

Научная статья
УДК 581.1:577.214.625:578.853
EDN: VEHRVM
DOI: 10.21285/achb.945



Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* в условиях абиотического стресса

З.А. Бережнева, Х.Г. Мусин, Б.Р. Кулуев✉

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН,
Уфа, Россия

Аннотация. Ксилоглюканэндотрансгликозилазы представляют собой гидролитические ферменты клеточных стенок, которые участвуют в регуляции и обеспечении роста растений. Сверхэкспрессия генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз может позитивно влиять на рост и стрессоустойчивость трансгенных растений, однако механизмы такого влияния остаются малоизученными. Целью данной работы являлось создание трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы осины *PtrXTH1*, а также морфофизиологический анализ их корней в условиях действия абиотических стресс-факторов. Трансгенные растения табака характеризовались увеличенной длиной корней по сравнению с растениями дикого типа как при оптимальных условиях, так и при засолении (действие хлорида натрия в концентрации 100 мМ), гипотермии (12 °С) и загрязнении кадмием (действие ацетата кадмия в концентрации 200 мкМ). Площадь клеток паренхимы корней у трансгенных растений табака была больше по сравнению с растениями дикого типа только при действии ацетата кадмия, тогда как при норме, гипотермии и засолении разница в размере клеток не обнаруживалась. Сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* способствовала увеличению в корнях общей антиоксидантной способности, содержания пролина, водорастворимых сахаров, окисленного и восстановленного глутатиона при действии всех трех стрессовых факторов. Таким образом, трансген *PtrXTH1* оказывает стимулирующее действие на рост корней табака при норме и действии абиотических стресс-факторов, что сопровождается положительными изменениями в антиоксидантной системе.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, антиоксидантная система, гипотермия, засоление, кадмий, рост корней, трансгенные растения

Финансирование. Исследование выполнено в рамках госзадания 122030200143-8.

Для цитирования: Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* в условиях абиотического стресса // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 4. С. 495–503. DOI: 10.21285/achb.945. EDN: VEHRVM.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Root growth in transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding xyloglucan endotransglycosylase under abiotic stress

Zoya A. Berezhneva, Khalit G. Musin, Bulat R. Kuluev✉

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center RAS, Ufa, Russian Federation

Abstract. Xyloglucan endotransglycosylases are hydrolytic cell wall enzymes that are involved in the regulation and promotion of plant growth. Overexpression of genes encoding xyloglucan endotransglycosylases can have a positive

effect on the growth and stress tolerance of transgenic plants; however, the mechanisms of such influence remain poorly understood. This study was aimed at creating transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding aspen xyloglucan endotransglycosylase, as well as conducting a morphophysiological analysis of their roots under abiotic stress. The transgenic tobacco plants were characterized by an increased root length as compared to wild plants, both under optimal conditions and in response to salinity (100 mM sodium chloride), low temperature (12 °C), and cadmium contamination (200 µM cadmium acetate). The area of root parenchyma cells in transgenic tobacco plants is larger as compared to wild plants only under the effect of cadmium acetate, whereas under normal conditions and under low-temperature and salinity stress, no difference in cell size was observed. The *PtrXTH1* gene overexpression contributed to the increased total antioxidant capacity in the roots, as well as a higher content of proline, water-soluble sugars, and oxidized and reduced glutathione, in the context of the three stress factors. Thus, the *PtrXTH1* transgene stimulates the growth of tobacco roots under normal and abiotic stress conditions, which is accompanied by positive changes in the antioxidant system.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, antioxidant system, low temperature, salinity, cadmium, root growth, transgenic plants

Funding. This study was supported by state assignment 122030200143-8.

For citation: Berezhneva Z.A., Musin K.G., Kuluev B.R. Root growth in transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene encoding xyloglucan endotransglycosylase under abiotic stress. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(4):495-503. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.945. EDN: VEHRVM.

ВВЕДЕНИЕ

Ксилоглюканэндотрансгликозилазы представляют собой апопластические гидролитические ферменты, которые осуществляют реакции трансгликозилирования и расщепления связующих гликанов, способствуя разрушению клеточной стенки, что необходимо для роста клеток [1]. Гены ксилоглюканэндотрансгликозилаз играют важную роль в обеспечении роста растений при воздействии абиотических стресс-факторов. К примеру, конститутивная экспрессия гена *CaXTH3 Capsicum annuum* в трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana* повышала их устойчивость к засухе и засолению [2]. При воздействии гипотермии происходило понижение уровня экспрессии гена *DkXTH6* и повышение уровня транскриптов гена *DkXTH7* хурмы в *A. thaliana* [3]. Сверхэкспрессия гена *DkXTH1* хурмы в трансгенных растениях *A. thaliana* повышала их толерантность к засолению, засухе и воздействию абсцизовой кислоты, а также позитивно влияла на рост корней и листьев [4]. Уровень транскриптов гена *NtEXGT* табака увеличивался в условиях засоления, засухи и низких положительных температур, а трансгенные растения *35S::NtEXGT* имели увеличенные размеры органов при воздействии абиотических стресс-факторов [5]. Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PnXTH1* характеризовались увеличенными размерами органов побега при воздействии засоления по сравнению с растениями дикого типа [6]. Сверхэкспрессия гена *PeXTH Populus euphratica* в трансгенных растениях табака повышала солеустойчивость [7]. Экспрессия генов *AtXTH19* и *AtXTH23* в растениях *A. thaliana* повышалась под действием солевого стресса. Некоторые гены ксилоглюканэндотрансгликозилазы китайской капусты (*Brassica rapa* L.) активировались при тепловом стрессе [8], а ген *OsXET9* риса индуцировался при холодном стрессе [9]. Дифференциальная экспрессия генов *NtXTHs* табака наблюдалась при различных стрессовых условиях, и экспрессия почти всех *NtXTHs* была повышена при действии различных стрессовых факторов, таких как засоление, защелачивание, засуха и гипотермия [10].

Таким образом, гены ксилоглюканэндотрансгликозилаз могут быть использованы в генной инженерии для увеличения устойчивости растений к абиотическим

стресс-факторам, однако механизмы позитивного влияния ксилоглюканэндотрансгликозилаз на стрессоустойчивость остаются малоизученными. Более того, большинство исследований конститутивной экспрессии генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз проведено на органах побега [6–8], а о роли этих ферментов при росте корней в стрессовых условиях сведений пока немного. Исходя из этого, целью данного исследования было получение трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* осины, проведение морфометрического и микроскопического анализа, а также оценка состояния антиоксидантной системы корней этих растений в условиях абиотических стрессов, таких как засоление, гипотермия и воздействие кадмия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение, отбор и анализ трансгенных растений. Для генетической трансформации табака использовали конструкцию гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *PtrXTH1* осины (*Populus tremula* L.) в бинарном векторе pCambia1301 с 35S CaMV промотором, которую получали, как описано ранее [6]. Для клонирования и анализа методом полимеразной цепной реакции бактериальных клонов и трансгенных растений использовали праймеры, подобранные ранее к ортологичному гену *PtXTH1 Populus trichocarpa* (XM_006385804) [6]. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* получали методом агробактериальной трансформации листовых дисков. Отбор трансгенных растений проводили по результатам анализа методом полимеразной цепной реакции на наличие гена *PtrXTH1*, гистохимического анализа на активность β-глюкуронидазы и анализа устойчивости к селективному антибиотику гигромицину. Подробности получения, отбора и анализа трансгенных растений табака описаны нами ранее [6]. Морфометрический анализ проводился на трансгенных растениях второго поколения (T₂), выращенных на селективной среде Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением антибиотика гигромицина для элиминации нетрансгенных сеянцев. Тотальную РНК из корней исследуемых растений табака выделяли методом тризол-хлороформной экстракции, первую цепь кДНК строили при помощи олиго(dT) праймера и MMuLV-

ревертазы (NEB, США). Количественное определение содержания мРНК (после конверсии в кДНК) гена *PtrXTH1* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I на термоциклере Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Австралия). В качестве стандарта использовали мРНК фактора элонгации EF-1α (AF120093.1), уровень экспрессии которого принимали за 100%. Последовательности использованных праймеров для выявления методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией генов *PtrXTH1* и *EF-1α* также были опубликованы ранее [6]. В итоге для дальнейших экспериментов нами взяты четыре линии трансгенных растений табака, которые характеризовались наиболее высоким уровнем содержания транскриптов гена *PtrXTH1* в корнях: линия 3 – 166%, линия 17 – 181%, линия 25 – 154%, линия 28 – 122%. В остальных линиях трансгенных растений уровень содержания транскриптов гена *PtrXTH1* в корнях не превышал 100%.

Оценка параметров роста корней трансгенных растений табака при действии абиотических стрессов. Трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* поколения T₂ проращивали в камерах роста Binder (Германия) при температуре 25 °С, освещенности 140 мкмоль/(м²с) и фотопериоде 16/8 ч (свет/темнота) на питательной среде МС. Через 10 дней проращивания на селективной среде с гигромицином проростки с одинаковыми размерами корней переносили на вертикально-ориентированные чашки Петри со средой МС. После 10 дней выращивания определяли прирост корней (изменение длины) при норме (контроль), при действии хлорида натрия (NaCl) в концентрации 50 и 100 мМ, при воздействии гипотермии (12 °С) и при влиянии ацетата кадмия (CdAc) в концентрациях 200 и 400 мкМ [11]. Измерение длины корней проводили перед началом эксперимента и после 10 дней опыта. При оценке результатов эксперимента учитывался только прирост корней за эти 10 дней. В качестве контроля (дикий тип) использовались растения табака *N. tabacum* сорта Petit Havana линии SR1 дикого типа. Выборка составила 100 растений для каждой линии. Результаты исследований представляли в виде гистограмм со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали по тесту Дункана ($P < 0,05$) [12].

При нормальных условиях достоверное увеличение длины корней по сравнению с растениями дикого типа выявлено у линий 3, 17 и 25 (рис. 1, а). Оценка прироста корней трансгенных растений табака при действии температуры 12 °С показала, что длина по сравнению с диким типом увеличивается у всех исследуемых линий (рис. 1, б). При выращивании растений на среде МС с добавлением 50 мМ NaCl увеличение длины корней по сравнению с диким типом обнаружено у линий 3 и 17 (рис. 1, с). При действии 100 мМ NaCl больший прирост корней, чем у дикого типа, наблюдался у линий 3, 17 и 25 (рис. 1, д). При выращивании растений на среде МС с добавлением CdAc в концентрации 200 мкМ повышенные показатели прироста корней по сравнению с диким типом выявлены у всех изучаемых линий трансгенных растений табака (рис 1, е). При действии 400 мкМ

CdAc более быстрыми темпами роста корней по сравнению с диким типом характеризовались линии 3 и 28 трансгенных растений (рис. 1, ф).

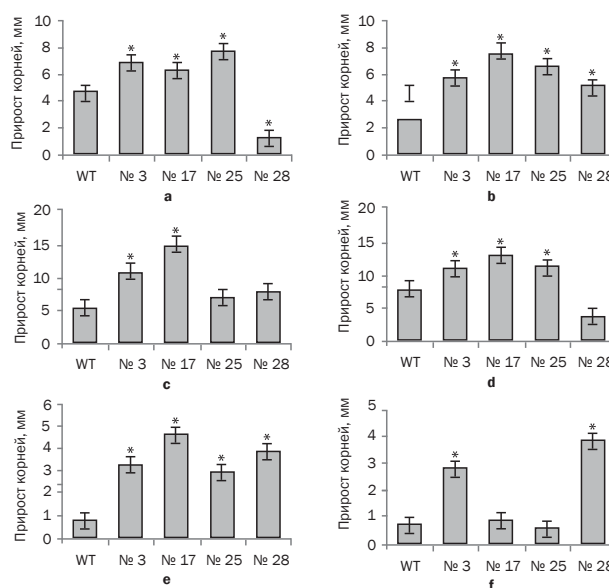


Рис. 1. Прирост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* за 10 дней: а – нормальные условия; б – воздействие 12 °С; с – влияние 50 мМ NaCl; д – влияние 100 мМ NaCl; е – влияние 200 мкМ CdAc; ф – влияние 400 мкМ CdAc (WT – дикий тип; цифрами по оси абсцисс отмечены номера линий трансгенных растений; * – $P < 0,05$ согласно тесту Дункана)

Fig. 1. Roots growth of transgenic tobacco plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene for 10 days: a – normal conditions; b – the effect of 12 °C; c – the effect of 50 mM NaCl; d – the effect of 100 mM NaCl; e – the effect of 200 μM CdAc; f – the effect of 400 μM CdAc (WT – wild-type; the numbers on the x-axis indicate the line numbers of transgenic plants; * – $P < 0.05$ according to the Duncan test)

Фиксация и микроскопический анализ корней. Фиксацию корней табака проводили в 4%-м формалине на фосфатном буфере (pH 7,2) в течение 4 ч при комнатной температуре. Затем корни переносили в 30%-й глицерин, приготовленный на 2%-м диметилсульфоксиде, и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Готовили «просветляющий раствор» следующего состава: 3,7 М KI и 12,5 мМ Na₂S₂O₃ в 100 мл 2%-го диметилсульфоксида. Потом корни переносили в «просветляющий раствор» для подготовки к просмотру препаратов под микроскопом. Затем 35 мл «просветляющего раствора» смешивали с 65 мл 100%-го глицерина. Корни табаков выдерживали в «просветляющем растворе» не меньше 1,5 ч, после чего готовили временные препараты в 50%-м глицерине [13]. Размер клеток корней изучали в вариантах: оптимальные условия роста, рост при засолении 50 мМ NaCl, при воздействии низкой положительной температуры 12 °С и при действии 200 мкМ CdAc. Каждая повторность включала в себя по 10 корней на каждый вариант опыта ($n = 10$). Измерения размеров клеток паренхимы корней проводили в зоне всасы-

вания. Размер и площадь клеток анализировали на флуоресцентном микроскопе Biozero BZ-8100 (Кеуенсе, Япония). По результатам экспериментов проанализировано по 150 клеток на каждую вариацию опыта исследованных растений ($n = 150$). Анализ и фиксация клеток проводились через 10 дней после посадки на вертикально-ориентированные чашки Петри. Форма клеток корней была цилиндрическая, вытянутая при всех вариациях опыта, как у табака дикого типа, так и у трансгенных растений (рис. 2).

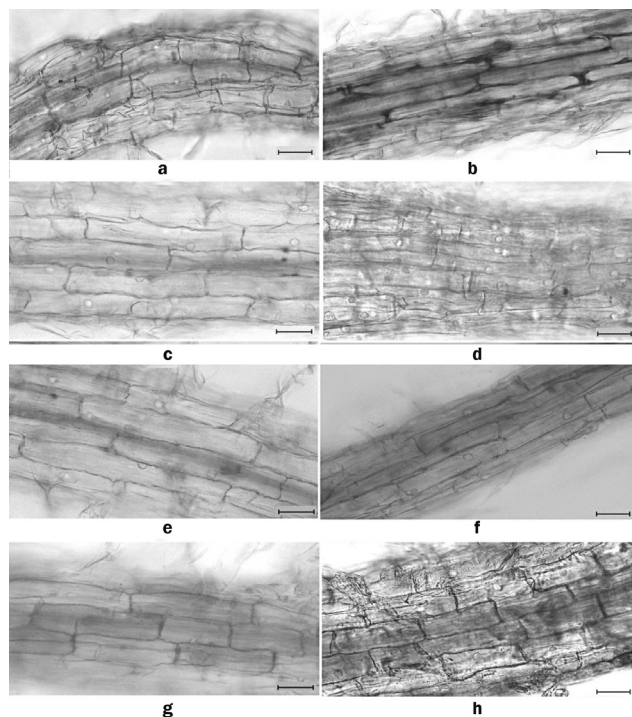


Рис. 2. Размеры и форма клеток корней табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1*: а – корни табака дикого типа при нормальных условиях; б – корни трансгенного табака при нормальных условиях; в – корни табака дикого типа при воздействии 50 мМ NaCl; д – корни трансгенного табака при воздействии 50 мМ NaCl; е – корни табака дикого типа при гипотермии 12 °С; ф – корни трансгенного табака при гипотермии 12 °С; г – корни табака дикого типа при воздействии 200 мкМ CdAc; h – корни трансгенного табака при воздействии 200 мкМ CdAc (увеличение 160х, масштаб 50 мкм)

Fig. 2. Size and shape of the cells of wild-type tobacco and transgenic plants roots with overexpression of the *PtrXTH1* gene: а – wild-type tobacco roots under normal conditions; б – transgenic tobacco roots under normal conditions; в – wild-type tobacco roots exposed to 50 mM NaCl; д – transgenic tobacco roots exposed to 50 mM NaCl; е – wild-type tobacco roots exposed to 12 °C; ф – transgenic tobacco roots exposed to 12 °C; г – wild-type tobacco roots exposed to 200 μM CdAc; h – roots of transgenic tobacco exposed to 200 μM CdAc (magnification 160x, scale 50 μm)

При воздействии 200 мкМ CdAc размеры клеток у трансгенных растений табака со сверхэкспрессией изучаемого гена были больше по сравнению с растениями табака дикого типа (таблица). При действии

засоления и гипотермии разница в размерах клеток между трансгенными растениями и растениями дикого типа не обнаруживалась.

Площадь клеток корней растений табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* при нормальных условиях и при воздействии различных абиотических стресс-факторов

Area of tobacco root cells of wild-type and transgenic plants with overexpression of the *PtrXTH1* gene under normal conditions and under the influence of various abiotic stress factors

Условия проведения эксперимента	Дикий тип, мкм ²	Трансгенные растения 35S::PtrXTH1, мкм ²
Нормальные условия	2836,8±873,3	2777,4±662,2
Засоление (50 мМ NaCl)	2669,3±1080,2	2537,2±677,2
Гипотермия (12 °С)	2743,2±797,4	2685,7±744,3
Загрязнение кадмием (200 мкМ CdAc)	2959,1±755,2	3930,3±1077,7*

Примечание. * – $P < 0,05$.

Анализ содержания белка и компонентов антиоксидантной системы трансгенных растений табака в условиях абиотических стрессов. Для определения активности фермента супероксиддисмутазы использовали метод, описанный С. Чевари с соавторами [14]. Активность гваяколпероксидаз определяли по способности полимеризации гваякола до тетрагваякола [15]. Активность аскорбатпероксидаз определялась по методу С. Верма и Р.С. Дуби [16]. Содержание водорастворимых сахаров определяли по методике, описанной М. Дюбуа с соавторами [17]. Активность каталаз определяли по скорости деградации молекул H_2O_2 [18]. Активность глутатион-S-трансфераз определяли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов, образовавшихся между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом [19]. Количество окисленного и восстановленного глутатиона определяли по методике Н.В. Шалыго и др. [20]. Содержание малонового диальдегида измеряли с использованием тиобарбитуровой кислоты по методу, описанному в работе Н.Л. Тейлора и А.Х. Миллара [21]. Методика определения количества пролина взята из работы Л.С. Бэйтса и др. [22] с модификациями А.Х.А. Хедра и др. [23]. Оценку общей антиоксидантной способности проводили на метанольных (80%) экстрактах по восстановлению молибдена (VI) до молибдена (V) в кислой среде [24]. Содержание количества общего растворимого белка измеряли по методу М.М. Брэдфорда [25].

По результатам оценки содержания белка (рис. 3, а) выявлено, что в корнях трансгенных растений происходит большее его накопление при действии абиотических стрессов, чем у растений дикого типа, в то время как при нормальных условиях содержание белка в трансгенных растениях находится на уровне растений дикого типа. В корнях трансгенного табака обнаружена повышенная по сравнению с диким типом общая антиоксидантная способность как при нормальных условиях, так и при воздействии засоления, гипотермии

и тяжелых металлов (рис. 3, b). Содержание пролина (рис. 3, c) было выше в трансгенных растениях со сверхэкспрессией гена *PtRXTH1* как при нормальных условиях, так и при воздействии гипотермии и засоления по сравнению с диким типом. При действии CdAc содержание пролина в корнях трансгенных растений существенно не отличалось от дикого типа. При нормальных условиях содержание водорастворимых сахаров (рис. 3, d) в трансгенных растениях табака было меньше по сравнению с растениями дикого типа. При влиянии засоления и гипотермии содержание водорастворимых сахаров в трансгенных растениях становилось выше по сравнению с диким типом. При действии CdAc происходило повышение содержания водорастворимых сахаров в диком типе, но в трансгенных растениях количество водорастворимых сахаров уменьшалось по сравнению с нормальными условиями. Содержание малонового диальдегида (рис. 3, e) при нормальных условиях было в 4 раза больше в корнях трансгенных растений табака по сравнению с диким типом. При воздействии стрессовых факторов содержание малонового диальдегида в трансгенных растениях становилось меньше, чем при нормальных условиях, но в то же время оставалось выше показателей дикого типа при тех же стрессовых условиях.

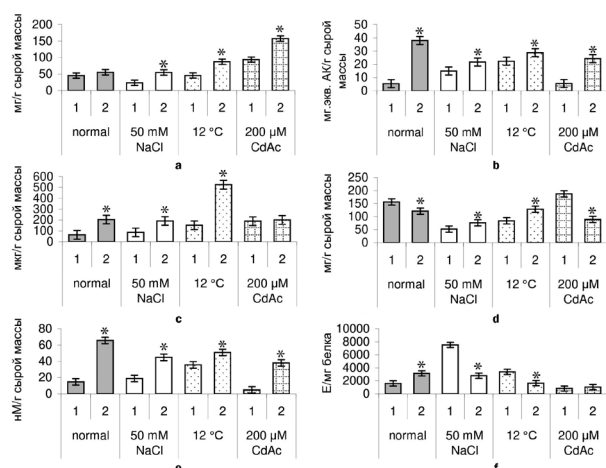


Рис. 3. Содержание белка и водорастворимых сахаров, а также анализ компонентов антиоксидантной системы в корнях растений табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtRXTH1* при нормальных условиях (normal), при воздействии 50 mM NaCl, 12 °C, 200 мкМ CdAc: а – содержание белка; б – общая антиоксидантная способность; с – содержание пролина; d – содержание водорастворимых сахаров; e – содержание малонового диальдегида; f – активность каталазы; 1 – дикий тип, 2 – трансгенные растения (* – $P < 0,05$ согласно тесту Дункана)

Fig. 3. Content of protein, water-soluble sugars and analysis of the antioxidant system in the roots of wild-type tobacco and transgenic plants with overexpression of the *PtRXTH1* gene under normal conditions (normal), in response to 50 mM NaCl, 12 °C, 200 μM CdAc: a – protein content; b – total antioxidant capacity; c – proline content; d – water-soluble sugars content; e – malondialdehyde content; f – catalase activity; 1 – wild-type, 2 – transgenic plants (* – $P < 0.05$ according to the Duncan test)

При нормальных условиях каталазная активность была выше у трансгенных растений по сравнению с диким типом, но при воздействии засоления и гипотермии у трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtRXTH1* активность каталазы была существенно ниже, чем у дикого типа (рис. 3, f). При воздействии кадмия разницы между растениями дикого типа и трансгенными растениями не выявлено.

Активность аскорбатпероксидаз (рис. 4, a) была больше в трансгенных растениях при нормальных условиях по сравнению с растениями дикого типа, при воздействии стресс-факторов их активность снизилась и уменьшилась по сравнению с диким типом. Активность глутатион-S-трансфераз (рис. 4, b) и гваяколпероксидаз (рис. 4, c) в трансгенных растениях табака при нормальных условиях не отличалась от дикого типа. При воздействии абиотических стресс-факторов у трансгенных растений активность данных ферментов была существенно ниже, чем у растений дикого типа, у которых наблюдалось повышение активности ферментов при воздействии каждого из трех стресс-факторов.

В нормальных условиях содержание восстановленного (рис. 4, d) и окисленного глутатиона (рис. 4, e) в трансгенных растениях было намного выше, чем у

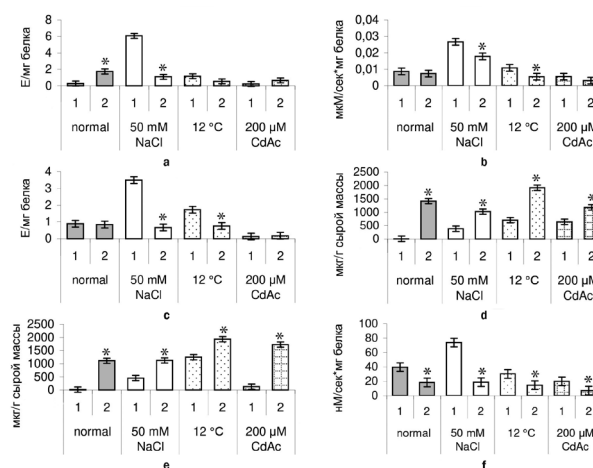


Рис. 4. Анализ компонентов антиоксидантной системы в корнях растений табака дикого типа и трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtRXTH1* при нормальных условиях (normal), при воздействии 50 mM NaCl, 12 °C, 200 мкМ CdAc: а – активность аскорбатпероксидаз; б – активность глутатион-S-трансфераз; с – активность гваяколпероксидаз; d – содержание восстановленного глутатиона; e – содержание окисленного глутатиона; f – активность супероксиддисмутазы; 1 – дикий тип, 2 – трансгенные растения со сверхэкспрессией гена *PtRXTH1* (* – $P < 0,05$ согласно тесту Дункана)

Fig. 4. Analysis of the antioxidant system in wild-type tobacco roots and transgenic plants with overexpression of the *PtRXTH1* gene under normal conditions, under the influence of 50 mM NaCl, 12 °C, 200 μM CdAc: a – ascorbate peroxidases activity; b – glutathione-S-transferases activity; c – guaiacol peroxidases activity; d – content of reduced glutathione; e – content of oxidized glutathione; f – superoxide dismutase activity; 1 – wild-type, 2 – transgenic plants with overexpression of the *PtRXTH1* gene (* – $P < 0.05$ according to the Duncan test)

растений дикого типа. При засолении у растений дикого типа происходило резкое увеличение обеих форм глутатиона, тогда как у трансгенных растений содержание глутатиона оставалось на том же уровне или даже немного уменьшалось (см. рис. 4, d). При действии гипотермии и кадмия мы обнаружили большее содержание восстановленного и окисленного глутатиона у трансгенных растений по сравнению с диким типом. Активность фермента супероксиддисмутазы была меньше у трансгенных растений табака по сравнению с диким типом как при нормальных условиях, так и при действии абиотических стресс-факторов (рис. 4, f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Корни при сверхэкспрессии гена *PtrXTH1* росли быстрее, а микроскопический анализ показал, что размеры клеток корней у трансгенных растений крупнее, чем у растений дикого типа, только при действии кадмия. Это означает, что сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* способствовала улучшению роста корней за счет не только стимуляции роста клеток растяжением, но и клеточного деления, что соотносится с нашими предыдущими данными по гену *NtEXGT*. Сверхэкспрессия гена *PtrXTH1* способствовала увеличению содержания белка, пролина, обеих форм глутатиона, водорастворимых сахаров. Это говорит о позитивных изменениях в антиоксидантной системе, что, в свою очередь, является необходимой предпосылкой для активного роста растения. Ранее не сообщалось о позитивном влиянии генов ксилонуклеотидотрансглюкозилаз на глутатионовый пул и содержание пролина и водорастворимых сахаров в растениях. Механизм данного явления пока остается неясным. В литературе присутствует большое количество статей о влиянии различных абиотических стрессов на глутатионовый пул и пролин различных растений [26], но нет работ, в которых использовались трансгенные растения со сверхэкспрессией ксилонуклеотидотрансглюкозилаз. Таким образом, нами обнаружен механизм ответа растения на воздействие абиотических факторов при высоком уровне экспрессии гена ксилонуклеотидотрансглюкозилаз. Обнаруженное нами повышение общей антиоксидантной способности соотносится с увеличением количества пролина и глутатиона. Увеличение содержания пролина в трансгенных растениях со сверхэкспрессией генов ксилонуклеотидотрансглюкозилаз в ответ на воздействие кадмия выявлено в ранее проводимом нами исследовании [27]. Содержание свободного пролина многократно повышается в клетках растений в ответ на влияние абиотических стрессов, что показывает чувствительность растений к данным стрессам. Эти данные могут говорить о наличии защитного эффекта ксилонуклеотидотрансглюкозилаз при действии абиотических стресс-факторов (таких как засоление и гипотермия), который реализуется не только через стимуляцию роста, но и за счет влияния на компоненты антиоксидантной системы.

При повышении экспрессии ксилонуклеотидотрансглюкозилаз происходит усиленное расщепление ксилонуклеотидов, что дает сигнал для роста растения [1]. Данный сигнал стимулирует размягчение клеточной стенки, что ведет к росту клеточной стенки и корня в целом. Растение растет за счет увеличения экспрессии многочисленных генов – регуляторов роста, происходит одновременная активация деления клеток и растя-

жения клеточных стенок растений. При этом растению важно, чтобы при интенсивном росте не происходило большого накопления активных форм кислорода, которые угнетают его жизнедеятельность. В связи с вышесказанным растение – видимо, в этот период – повышает свой антиоксидантный статус, прежде всего за счет увеличения содержания пролина, глутатиона и, возможно, других компонентов антиоксидантной системы, так как общая антиоксидантная способность у трансгенных растений имела высокие значения, что в целом является показателем повышенного антиоксидантного статуса. Также для стабилизации внутриклеточных структур важное значение имеет накопление защитных веществ, таких как водорастворимые сахара, которые используются растениями для упрочнения связей между белками, липидами и хлорофиллом. В то же время в трансгенных растениях зафиксировано уменьшение активностей каталазы, аскорбатпероксидазы, гваяколпероксидазы, глутатион-S-трансферазы и супероксиддисмутазы. Вероятно, ксилонуклеотидотрансглюкозилазы оказывают защитный эффект на растения в условиях абиотических стрессов, в том числе благодаря влиянию на содержание пролина, водорастворимых сахаров, глутатиона. В итоге трансгенные растения могут не нуждаться в столь высокой активности некоторых антиоксидантных ферментов. Таким образом, в ответ на размягчение клеточных стенок происходит активация роста и деления клеток корней. При действии стрессовых факторов клетки корней трансгенных растений со сверхэкспрессией гена *PtrXTH1* могут дольше не останавливать свой рост, нежели растения дикого типа, вероятно, благодаря более рыхлому состоянию клеточных стенок. При воздействии абиотических стресс-факторов в растении происходят негативные окислительные процессы, в том числе в результате интенсивного фотосинтеза, дыхания и роста, что, возможно, является причиной выявленного нами более высокого содержания малонового диальдегида у трансгенных растений. Для противодействия этому, вероятно, активируются пролин, водорастворимые сахара и глутатион. Однако механизмы прямого влияния ксилонуклеотидотрансглюкозилаз на их биосинтез и активность пока неизвестны. Следует отметить, что в стрессовых условиях малоновый диальдегид в трансгенных растениях вырабатывался все же менее активно, чем в нормальных условиях, что еще раз может свидетельствовать о протекторном эффекте гена *PtrXTH1*. Повышенное содержание белка в корнях трансгенных растений может быть обусловлено также наличием активно растущих клеток, которые обычно синтезируют больше белка. С другой стороны, повышенное содержание пролина, глутатиона и водорастворимых сахаров, видимо, защищает белки от разрушения, что также может способствовать увеличению их содержания в корнях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конститутивная экспрессия гена *PtrXTH1* улучшает рост корней за счет стимуляции деления и растяжения клеток и повышает устойчивость растений к засолению, гипотермии и кадмию. Этот положительный эффект объясняется комплексным действием продукта гена ксилонуклеотидотрансглюкозилазы *PtrXTH1* на клеточные стенки и антиоксидантную систему.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Van Sandt V.S.T., Suslov D., Verbelen J.-P., Visenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall // *Annals of Botany*. 2007. Vol. 100. P. 1467–1473. DOI: 10.1093/aob/mcm248.
2. Cho S.K., Kim J.E., Park J.-A., Eom T.J., Kim W.T. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CsXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants // *FEBS Letters*. 2006. Vol. 580, no. 13. P. 3136–3144. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.062.
3. Han Y., Ban Q., Hou Y., Meng K., Suo J., Rao J. Isolation and characterization of two persimmon xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*XTH*) genes that have divergent functions in cell wall modification and fruit post-harvest softening // *Frontiers in Plant Science*. 2016. Vol. 7. P. 624. DOI: 10.3389/fpls.2016.00624.
4. Han Y., Han S., Ban Q., He Y., Jin M., Rao J. Overexpression of persimmon *DkXTH1* enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants // *Plant Cell Reports*. 2017. Vol. 36. P. 583–596. DOI: 10.1007/s00299-017-2105-4.
5. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Berezhneva Z.A., Nikonorov Y.M., Postrigan B.N., Kudoyarova G.R., et al. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco *NtEXGT* gene and its involvement in abiotic stress response // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017. Vol. 111. P. 203–215. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.12.005.
6. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Участие генов ксиланглюканэндотрансглюкозилаз *PtrXTH1* и *PnXTH1* в регуляции роста и адаптации растений к стресс-факторам // *Физиология растений*. 2018. Т. 65. N 1. С. 26–37. DOI: 10.7868/S0015330318010037. EDN: YMTJBE.
7. Han Y., Wang W., Sun J., Ding M., Zhao R., Deng S., et al. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants // *Journal of Experimental Botany*. 2013. Vol. 64, no. 14. P. 4225–4238. DOI: 10.1093/jxb/ert229.
8. Yang K.A., Lim C.J., Hong J.K., Park C.Y., Cheong Y.H., Chung W.S., et al. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage // *Plant Science*. 2006. Vol. 171, no. 1. P. 175–182. DOI: 10.1016/J.PLANTSCI.2006.03.013.
9. Dong J., Jiang Y., Chen R., Xu Z., Gao X. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (*OsXET9*) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses // *African Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 10, no. 76. P. 17424–17434. DOI: 10.5897/AJB11.1242.
10. Wang M., Xu Z., Ding A., Kong Y. Genome-wide identification and expression profiling analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // *Genes*. 2018. Vol. 9, no. 6. P. 273. DOI: 10.3390/genes9060273.
11. Бережнева З.А., Кашафутдинова А.Р., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтетазы рапса *BnGSH* при действии стрессовых факторов // *Вестник защиты растений*. 2017. N 3. С. 55–59. EDN: ZIFWJZ.
12. Duncan D.B. Multiple range and multiple *F* test // *Biometrics*. 1955. Vol. 11, no. 1. P. 1–42. DOI: 10.2307/3001478.
13. Филин А.Н., Иванов В.Б. Влияние 2,4-Д на пролиферацию и растяжение клеток в корнях *Arabidopsis thaliana* // *Физиология растений*. 2016. Т. 63. N 1. С. 174–179. DOI: 10.7868/S0015330316010061. EDN: UXHEKT.
14. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксид-дисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // *Лабораторное дело*. 1985. N 11. С. 678–681.
15. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перианский Ю.В., Луковникова Г.А., Смирнова-Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
16. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants // *Plant Science*. 2003. Vol. 164, no. 4. P. 645–655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
17. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Roberts P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances // *Analytical Chemistry*. 1956. Vol. 28, no. 3. P. 350–356. DOI: 10.1021/AC60111A017.
18. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schöffel F. Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2002. Vol. 129, no. 2. P. 838–853. DOI: 10.1104/pp.001362.
19. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *Journal of Biological Chemistry*. 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130–7139.
20. Шалыго Н.В., Щербakov P.A., Доманская И.Н., Радюк М.С. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях // *Физиология и биохимия культурных растений*. 2007. Т. 39. N 3. С. 264–270.
21. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative stress and plant mitochondria // *Mitochondria. Methods in Molecular Biology* / eds D. Leister, J.M. Herrmann. Humana Press, 2007. Vol. 372. P. 389–403. DOI: 10.1007/978-1-59745-365-3_28.
22. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // *Plant and Soil*. 1973. Vol. 39. P. 205–207. DOI: 10.1007/BF00018060.
23. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Wahid A.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress // *Journal of Experimental Botany*. 2003. Vol. 54, no. 392. P. 2553–2562. DOI: 10.1093/jxb/erg277.
24. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., et al. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation // *AoB Plants*. 2014. Vol. 6. DOI: 10.1093/aobpla/plu046.
25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72, no. 1-2. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
26. Швец Д.Ю., Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Влияние *rol*-генов *Agrobacterium rhizogenes* штаммов A4, 15834 и K599 на рост корней трансгенных растений табака и состояние антиоксидантной системы в условиях абиотического стресса // *Физиология растений*. 2024. Т. 71. N 5. С. 632–646. DOI: 10.31857/S0015330324050111. EDN: MLUDPV.

27. Бережнева З.А., Мусин Х.Г., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений табака со сверхэкспрессией генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансглико-

зилаз в условиях кадмиевого стресса // Физиология растений. 2022. Т. 69. N 5. С. 522–530. DOI: 10.31857/S0015330322050037. EDN: OVOZAD.

REFERENCES

1. Van Sandt V.S.T., Suslov D., Verbelen J.-P., Visenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Annals of Botany*. 2007;100:1467-1473. DOI: 10.1093/aob/mcm248.
2. Cho S.K., Kim J.E., Park J.-A., Eom T.J., Kim W.T. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper *CaXTH3*, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters*. 2006;580(13):3136-3144. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.062.
3. Han Y., Ban Q., Hou Y., Meng K., Suo J., Rao J. Isolation and characterization of two persimmon xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*XTH*) genes that have divergent functions in cell wall modification and fruit post-harvest softening. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:624. DOI: 10.3389/fpls.2016.00624.
4. Han Y., Han S., Ban Q., He Y., Jin M., Rao J. Overexpression of persimmon *DkXTH1* enhanced tolerance to abiotic stress and delayed fruit softening in transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 2017;36:583-596. DOI: 10.1007/s00299-017-2105-4.
5. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Berezhneva Z.A., Nikonov Y.M., Postrigan B.N., Kudoyarova G.R., et al. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco *NtEXGT* gene and its involvement in abiotic stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017;111:203-215. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.12.005.
6. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Knyazev A.V., Nikonov Y.M., Chemeris A.V. Role of *PtrXTH1* and *PnXTH1* genes encoding xyloglucan endo-transglycosylases in regulation of growth and adaptation of plants to stress factors. *Fiziologiya rastenii*. 2018;65(1):26-37. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330318010037. EDN: YMTJBE.
7. Han Y., Wang W., Sun J., Ding M., Zhao R., Deng S., et al. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(14):4225-4238. DOI: 10.1093/jxb/ert229.
8. Yang K.A., Lim C.J., Hong J.K., Park C.Y., Cheong Y.H., Chung W.S., et al. Identification of cell wall genes modified by a permissive high temperature in Chinese cabbage. *Plant Science*. 2006;171(1):175-182. DOI: 10.1016/J.PLANTSCI.2006.03.013.
9. Dong J., Jiang Y., Chen R., Xu Z., Gao X. Isolation of a novel xyloglucan endotransglucosylase (*OsXET9*) gene from rice and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(76):17424-17434. DOI: 10.5897/AJB11.1242.
10. Wang M., Xu Z., Ding A., Kong Y. Genome-wide identification and expression profiling analysis of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Genes*. 2018;9(6):273. DOI: 10.3390/genes9060273.
11. Berezhneva Z.A., Kashafutdinova A.R., Kuluev B.R. Root growth in *Nicotiana tabacum* transgenic plants with overexpression of *BnGSH* gene of oilseed rape glutathione synthetase under stress factors. *Plant Protection News*. 2017;3:55-59. (In Russian). EDN: ZIFWJZ.
12. Duncan D.B. Multiple range and multiple *F* test. *Biometrics*. 1955;11(1):1-42. DOI: 10.2307/3001478.
13. Filin A.N., Ivanov V.B. Effect of 2,4-D on cell proliferation and elongation in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Fiziologiya rastenii*. 2016;63(1):174-179. (In Russian). DOI: 10.7868/S0015330316010061. EDN: UXXEKT.
14. Chevari S., Chaba I., Sekel I. Role of superoxide dismutase in cellular oxidative processes and method of its determination in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985;11:678-681. (In Russian).
15. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P., Perunskii Yu.V., Lukovnikova G.A., Smirnova-Ikonnikova M.I. *Methods for biochemical research of plants*. Leningrad: Agropromizdat; 1987, 430 p. (In Russian).
16. Verma S., Dubey R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 2003;164(4):645-655. DOI: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0.
17. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956;28(3):350-356. DOI: 10.1021/AC60111A017.
18. Panchuck I.I., Volkov R.A., Schöffel F. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 2002;129(2):838-853. DOI: 10.1104/pp.001362.
19. Habig W.H., Pabst M.S., Jakoby W.B. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249(22):7130-7139.
20. Shalygo N.V., Shcherbakov R.A., Domanskaya I.N., Radyuk M.S. Spectrofluorimetric method for the determination of oxidized and reduced glutathione in plants. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii*. 2007;39(3):264-270. (In Russian).
21. Taylor N.L., Millar A.H. Oxidative stress and plant mitochondria. In: Leister D., Herrmann J.M. (eds). *Mitochondria. Methods in Molecular Biology*. Humana Press; 2007, vol. 372, p. 389-403. DOI: 10.1007/978-1-59745-365-3_28.
22. Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973;39:205-207. DOI: 10.1007/BF00018060.
23. Khedr A.H.A., Abbas M.A., Wahid A.A.A., Quick W.P., Abogadallah G.M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*. 2003;54(392):2553-2562. DOI: 10.1093/jxb/erg277.
24. Boestfleisch C., Wagenseil N.B., Buhmann A.K., Seal C.E., Wade E.M., Muscolo A., et al. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation. *AoB Plants*. 2014;6. DOI: 10.1093/aobpla/plu046.
25. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1-2):248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.

26. Shvets D.Yu., Berezhneva Z.A., Musin Kh.G., Kuluev B.R. Effect of *rol* genes of the A4, 15834, and K599 strains of *Agrobacterium rhizogenes* on root growth and states of the antioxidant systems of transgenic tobacco plants subjected to abiotic stress. *Fiziologiya rastenii*. 2024;71(5):632-646. (In Russian). DOI: 10.31857/S0015330324050111. EDN: MLUDPV.

27. Berezhneva Z.A., Musin kh.G., Kuluev B.R. Root growth of transgenic tobacco plants with overexpression of expansin and xyloglucan endotransglycosylase genes under cadmium stress. *Fiziologiya rastenii*. 2022;69(5):522-530. (In Russian). DOI: 10.31857/S0015330322050037. EDN: OVOZAD.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Бережнева Зоя Александровна,
младший научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
berezheva-z@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2634-9860>

Мусин Халит Галеевич,
к.б.н., научный сотрудник,
Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
khalit.musin@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7336-2027>

Кулуев Булат Разяпович,
д.б.н., заведующий лабораторией,
Институт биохимии и генетики Уфимского
федерального исследовательского центра РАН,
450054, Уфа, Проспект Октября, 71,
Российская Федерация,
✉ kuluev@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Zoya A. Berezhneva,
Junior Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Avenue, Ufa, 450054,
Russian Federation,
berezheva-z@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2634-9860>

Khalit G. Musin,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Avenue, Ufa, 450054,
Russian Federation,
khalit.musin@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0001-7336-2027>

Bulat R. Kuluev,
Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory,
Institute of Biochemistry and Genetics,
Ufa Federal Research Center RAS,
71, Oktyabrya Avenue, Ufa, 450054,
Russian Federation,
✉ kuluev@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Вклад авторов

З.А. Бережнева – постановка эксперимента по выращиванию и стресс-обработке растений, морфометрический анализ, микроскопия, написание статьи.
Х.Г. Мусин – биохимический анализ антиоксидантной системы.
Б.Р. Кулуев – создание трансгенных растений, написание и редактирование статьи.

Contribution of the authors

Zoya A. Berezhneva – setting up an experiment on growing and stress-treating plants, morphometric analysis, microscopy, writing the text of manuscript.
Khalit G. Musin – biochemical analysis of the antioxidant system.
Bulat R. Kuluev – creation of transgenic plants, writing and editing the text of manuscript.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Информация о статье

Поступила в редакцию 21.08.2023.
Одобрена после рецензирования 06.12.2023.
Принята к публикации 30.11.2024.

Information about the article

The article was submitted 21.08.2023.
Approved after reviewing 06.12.2023.
Accepted for publication 30.11.2024.