапливаются в клеточной стенке в большем количестве и способствуют расхождению микрофибрилл целлюлозы даже при относительно низком уровне осмотического давления [Wu, Cosgrove, 2000; Sabirzhanova et al., 2005]. Нельзя исключить того, что экспансины могут на некоторое время поддержать рост клеток растяжением даже у нетургесцентных клеток, однако эти предположения нуждаются в дальнейшей проверке. С другой стороны при действии стрессовых факторов в клетке

увеличивается содержание активных форм кислорода [Wise et al., 1987], которые могут окислять или разрушать молекулы экспансинов, а конститутивная экспрессия этих белков, возможно, частично компенсирует эти потери. Однако точный механизм антистрессового эффекта экспансинов пока неизвестен, поэтому представляется актуальным продолжение исследований молекулярных основ индукции улучшения роста и увеличения стрессоустойчивости при повышенной экспрессии генов этого семейства белков.

Волосовидные корни растений в современной биотехнологии используются для продуцирования ценных вторичных метаболитов [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2015], поэтому представляет большой интерес разработка подходов для повышения их продуктивности. Наши результаты показывают, что для этих целей могут быть использованы гены экспансинов. Волосовидные корни нами были получены из трансгенных растений табака, созданных ранее. Однако если главной целью планируемой исследовательской работы является создание волосовидных корней, то целесообразнее для этого проводить прямую одноступенчатую агробактериальную трансформацию, а именно использовать штаммы *A. rhizogenes* с внедренными в них целевыми генно-инженерными конструкциями и обрабатывать ими растения дикого типа. В таком случае можно получать волосовидные корни за один месяц, тогда как в случае получения полноценных трансгенных растений эта процедура может затянуться на многие месяцы экспериментальной работы. Причем при необходимости из волосовидных корней можно без труда регенерировать целые трансгенные растения [Knyazev et al., 2017, 2017a]. Исходя из вышесказанного, мы предлагаем использовать волосовидные корни табака в качестве модельного объекта для проверки функциональной полноценности и эффективности генно-инженерных конструкций, предназначенных для улучшения параметров роста и стрессоустойчивости растений.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Агидель» и УНУ «КОДИНК» в рамках гранта РФФИ № 18-04-00118 А, гранта ФЦП №2019-05-595-000-058 Минобрнауки России и государственного задания АААА-А19-119021190011-0 ИБГ УФИЦ РАН.

Литература

1. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка, как динамичная система. М.: Наука, 2007. 429 с.
2. Гумерова Г.Р., Чемерис А.В., Никоноров Ю.М., Кулуев Б.Р. Морфологический и молекулярный анализ изолированных культур адвентивных корней табака, полученных методами биобаллистической

бомбардировки и агробактериальной трансформации // *Физиология растений*. 2018. Т. 65. № 5. С. 376–387.

3. Дрейпер Д.С., Армитидж Ф., Дьюри Г., Джэкоб Л., Уолден Р., Кумар А., Джефферсон Р., Хэмил Д. Генная инженерия растений. М.: Мир, 1991. С. 408.

4. Кулуев Б.Р. Каулимовирусы и их полногеномные промоторы // *Биомика*. 2012. Т. 4. № 1. С. 1-19.

5. 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.

6. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В. Морфологический анализ трансгенных растений табака экспрессирующих ген *PnEXPA3* тополя черного // *Онтогенез*. 2013а. Т. 44. №3. С. 166-173.

7. 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.

8. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Постригань Б.Н., Чемерис А.В. Получение трансгенных растений табака, экспрессирующих фрагменты генов *ARGOS* и *NtEXPA4* в антисмысловой ориентации // *Генетика*. 2014а. Т. 50. №1. С. 44–51.

9. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г. Регуляция роста клеток растяжением в растениях // *Успехи современной биологии*. 2015. Т. 135. № 2. С. 148-163.

10. Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ан.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений – важный инструмент для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // *Биомика*. 2015. Т. 7. №2. С. 70-120.

11. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Роль генов экспансинов *PnEXPA3* и *PnEXPA3* в регуляции роста листьев тополя // *Генетика*. 2017. Т. 53. №6. С. 663–674.

12. Кулуев Б.Р., Круглова Н.Н., Зарипова А.А., Фархутдинов Р.Г. Основы биотехнологии растений: учебное пособие / Б.Р. Кулуев [и др.], по ред. Р.Г. Фархутдинова. Уфа: РИЦ БашГУ. 2017а. 244 с. ISBN 978-5-7477-4333-5.

13. 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.

14. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // *Вестник биотехнологии и физико-химической*

- биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 40–45.
15. Мусин Х.Г., Якупова А.Б., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Особенности роста культур генетически трансформированных (бородатых) корней табака и витании при изменении объема питательной среды // *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова*. 2017. Т. 13. №2. С. 46–50.
16. Сербинов И.Л. Бактериальный рак плодовых деревьев, ягодных кустарников и других садовых, а также сельскохозяйственных растений // *Плодоводство*. 1912. №9. С. 787–795.
17. Cosgrove D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls // *Current Opinion Plant Biology*. 2015. V. 25. P. 162–172. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.014
18. Ding A., Marowa P., Kong Y. Genome-wide identification of the expansin gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*) // *Molecular Genetics and Genomics*. 2016. V. 291. P. 1891–1907. doi: 10.1007/s00438-016-1226-8
19. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin // *Plant Root*. 2017. V. 11. P. 64–69. doi:10.3117/plantroot.11.64
20. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Hairy Root Induction in *Parasponia andersonii* Planch // *Asian Journal of Plant Sciences*. 2017a. V. 16 (4). P. 227–234. doi: 10.3923/ajps.2017.227.234
21. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Mikhaylova E.V., Nikonorov Y.M., Berezheva 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. DOI: 10.1016/j.jplph.2016.09.001
22. 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. V. 31. P. 393–397. doi: 10.1007/s10059-011-0046-2
23. Sabirzhanova I.B., Sabirzhanov B.E., Chemeris A.V., Veselov D.S., Kudoyarova G.R. Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005. V. 43. P. 419–422. doi: 10.1016/j.plaphy.2005.01.021
24. Wise R.R., Naylor A.W. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants // *Plant Physiology*. 1987; 83(2): 278–282.
25. Wu Y., Cosgrove D.J. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins // *Journal of Experimental Botany*. 2000. V. 51. P. 1543–1553.
26. 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. 8. e100792. doi: 10.1371/journal.pone.0100792
27. 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. 313–323. doi: 10.1007/s00709-010-0172-2

References

1. Cosgrove D.J. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion Plant Biology*. 2015. V. 25. P. 162–172. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.014
2. Ding A., Marowa P., Kong Y. Genome-wide identification of the expansin gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Molecular Genetics and Genomics*. 2016. V. 291. P. 1891–1907. doi: 10.1007/s00438-016-1226-8
3. Draper J., Armitage F., Dury G., Jacob L., Walden R., Kumar A., Jefferson R., Hamil D. Plant genetic transformation and gene expression. A laboratory manual. Oxford; Boston: Blackwell Scientific Publications 1988. 366 p.
4. Gorshkova T.A. Plant cell wall as a dynamic system. M.: Nauka, 2007. 429 p. (In Russian)
5. Gumerova G.R., Chemeris A.V., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R. 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. V. 65. No. 5. P. 740–749. doi: 10.1134/S1021443718050072
6. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Aseptic germination and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum kok-saghyz* Rodin. *Plant Root*. 2017. V. 11. P. 64–69. doi:10.3117/plantroot.11.64
7. Knyazev A.V., Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Hairy Root Induction in *Parasponia andersonii* Planch. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2017a. V. 16 (4). P. 227–234. doi: 10.3923/ajps.2017.227.234
8. Kuluev B.R. Caulimoviruses and their promoters. *Biomics*. 2012. V. 4. No.1. P. 1–19. (In Russian)
9. Kuluev B.R., Safiullina M.G., Knyazev A.V., Chemeris A.V. Effect of ectopic expression of *NtEXPA5* gene on cell size and growth of organs of transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2013. V. 44. P. 28–34. doi: 10.1134/S1062360413010049

10. Kuluev B. R., Safiullina M. G., Knyazev A. V., Chemeris A. V. Morphological analysis of transgenic tobacco plants expressing the *PnEXPA3* gene of black poplar (*Populus nigra*). *Russian Journal of Developmental Biology*. 2013a. V. 44. P. 129 – 134. DOI: 10.1134/S106236041303003X
11. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. Role of the expansin genes *NtEXPA1* and *NtEXPA4* in the regulation of cell extension during tobacco leaf growth. *Russian Journal of Genetics*. 2014. V. 50. P. 489–497. doi: 10.1134/S1022795414010074
12. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Postrigan B.N., Chemeris A.V. The creation of transgenic tobacco plants expressing fragments of the *ARGOS* and *NtEXPA4* genes in antisense orientation. *Russian Journal of Genetics*. 2014a. V. 50. P. 37–44. doi: 10.1134/S1022795414010074
13. Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A., Baymiev An.Kh., Chumakov M.I., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Plant hairy roots are important instrumentation for researchers and powerful phytochembiofactory for manufacturers. *Biomics*. 2015. V. 7. No.2. P. 70-120. (In Russian)
14. Kuluev B.R., Safiullina M.G. Regulation of cell expansion in plants. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2015. 135(2): 148–163.
15. 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. doi: 10.1016/j.jplph.2016.09.001
16. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Chemeris A.V. The role of expansin genes *PnEXPA3* and *PnEXPA3* in the regulation of leaf growth in poplar. *Russian Journal of Genetics*. 2017. V. 53. P. 651–660. doi: 10.1134/S1022795417060084
17. Kuluev B.R., Kruglova N.N., Zaripova A.A., Farhutdinov R.G. The Basics of Plant Biotechnology: A Training Manual. Ufa. BSU. 2017a. 244 p. (In Russian)
18. 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. No. 2. P. 211–221. doi: 10.1134/S1021443718020036
19. 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. V. 31. P. 393–397. doi: 10.1007/s10059-011-0046-2
20. Mikhaylova E.V., Kuluev B.R., Yasybaeva G.R., Chemeris A.V. Creation of *Withania somnifera* hairy root cultures and estimation of their growth parameters on solid and liquid medium. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2017. V. 13. N.2. P. 40–45. (In Russian)
21. Musin Kh.G., Yakupova A.B., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. Growth characteristics of tobacco and *Withania somnifera* hairy root cultures in different volume of flasks and nutrient media. *Yu.A. Ovchinnikov Bulletin of Biotechnology and Physical and Chemical Biology*. 2017. V. 13. N. 2. P. 46–50. (In Russian)
22. Sabirzhanova I.B., Sabirzhanov B.E., Chemeris A.V., Veselov D.S., Kudoyarova G.R. Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005. V. 43. P. 419–422. 10.1016/j.plaphy.2005.01.021
23. Serbinov I.L. Bacterial cancer of fruit trees, berry bushes and other garden and agricultural plants // *Plodovodstvo*. 1912. No. 9. P. 787-795. (In Russian)
24. Wise R.R., Naylor A.W. Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiology*. 1987. 83(2). P. 278-282.
25. Wu Y., Cosgrove D.J. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*. 2000. V. 51. P. 1543–1553.
26. 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. 8. e100792. doi: 10.1371/journal.pone.0100792
27. 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. 313–323. doi: 10.1007/s00709-010-0172-2