

Трансформация табака по гену синтеза глицинбетаина не ослабила чувствительность растений к токсичности алюминия в кислой почве

© 2020. И. Г. Широких^{1,2}, д. б. н., зав. лабораторией, в. н. с.,

Я. И. Назарова¹, к. б. н., н. с.,

С. Ю. Огородникова², к. б. н., с. н. с., О. Н. Шуплецова¹, д. б. н., с. н. с.,

А. Л. Блинова¹, м. н. с., Г. Н. Ралдугина³, к. б. н., с. н. с.,

С. В. Евсюков³, аспирант, Е. Н. Баранова⁴, к. б. н., в. н. с.,

¹Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого,

610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а,

²Институт биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,

167892, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

³Институт физиологии растений РАН имени К. А. Тимирязева,

127276, Россия, г. Москва, ул. Россия, ул. Ботаническая, д. 35,

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,

127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42,

e-mail: irgenal@mail.ru

В работе использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) с геном холиноксидазы (*codA*), отвечающим за синтез глицинбетаина – осмолита, способствующего стабилизации клеток при абиотических стрессах. Растения исходного сорта Самсун и независимых трансгенных линий CodA7 и CodA17, различающихся по экспрессии целевого гена, выращивали в горшечной культуре на торфяно-перегнойной почвенной смеси (контроль) и на естественной кислой дерново-подзолистой почве с алюминием (стресс). Сравнительная оценка реакции исходного сорта и трансгенных линий по морфометрическим показателям, характеристикам антиоксидантной защиты, содержанию фотосинтетических пигментов не выявила защитное действие гетерологичной вставки в отношении эдафического стресса, обусловленного повышенной кислотностью и токсичностью алюминия.

Ключевые слова: *codA*, растение-трансформант, глицинбетаин, кислотность, токсичность алюминия, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, пигменты.

Transformation with a bacterial gene for choline oxidase doesn't lower tobacco sensitivity to aluminum in acidic soil

© 2020. I. G. Shirokikh^{1,2}

ORCID: 0000-0002-3319-2729*

Ya. I. Nazarova¹

ORCID: 0000-0002-2945-5282*

S. Yu. Ogorodnikova²

ORCID: 0000-0001-8865-4743*

O. N. Shupletsova¹

ORCID: 0000-0003-4679-0717*

A. L. Blinova¹

ORCID: 0000-0002-8912-1081*

G. N. Raldugina³

ORCID: 0000-0002-3349-8461*

S. V. Evsukov³

ORCID: 0000-0003-0106-8317*

E. N. Baranova⁴

ORCID: 0000-0001-9832-3948*

¹Federal Scientific Agricultural Center of the North-East named N. V. Rudnitsky,

166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,

²Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS,

28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Republic of Komi, Russia, 167982,

³Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences named after K. A. Timiryazev,

35, Botanicheskaya St., Moscow, Russia, 127276,

⁴All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology,

42, Timiryazevskaya St., Moscow, Russia, 127550,

e-mail: irgenal@mail.ru

The resistance of economically important crops to abiotic environmental stresses can be increased by overexpression of genes associated with the adaptation of plants to adverse factors. Most adaptive reactions in plants are aimed at stabilizing and protecting cellular structures by synthesizing compounds with osmoprotective properties. Metabolic adaptation through the accumulation of compatible osmolytes is considered as one of the main strategies for the protection and survival of plants in extreme conditions. The purpose of the work is an experimental verification of the hypothesis of the ability of the bacterial *codA* cholineoxidase gene to weaken the sensitivity of plants to the toxic effect of aluminum in acidic soil. The object of the study is tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) with the *codA* gene responsible for the synthesis of glycine betaine, a compatible osmolyte that helps stabilize cells under abiotic stresses. Samsun tobacco and the independent transgenic lines CodA7 (*codA*⁻) and CodA17 (*codA*⁺) were grown in a pot culture on a peat-humus soil mixture (control) and on natural acidic sod-podzolic soil with aluminum (stress). A comparative assessment of the reaction of the initial variety and transgenic lines was carried out according to morphometric indicators, characteristics of antioxidant protection, and the content of photosynthetic pigments. There was no decrease in CodA17 sensitivity to increased soil acidity and aluminum toxicity. The lack of a protective effect of the introduced construct with the *codA* gene can be explained by the accumulation of glycine betaine in the leaves, while the oxidative stress caused by aluminum is associated mainly with the roots of the plant.

Keywords: *codA*, transforming plant, glycine betaine, acidity, aluminum toxicity, lipid peroxidation, superoxide dismutase, pigments.

Успехи современной молекулярной биологии позволяют не только исследовать физиологические и биохимические механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям окружающей среды, но и выявить, а затем и клонировать связанные с адаптацией гены для использования в генно-инженерных технологиях [1]. За счёт сверхэкспрессии генов, ассоциированных с адаптацией растений к абиотическим стрессам, может быть повышена устойчивость к ним экономически важных сельскохозяйственных культур, но первоначальное изучение биохимических и физиологических механизмов адаптации удобно проводить на модельных культурах, таких, как табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.).

Эффекты воздействия на растения различных абиотических стрессовых факторов имеют между собой много общего. Так, следствием многих из них является снижение в клетках содержания воды. Поэтому большинство адаптационных реакций у растений направлено на стабилизацию и защиту клеточных структур путём синтеза соединений с осмопротекторными свойствами [2]. Метаболическую адаптацию через накопление совместимых осмолитов, рассматривают сегодня в качестве одной из основных стратегий защиты и выживания растений в экстремальных условиях [1, 2]. Одним из эффективных осмолитов с протекторными свойствами является глицинбетаин (ГБ) (триметилглицин) – совместимый четвертичный амин, который при стрессе участвует в защите макрокомпонентов растительных клеток [3]. Некоторые растения накапливают значительные количества этого соединения в ответ на повышенное содержание солей, холод и засуху.

В генно-инженерных попытках превратить растения с дефицитом ГБ в его аккумуля-

торы ранее уже были использованы гены, связанные с различными путями биосинтеза ГБ [4]. Сверхэкспрессия гена, кодирующего бетаин-альдегиддегидрогеназу из *Prunella asiatica* Nokaï, привела к сверхнакоплению ГБ у пшеницы и ослаблению вредного действия солевого стресса [5]. Накопление ГБ в трансгенном *Arabidopsis thaliana* в результате экспрессии бактериального гена холиноксидазы (*codA*) повышало толерантность к воздействию соли, холода, жары и света высокой интенсивности [6, 7]. Трансгенные по гену *codA* растения риса (*Oryza sativa* L.) продемонстрировали повышенную устойчивость к подавлению фотосинтеза, вызываемому солью или холодом [8]. Растения *Brassica juncea* (L.) Czern с экспрессией гена *codA* превосходили по интенсивности роста растения исходного (дикого) типа в условиях солевого стресса [9]. Усиление транскрипции бактериального гена холиноксидазы А с помощью терминатора HSP повышало продукцию ГБ и устойчивость к засолению деревьев *Eucalyptus camaldulensis* [10]. Накопление ГБ в транспластомных растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), экспрессирующих холиноксидазу, обеспечивало растениям повышенную устойчивость к засухе [11].

Среди сообщений о том, что экспрессия гена холиноксидазы обеспечивает растениям-трансформантам повышение устойчивости к ряду неблагоприятных факторов окружающей среды, отсутствует информация о реакции трансформантов на токсичность алюминия в кислых почвах, вызывающая у растений окислительный стресс. При продолжительном воздействии ионной токсичности антиоксидантные системы растений перестают справляться с возрастающим уровнем активных форм кислорода (АФК), что приводит к серьёз-

ным нарушениям клеточного метаболизма: фотоокислению хлорофилла, перекисному окислению липидов (ПОЛ), деградации белков [12]. И хотя у растений описано несколько механизмов противодействия вызываемому ионами алюминия стрессу [13, 14], о действии ГБ в этих условиях, насколько нам известно, ранее не сообщалось.

Цель работы – экспериментальная проверка предположения о способности гетерологичной вставки *codA* ослаблять у табака чувствительность к токсическому действию алюминия в кислой почве.

Объекты и методы

В работе использовали табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун и полученные на его основе генетически модифицированные линии CodA7 и CodA17. В качестве целевого был использован ген *codA*, под контролем CaMV 35S промотора. В качестве маркерного использовали ген *NPTII* неомицин-фосфотрансферазы, дающий возможность отбирать трансгенные проростки на среде с канамицином (Кнм). Целевой ген *codA* был снабжён сигнальной последовательностью, которая обеспечивала доставку фермента холиноксидазы внутрь пластидного компартмента [15].

Для получения трансгенных растений применяли метод совместного культивирования эксплантов с агробактерией, находящейся на поверхности агаризованной среды [16]. После двух суток сокультивирования на среде для каллусогенеза (среда МС [17], 3% сахароза, 2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК), 4 мг/л кинетина, 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д)) экспланты переносили на среду для морфогенеза (среда МС, 3% сахарозы, 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,1 мг/л НУК, дополненную антибиотиками цефотаксимом (Цфс) (800 мг/л) и Км (100 мг/л) и помещали в световую камеру с фотопериодом 16 час (день / ночь) и температурой 20–22/17–19 °С (день/ночь).

Через 5–6 недель образовавшиеся зелёные побеги отделяли от эксплантов и помещали на среду для укоренения (половинные макросоли и микросоли МС, 1% сахароза). Концентрацию Цфс с каждым последующим субкультивированием постепенно снижали до 300–200 мг/л, концентрация Км оставалась постоянной.

Для молекулярного подтверждения трансгенной природы полученных транс-

формантов использовали полимеразную цепную реакцию с праймерами: codF 5'-CGCCAACTTCTTCCAGATCAA-3' – прямой праймер, и codR 5'-GGGTGTTTCATGTTCGAACG-3' – обратный праймер, подобренными к нуклеотидной последовательности гена *codA*. Величина продукта амплификации, ограниченного данными праймерами, имела длину 507 п.о. Для гена *NPTII* использовали следующие праймеры: F 5'-GTGGAGAAGGCTATTCCGGCTA-3' и R 5'-CCACCATGATATTCGGCAAG-3' («Евроген»). ДНК выделяли из растительной ткани с использованием набора реагентов «ДНК-Экстрен» производства фирмы «Синтол» (Россия) согласно методике производителя. Реакцию ПЦР с праймерами к *codA* проводили в следующих условиях: 94 °С – 5 мин, затем 35 циклов: 94 °С – 1 мин; 59 °С – 30 сек; 72 °С – 1 мин. После циклов: 72 °С – 5 мин.

Кроме того, чтобы исключить контаминацию агробактерией, все растения проверяли также реакцией ПЦР с праймерами к агробактериальному гену *VitE2 F-5'-CGAATACATTCTCGTGCGTCAAAC-3'* и R 5'-TTTCGAGTTCATGCATAATGCCTGAC-3'.

Экспрессию гена *codA* определяли с помощью обратной цепной реакции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли по стандартному методу с использованием набора «РНК-Экстрен» фирмы «Синтол» согласно методике производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически, кДНК получали по методике производителя («Синтол»).

Клональное микроразмножение пробирочных растений исходного сорта и линий CodA7 и CodA17 проводили на среде МС без гормонов и витаминов. Пробирочные растения после образования развитой корневой системы высаживали в вегетационные сосуды с почвой (2 растения на сосуд, 3 сосуда в каждом варианте). Для создания эдафического стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислых почвах, использовали природную дерново-подзолистую почву с $pH_{\text{сол.}}$ 3,6 ед. и содержанием подвижного алюминия 12,8 мг/100 г. Контролем служили растения, выращенные в сосудах, заполненных торфяно-перегнойной смесью с pH 6,0 ед. без алюминия. Растения выращивали при освещённости 4000 кЛк, фотопериоде 16 час, температуре 25/18 °С день/ночь. Морфометрические показатели измеряли спустя 10 недель со времени высадки растений в почву. Для определения биохимических показателей смешанные пробы листьев отбирали по вари-

антам три раза, начиная с седьмой недели выращивания растений. Временные промежутки между отбором проб составляли две недели.

Для тестирования у растений симптомов окислительного стресса определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) методом, основанном на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление п-нитротетразолиевого синего [18] и интенсивность ПОЛ по содержанию малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой [19].

Содержание фотосинтетических пигментов определяли на спектрофотометре «Spectol» (Германия) в ацетоновой вытяжке [20] при длинах волн 662, 644 (хлорофиллы) и 440,5 нм (каротиноиды).

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами с использованием пакета программ EXCEL.

Результаты и обсуждение

Среди растений табака, подвергнутых агробактериальной трансформации с использованием экспрессионного вектора pVICodA [15], трансгенные линии были отобраны на селективной среде с антибиотиком Кнм. Для последующей работы были отобраны две линии CodA17 и CodA7, для которых молекулярно-генетический анализ посредством ПЦР показал наличие интегрированного гена *codA*. Далее методом ОТ-ПЦР было получено подтверждение экспрессии интродуцированного гена *codA*

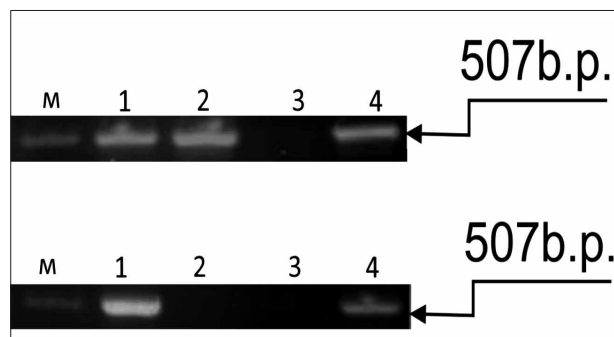


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов ПЦР (вверху) и ОТ-ПЦР (внизу). Дорожки слева направо: М – маркер молекулярных весов; 1 – трансгенная линия CodA17; 2 – трансгенная линия CodA7; 3 – контрольное нетрансформированное растение; 4 – плазмидная ДНК
Fig. 1. Electrophoregrams of PCR (above) and RT-PCR products (below). Lanes from left to right: M – molecular weight marker; 1 – transgenic line CodA17; 2 – transgenic line CodA7; 3 – control non-transformed plant; 4 – plasmid DNA

у линии CodA17, тогда как у линии CodA7 экспрессия целевого гена не наблюдалась (рис. 1).

Обусловленный токсичностью ионов водорода и алюминия стресс проявляется у растений, в первую очередь, угнетением линейного роста корневой системы [21]. Табак исходного сорта Самсун при выращивании на кислом фоне с алюминием характеризовался по сравнению с контролем достоверно более низкими показателями длины корня и, соответственно, более широким соотношением линейных размеров надземной и подземной части (h/l) (табл. 1).

Таблица 1/ Table 1

Морфометрические показатели растений табака исходного сорта и трансгенных линий в зависимости от почвенного фона / Morphometric indicators of tobacco plants of the initial variety and transgenic lines depending on the soil background

Фон почвы Soil background	Высота побега, см / shoot height (h), cm	Длина корня, см / root length (l), cm	Отношение/ ratio h/l
Контроль (нейтральный) Control (neutral)	23,0±3,0	17,1±2,6	1,3
Кислый с алюминием Sour with aluminum	20,8±0,8	11,5±1,3*	1,8
CodA7			
Контроль (нейтральный) Control (neutral)	24,9±0,9	16,2±1,9	1,5
Кислый с алюминием Sour with aluminum	19,3±1,4*	13,1±2,1	1,5
CodA17			
Контроль (нейтральный) Control (neutral)	18,1±4,1	15,3±1,8	1,2
Кислый с алюминием Sour with aluminum	17,0±3,0	8,0±2,0*	2,1

Примечание: * – различие с контролем достоверно при $p \leq 0,05$.
 Note: * – the difference with control is significant at $p \leq 0,05$.

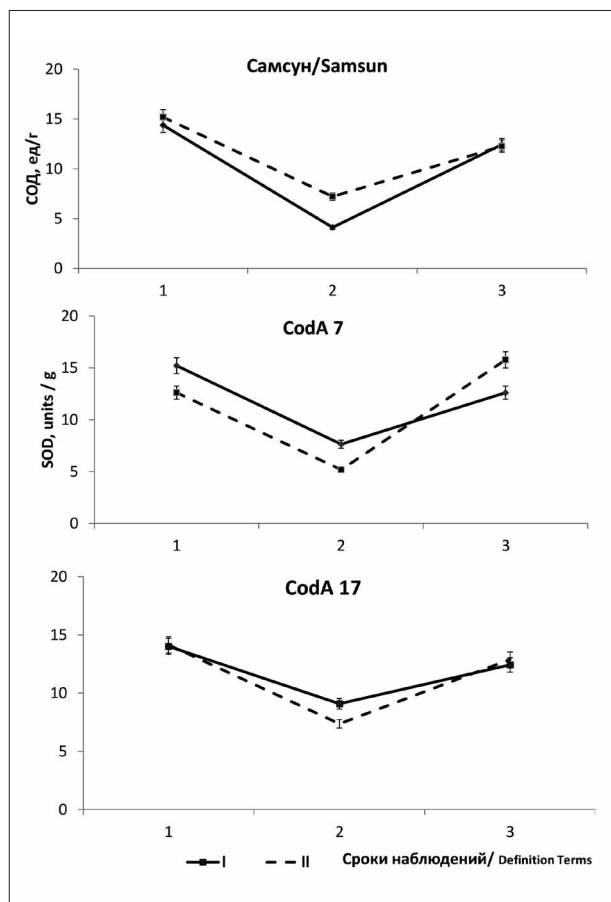


Рис. 2. Динамика активности СОД в листьях табака исходного сорта Самсун и трансгенных линий в зависимости от фона почвы: I – контроль (нейтральный), II – кислый с алюминием
Fig. 2. Dynamics of SOD activity in tobacco leaves of the original Samsun variety and transgenic lines depending on the soil background: I – control (neutral), II – acidic with aluminum

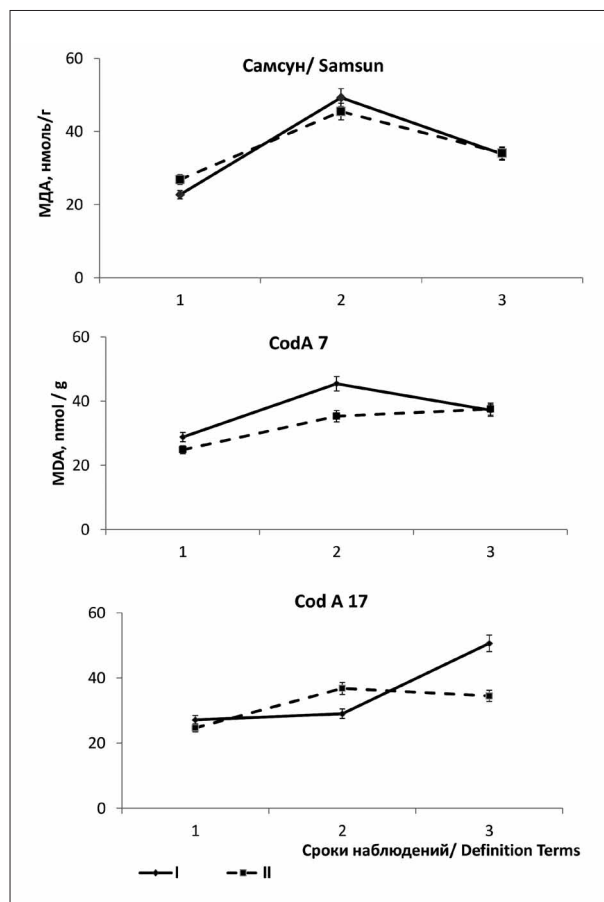


Рис. 3. Динамика ПОЛ в листьях табака исходного сорта Самсун и трансгенных линий в зависимости от фона почвы: I – контроль (нейтральный), II – кислый с алюминием
Fig. 3. Dynamics of lipid peroxidation in tobacco leaves of the original Samsun cultivar and transgenic lines depending on soil background: I – control (neutral), II – acidic with aluminum

Линии CodA7 и CodA17 в обычных условиях несущественно различались между собой по морфометрическим показателям и не уступали исходному сорту. На кислом фоне с алюминием линия CodA7 практически не демонстрировала угнетение роста корня, тогда как линия CodA17, напротив, характеризовалась меньшими размерами корневой системы, чем исходный сорт. В результате соотношение h/l у табака линии CodA17, экспрессирующей целевой ген холиноксидазы, расширилось с 1,2 в контроле до 2,1 при стрессе, тогда как у растений линии CodA7, не экспрессирующей целевой ген, осталось таким же, как при росте в обычных условиях – 1,5. Этот эффект можно объяснить действием ГБ, по-видимому, в больших количествах накапливающегося в клетках побега по сравнению с клетками корня при экспрессии интродуцированного гена *codA*.

При стрессе в растениях могут происходить разнонаправленные изменения активности СОД, однако её увеличение принято связывать с развитием окислительного стресса [22]. Активность СОД у табака исходного сорта Самсун при выращивании на кислом фоне существенно увеличилась по сравнению с обычными условиями (нейтральный фон) в первые два срока измерений (рис. 2). В растениях линии CodA7 при стрессе, напротив, активность СОД была ниже, чем в обычных условиях и увеличивалась лишь к третьему сроку измерения. Кроме того, в первые два срока измерений уровень накопления МДА в растениях линии CodA7, подвергнутой действию ионной токсичности, был существенно ниже, чем на нейтральном фоне (рис. 3), что можно объяснить наличием вставки гена *NPТII*, по-видимому, способствующему ингибированию синтеза этих ферментов. Ли-

ния CodA17, хотя и характеризовалась при стрессе сходной с линией CodA7 динамикой активности СОД (рис. 2), но в отличие от неё и исходного сорта, проявила иную картину динамики ПОЛ даже в обычных условиях (рис. 3), что можно объяснить накоплением ГБ в растениях этой линии, происходящей за счёт экспрессии трансгена *codA*. Это было показано ранее исследованиями других авторов, в которых накопление ГБ повышало или стабилизовало активность антиокислительных ферментов, что приводит к нейтрализации АФК и снижению окислительного повреждения биологических мембран [5].

О функциональном состоянии растений в условиях стресса, обусловленного токсичностью алюминия в кислой почве, судили по содержанию в листьях фотосинтетических пигментов. По сравнению с исходным сортом генетически модифицированные линии табака характеризовались значительными изменениями в суммарном содержании пластидных пигментов и в соотношении хлорофиллов *a*, *b* и ка-

ротиноидов даже в обычных условиях. Линия CodA7 отличалась от сорта Самсун существенно меньшим количеством в листьях хлорофилла *b* и каротиноидов, а линия CodA17, напротив, – существенным увеличением количества всех пластидных пигментов (табл. 2). Возможно, перестройки фотосинтетического аппарата у растений, подвергнутых генетической модификации, обусловлены функционированием сигнальной последовательности, которая была включена в состав генной конструкции для обеспечения доставки ГБ в пластиды.

На кислом фоне с алюминием в листьях табака исходного сорта наблюдали резкое сокращение количества пластидных пигментов в сравнении с растениями, выращенными в обычных условиях. Так, содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов в условиях ионной токсичности было ниже соответственно на 22, 26 и 45%, чем в контроле без алюминия. У линии CodA7, экспрессирующей только маркерный ген, на кислом фоне снизилось (на 37%) содержание хлорофилла *a*, тогда

Таблица 2/ Table 2

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях табака в зависимости от почвенного фона
The content of photosynthetic pigments in tobacco leaves depending on the soil background

Генотип Genotype	Фон почвы Soil background	Хлорофиллы, мг/г Chlorophyll, mg/g		Каротиноиды, мг/г Carotenoids, mg/g	Отношение Ratio <i>a/b</i>	Сумма (<i>a+b</i>), мг/г / total (<i>a+b</i>), mg/g	Соотношение хлорофиллы/ каротиноиды Ratio chlorophylls/ carotenoids
		<i>a</i>	<i>b</i>				
Самсун Samsun	Контроль (нейтральный) Control (neutral)	<u>2,20±0,11</u>	<u>0,53±0,02</u>	<u>1,17±0,10</u>	<u>4,17</u>	<u>2,73</u>	<u>2,33</u>
	Кислый с алюминием Sour with aluminum	1,71±0,0	0,39±0,03	0,64±0,01	4,41	2,10	3,25
CodA7	Контроль (нейтральный) Control (neutral)	<u>2,21±0,21</u>	<u>0,36±0,04</u>	<u>0,81±0,07</u>	<u>6,14</u>	<u>2,57</u>	<u>3,16</u>
	Кислый с алюминием Sour with aluminum	1,39±0,01	0,39±0,03	0,83±0,01	3,61	1,78	2,14
CodA17	Контроль (нейтральный) Control (neutral)	<u>2,64±0,02</u>	<u>0,97±0,06</u>	<u>1,37±0,00</u>	<u>2,73</u>	<u>3,61</u>	<u>2,63</u>
	Кислый с алюминием Sour with aluminum	1,34±0,11	0,39±0,05	0,78±0,04	3,51	1,73	2,21

как количество хлорофилла *b* и каротиноидов существенно не изменилось по сравнению с обычными условиями. Парадоксально, что в листьях линии CodA17, экспрессирующей целевой ген холиноксидазы, содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов при стрессе снизилось на 50, 60 и 43% соответственно. То есть окислительные повреждения фотосинтетического аппарата, обусловленные токсичностью ионов Al^{3+} у растений табака CodA7, содержащей, но не экспрессирующей ген холиноксидазы, были менее выраженными, чем у линии CodA17, экспрессирующей этот ген. Это говорит о том, что трансгенные растения, содержащие функционирующий ген холиноксидазы, не являлись устойчивыми к токсичности алюминия. Возможной тому причиной является то, что ГБ, накапливающийся в трансгенных растениях, защищает в основном клетки надземной части, способствуя сохранению воды, тогда как ионы алюминия вызывают в основном окислительный стресс, и, в первую очередь, в клетках корневой системы.

Заключение

Таким образом, в результате проведённого исследования установлено, что растения, трансформированные конструкцией, содержащей ген холиноксидазы *codA*, не снизили чувствительность к токсическому действию ионов алюминия. Вместе с тем, учитывая, что нами была исследована только одна линия трансгенных растений табака, содержащая и экспрессирующая гетерологичный ген *codA*, необходимы дальнейшие исследования с проверкой других линий таких же растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 19-016-00207 _а «Влияние изменённого окислительного и осмотического статуса клеток на морфологические особенности надземной и подземной части растений и на преобразование микробиоты, ассоциированной с корневой системой» и, частично, в рамках государственного задания № 0414-2018-0003 «Оценка и прогноз отсроченного техногенного воздействия на природные и трансформированные экосистемы подзоны южной тайги», а также государственного задания № 0574-2019-0002.

Литература

1. Agarwal P.K., Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling // *Biologia Plantarum*. 2010. No. 54. P. 201–212.

2. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.: Высшая школа, 2006. 742 с.
3. Дэвис Д., Джованелли Д., Рис Т. Биохимия растений. М.: Мир. 1966. 417 с.
4. Sakamoto A., Murata N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance // *Journal of Experimental Botany*. 2000. V. 51. No. 342. P. 81–88.
5. Лян К., Чжан С.Я., Ло И., Ван Г.П., Цзо Ц., Ван В. Сверхнакопление глицинбетаина у пшеницы ослабляет вредное действие солевого стресса // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. № 3. С. 410–417.
6. Hayashi H., Chen T.H.H., Murata N. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth // *Plant, Cell and Environment*. 1998. V. 21. No. 2. P. 232–239.
7. Hayashi H., Mustardy L., Deshnum P., Ida M., Murata N. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress // *The Plant Journal*. 1997. V. 12. No. 1. P. 133–142.
8. Sakamoto A., Murata A.N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold // *Plant Molecular Biology*. 1998. V. 38. P. 1011–1019.
9. Prasad K.V.S.K., Sharmila P., Kumar P.A., Saradhi P.P. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress // *Molecular Breeding*. 2000. V. 6. No. 5. P. 489–499.
10. Tran N.H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. Transcriptional enhancement of a bacterial choline oxidase A gene by an HSP terminator improves the glycine betaine production and salinity stress tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* trees // *Plant Biotechnology*. 2018. V. 35. No. 3. P. 215–224.
11. You L., Song Q., Wu Y., Li S., Jiang C., Chang L., Zhang J. Accumulation of glycine betaine in transplastomic potato plants expressing choline oxidase confers improved drought tolerance // *Planta*. 2019. V. 249. No. 6. P. 1963–1975.
12. Чжан Х., Ли Я.Х., Ху Л.Ю., Ван С.Х., Чжан Ф.К., Ху К.Д. Влияние обработки листьев пшеницы донором окиси азота на антиокислительный метаболизм при стрессе, вызванном алюминием // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 4. С. 523–528.
13. Kinraide T.B., Parker D.R., Zobel R.W. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer // *J. Exp Bot*. 2005. V. 56. P. 1853–1865.
14. Yang Z.M., Sivaguru M., Horts W.J., Matsumoto H. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*) // *Physiol Plant*. 2001. V. 110. P. 72–74.
15. Гулевич А.А., Куренина Л.В., Баранова Е.Н. Использование системы таргетинга ферментов Fe-зависимой супероксиддисмутазы и холиноксидазы в хлоропласт как стратегия эффективной защиты растений от абиотических стрессов // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2018. № 1. С. 7–12.

16. Данилова С.А., Кузнецов В.В., Долгих Ю.И. Новый эффективный метод генетической трансформации кукурузы с использованием агробактериального газона // Физиология растений. 2009. Т. 56. № 2. С. 285–290.

17. Murachige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue // Physiol. Plant. 1962. V. 15. No. 3. P. 473–497.

18. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. 1971. V. 44. No. 1. P. 276–287.

19. Лукаткин А.С. Холодовое повреждение теплолюбивых растений и окислительный стресс. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2002. 208 с.

20. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зелёных листьев // Биохимические методы в физиологии растений. 1971. Т. 19. № 1. С. 164–170.

21. Климашевский Э.Л. Генетический аспект минерального питания растений. М.: Агропромиздат, 1991. 415 с.

22. Сошинкова Т.Н., Радюкина Н.Л., Королькова Д.В., Носов А.В. Пролин и функционирование антиоксидантной системы растений и культивируемых клеток *Thellungiella salsuginea* при окислительном стрессе // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 1. С. 47–47.

References

1. Agarwal P.K., Jha B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling // Biologia Plantarum. 2010. No. 54. P. 201–212.

2. Kuznetsov V.V., Dmitrieva G.A. Plant physiology. Moskva: Vysshaya shkola, 2006. 742 p. (in Russian).

3. Davis D., Giovanelli D., Rice T. Plant biochemistry. Moskva: Mir, 1966. 417 p. (in Russian).

4. Sakamoto A., Murata N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance // Journal of Experimental Botany. 2000. V. 51. No. 342. P. 81–88. doi: 10.1093/jexbot/51.342.81

5. Liang K., Zhang S.Ya., Luo I., Wang G.P., Zuo Ts., Wang V. Super accumulation of glycine betaine in wheat weakens the harmful effects of salt stress // Plant Physiology. 2009. V. 56. No. 3. P. 410–417 (in Russian).

6. Hayashi H., Chen T.H.H., Murata N. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis during germination and early growth // Plant, Cell and Environment. 1998. V. 21. No. 2. P. 232–239.

7. Hayashi H., Mustardy L., Deshniem P., Ida M., Murata N. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress // The Plant Journal. 1997. V. 12. No. 1. P. 133–142. doi: 10.1046/j.1365-3113.1997.12010133.x

8. Sakamoto A., Murata A.N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold // Plant Molecular Biology. 1998. V. 38. P. 1011–1019.

9. Prasad K.V.S.K., Sharmila P., Kumar P.A., Saradhi P.P. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with

bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress // Molecular Breeding. 2000. V. 6. No. 5. P. 489–499.

10. Tran N.H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. Transcriptional enhancement of a bacterial choline oxidase A gene by an HSP terminator improves the glycine betaine production and salinity stress tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* trees // Plant Biotechnology. 2018. V. 35. No. 3. P. 215–224. doi: 10.5511/plantbiotechnology.18.0510b

11. You L., Song Q., Wu Y., Li S., Jiang C., Chang L., Zhang J. Accumulation of glycine betaine in transplastomic potato plants expressing choline oxidase confers improved drought tolerance // Planta. 2019. V. 249. No 6. P. 1963–1975. doi: 10.1007/s00425-019-03153-y

12. Zhang Kh., Lee Ya.Kh., Hu L.Yu., Van S.Kh., Zhang F.K., Hu K.D. Effect of treatment of wheat leaves with a nitric oxide donor on antioxidant metabolism under stress caused by aluminum // Plant physiology. 2008. V. 55. No. 4. P. 523–528.

13. Kinraide T.B., Parker D.R., Zobel R.W. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer // Journal of Experimental Botany. 2005. V. 56. P.1853–1865. doi: 10.1093/jxb/eri175

14. Yang Z.M., Sivaguru M., Horts W.J., Matsumoto H. Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*) // Physiol Plantarum. 2001. V.110. P. 72–74. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.110110.x

15. Gulevich A.A., Kurenina L.V., Baranova E.N. Application of a system for targeting Fe-dependent superoxide dismutase and choline oxidase enzymes to chloroplast as a strategy for effective plant resistance to abiotic stresses // Russian Agricultural Sciences. 2018. V. 44. No. 2. P. 118–123.

16. Danilova S.A., Kuznetsov V.V., Dolgikh Yu.I. New effective method for the genetic transformation of corn using an agrobacterial lawn // Fiziologiya rasteniy. 2009. V. 56. No. 2. P. 285–290 (in Russian).

17. Murachige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue // Physiologia plantarum. 1962. V. 15. No. 3. P. 473–497.

18. Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Analytical biochemistry. 1971. V. 44. No. 1. P. 276–287.

19. Lukatkin A.S. Cold damage to heat-loving plants and oxidative stress. Saransk: Izd-vo Mordov. un-ta, 2002. 208 p. (in Russian).

20. Shlyk A.A. Determination of chlorophylls and carotenoids in green leaf extracts // Biokhimicheskie metody v fiziologii rasteniy. Moskva: Nauka. 1971. V. 19. No. 1. P. 164–170 (in Russian).

21. Klimashevsky E.L. The genetic aspect of the mineral nutrition of plants. Moskva: Agropromizdat, 1991. 415 p. (in Russian).

22. Soshinkova T.N., Radyukina N.L., Korolkova D.V., Nosov A.V. Proline and functioning of the antioxidant system of plants and cultured cells of *Thellungiella salsuginea* under oxidative stress // Fiziologiya rasteniy. 2013. V. 60. No. 1. P. 47–47 (in Russian). doi: 10.7868/S0015330313010090