



**КАЛЛУСОГЕНЕЗ У РАСТЕНИЙ ТАБАКА *NICOTIANA TABACUM* L.
СОРТОВ ВИРДЖИНИЯ 202 И ЮБИЛЕЙНЫЙ НОВЫЙ 142**

*Хакимова Л.Р.^{1,2}, Вершинина З.Р.^{1,3}

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября 71, лит. 1Е.

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Россия, 450000, Уфа, ул. Ленина, 3.

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет», кафедра «Школа молекулярных технологий», Россия, 450064, Уфа, ул. Космонавтов, 1.

*E-mail: lili-nigmatullina@bk.ru

Резюме

Nicotiana tabacum L. – растение семейства Пасленовые, являющееся промышленным культурным видом, которое потенциально может быть использовано в качестве биофабрик для производства лекарств, вакцин или ценных мелких метаболитов, кроме того, растения табака имеют уникальную способность к быстрому и эффективному каллусогенезу. Благодаря этому, возможно его использование в качестве модельной системы клеток растений. Рассмотрены два сорта курительного табака Вирджиния 202 и Юбилейный новый 142, у которых была исследована эффективность каллусогенеза при стандартных условиях на среде с добавлением 1 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурина) и 0,1 мг/л НУК (нафтилукусная кислота) с помощью регенерации через стадию каллусов. В результате, сорт Вирджиния 202 показал высокий потенциал каллусообразования, кроме того, хорошо адаптировался в лабораторных условиях после роста *in vitro* и давал зрелые семена. Это дает возможность расширить спектр используемых сортов с высокой эффективностью каллусообразования для исследований моделей с внесенными генетическими изменениями.

Ключевые слова: каллусогенез, *Nicotiana tabacum* L., 6-БАП, НУК, *in vitro*, Вирджиния 202, Юбилейный новый 142.

Цитирование: Хакимова Л.Р., Вершинина З.Р. Каллусогенез у растений табака *Nicotiana tabacum* L. сортов Вирджиния 202 и Юбилейный новый 142 // *Biomics*. 2023. Т.15(3). С. 151-158. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-15

© Авторы

**CALLUS FORMATION IN TOBACCO PLANTS *NICOTIANA TABACUM* L.
VARIETIES VIRGINIA 202 AND JUBILEE NEW 142**

*Khakimova L.R.^{1,2}, Vershinina Z.R.^{1,3}

¹Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, 450054, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, lit. 1E

²Bashkir State Medical University (BSMU), 450008, Russia, Ufa, Lenina st. 3

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ufa State Petroleum Technological University" (USPTU), Department of molecular technologies, Russia, 450064, Ufa, Kosmonavtov st. 1

Resume

Nicotiana tabacum L. is a plant of the Solanaceae family, which is an industrial cultivated species that can be used as biofactories for the production of drugs, vaccines or valuable small metabolites; tobacco plants also have a unique ability for rapid and efficient callusogenesis. Because of this, it can be used as a model plant cell system. Two varieties of smoking tobacco Virginia 202 and Yubileiny new 142 were considered, in which the efficiency of callusogenesis was studied under standard conditions on a medium with the addition of 1 mg/l 6-BAP (6-benzylaminopurine) and 0.1 mg/l NAA (naphthylacetic acid) with using regeneration through the callus stage. As a result, the variety Virginia 202 showed a high potential for callus formation, in addition, it adapted well in laboratory conditions after growth *in vitro* and produced mature seeds. This makes it possible to expand the range of varieties used with high callus formation efficiency for studying models with introduced genetic changes.

Keywords: callus formation, *Nicotiana tabacum* L., 6-BAP, NUC, *in vitro*, Virginia 202, Jubilee new 142.

Citation: Khakimova L.R., Vershinina Z.R. Callus formation in tobacco plants *Nicotiana tabacum* L. varieties Virginia 202 and Jubilee new 142. *Biomics*. 2023. T.15(3). С. 151-158. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-15 (In Russian)

© The Authors

Введение

Табак (*Nicotiana tabacum* L.) — одна из основных технических культур, широко выращиваемая во многих странах, относится к семейству Паслёновые (*Solanaceae* Juss.). Все виды табака распространены главным образом в тропиках Америки, где они встречаются в диком состоянии. В культуре распространены два вида: табак настоящий (*Nicotiana tabacum* L.) и табак махорка (*N. rustica* L.). *N. tabacum* описывается как однолетнее травянистое растение высотой 1–2 м, несущее на прямостоячем стебле от 10 до 20 крупных, широкоовальных или яйцевидных листьев. Всё растение покрыто клейкими выделениями железистых волосков. Растения табака возделываются из-за листьев, содержащих алкалоид никотин (1–4%), углеводы (2–20%), белок (1–13%), органические кислоты (5–17%), смолы (4–12%), эфирные масла (0,1–1,7%). Аромат табака зависит от эфирных масел. Кроме того, в листьях имеется целый ряд других веществ, некоторые из них канцерогенны [Демьянова и др. (Dem'yanova et al.), 2007]. Многие дикие виды растений табака обладают рядом ценных свойств: иммунитетом к болезням и вредителям, холодостойкостью, высокой продуктивностью, приятным ароматом и другими положительными качествами, благодаря чему их используют в селекционной работе. Главным образом культуру табака выращивают для получения урожая листьев — они имеют основную хозяйственную значимость как материал для изготовления курительных изделий [Sun et al., 2020].

Одним из важных свойств растений является способность к регенерации *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных растений. Это свойство тотипотентности позволяет получать генно-

модифицированные растения через культуру тканей. Растения табака имеют уникальную способность к быстрому и эффективному каллусообразованию. Благодаря этому *N. tabacum* возможно трансформировать плазмидами с целевыми генами и получать взрослые растения, которые не только несут внесённые гены, но также могут передавать их будущим поколениям [Щелкунов (Shchelkunov), 2004]. Одной из целей генной инженерии является получение растений с ценными признаками для сельскохозяйственного производства.

За последние десятилетия появилось немало публикаций, где первоначальное изучение изменений биохимических и физиологических параметров после генно-инженерных манипуляций в растениях рассматриваются именно на растениях табака, то есть *N. tabacum* выступает как модельная система. Имеется много работ по изучению сверхэкспрессии генов, ассоциированных с адаптацией растений к абиотическим стрессам, которые могут повышать устойчивость к ним экономически важных сельскохозяйственных культур [Agarwal et al., 2010; Широких и др. (Shirokikh et al.), 2020]. Например, были получены растения табака сорта Самсун с геном холиноксидазы (*codA*), отвечающим за синтез глицинбетаина — осмолита, способствующего стабилизации клеток при абиотических стрессах [Широких и др. (Shirokikh et al.), 2020]. Отобраны линии табака сорта Wisconsin, несущие два гена ацил-липидных десатураз цианобактерий, экспрессия которых в растениях позволяет изменить состав жирных кислот мембран и повысить их холодоустойчивость [Герасименко и др. (Gerasimenko et al.), 2010].

Методом агробактериальной трансформации получены растения табака сорта Самсун с геном

антимикробного пептида бомбинина (*bom*). Экспрессия данного гена в трансгенных растениях показана по ингибированию роста фитопатогенных бактерий *Erwinia carotovora* экстрактами трансформированных растений [Захарченко и др. (Zakharchenko et al.), 2013]. Также описана работа, где получены трансгенные растения табака того же сорта со встроенным геном антимикробного пептида цекропина P1 (CP1). Уровень синтеза цекропина P1 в различных линиях составлял 0.02–0.2% от общего растворимого белка листьев растений. Трансгенные растения проявляли по сравнению с контрольными растениями повышенную устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам и к окислительному стрессу [Захарченко и др. (Zakharchenko et al.), 2005; 2015].

Трансформация растений табака генами *Mn-SOD* и *Fe-SOD* арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) приводила к активации антиоксидантной системы в клеточных компартаментах, что увеличивало не только активность СОД за счет ее дополнительного количества, но и увеличивалась активность компонентов защитной системы, участвующих в детоксикации пероксида водорода [Савина и др. (Savina et al.), 2015]. Кроме того, *N. tabacum* L. используют и в детоксикации окружающей среды. Например, чтобы изучить возможность повышения способности растений к детоксикации взрывчатого 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ), который является наиболее широко используемым военным взрывчатым веществом (токсичен для биологических систем и не распадается в окружающей среде), были созданы трансгенные растения табака NC89, конститутивно экспрессирующие ген нитроредуктазы *nsfI* из *Enterobacter cloacae*. Трансгенные линии растений при добавлении ТНТ оказались способны удалять его из среды [Sun et al., 2012].

Большое количество экспериментов проведено на *N. tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1. В работах были получены трансгенные растения с использованием генов транскрипционных факторов AINTEGUMENTA: *PnANTL1* и *PnANTL2* тополя черного [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2012; 2013a], *BnaX.ANT.b* рапса [Кулуев et al., 2016], *NtANTL* табака [Кулуев et al., 2015]; белков с OSR-доменом: *ARGOS* и *ARGOS-LIKE A. thaliana* [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2014], *PnARGOS-LIKE* тополя черного [Кулуев et al., 2016]; экспансинов *NtEXPA1*, *NtEXPA4* и *NtEXPA5* табака [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2014], *AtEXPA10 A. thaliana* [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2012], *PnEXPA1* и *PnEXPA3* тополя черного [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2012; Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2013b]; ксиллоглюканэндотрансгликозилаз *NtEXGT* табака (AB017025.1), *PnXTH1* тополя черного (XM_002304589), *tXET-B2* томата (X82684.1); глутатионсинтазы *BnGSH* рапса (NC_027758);

глутатион-S-трансферазы *AtGSTI A. thaliana* (Y11727.1). Данные целевые гены были клонированы в бинарные вектора семейства pCambia, под контролем конститутивных промоторов 35S или промотора вируса мозаики георгина [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2016].

Таким образом, целью данной работы являлась проверка новых сортов растений табака на способность к каллусообразованию для расширения спектра используемых сортов для исследований *in vitro*.

Материалы и методы

Исследуемые сорта растений табака.

Объектами в данной работе выступали курительные табаки сортов Вирджиния 202 и Юбилейный новый 142. Вирджиния 202 описывается как один из самых распространенных сортов табака, предназначенный для курения любым способом, с низким содержанием смол и приятным сладковатым вкусом. Вегетационный период 115-130 дней. Растение крупное, высотой 180-200 см, с прямым стеблем, крупными светло-зелеными листьями и розоватыми воронковидными цветками. Сорт Юбилейный новый 142 считается стандартом качества и с ним сравнивают все вновь выведенные разновидности табака. Положение листьев на стеблях торчащее, 25-27 штук, высота растения – 180-200 см.

Изначально растения табака исследуемых сортов были выращены в лабораторных условиях в 350 мл готового грунта TerraVita (ООО «Норд Палп», Россия).

Стерилизация листьев растений.

В исследовании по индукции каллусообразования использовали листья табака здорового двухмесячного растения, росшего в стандартных условиях полива, температуры и освещения (5 кЛк, 16/8 часов, день/ночь). Стерилизацию проводили следующим образом: листья табака промывали стерильной дистиллированной водой, затем добавляли 70%-ный этанол, чтобы полностью покрывал образцы. Аккуратно перемешивали в течение 15 секунд, после чего сливали спирт и в сосуд наливали 10% раствор хлорного отбеливателя «Белизна» (АО «Башкирская содовая компания», Россия) с добавлением 10 мкл твин-20. Следили, чтобы раствор также полностью покрывал кусочки листьев. Стерилизацию проводили в течение 10 минут при осторожном периодическом перемешивании и покачивании. Затем сливали стерилизующий раствор и промывали кусочки листьев 5 раз стерильной дистиллированной водой. Далее переносили листья в стерильные чашки Петри, обрезали побелевшие края и скальпелем нарезали на отдельные экспланты размером приблизительно 1 x 1 см без крупных жилок. Готовые экспланты

переносили на среду МС нижней стороной листа вверх. Далее инкубировали экспланты при постоянной температуре 25°C.

Способность к каллусообразованию проверяли на стандартной среде для регенерации табака – MS [Murashige, Skoog, 1962], содержащая 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК) [Horsch et al., 1984; Герасименко и др. (Gerasimenko et al.), 2010].

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с использованием пакета

Microsoft Office Excel 2010, доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.

Результаты и обсуждение

Первые видимые изменения на растительных эксплантах начали появляться через неделю культивирования (рисунок 1А), еще через неделю образовывался видимый каллус на краях растений (рисунок 1Б). Еще через 10 дней были видимые маленькие побеги полноценных растений табака (рисунок 1В и 1Г).

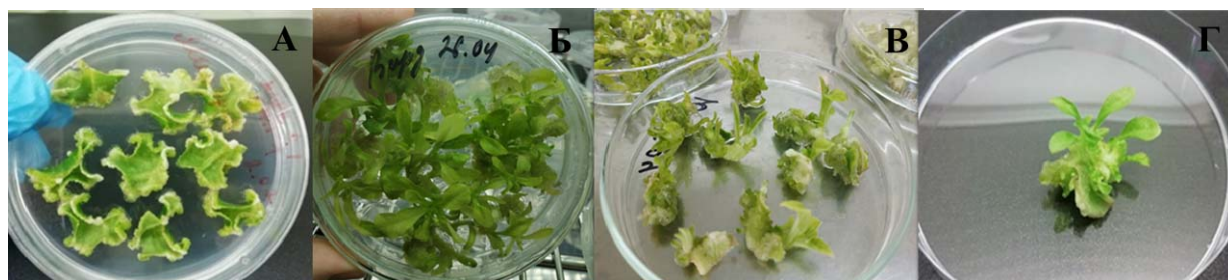


Рисунок 1. Образование морфогенного каллуса с микрорастениями через 4 недели культивирования *in vitro*
Figure 1. Formation of morphogenic callus with microplants after 4 weeks of cultivation *in vitro*

Далее микрорастения были отделены от основного каллуса и рассажены в высокие стерильные стаканы фирмы Magenta для увеличения морфологических размеров растений. На этапе получения полноценных маленьких растений концентрация 6-БАП в среде была уменьшена на 25%

для более активного образования корней (рисунок 2). Далее сформированные растения переносили сначала в стерильную почву в закрытом сосуде для предохранения от пересыхания, а через неделю культивировали в открытом стакане.

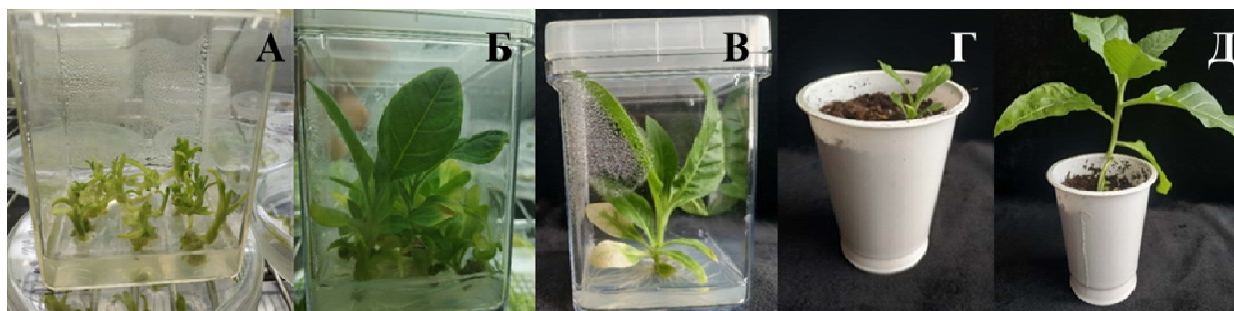


Рисунок 2. Образование корней *in vitro* у 7-8 недельных растений и адаптация растений в лабораторных условиях: А – микрорастения сразу после пересадки; Б – 2 недели роста растений в высоких стерильных стаканах; В – отсаженные растения с образовавшимися корнями; Г – адаптация растений к лабораторным условиям; Д – две недели роста адаптированного растения.

Figure 2. *In vitro* root formation in 7-8 week old plants and plant adaptation in laboratory conditions: А – microplants immediately after transplantation; В – two weeks of plant growth in tall sterile glasses; С – transplanted plants with formed roots; D – adaptation of plants to laboratory conditions; E – two weeks of growth of an adapted plant.

Одним из наиболее информативных показателей эффективности каллусогенеза является получение правильных морфогенных побегов и прироста каллусной массы у эксплантов [Гвасалия и др. (Gvasaliya et al.), 2020].

Через 4 недели культивирования рассчитывали сколько побегов образовалось на каждом экспланте и была вычислена эффективность каллусообразования (таблица 1).

Таблица 1

Количество полученных растений табака / Table 1 – Number of tobacco plants obtained

| Сорт variety | количество эксплантов number of explants | количество каллуса amount of callus | количество побегов через 4 недели number of shoots in 4 weeks | количество адаптированных растений <i>in vitro</i> number of plants adapted <i>in vitro</i> |
|---|---|---|--|---|
| Юбилейный новый 142 Jubilee new 142 | 40 | 75 | 86 | 52 |
| Вирджиния 202 Virginia 202 | 40 | 86 | 95 | 75 |

Количество побегов было рассчитано через 4 недели, так как известно, что каллусы способны регенерировать новые побеги еще долгое время при благоприятных условиях культивирования. В результате оба сорта показали эффективный каллусогенез, экспланты активно образовывали каллусы при стандартных условиях культивирования. От обоих сортов было получено достаточное количество побегов. Наибольшее количество каллусов было получено у растений табака сорта Вирджиния 202.

Было замечено, что сорт Юбилейный новый 142 имел очень долгий период роста, на листьях проявлялся хлороз и практически не цвел при комнатных условиях и соответственно не давал зрелые семена. В виду этого данный сорт не подходит для использования его как модельной системы для экспериментов *in vitro*. Наиболее подходящим оказался табак сорта Вирджиния 202, который отлично рос при комнатных условиях, имел достаточный период роста и давал зрелый урожай семян (рисунок 3).



Рисунок 3. Взрослые 2-х месячные растения: А – Вирджиния 202; Б – Новый Юбилейный 142;
В и Г – образование семенных коробочек и созревшие семена растений
Figure 3. Adult 2-month-old plants: A – Virginia 202; B – New Jubilee 142;
C and D – the formation of seed pods and ripe plant seeds

Таким образом, из исследуемых сортов растений табака выбран сорт Вирджиния 202, который подходит для исследований *in vitro* в качестве модельной системы в создании трансгенных растений с целевыми генами. Это дает возможность расширить спектр используемых сортов, которые хорошо

адаптируются к росту *in vitro* и в лабораторных условиях.

Литература

1. Гвасалия М.В., Маляровская В.И., Рахмангулов Р.С. Влияние регуляторов роста на индукцию каллусогенеза *in vitro* растений чая

- (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. 2020. № 2 (61). С. 51.
2. Герасименко И.М., Сахно Л.А., Головач И.С., Кищенко Е.М., Синдаровская Я.Р., Шимшилашвили Х.Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Информационный вестник ВОГиС. 2010. Т. 14(1). С. 127-133.
 3. Демьянова Е.И. Ботаническое ресурсоведение: учеб. пособие по спецкурсу // Перм. гос. ун-т. Пермь, 2007. 172 с.
 4. Захарченко Н.С., Локтюшов Е.В., Рукавцова Е.Б. и др. Получение трансгенных растений, экспрессирующих ген антимикробного пептида бомбинина // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2013. № 3. С. 287-296.
 5. Захарченко Н. С., Стрижов Н. И., Школьная Л. А. и др. Новая экспрессионная система для повышенного синтеза антимикробного пептида цекропина P1 в растениях // Физиология растений. 2015. Т. 62(4). С. 571. DOI: 10.7868/S001533031504020X
 6. Захарченко Н.С., Рукавцова Е.Б., Гудков А.Т., Бурьянов Я.И. Повышенная устойчивость к фитопатогенным бактериям у трансгенных растений табака с синтетическим геном антимикробного пептида цекропина P1 // Генетика. 2005. Т. 41. С. 1445–1452. DOI: 10.1007/s11177-005-0218-2
 7. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Бережнева З.А. и др. Трансгенные растения табака как модельный объект при исследовании продуктивности и стрессоустойчивости // Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность: Сборник статей по материалам VI Всероссийского симпозиума, Москва, 16–21 ноября 2016 года. Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 2016. С. 105-108.
 8. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Ильясова А.А., Чемерис А.В. Эктопическая экспрессия генов *PnANTL1* и *PnANTL2* тополя черного в трансгенных растениях табака // Генетика. 2012. Т. 48(10). С. 1162–1170.
 9. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Лебедев Я.П., Чемерис А.В. Морфофизиологическая характеристика трансгенных растений табака, экспрессирующих гены экспансинов *AtEXPA10* арабидопсиса и *PnEXPA1* тополя // Физиология растений. 2012. Т. 59(1). С. 108–117.
 10. 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.
 11. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Эстрадиолиндуцибельная и цветкоспецифичная экспрессия генов *ARGOS* и *ARGOS-LIKE* в трансгенных растениях табака // Генетика. 2014. Т. 50(8). С. 918–929.
 12. Кулуев Б.Р., Князев А.В., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Морфологические особенности трансгенных растений табака, экспрессирующих ген *AINTEGUMENTA* рапса под контролем промотора вируса мозаики георгина // Онтогенез. 2013. Т. 44(2). С. 110–114.
 13. 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.
 14. Кулуев Б.Р., Сафиуллина М.Г., Князев А.В., Чемерис А.В. Морфологический анализ трансгенных растений табака экспрессирующих ген *PnEXPA3* тополя черного // Онтогенез. 2013. Т. 44(3). С. 166–173.
 15. Савина С.М., Шалыго Н.В. Потенцирование антиоксидантной системы в трансгенных растениях табака с повышенной экспрессией супероксиддисмутазы // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2015. Т. 59(5). С. 62-67.
 16. Широких И.Г., Назарова Я.И., Огородникова С.Ю., Шуплецова О.Н., Блинова А.Л., Ралдугина Г.Н., Евсюков С.В., Баранова Е.Н. Трансформация табака по гену синтеза глицинбетаина не ослабила чувствительность растений к токсичности алюминия в кислой почве // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 2. С. 103-110. – DOI 10.25750/1995-4301-2020-2-103-110
 17. Широких И.Г., Огородникова С.Ю., Назарова Я.И., Шуплецова О.Н. Влияние солевого стресса на растения *Nicotiana tabacum* L. дикого типа и трансформированных геном холиноксидазы (*codA*) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2022. Т. 183. № 1. С. 86-94. DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-86-94
 18. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. Новосибирск: Сибир. Универс., 2004. 496 с.
 19. Agarwal P.K., Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling // *Biologia Plantarum*. 2010. V.54. P. 201–212.
 20. Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G. et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // *Science*. 1984. V. 223. P. 496–498.
 21. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Nurgaleeva E.Z., Knyazev A.V., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. Role of *AINTEGUMENTA-like* gene *NtANTL* in the regulation of

- tobacco organ growth // *Journal of Plant Physiology*. 2015. V. 189. P. 11–23.
22. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size // *Biologia Plantarum*. 2016. V. 60. P. 513–522.
23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. V. 15. P. 473–497.
24. Sun H., Lang Z., Zhu L., Huang D. Acquiring transgenic tobacco plants with insect resistance and glyphosate tolerance by fusion gene transformation // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31(10). P.1877-87. doi: 10.1007/s00299-012-1301-5
25. Sun H., Sun X., Wang H., Ma X. Advances in salt tolerance molecular mechanism in tobacco plants // *Hereditas*. 2020. V. 157(1). P.5. doi:10.1186/s41065-020-00118-0
- References**
1. Agarwal P.K., Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum*. 2010. V. 54. P. 201–212.
2. Demyanova E.I. Botanicheskoye resursovedeniye: ucheb. Posobiye po spetskursu. Perm. state un-t. Perm, 2007. 172 p. [Botanical resource science: textbook. allowance for a special course] (In Russian).
3. Gerasimenko I.M., Sakhno L.O., Golovach I.S., Kishchenko O.M., Sindarovska Y.R., Shimshilashvili C.R., Sheludko Y.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Raise of plants possessing genes for acyl-lipid desaturases from the cyanobacteria. *VOGIS Herald*. 2010. V. 14(1). P. 127–133. (In Russian)
4. Gvasaliya M., Malyarovskaya V., Rakhmangulov R. Growth regulators influence on the induction of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) callus genesis *in vitro*. *Vestnik Michurinskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2020. №. 2 (61). P. 51. (In Russian)
5. Horsch R.B., Fraley R.T., Rogers S.G. et al. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*. 1984. V. 223. P. 496–498.
6. 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(5). P. 489–497. DOI: 10.1134/S1022795414040061
7. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Nurgaleeva E.Z., Knyazev A.V., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. Role of *AINTEGUMENTA-like* gene *NtANTL* in the regulation of tobacco organ growth. *Journal of Plant Physiology*. 2015. V. 189. P. 11–23.
8. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. The poplar *ARGOS-LIKE* gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size. *Biologia Plantarum*. 2016. V. 60. P. 513–522.
9. Kuluev B. R., Knyazev A. V., Berezhneva Z. A. et al. Transgenic tobacco plants as a model object in the study of productivity and stress tolerance. *Transgennyye rasteniya: tekhnologii sozdaniya, biologicheskiye svoystva, primeneniye, biobezopasnost'*: Sbornik statey po materialam VI Vserossiyskogo simpoziuma, Moskva, 16–21 noyabrya 2016. Moskva: Federal'noye gosudarstvennoye byudzhethnoye uchrezhdeniye nauki Institut fiziologii rasteniyim. K.A.Timiryazeva Rossiyskoy akademii nauk, 2016. P. 105-108. [Transgennyye rasteniya tabaka kak model'nyy ob"yekt pri issledovanii produktivnosti i stressoustoychivosti] (In Russian).
10. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Il'yasova A.A., Chemeris A.V. Ectopic expression of the *PnANTL1* and *PnANTL2* black poplar genes in transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Genetics*. 2012. V. 48(10). P. 1162–1170. DOI: 10.1134/S1022795412100031
11. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Lebedev YA.P., Chemeris A.V. Morphological and physiological characteristics of transgenic tobacco plants expressing expansin genes: *AtEXP10* from arabidopsis and *PnEXPA1* from poplar. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012. V. 59(1). P. 108–117. DOI: 10.1134/S1021443712010128
12. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris A.V. Estradiol inducible and flower-specific expression of *ARGOS* and *ARGOS-LIKE* genes in transgenic tobacco plants. *Russian Journal of Genetics*. 2014. V. 50. №8. P. 918–929. DOI: 10.1134/S1022795414070102
13. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Morphological features of transgenic tobacco plants expressing the aintegumenta gene of rape under control of the dahlia mosaic virus promoter. *Russian Journal of Developmental Biology*. 2013. V. 44(2). P. 110–114. DOI: 10.1134/S1062360413020070
14. 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(1). P. 34–41. DOI: 10.1134/S1062360413010049
15. 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*. 2013. V. 44(3). P. 166–173. DOI: 10.1134/S106236041303003X
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962. V. 15. P. 473–497.

17. Savina S. M., Shalygo N. V. Potentiation of the antioxidant system in transgenic tobacco plants with increased expression of superoxide dismutase. *Doklady Natsional'noy akademii nauk Belarusi*. 2015. V. 59(5). P. 62-67. [Potentsirovaniye antioksidantnoy sistemy v transgennykh rasteniyakh tabaka s povyshennoy ekspressiyey superoksiddismutazy] (In Russian).
18. Shchelkunov S.N. Genetic engineering. Novosibirsk: Sibir. Univers. 2004. 496 p. [Geneticheskaya inzheneriya] (In Russian).
19. Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I., Ogorodnikova S.Yu., Shupletsova O.N., Blinova A.L., Raldugina G.N., Yevsyukov S.V., Baranova Ye.N. Transformation with a bacterial gene for choline oxidase doesn't lower tobacco sensitivity to aluminum in acidic soil. *Theoretical and Applied Ecology*. 2020. № 2. P. 103-110. DOI 10.25750/1995-4301-2020-2-103-110. [Transformatsiya tabaka po genu sinteza glitsinbetainane oslabila chuvstvitel'nost' rasteniy k toksichnosti alyuminiya v kisloy pochve] (In Russian).
20. Shirokikh I.G., Ogorodnikova S.Yu., Nazarova Ya.I., Shupletsova O.N. Vliyaniye solevogo stressa na rasteniya *Nicotiana tabacum* L. dikogo tipa I transformirovannykh genom kholinoksidazy (codA). *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii*. 2022. V. 183(1). P. 86-94. DOI 10.30901/2227-8834-2022-1-86-94 [Effect of salt stress on plants of wild-type *Nicotiana tabacum* L. and transformants with a choline oxidase (codA) gene] (In Russian).
21. Sun H., Lang Z., Zhu L., Huang D. Acquiring transgenic tobacco plants with insect resistance and glyphosate tolerance by fusion gene transformation. *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31(10). P.1877-87. doi: 10.1007/s00299-012-1301-5
22. Sun H., Sun X., Wang H., Ma X. Advances in salt tolerance molecular mechanism in tobacco plants. *Hereditas*. 2020. V. 157(1). P.5. doi:10.1186/s41065-020-00118-0
23. Zakharchenko N.S., Loktyushov Ye.V., Rukavtsova Ye.B. et al. Obtaining transgenic plants expressing the gene for the antimicrobial bombinin peptide. *Izvestiya Tul'skogo gosudarstvennogo universiteta. Yestestvennyye nauki*. 2013. № 3. P. 287-296. [Polucheniye transgennykh rasteniy, ekspressiruyushchikh gen antimikrobnogo peptide bombinina] (In Russian).
24. Zakharchenko N.S., Rukavtsova Ye.B., Gudkov A.T., Buryanov Ya.I. Enhanced resistance to phytopathogenic bacteria in transgenic tobacco plants with synthetic gene of antimicrobial peptide cecropin P1. *Russian Journal of Genetics*. 2005. V. 41. P. 1445–1452. DOI: 10.1007/s11177-005-0218-2
25. Zakharchenko N.S., Strizhov N.I., Shkolnaya L.A. et al. Novel expression system for enhanced synthesis of antimicrobial peptide cecropin P1 in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2015. V. 62(4). P. 571. DOI 10.7868/S001533031504020X