

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
"Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии"
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Шкрыль Юрий Николаевич

Агробактериальные гены *rol* как активаторы биосинтеза вторичных метаболитов и
стрессоустойчивости клеток растений

1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

чл.-корр. РАН, д.б.н. Булгаков В. П.

Владивосток – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. Природный механизм переноса генов бактериями рода <i>Rhizobium</i>	15
1.1.1. Концепция генетической колонизации растений.....	15
1.1.2. Молекулярный механизм переноса Т-ДНК.....	17
1.1.3. Растительные белки-участники переноса Т-ДНК.....	18
1.2. Представители семейства <i>plast</i> онкогенов.....	22
1.3. Гены <i>rol</i>	26
1.3.1. Общая характеристика генов <i>rol</i>	26
1.3.2. Ген <i>rolA</i>	28
1.3.3. Ген <i>rolB</i>	30
1.3.4. Ген <i>rolC</i>	33
1.3.5. Ген <i>rolD</i>	35
1.4. Растительные гомологи генов Т-ДНК.....	36
1.5. Структурная и функциональная организация сигнальных систем растений ...	38
1.6. Кальциевая сигнальная система растений.....	42
1.6.1. Внутриклеточные токи ионов кальция.....	42
1.6.2. Кальций-связывающие белки.....	45
1.6.3. Кальций-связывающие белки как инструмент генетической инженерии растений.....	53
1.7. НАДФН-оксидазная сигнальная система растений.....	56
1.7.1. НАДФН-оксидазы: структура и физико-химические свойства.....	56
1.7.2. Регуляция активности НАДФН-оксидаз.....	57
1.7.3. Физиологическая роль растительных НАДФН-оксидаз.....	59
1.8. Роль активных форм кислорода в сигнальной регуляции.....	61
1.8.1. Генерация активных форм кислорода в растительной клетке.....	61
1.8.2. Система антиоксидантной защиты растительной клетки.....	64
1.8.3. Механизм передачи сигналов с участием активных форм кислорода.....	68
1.8.4. Физиологическая роль в жизнедеятельности растений.....	69

1.8.5. Роль активных форм кислорода при стрессах различного происхождения	70
1.9. Вторичные метаболиты <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
1.9.1. Общая характеристика и основные группы метаболитов.....	74
1.9.2. Пути биосинтеза вторичных метаболитов	78
1.10. Вторичные метаболиты <i>Rubia cordifolia</i>	85
1.10.1. Общая характеристика и основные группы метаболитов.....	85
1.10.2. Биосинтез антрахинонов в растениях <i>Rubia cordifolia</i>	87
1.10.3. Фармакологические свойства	90
1.11. Вторичные метаболиты <i>Aristolochia manshuriensis</i>	91
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	94
2.1. Растительный материал, бактерии и плазмиды	94
2.2. Создание вектора для анализа внутриклеточной локализации белка RolC.....	96
2.3. Культивирование и трансформация бактерий	97
2.4. Получение модельных клеточных культур и растений	98
2.4.1. Каллусные культуры <i>Rubia cordifolia</i>	98
2.4.2. Каллусные культуры <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
2.4.3. Трансгенные растения <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
2.4.4. Трансформированные корни <i>Aristolochia manshuriensis</i>	100
2.5. Выделение ДНК, РНК и синтез первой цепи кДНК.....	101
2.6. Химический анализ клеточных культур.....	102
2.6.1. Анализ вторичных метаболитов <i>Rubia cordifolia</i>	102
2.6.2. Анализ вторичных метаболитов <i>Arabidopsis thaliana</i>	103
2.6.3. Анализ вторичных метаболитов <i>Aristolochia manshuriensis</i>	105
2.7. Определение фармакологической активности антрахинонов из каллусной культуры <i>Rubia cordifolia</i>	106
2.8. Определение фармакологической активности экстрактов из клеточных культур <i>Aristolochia manshuriensis</i>	107
2.8.1. Антиоксидантная активность экстрактов.....	107
2.8.2. Противоопухолевая активность экстрактов.....	107
2.9. Определение активных форм кислорода (АФК).....	108

2.9.1. Измерение содержания внутриклеточных АФК методом лазерной конфокальной микроскопии.....	108
2.9.2. Флуориметрический метод анализ АФК	109
2.10. Определение жизнеспособности клеток растений	110
2.11. Анализ содержания восстановленного и окисленного глутатиона методом масс-спектрометрии	110
2.12. Идентификация генов биосинтеза антрахинонов <i>Rubia cordifolia</i>	111
2.13. Идентификация и анализ генов антиоксидантных ферментов <i>Rubia cordifolia</i>	112
2.14. Идентификация и анализ генов НАДФН оксидаз <i>Rubia cordifolia</i>	113
2.15. Идентификация и анализ генов кальций-зависимых протеинкиназ <i>Rubia cordifolia</i>	115
2.16. Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени.....	115
2.17. Определение внутриклеточной локализации белка RolC.....	126
2.17.1. Получение и трансформация протопластов	126
2.17.2. Визуализация слитого белка RolC-EGFP в живых клетках с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии	126
2.18. Статистический анализ.....	127
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	128
3.1. Влияние генов <i>rol</i> на биосинтез вторичных метаболитов	128
3.1.1. Влияние генов <i>rol</i> на рост и биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах <i>Rubia cordifolia</i>	128
3.1.2. Эффекты генов <i>rolA</i> и <i>rolB</i> в условиях длительного культивирования трансгенных культур <i>Rubia cordifolia</i>	129
3.1.3. Фармакологическая активность антрахинонов из каллусной культуры <i>Rubia cordifolia</i>	137
3.1.4. Влияние генов <i>rol</i> на биосинтез вторичных метаболитов в трансформированных корнях <i>Aristolochia manshuriensis</i>	140
3.1.5. Фармакологическая активность экстрактов из клеточных культур <i>Aristolochia manshuriensis</i>	143
3.1.6. Влияние генов <i>rol</i> на биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах <i>Arabidopsis thaliana</i>	148

3.1.7. Влияние генов <i>rol</i> на биосинтез вторичных метаболитов в растениях <i>Arabidopsis thaliana</i>	157
3.1.8. Обсуждение результатов по влиянию генов <i>rol</i> на биосинтез вторичных метаболитов.....	163
3.2. Влияние генов <i>rol</i> на содержание АФК и устойчивость трансгенных культур к абиотическим стрессам	169
3.2.1. Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, экспрессирующих ген <i>rolC</i>	169
3.2.2. Внутриклеточная локализация белка RolC	173
3.2.3. Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, экспрессирующих ген <i>rolB</i>	176
3.2.4. Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, трансформированных pRiA4	188
3.2.5. Обсуждение результатов по влиянию генов <i>rol</i> на продукцию АФК и стрессоустойчивость клеток.....	191
3.3. Влияние генов <i>rol</i> на экспрессию генов антиоксидантных ферментов.....	196
3.3.1. Идентификация и анализ генов антиоксидантной системы у растений <i>Rubia cordifolia</i>	196
3.3.2. Экспрессия генов антиоксидантной системы в растении <i>Rubia cordifolia</i>	201
3.3.3. Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в трансгенных культурах.....	203
3.3.4. Обсуждение результатов по влиянию генов <i>rol</i> на гены антиоксидантной системы.....	210
3.4. Влияние генов <i>rol</i> на экспрессию генов НАДФН-оксидазы (<i>Rboh</i>)	213
3.4.1. Идентификация и анализ генов <i>Rboh</i> в растении <i>Rubia cordifolia</i>	213
3.4.2. Влияние стрессовых факторов на экспрессию генов <i>Rboh</i> в каллусной культуре <i>Rubia cordifolia</i>	217
3.4.3. Экспрессия генов <i>Rboh</i> в трансгенных культурах.....	219
3.4.4. Обсуждение результатов по влиянию генов <i>rol</i> на гены НАДФН-оксидазы	223

3.5. Влияние генов <i>rol</i> на экспрессию генов Ca ²⁺ -зависимых протеинкиназ (<i>CDPK</i>)	225
3.5.1. Идентификация и анализ генов <i>CDPK</i> в растении <i>Rubia cordifolia</i>	225
3.5.2. Влияние метилжасмоната на экспрессию <i>CDPK</i> в каллусах <i>Rubia cordifolia</i>	230
3.5.3. Экспрессия <i>CDPK</i> в трансгенных культурах	232
3.5.4. Обсуждение результатов по влиянию генов <i>rol</i> на экспрессию <i>CDPK</i>	242
3.6. Влияние гена <i>rolB</i> на молекулярный механизм биогенеза микроРНК.....	246
3.7. Влияние гена <i>rolB</i> на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией и защитой растений	251
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	257
ВЫВОДЫ	261
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	263
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	264

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Почвенные бактерии *Rhizobium rhizogenes* способны переносить область транспортной ДНК (Т-ДНК) своей плазмиды Ri (от англ. *root inducing*) в геном растений. Это природный механизм трансформации, безопасный для человека или животных, который приводит к появлению природно-трансгенных растений и является примером горизонтального переноса генов между про- и эукариотическими организмами (Matveeva and Otten, 2019). В составе Т-ДНК агробактерий содержатся гены с известными функциями, обеспечивающими биосинтез опинов и растительных гормонов, а также малоизученные гены семейства *plast*, к которым, в частности, относятся гены *rol* (от англ. *root loci*). Последние которые как в отдельности, так и в комбинации друг с другом, способны вызывать неопластический рост с образованием «волосатых» корней, а также другие морфологические и физиологические изменения в трансформированных растениях и клеточных культурах. Индукция «волосатых» корней агробактерией возможна практически у любых двудольных растений и с точки зрения биотехнологии интересна тем, что в условиях *in vitro* данный тип ткани способен к неограниченному гормон-независимому росту и активной продукции вторичных метаболитов (Stepanova et al., 2022). Высокая генетическая стабильность трансформированных корней благоприятствует их применению для получения рекомбинантных белков и вакцин (Gutierrez-Valdes et al., 2020). Генетически трансформированные корни также представляют собой ценную модель для исследований в области фиторемедиации, физиологических процессов и путей биосинтеза у растений (Doran, 2009; Ono and Tian, 2011; Sharma et al., 2013).

Отдельные гены *rol* давно привлекают внимание исследователей своими необычными свойствами, особенностями происхождения и эволюции, а также значительным потенциалом в области биотехнологии. Накопленные данные подчёркивают значимость этих генов как регуляторов в разнообразных аспектах жизнедеятельности растений — начиная от гормонального баланса и заканчивая

защитными механизмами и метаболизмом (Павлова и др., 2013; Mauro et al., 2017; Paolis et al., 2019). Несмотря на эти значительные успехи в изучении генов *rol*, есть существенные пробелы в понимании молекулярных механизмов их действия, что ограничивает их практическое применение. Белки, кодируемые генами *rol*, не имеют какой-либо четкой гомологии с известными белками растений или бактерий, а данные об их ферментативной активности немногочисленны и противоречивы. Более того, было выяснено, что гены *rol* могут оказывать плеiotропное воздействие на процессы роста и вторичного метаболизма. Поэтому изучение молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе действия генов *rol*, а также анализ их воздействия на биосинтетические процессы в растительных клетках представляют собой актуальное направление научных исследований.

Клеточные культуры растений являются ценным инструментом биотехнологии для исследования молекулярных и физиологических процессов в контролируемых условиях. В отличие от растений, культуры клеток обеспечивают генетически однородный материал, что повышает воспроизводимость и упрощает анализ данных. Особый интерес представляет использование клеточных культур для получения вторичных метаболитов растений — уникальных соединений, обладающих широким спектром биологических эффектов и имеющих значительный потенциал в разработке новых лекарственных средств. Эти метаболиты включают алкалоиды, флавоноиды, терпеноиды и многие другие соединения, которые могут служить мощными антиоксидантами, антимикробными, противовоспалительными и противоопухолевыми агентами. Важно отметить, что клеточные культуры позволяют не только обойти ограничения, связанные с сезонностью и изменениями климата, но и увеличить выход ценных веществ, зачастую недоступных или сложных для извлечения из традиционных растительных источников. Методы генетической инженерии значительно расширяют возможности модификации вторичного метаболизма в клеточных культурах растений, способствуя увеличению их биотехнологического потенциала.

Степень разработанности темы. Долгое время считалось, что исключительной функцией генов *rol* является воздействие на гормональный статус трансформированных клеток. Однако такая упрощенная «гормональная» гипотеза со временем утратила актуальность в связи с появлением новых сведений о действии *rol*-генов на разнообразные аспекты функционирования растительных клеток, не связанные напрямую с эффектами фитогормонов. Также оставался открытым вопрос о влиянии генов *rol* на экспрессию генов, ответственных за биосинтез вторичных метаболитов, и о стабильности индуцированных ими изменений метаболизма.

Активные формы кислорода (АФК) служат не только фактором защиты растений от патогенных микроорганизмов, но и являются важными интермедиатами сигнальных систем в регуляции роста, развития и ответов на абиотические стрессовые условия. Тем не менее, особенности взаимодействия *R. rhizogenes* с растениями в контексте метаболизма АФК оставались неизвестны. Этот вопрос представляет значительный интерес для биотехнологии в связи с потенциальным влиянием АФК на механизмы защиты растений и адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось выявление молекулярных механизмов действия агробактериальных генов *rol* на биосинтез вторичных соединений, метаболизм АФК и устойчивость растительных клеток к абиотическим стрессовым факторам. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить особенности *rol*-опосредованной регуляции вторичного метаболизма в клеточных культурах лекарственных и модельных растений.

2. Определить влияние отдельных генов *rolB* и *rolC*, а также трансформации диким штаммом *R. rhizogenes* A4, на содержание АФК в трансгенных клетках и на их устойчивость к абиотическим стрессовым воздействиям.

3. Выявить взаимосвязь между содержанием АФК, экспрессией генов антиоксидантной системы и НАДФН-оксидазы в трансформированных клетках растений.

4. Оценить участие Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ в *rol*-опосредованных реакциях трансформированных растительных клеток.

5. Изучить экспрессию генов, связанных с биогенезом микроРНК, гормональной регуляцией и защитными механизмами, в *rolB*-трансгенных клеточных культурах.

Научная новизна и практическая значимость работы. Установлено, что гены *rolA* и *rolB* способны длительное время поддерживать высокий уровень биосинтеза антрахинонов в трансгенных клеточных культурах марены сердцелистной. Гены *rol* увеличивают синтез антрахинонов путем активации экспрессии ключевых генов их биосинтеза – изохоризмат-синтазы (*ICS*), О-сукцинилбензоат-КоА-синтазы (*OSBS*) и О-сукцинилбензоат-КоА-лигазы (*OSBL*) и изопентенилдифосфат-дельта-изомеразы (*IPPi*). При этом максимальный эффект активации под действием *rolB* проявляется сразу после трансформации, тогда как *rolA* вызывает постепенное повышение уровня продукции антрахинонов в процессе культивирования трансгенных клеток.

Впервые выявлена способность генов *rol*, как по отдельности, так и в составе нативной Т-ДНК агробактерий, ингибировать продукцию внутриклеточных АФК. Данный эффект проявляется как в нормальных условиях, так и при воздействии стрессовых факторов, обеспечивая повышенную устойчивость трансгенных клеток к неблагоприятным воздействиям.

Установлено, что гены *rol* по-разному осуществляют генетическую регуляцию путей генерации и детоксикации АФК трансгенных клеток. Ген *rolC* способствует снижению продукции АФК, ингибируя экспрессию НАДФН-оксидаз, тогда как эффект *rolB* связан с активацией транскрипции генов антиоксидантных ферментов.

Впервые охарактеризовано воздействие гена *rolB* на биогенез микроРНК, а также экспрессию белков теплового шока и циклофилинов, связанных с гормональной регуляцией и защитными реакциями растений.

Достигнута эффективная активация вторичного метаболизма в клетках лекарственных растений, используя метод генетической трансформации генами *rol*. В клеточной культуре марены сердцелистной данный подход позволяет многократно увеличить продукцию антрахинонов по сравнению с контрольной культурой. В трансформированных корнях кирказона маньчжурского концентрация магнофлорина достигла значений, превышающих показатели дикорастущей лианы.

Методология и методы исследования. В работе применяли современные методы биотехнологии, генной инженерии и молекулярной биологии растений. Инструментальные методы анализа включали полимеразную цепную реакцию в реальном времени, жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией, конфокальную микроскопию и секвенирование ДНК. В ходе диссертационной работы были использованы информационные ресурсы, включая базы данных GenBank и TAIR. Для анализа и обработки экспериментальных данных были применены специализированные программные пакеты, такие как Phym1, Phylip, ProtTest, MUSCLE и MEGA.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Гены *rol* обеспечивают стабильную и регулируемую активацию биосинтеза различных классов вторичных метаболитов растений: антрахинонов, производных фенантрена, индольных глюкозинолатов и флавоноидов. Повышение продукции обусловлено активацией транскрипции генов биосинтеза вторичных метаболитов. При этом эффекты генов *rolB* и *rolC* достигают максимальных значений сразу после трансформации и остаются стабильными на протяжении длительного культивирования клеток. Стимулирующие свойства гена *rolA* усиливаются при длительном культивировании.

2. Гены *rol* модулируют окислительно-восстановительный гомеостаз, подавляя продукцию внутриклеточных АФК. Механизм действия генов *rol* на продукцию АФК различается. Ген *rolC* снижает, а ген *rolB* активирует экспрессию НАДФН-оксидаз и ферментов антиоксидантной системы. В клетках, трансформированных диким штаммом *R. rhizogenes*, наблюдается смешанный эффект: снижение экспрессии НАДФН-оксидаз и активация некоторых антиоксидантных генов. Поддержание заданного уровня АФК достигается также посредством регуляции изоформ *CDPK*, обеспечивающих снижение ее внутриклеточного содержания.

3. Подавление продукции внутриклеточных АФК отдельными генами *rolB* и *rolC*, а также диким штаммом *R. rhizogenes* А4, обеспечивает трансгенным культурам повышенную устойчивость к абиотическим стрессовым воздействиям. Показатели жизнеспособности в трансгенных культурах были выше, тогда как ответная реакция на стресс – менее выражена, что также свидетельствует о большей устойчивости.

4. Плеойтропное влияние *rolB* на физиологические и метаболические процессы трансформированных клеток связано с активацией отдельных компонентов аппарата РНК-интерференции, включая ключевые белки созревания, стабилизации и функционирования микроРНК, а также белков теплового шока и циклофилинов, обеспечивающих, в том числе, повышение устойчивости к стрессовым факторам.

Степень достоверности результатов. Степень достоверности полученных в ходе диссертационной работы результатов подтверждается использованием валидированных аналитических методов, строгим соблюдением принципов научного эксперимента и комплексным подходом к анализу данных. Все эксперименты в рамках данного исследования проводились минимум в трех биологических повторах, сопровождаемых соответствующими контрольными испытаниями. Данные, собранные в ходе экспериментов, были подвергнуты статистическому анализу, включая проверку значимости наблюдаемых различий, с использованием *t*-критерия Стьюдента и многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Апробация работы. Материалы данной работы были представлены на следующих российских и международных конференциях и симпозиумах: Международная конференция “Биотехнология на рубеже двух тысячелетий” (Саранск, 2001), 7-ая Пущинская школа-конференция “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2003), 7-ая региональной конференция молодых ученых “Актуальные проблемы химии и биологии” (Владивосток, 2003), Всероссийская конференция "Химия и технология растительных веществ" (Саратов, 2004), региональная конференция “Исследования в области физико-химической биологии и биотехнологии” (Владивосток, 2004), 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (Тэгу, Южная Корея, 2013), The 8th International Conference on European Science and Technology (Мюнхен, Германия, 2014), Second European Conference on Biology and Medical Sciences (Вена, Австрия, 2014), XV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликована 31 работа, в том числе 17 научных статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 3 статьи в других периодических изданиях и 11 материалов конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, выбор методов, анализ результатов и подготовку публикаций. Химический анализ культур марены сердцелистной выполнен совместно с сотрудниками лаборатории химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН к.х.н. Мищенко Н.П. и д.х.н. Федоревым С.А. Фармакологическая активность антрахинонов определена совместно с коллегами из Алтайского государственного медицинского университета

(г. Барнаул). Вторичные метаболиты резуховидки Таля и кирказона маньчжурского анализировали совместно с н.с. Григорчук В.П. (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН). Цитотоксические свойства экстрактов из клеточных культур кирказона определены совместно с коллегами из лаборатории биомедицинских клеточных технологий Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета (г. Владивосток). Анализ содержания АФК с помощью конфокальной микроскопии проведён совместно с руководителем лаборатории клеточной биологии и биологии развития ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН к.б.н. Горпенченко Т.Ю.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 802 источника. Диссертация изложена на 353 страницах и содержит 61 рисунок и 18 таблиц.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему научному консультанту чл.-корр. РАН Булгакову В.П. за многолетнюю поддержку, ценные советы и рекомендации. Автор искренне благодарит академика Журавлева Ю.Н., д.б.н. Челомину Г.Н. и д.б.н. Картавцеву И.В. за плодотворную помощь при подготовке рукописи диссертации. Автор благодарит к.х.н. Мищенко Н.П., д.х.н. Федореева С.А. и н.с. Григорчук В.П. за неоценимый вклад в химическую часть настоящего исследования; к.б.н. Горпенченко Т. Ю. и чл.-корр. Аминина Д.Л. – за цитологические исследования и ценные консультации; н.с. Чернодед Г.К. – за помощь в получении и культивировании клеточных линий; к.б.н. Веремейчик Г.Н. – за помощь при определении экспрессии генов; к.б.н. Авраменко Т.Ю. и к.б.н. Югай Ю.А. – за помощь в экспериментальной работе. Автор также выражает искреннюю признательность всем своим коллегам.

В работе использовали оборудование ЦКП “Биотехнология и генетическая инженерия” ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Природный механизм переноса генов бактериями рода *Rhizobium*

1.1.1. Концепция генетической колонизации растений

Почвенные граммотрицательные бактерии рода *Rhizobium* (ранее *Agrobacterium*) относят к семейству Rhizobiaceae, класс альфа-протеобактерий. Наиболее известные представители семейства – *R. rhizogenes* (ранее *A. rhizogenes*) и *R. radiobacter* (ранее *A. tumefaciens*) – способны заражать широкий круг растений-хозяев используя механизм горизонтального переноса. В генно-инженерной практике агробактерии используют для трансформации двудольных и некоторых голосеменных растений, клеток животных и грибов, в том числе, дрожжей (Lacroix et al., 2006). Среди преимуществ использования бактерий в качестве генно-инженерного инструмента – простота и низкая стоимость процедуры, малая вероятность перестроек в ДНК, небольшое число копий и высокая стабильность вставки при трансформации. Кроме агробактерий способностью к генетической трансформации обладают и другие представители класса альфа-протеобактерий, но эффективность трансформации в этом случае гораздо ниже (Gelvin, 2017). Благодаря способности осуществлять перенос генетического материала между представителями разных царств, агробактерии стали объектом большого количества фундаментальных исследований, а также приобрели большое значение для промышленной биотехнологии.

Способность к трансгенезу обусловлена наличием у всех вирулентных штаммов агробактерий видоспецифичных Ti- (от англ. *tumor-inducing*) или Ri-плазмид (от англ. *root-inducing*), размер которых может достигать 250 тыс. п.н. В составе плазмид обнаруживается участок, который переносится в растительный геном – транспортная ДНК (Т-ДНК), содержащий гены, кодирующие ферменты биосинтеза опинов, растительных фитогормонов, а также гены, ответственные за процесс неопластической трансформации клеток растений, которые часто именуют онкогенами (Рисунок 1). Октопиновые и агропиновые типы плазмид содержат две копии Т-ДНК – T_L-ДНК и T_R-ДНК, в некоторых случаях также выделяют

центральную область между ними – T_c-ДНК (Gelvin, 2003; Gordon and Christie, 2014; Ozyigit et al., 2013) (Рисунок 1).

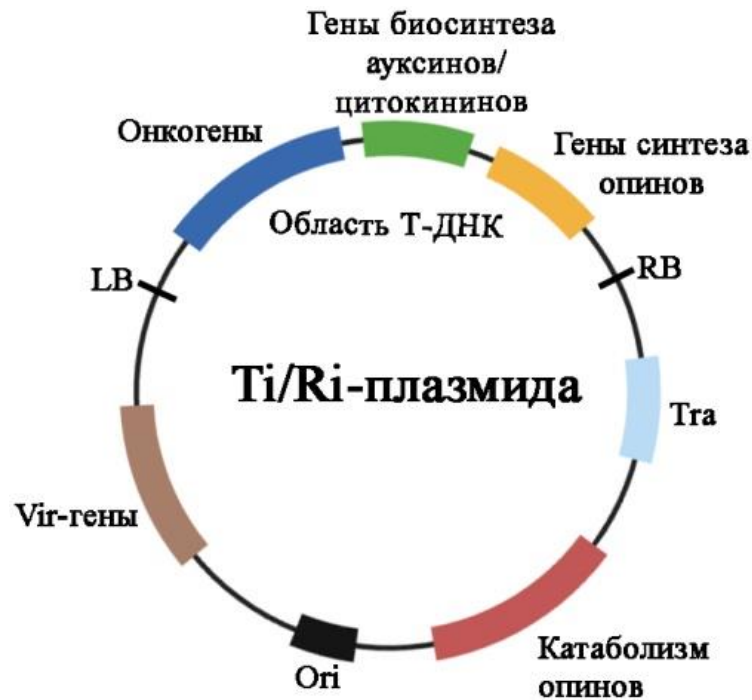


Рисунок 1 – Схематическая иллюстрация организации Ti- и Ri-плазмиды агробактерий. Левая (LB) и правая (RB) граница области T-ДНК, точка начала репликации (ori), область конъюгации (Tra), гены вирулентности (*vir*-гены).

Функция T-ДНК заключается в обеспечении жизнедеятельности бактерии посредством энергоресурсов растительной клетки. Размер природной T-ДНК может варьировать, достигая 30 тыс. п.н., тогда как в лабораторных условиях размер фрагмента ДНК, успешно перенесенного с помощью агробактерий, составил более 100 тыс. п.н. (Gelvin, 2003; Miranda et al., 1992). Временная экспрессия трансгенов может осуществляться без интеграции T-ДНК в растительный геном, тогда как для стабильной трансформации это условие является обязательным.

1.1.2. Молекулярный механизм переноса Т-ДНК

Для осуществления переноса и интеграции Т-ДНК в растительный геном в составе плазмид вирулентных штаммов содержится оперон, кодирующий факторы вирулентности *vir* (от англ. *virulence*). В составе корового оперона, общий размер которого составляет около 30 тыс. п.н., выделяют семь основных локусов (*virA*–*virG*). Внутри или рядом с ним могут обнаруживаться вспомогательные гены – *virF*, *virH*, *virJ*–*virM*, наличие которых не является обязательным для опухолеобразования (Melchers et al., 1990; Stachel and Nester, 1986; Kalogeraki and Winans, 1998). Известно также, что на ранних стадиях инфицирования принимают участие и гены, входящие в состав бактериального нуклеоида (Nester, 2015).

Активацию экспрессии генов *vir* может вызвать ряд факторов, включая присутствие фенольных соединений и некоторых полисахаридов растительного происхождения, низкий уровень фосфатов, пониженный уровень рН и другие (Lacroix and Citovsky, 2013). Для запуска транскрипции необходима двухкомпонентная система белков-активаторов VirA и VirG, постоянно присутствующих в бактериальных клетках в низких концентрациях. При связывании с сигнальной молекулой мембранный белок VirA, являющийся рецепторной гистидинкиназой, претерпевает димеризацию и автофосфорилирование, с последующим переносом фосфатной группы на VirG. Последний, в свою очередь, изменяет конформацию и выступает в качестве транскрипционного фактора, активируя экспрессию *vir* оперона (Jin et al., 1990).

Продукты генов *vir* – хеликаза VirD1 и нуклеаза VirD2 – участвуют в синтезе и процессинге/созревании Т-комплекса. Совместно они опосредуют вырезание одноцепочечных Т-ДНК в сайтах узнавания, представленных инвертированными повторами около 25 п.н., по которым вносятся одноцепочечные разрывы. После первого надреза VirD2 ковалентно присоединяется к 5'-концу Т-ДНК и вносит разрыв с 3'-конца (Scheiffele et al., 1995). Совместно с другими белками (VirD5, VirE2, VirF у *R. radiobacter*, GALLS-CT и GALLS-FL – *R. rhizogenes*) Т-комплекс

транспортируется в клетку-реципиент. Перенос Т-ДНК осуществляется через бактериальную систему секреции IV типа, также сформированную Vir белками. Секреция осуществляется непосредственно через полые пили, после чего комплекс Т-ДНК и Vir белков транспортируется из цитоплазмы в ядро. Перенос через ядерную мембрану опосредуют белки VirD2 и VirE2, взаимодействующие с 1 и 4 изоформами альфа-импортина (Bhattacharjee et al., 2008). В аминокислотной последовательности белков также обнаружены адресные сигналы для последующего транспорта их в ядро (Gelvin, 2012). В ядре осуществляется финальный этап трансформации, заключающийся в интеграции Т-ДНК в хромосомы растения.

1.1.3. Растительные белки-участники переноса Т-ДНК

Использование ресурсов растительной клетки начинается с момента проникновения комплекса Т-ДНК и Vir белков в цитоплазму. В перемещении комплекса внутри клетки задействованы белки цитоскелета: мутанты по генам актина и кинезина проявляли устойчивость к агробактериальной трансформации (Zhu et al., 2003a). Одним из главных «проводников» в ядро выступает транскрипционный фактор bZIP семейства – VIP1 (VirE2-interacting protein). Белок VIP1 выполняет функцию адаптера, связываясь в цитоплазме с VirE2 и импортином-альфа, что стимулирует перенос комплекса в ядро (Citovsky et al., 2004). В ядре с участием убиквитин-протеасомного комплекса происходит диссоциация белка VirE2 от комплекса (Anand et al., 2012; Tzfira et al., 2004).

В Т-ДНК отсутствуют собственные интегразы или рекомбиназы, поэтому для интеграции также необходимо задействовать ферментативный аппарат растительной клетки. До сих пор отсутствует единая концепция, описывающая механизм интеграции Т-ДНК в растительный геном, отсутствуют эксперименты, в которых удалось бы осуществить процесс *in vitro* (Gelvin, 2017). Возможные сценарии интеграции Т-ДНК в растительный геном включают гомологичную и негомологичную (незаконную) рекомбинацию. В первом случае цепь Т-ДНК

встраивается в местах разрыва благодаря наличию участков микрогомологии, которые образуют Уотсон-Криковские пары с выступающими концами ДНК в местах разрывов в хромосомах. Во втором, встраиванию Т-ДНК предшествует процесс синтеза второй цепи Т-ДНК, после чего дуплекс может встраиваться в геном с помощью механизма негомологичного соединения концов. В недавней работе Levy была обнаружена ДНК-полимераза TEBICHI, гомолог ДНК-полимеразы θ , участвовавшая в контроле процесса интеграции (Levy, 2016). Являясь частью системы репарации, этот фермент способен к достраиванию ДНК в местах альтернативного соединения концов на основе микрогомологий между Т-ДНК агробактерий и ДНК растения-хозяина. Мутации в гене, кодирующем ДНК-полимеразу θ , приводят к практически полному ингибированию стабильной трансформации, не влияя на эффективность временной экспрессии (van Kregten et al., 2016). Согласно предложенной гипотезе, этот фермент также выполняет функцию достраивания второй цепи Т-ДНК в сайтах интеграции (van Kregten et al., 2016).

С использованием дрожжевой модели было продемонстрировано, что для каждого типа интеграции характерен свой набор белков: хеликаза Ku70, белки репарации Rad50, Mre11, Xrs2, лигаза Lig4 и модификатор хроматина Sir4 являются необходимыми для осуществления незаконной рекомбинации, белки репарации двуцепочечных разрывов Rad51 и Rad52 определяют интеграцию по типу гомологичной рекомбинации (van Attikum et al., 2001; van Attikum and Hooykaas, 2003). Вероятно, выбор механизма интеграции связан с доступностью тех или иных белков. Это подтверждают данные, описывающие, что в отсутствие Ku70 возможна была только гомологичная рекомбинация, тогда как в отсутствие рекомбиназы Rad51 и Rad52 – наоборот (Nishizawa-Yokoi et al., 2012; van Attikum et al., 2001). Мутации в обоих генах приводили к полному ингибированию интеграции Т-ДНК.

Статистика накопленных данных указывала на то, что интеграция Т-ДНК осуществляется преимущественно в А/Т богатые участки, характерные для

промоторных областей (van Attikum and Hooykaas, 2003; Schneeberger et al., 2005). Однако в последующем исследовании Kim и соавторы установили, что встраивание T-ДНК в геном растений носит случайный характер (Kim et al., 2007). Интеграция T-ДНК происходила как в регионах, насыщенных и лишенных генов, так и в гетерохроматине, центромерах, теломерах и повторяющейся ДНК. Отсутствие предпочтений между транскрипционно активным хроматином и гетерохроматиновыми областями указывало на то, что потенциальными мишенями при интеграции T-ДНК являются гистоны. Многочисленные исследования подтверждают участие гистоновых белков и других хроматин-модифицирующих факторов в процессе трансформации (Mysore et al., 2000; Yi et al., 2002; Zhu et al., 2003a; Anand et al., 2007; Crane and Gelvin, 2007; Tenea et al., 2009). Мутации генов, кодирующих специфические гистоны, деацетилазы и ацетилтрансферазы гистонов, а также шаперона SGA1 гистона H3 снижало уровень интеграции T-ДНК в геном (Mysore et al., 2000; Kalogeraki et al., 1998; Kim et al., 2007). Напротив, сверхэкспрессия некоторых гистонов приводила к увеличению чувствительности растений (Yi et al. 2002; Iwakawa et al., 2017; Tenea et al., 2009). Известно, что в растительных и дрожжевых клетках VirD2 взаимодействует с гистонами (Wolterink-van Loo et al., 2015), ферментами метилирования ДНК, MYST-подобной гистон-специфической ацетилтрансферазой 2 (Lee et al., 2012). Ещё одним партнером VirD2 является киназа циклин-зависимой киназы САК2М. Фосфорилируя большую субъединицу РНК-полимеразы II, которая, в свою очередь, рекрутирует белки базального транскрипционного комплекса, эта киназа участвует в инициации транскрипции (Bakó et al., 2003). В присутствии VirE2 VIP1 мог связываться с очищенными мононуклеосомами *in vitro* (Lacroix et al., 2008). Установлено взаимодействие VIP1 с коровыми гистонами H2A, H2B, H3 и H4 *in vitro*, а с гистоном H2A – *in planta* (Loyter et al., 2005). На эффективность трансформации также оказывали влияние мутации в генах рецепторной киназы EFR (Zipfel et al., 2006), MAP3 киназы, мишенью которой является VIP1 (Djamei et al., 2007),

транскрипционного фактора MTF1 MYB семейства (Djamei et al., 2007), импортинов (Bhattacharjee et al., 2008; Zhu et al., 2003b), фосфатаз семейства PP2C (Тао et al., 2004) и циклофилинов (Deng et al., 1998). Большое количество белков-участников свидетельствует о сложных регуляторных механизмах, активируемых в процессе интеграции T-ДНК.

Размер и состав T-ДНК у различных представителей рода *Rhizobium* сильно различаются, они могут приобретать мозаичную структуру в результате обмена отдельных участков ДНК между штаммами (Рисунок 2) (Otten, 2018).

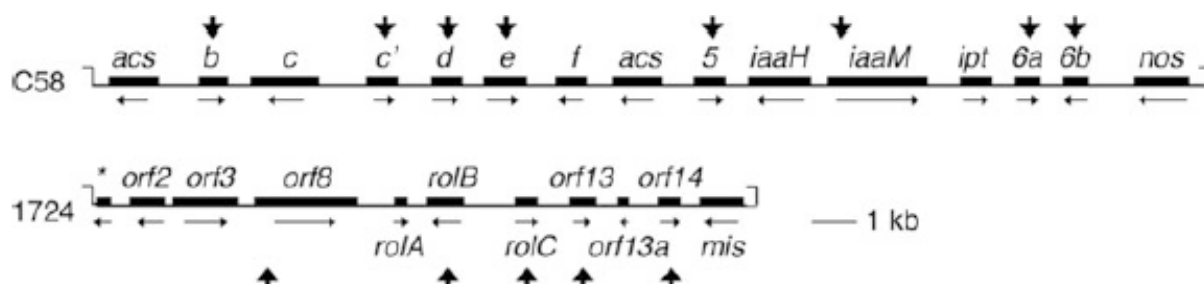


Рисунок 2 – Структурная организация области T-ДНК Ti (на примере штамма *R. radiobacter* C58) и Ri (на примере штамма *R. rhizogenes* 1724) плазмид. Гены семейства *plast* отмечены черными стрелками (Otten, 2018).

Можно выделить несколько функциональных групп генов T-ДНК (Chen and Otten, 2016). Первая группа генов кодирует синтез опинов, например, ген *nos* нопалинсинтазы. Вторая группа кодирует ферменты биосинтеза фитогормонов. Это гены *iaaM* триптофанмонооксигеназы и *iaaH* индолацетамидгидролазы, которые обычно встречаются вместе и кодируют синтез индолуксусной кислоты, и ген *ipt* изопентенилтрансферазы для синтеза цитокининов. Третья группа – это семейство генов *plast* (*rolB*, *rolC* и *6b*). К четвертой группе «сиротских» генов относят остальные малоизученные гены T-ДНК (таких как *orf13a*, *orf511* или *rolA*) (Otten, 2018).

1.2. Представители семейства *plast* онкогенов

Часть опухолеобразующих генов в составе Т-ДНК принадлежит к *plast* семейству, сформированному на основе гомологии белковых, но не нуклеотидных последовательностей (Levesque et al., 1988; Mohajjel-Shoja et al., 2011). В названии семейства заложено общее свойство фенотипической пластичности, обусловленное активностью генов.

Первые сведения о Plast белках получены для штаммов А4 *R. rhizogenes* (RolB, RolC, Orf13 и Orf14, N-терминальная часть Orf8) и 15955 *R. radiobacter* (p3', p5, p7, 6a, 6b и N-терминальная часть IaaM) (Levesque et al., 1988). В зависимости от значений изоэлектрической точки, полученных для аминокислотных последовательностей, авторы разделили белки на две подгруппы: в группу кислых белков вошли RolC, Orf13, Orf14, 6a и 6b, остальные – в группу основных. Авторы сделали важное наблюдение, что филогенетически близкородственные гены *plast* могут иметь схожие функции. Кроме того, они часто ассоциированы с другими генами Т-ДНК (*rolB*, *rolC* и *rolA*; *rolC* и *orf13*; *orf13* и *orf14*; *6b* и *6a* или 3'), что также косвенно может указывать на их функциональную взаимосвязь.

К настоящему времени, в семейство *plast* онкогенов входит 17 подсемейств, включены гены, значительно дивергировавшие друг от друга в процессе эволюции, что затрудняет определение точных границ группы. До сих пор не стандартизована классификация генов *plast*, также, как и их номенклатура (Otten, 2018). На данный момент, известно более 60 представителей *plast* генов из различных организмов (Otten, 2018). В их число входят штаммы *R. rhizogenes*, *R. radiobacter*, *R. vitis*, несколько представителей бактерий не из рода *Rhizobium*, а также растения, которые относят к природным трансформантам (Matveeva and Otten, 2019). В данной главе будут рассмотрены представители семейства *plast* генов, обладающие наиболее выраженными опухолеобразующими свойствами, включая гены *rolB*, *rolC*, *orf13* и *orf14* *R. rhizogenes*, а также *6a* и *6b* *R. radiobacter*.

В пионерных исследованиях Т-ДНК *R. radiobacter* с помощью сайт-направленного мутагенеза был выявлен локус *tml* (*tumor morphology large*), который отвечал за образование обширных опухолей (Garfinkel et al., 1981). В локусе содержатся два *plast* гена – *ba* и *bb*. Ген ***ba***, также известный как *ops* (*octopine/nopaline secretion*), изучен плохо, недостаточно данных о фенотипах трансформированных растений, отсутствуют сведения о его тканеспецифичной экспрессии (Otten, 2018). Однако *ba* примечателен тем, что мутантный по этому гену штамм не секретирует ни октопин, ни нопалин (Salomon et al., 1984). Это обстоятельство может указывать на влияние *ba* на продукцию опинов посредством октопинсинтазы (Otten, 2018). Ген ***bb***, напротив, один из наиболее изученных представителей *plast* семейства, является консервативным и активно транскрибируемым в Т-ДНК всех штаммов *R. radiobacter* (Willmitzer et al., 1983; Otten and De Ruffray, 1994). Известно 6 аллелей гена *bb*, продукты которых обладают различающимися биологическими активностями (Tinland et al., 1989). Ещё три варианта гена *bb* обнаружены у природных трансформантов (Chen et al., 2018). В связи с фенотипическими особенностями трансформированных растений ему приписывали ауксин- (Leemans et al., 1982; Spanier et al., 1989; Bonnard et al., 1989) и цитокинин-подобное действие (Bonnard et al., 1989; Wabiko and Minemura, 1996). Тем не менее, однозначная роль *bb* в метаболизме фитогормонов не определена, накопленные экспериментальные данные являются противоречивыми (Takahashi et al., 2013; Otten, 2018). Активность промоторов *bb* увеличивалась как в присутствии ауксинов (Bagyan et al., 1995), так и цитокининов (Gális et al., 1999; Gális et al., 2002), а иногда положительный эффект разной степени вызывали оба гормона (Reddy et al., 2003). Трансформация каланхоэ *Kalanchoe tubiflora* геном *bb* вызывала появление опухоли, в отличие от генов *iaa* и *ipt*, что указывало на нетипичные для генов гормональной регуляции механизмы индукции опухолеобразования (Hooykaas et al., 1988). Сверхэкспрессия *bb* также выявила множественные морфологические отклонения, не характерные для «гормональных» фенотипов: образование

трубчатых и двойных листьев, двойных цветков, нематочных сосудистых пучков и листовых зачатков от основания крупных железистых трихом (Helfer et al., 2003; Chen and Otten, 2016). К настоящему времени описано более 70 морфологических и анатомических изменений, характерных для *bb*-трансформантов, но главными остаются хлороз листьев, увеличение размера клеток, эктопические побеги и сосудистые пучки (Chen and Otten, 2015; Chen et al., 2016; Chen et al., 2018). Разнообразие аннотированных фенотипов демонстрирует плеiotропный эффект *bb*: ген затрагивает все основные системы жизнеобеспечения клетки, регулирующие первичный (Clément et al., 2006; Clément et al., 2007; Jin et al., 2017) и вторичный (Gális et al., 2002; Gális et al., 2004) метаболизм, гормональный баланс (Gális et al., 2002; Kakiuchi et al., 2006; Takahashi et al., 2013), аппарат транскрипции (Kitakura et al., 2008) и РНК-интерференции (Wang et al., 2011; Chen et al., 2018).

Ген *orf13* выделен из Т-ДНК *R. rhizogenes*, и, совместно с генами *rol*, стимулирует образование «волосатых» корней. Экспрессия *orf13* приводит к значительным изменениям в фенотипе трансформированных растений, изменяются форма и цвет листовой пластины (Hansen et al., 1993; Satuti et al., 2007), происходит стимуляция деления клеток и рост апикальной меристемы, при этом отмечается уменьшение размера растений вплоть до карликовости (Stieger et al., 2004; Kodahl et al., 2016). Для *Orf13* обнаружено наличие домена связывания с белком ретинобластомы растений (Stieger et al., 2004), показано взаимодействие с транскрипционными факторами семейства KNOX, тогда как ни уровень гормонов, ни чувствительность к ним в трансформантах не отличались от контроля (Stieger et al., 2004). Высказано предположение, что *Orf13* опосредует фенотипические эффекты посредством транскрипционной регуляции (Otten, 2018).

Ещё один представитель генов *plast* – *orf14* – близкородственный *orf13*, в отличие от остальных, не вызывает появления характерных фенотипических особенностей, которые могли бы указывать на его функции (Lemcke and Schmölling, 1998a; Aoki, 2004). Поэтому его, а также *orf13*, иногда относят к вспомогательным

генам, необходимым для усиления активности других опухолеобразующих генов. Так, их присутствие усиливает корнеобразование, вызванное генами *rol* (Aoki and Syono, 1999; Mohajjel-Shoja et al., 2011).

Рассмотренные представители семейства *plast* не исчерпывают его разнообразия, которое также обеспечивается многочисленным количеством штаммов агробактерий с неизученными вариантами генов. Хотя исследования с использованием индивидуальных генов *plast* будут важны для понимания их собственной активности, необходимо помнить, что эти гены эволюционировали в сочетании с другими генами Т-ДНК (Otten, 2018).

Множественные фенотипические эффекты, вызванные экспрессией *plast* генов, затрудняют определение биологических функций соответствующих белков. Кроме того, фенотип трансформированных растений зависит от места вставки в геноме (эффект положения) и уровня экспрессии трансгена. Отдельного упоминания заслуживает наличие у генов «первичных» и «вторичных» эффектов, связанных со значительными пертурбациями в метаболизме растения (Otten, 2018). Кроме того, гены обладают собственными регуляторными механизмами, обеспечивающими их корректную работу как на стадии индукции опухоли, так и в процессе последующего синтеза опинов (Otten, 2018). Результаты многочисленных исследований функций индивидуальных генов Т-ДНК до сих пор остаются во многом противоречивыми. Очевидно, что модель, представляющая наиболее простые и убедительные объяснения способа действия рассматриваемых генов, до сих пор не найдена. Тем не менее, интерес к агробактериальным генам Т-ДНК не ослабевает уже несколько десятков лет. Отдельного внимания заслуживают гены *rol*, которые относят к числу наиболее сильных в отношении вызываемых эффектов и часто используемых агробактериальных генов в биотехнологии растений.

1.3. Гены *rol*

1.3.1. Общая характеристика генов *rol*

В составе Т-ДНК *R. rhizogenes* были обнаружены 18 открытых рамок считывания, которые определяли возникновение синдрома «волосатого» корня (White et al., 1985; Tepfer, 1984; Durand-Tardif et al., 1985). Возглавляют группу гены *rolA*, *B*, *C* и *D* (от англ. *root locus*), соответствующие открытым рамкам считывания *Orf10*, *11*, *12* и *15*, соответственно (Slightom et al., 1986; Costantino et al., 1994). Совместная экспрессия генов *rol* приводит к формированию разнообразных фенотипов, среди которых наиболее часто встречаются низкорослые растения со сморщенными и мелкими листьями, укороченными междоузлиями и мощной корневой системой (Spena et al., 1987). Потеря апикального доминирования и фертильности, нарушение цветения и морфологии цветков, ветвистость – таков неполный список морфологических отличий трансформантов (Casanova et al., 2005) (Рисунок 3). Стоит отметить, что благодаря столь разнообразным морфогенетическим эффектам, гены *rol* часто используют в цветоводстве для создания новых сортов декоративных растений.

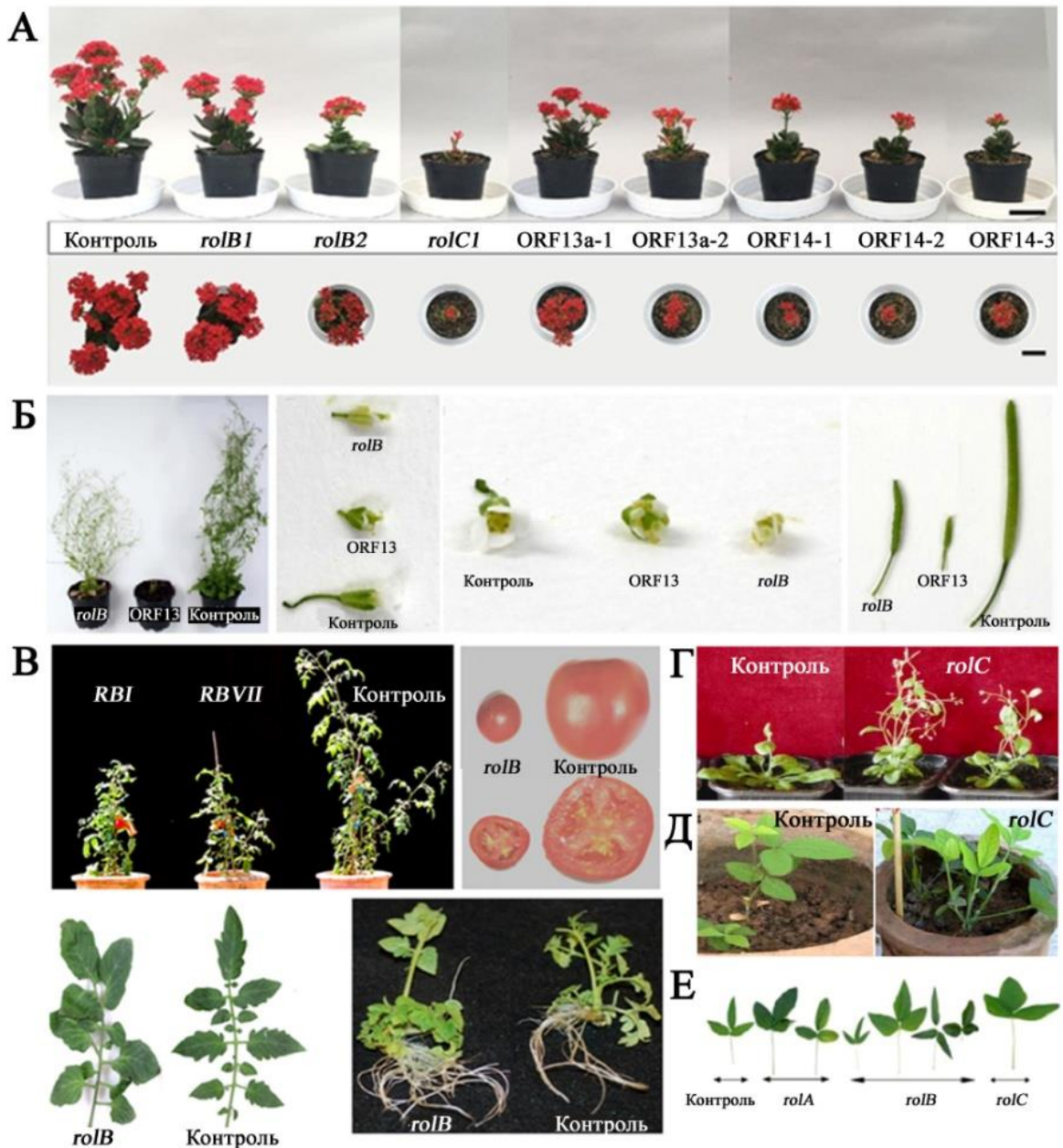


Рисунок 3 – Фенотипические особенности трансгенных растений, экспрессирующих отдельные агробактериальные гены. **А** – растения *Kalanchoë blossfeldiana*, трансформированные генами *rolB*, *rolC*, *ORF13* и *ORF14* (Favero et al., 2021); **Б** – растения *Arabidopsis thaliana*, трансформированные генами *rolB* и *ORF13* (Kodahl et al., 2016); **В** – растения *Solanum lycopersicum*, трансформированные геном *rolB* (Arshad et al., 2014); **Г** – растения *A. thaliana*, трансформированные геном *rolC* (Mohajjel-Shoja et al., 2011); **Д** – растения *Glycine max*, трансформированные генами *rolA*, *rolB* и *rolC* (Zia et al., 2010).

Экспрессии комбинации генов *rolABC* достаточно для индукции фенотипа «волосатого» корня (Schmülling et al., 1988). Индивидуальная экспрессия генов *rolA-C*, но не *rolD*, приводит к схожим эффектам, что и трансформация плазмидой дикого типа (Spano et al., 1988; Mauro et al., 1996). Примечательно, что белки, кодируемые *rol*-генами, не обладают выраженной гомологией с известными белками, депонированными в базы данных (Vilaine et al., 1998; Ridgen and Carneiro, 1999; Filippini et al., 1995). Растения, трансформированные генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, характеризуются измененным гомеостазом фитогормонов, главным образом, гиббереллинов, ауксинов и цитокининов.

1.3.2. Ген *rolA*

Морфогенетические эффекты *rolA*. Для растений, трансформированных геном *rolA*, характерными признаками являются сморщенные листья, укороченные междоузлия, задержка в цветении и неполноценная корневая система (Carneiro and Vilaine, 1993; Schmülling et al., 1988; Sinkar et al., 1988). Конститутивная экспрессия гена *rolA* приводит к образованию карликовых растений с мелкими листьями и компактными соцветиями у табака *Nicotiana tabacum*, томата *Solanum lycopersicum* L. (Dehio et al., 1993; Bettini et al., 2016a). Распределение транскриптов *rolA* в растении уменьшалось в ряду: стебель, листья и корень (Carneiro and Vilaine, 1993). Также авторы отмечают снижение содержания фитогормонов цитокининов, гиббереллинов, этилена и абсцизовой кислоты (Maurel et al., 1991; Dehio et al., 1993; Moritz and Schmülling, 1998; Bettini et al., 2016a). В *rolA*-трансформированных растениях томата с тремя копиями трансгена уровень индолилуксусной кислоты и абсцизовой кислоты был на 30–35% ниже, чем в контроле, тогда как присутствие одной копии приводило к ещё более значительному понижению их содержания (Bettini et al., 2016a).

Установлено наличие, по крайней мере, трех доменов в составе промотора гена *rolA*: А, В и С, которые определяют накопление транскриптов *rolA* в разных органах

(Carneiro and Vilaine, 1993). Биоинформационный анализ выявил, что домен А содержит участок, гомологичный ДНК-связывающему мотиву GT-2 гена *phyA* фитохрома А риса (Dehesh et al., 1996). Также в его составе выявлены DUE/NDE элементы, гомологичные таковым у ауксин-регулируемых генов сои (McClure et al., 1989; Körber et al., 1991). Домены В и С содержат последовательности, гомологичные энхансеру OCS (OCTOPINE SYNTHASE) и сайту связывания фактора ASF-1 (ACTIVATING SEQUENCE FACTOR 1) и промотора вируса 35S табачной мозаики, соответственно. Увеличение размера делеций промоторной области сопровождалось изменением распределения транскриптов мРНК *rolA* в разных частях растения, и исчезновением соответствующих фенотипических проявлений (Carneiro and Vilaine, 1993; Guivarch et al., 1996). В отличие от остальных генов Т-ДНК, *rolA* экспрессируется в клетках агробактерий, что обусловлено присутствием бактериального промотора в одном из интронов (Pandolfini et al., 2000). Интересно отметить биотическую устойчивость, которую *rolA*-трансформированные растения томата продемонстрировали в отношении *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* (Bettini et al., 2016a). Авторы связывают этот эффект с понижением уровня абсцизовой кислоты, которая является негативным регулятором устойчивости к болезням (Bettini et al., 2016a).

Биохимические функции белка RolA. Размер RolA составляет около 11.4 кДа и характеризуется высоким значением изоэлектрической точки (pI), соответствующей 11,2 кДа, в связи с чем была выдвинута гипотеза о его способности связываться с нуклеиновыми кислотами (Vilaine et al., 1998; Levesque et al., 1988). Аргументом в пользу этого предположения стал обнаруженный в составе RolA SPXX мотив, который также характерен для ДНК-связывающих белков, регулирующих активность генов (Suzuki, 1989). Предполагают, что сила связывания регулируется посредством фосфорилирования аминокислотного остатка серина. Однако Vilaine и соавторы (1998) опровергли это предположение, показав, что большая часть белка RolA ассоциирована с плазмалеммой, и ядерная локализация

для него не характерна (Vilaine et al., 1998). Ввиду отсутствия выраженного участка, который мог бы формировать трансмембранный домен, авторы заключили, что RolA является мембран-ассоциированным белком. Позднее Ridgen и Carneiro (1999) с помощью сравнительного моделирования белков обнаружили, что последовательность белка RolA принимает ту же укладку, что и ДНК-связывающий домен E2 бычьего папилломавируса-1, и в предварительных экспериментах *in vitro* продемонстрировали связывание слитого белка RolA-GST с ДНК (Ridgen and Carneiro, 1999).

Влияние на вторичный метаболизм. По сравнению с другими генами *rol*, влияние *rolA* на вторичный метаболизм, как правило, менее выражено, что косвенно подтверждается очень ограниченным числом примеров его использования для стимуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Показано, что в культурах корней табака экспрессия *rolA* стимулирует накопление никотина (Palazón et al., 1997), тогда как в культурах корней женьшеня *Panax ginseng* он не оказывал эффекта на накопление гинзенозидов (Bulgakov et al., 1998).

1.3.3. Ген *rolB*

Морфогенетические эффекты *rolB*. К настоящему моменту ген *rolB* обнаружен во всех Ri-плазмидах (Matveeva et al., 2015). Принято считать, что *rolB* является главным опухолеобразующим фактором: его индивидуальная экспрессия вызывает индукцию синдрома «волосатого» корня с эффективностью, близкой к таковой у дикого штамма (Cardarelli et al., 1987; Binns and Costantino, 1998), тогда как инактивация приводит к авирулентности (White et al., 1985). В T-ДНК содержится две копии гена *rolB*, одна из которых – *rolB_{TR}* – локализована на T_R-ДНК в 3'-области *aux1* гена (Bouchez and Camilleri, 1990). Тем не менее, продукт гена не является функциональным гомологом RolB – в нем отсутствует мотив CX₅R, характерный для суперсемейства тирозиновых фосфатаз, и он не способен проявлять морфогенетическую активность (Lemcke and Schmulling, 1998). Примечательно, что

этот мотив обнаружен только у штамма pRiA4, и отсутствует у других (Lemcke and Schmulling, 1998).

Одними из первых отличительных морфогенетических признаков *rolB*-трансформированных растений были описаны гетеростилия цветков и образование придаточных корней (Cardarelli et al., 1987; Walden et al., 1993). Для корней были характерны активный рост, ветвистость и выраженный плагиотропизм – признаки, возникающие при «гиперауксиновом» состоянии. Результаты независимых экспериментов указывали на влияние онкогена на уровень содержания ауксина или изменение чувствительности растительных клеток к нему (Carone et al., 1989; Bellincampi et al., 1996). Корни на трансформированных дисках табака образовывались без добавления ауксина, с интенсивным формированием корневой меристемы в каллусах. В ряде независимых работ у трансформантов были установлены повышенная чувствительность к ауксину (Maurel et al., 1991; Filippini et al., 1994), которая подавлялась добавлением антител к ауксин-связывающему белку (Venis et al., 1992). Кроме того, экспрессия *rolB* в табаке стимулировала некроз (Mohajjel-Shoja, 2011; Schmülling et al., 1988).

Промотор *rolB* активировался ауксином (Maurel et al., 1990), тогда как олигогалактурониды, функциональные антагонисты ауксинов, оказывали ингибирующий эффект на экспрессию гена (Bellincampi et al., 1996). Позднее было отмечено, что гормон-зависимая активация *rolB* присуща только меристемным клеткам, в остальных случаях она протекает по ауксин-независимому механизму (Carone et al., 1994).

Экспрессия трансгена тканеспецифична, что обусловлено *cis*-регуляторными особенностями доменов *A-E*, обнаруженных в промоторе гена *rolB* (Carone et al., 1994). Делеции и различные комбинации доменов приводили к перераспределению накопления транскриптов *rolB* в разных типах клеток. В табаке был обнаружен транскрипционный фактор NtBBF1 (*N. tabacum* RoIB DOMAIN B FACTOR 1) типа «цинковые пальцы», селективно связывающийся с коровой нуклеотидной

последовательностью АСТТТА домена В (De Paolis et al., 1996; Baumann et al., 1999), и активирующий экспрессию трансгена (Baumann et al., 1999). Этот тип транскрипционных факторов содержит высококонсервативный ДНК-связывающий Dof домен, который обнаруживается у филогенетически отдаленных видов (Altamura et al., 2004). Позднее был выявлен транскрипционный фактор RBF1 (RIBOSOME-BINDING FACTOR 1), связывающийся с доменом А (Filetici et al., 1997). Baumann и соавторы (1999) предположили, что после трансформации события развиваются по следующему сценарию: под действием NtBBF1 активируется ауксин-чувствительная экспрессия *rolB*, в результате чего увеличивается чувствительность к ауксину, стимулируется закладка новых меристем. Их дальнейшая судьба будет определяться локальной концентрацией фитогормонов (Altamura et al., 1994; Baumann et al., 1999). Примечательно, что ауксин был необходим для активации экспрессии *rolB*, однако, его взаимосвязь с NtBBF1 не была выявлена. Нельзя исключать вероятность участия других транскрипционных факторов, содержащих Dof домен, в процессах *rolB*-индуцированного морфогенеза (Altamura et al., 2004).

Биохимические функции белка RolB. Гены *rolB*, выделенные из разных штаммов, характеризуются структурной и функциональной гетерогенностью (Otten, 2018; Mauro and Bettini, 2021). Молекулярная масса белка RolB, выделенного из штамма pRiA4, составляет около 30 кДа, значение $pI = 7,01$. Неоднозначны данные о внутриклеточной локализации RolB: так, в штамме pRiA4 белок обнаруживают в плазмалемме, тогда как для RolB pRiA1724 показана ядерная локализация (Moriuchi et al., 2004).

К настоящему времени предложены три модели, объясняющие множественные эффекты гена *rolB*. Первая модель – ауксиновая – постулировала *rolB*-опосредованное высвобождение ауксинов из неактивных конъюгатов. Estruch и соавторы (Estruch et al., 1991a) предположили, что белок RolB обладает β -глюкозидазной активностью, однако, эта гипотеза была признана недействительной, так как уровень гетероауксина и его конъюгатов в трансформированных растениях

не изменялся (Nilsson et al., 1993a; Delbarre et al., 1994). Позднее у гетерологичного белка RolB был обнаружен мотив CX₅R, характерный для ферментов тирозиновых фосфатаз (Filippini et al., 1996), а сам белок был аннотирован как мембранный. Поскольку фосфатазы являются ключевыми ферментами в сигнальных каскадах, предполагают, что этот тип активности мог бы объяснить плеiotропизм гена *rolB*. Третья модель не описывает конкретных функций RolB, но предполагает его ядерную локализацию. В работе Moriuchi и соавторов (Moriuchi et al., 2004) было установлено, что RolB взаимодействует с белками семейства 14-3-3 *in vitro* и *in planta*. Ввиду отсутствия сигналов ядерной локализации у RolB, их взаимодействие с белками, опосредующими ядерный транспорт, выглядит весьма привлекательно, однако, несмотря на это, дальнейший молекулярный механизм функционирования RolB до сих пор не установлен.

Влияние на вторичный метаболизм. К настоящему моменту известно, что трансформация геном *rolB* приводит к активации вторичного метаболизма у представителей семейств Solanaceae, Araliaceae, Rubiaceae, Vitaceae и Rosaceae. Действие *rolB* распространяется на разные группы метаболитов, достигая более чем 100-кратной активации в отдельных случаях (Bulgakov et al., 2008). Экспрессия *rolB* стимулирует накопление резвератрола в винограде *Vitis amurensis* (Kiselev et al., 2007), приводит к 58–62% увеличению содержания ликопина в томате (Arshad et al., 2014), 9-ти кратному увеличению накопления артемизинина в *Artemisia carvifolia* (Dilshad et al., 2015), а также активации биосинтеза рутина, кофейной кислоты, кверцетина и изокверцетина (Mauro and Bettini, 2021).

1.3.4. Ген *rolC*

Морфогенетические эффекты *rolC*. Ген *rolC* pRiA4 кодируется 540 п.н., не имеет гомологов среди других представителей *Rhizobium*, и является самым консервативным из всех генов *rol* *R. rhizogenes* (Otten, 2018). Растения, трансформированные геном *rolC*, имеют характерный карликовый фенотип с

разросшимся корнем, сморщенными ланцетными листьями, а также демонстрируют нарушение апикального доминирования и раннее цветение (Oono et al., 1987; Schmülling et al., 1988; Oono et al., 1990). Транскрипционная активность гена тканеспецифична и уменьшается в ряду: корень, стебель, лист (Nakamura et al., 1988). Наиболее сильная экспрессия гена *rolC* характерна для паренхимных клеток флоэмы и протофлоэмы – в корне (Matsuki et al., 1989; Sugaya et al., 1989; Schmülling et al., 1989). Закономерность распределения транскриптов обусловлена наличием в промоторе гена участка, чувствительного к сахарозе, и его активность в клетках флоэмы связывают с высоким содержанием в них сахарозы (Yokooyama et al., 1994). Растения, сверхэкспрессирующие ген *rolC*, демонстрируют повышенную чувствительность к цитокининам, но не к другим фитогормонам (Schmülling et al., 1993).

Биохимические функции белка RolC. Ген *rolC* кодирует белок с молекулярной массой около 20 кДа и pI 4,9. Показана локализация RolC в цитозоле (Estruch et al., 1991b). Авторы также установили, что белок RolC является β-глюкозидазой, и положительно влияет на уровень свободных цитокининов, высвобождая их из неактивного конъюгированного состояния. Однако Nilsson и соавторы (1993b) не смогли воспроизвести этот эффект. Позднее Faiss и соавторы (1996) также подтвердили, что RolC не опосредует гидролиз цитокининовых гликозидов, но участвует в метаболизме сахаров. Также установлено взаимодействие RolC с транскрипционным фактором TCP13, регулирующим клеточную дифференцировку и морфогенез листа (Mohajjel-Shoja et al., 2011).

Влияние на вторичный метаболизм. Наряду с *rolB*, ген *rolC* также является активатором вторичного метаболизма, хотя, вероятно, уступает первому по силе оказываемого действия. Трансформация геном *rolC* стимулирует накопление алкалоидов тропанового (Bonhomme et al., 2000), пиридинового (Palazón et al., 1998a) и индольного (Palazón et al., 1998b) рядов, гинзенозидов (Bulgakov et al., 1998), изофлавоноидов (Grishchenko et al., 2013) и никотина (Palazón et al., 1998a).

Накопление гиосциамина и скополамина в *rolC*-трансформированных корнях *Atropa belladonna* увеличивалось в 12 раз (Bonhomme et al., 2000). Несмотря на способность *rolC* активировать биосинтез вторичных метаболитов, их продукция редко увеличивается более чем в 3–5 раз.

1.3.5. Ген *rolD*

Морфогенетические эффекты *rolD*. В отличие от других генов *rol*, данный представитель выявлен не у всех штаммов *R. rhizogenes*, но только в T_L-ДНК Ri-плазмид агропинового типа (Pavlova et al., 2014). Размер гена *rolD* составляет 1032 п.н. (Otten, 2018). Основной характерной чертой *rolD*-трансформированных растений является стимуляция закладки цветковых меристем и пазушных соцветий, что вызывает торможение роста и более ранний переход в генеративную фазу (Mauro et al., 1996; Altamura, 2004). Как и в случае *rolB*, в промоторе *rolD* обнаружен участок связывания с транскрипционными факторами, содержащими Dof-домен (Rangslang et al., 2018). Примечательно, что экспрессия гена *rolD* не оказывает выраженного эффекта на корнеобразование, но стимулирует закладку и рост боковых корневых меристем (Falasca et al., 2010). Сверхэкспрессия *rolD* также приводит к активации продукции белков PR-1 (от англ. pathogenesis-related proteins), участвующих в защитных реакциях (Bettini et al., 2003).

Биохимические функции белка RolD. Белок RolD, выделенный из штамма pRi1724, имеет молекулярную массу около 22 кДа и значение pI = 4,3. Продемонстрирована цитозольная локализация RolD (Estruch et al., 1991c). Белок RolD обладает активностью орнитинциклодезаминазы, которая катализирует НАД⁺-зависимое превращение орнитина в пролин (Trovato et al., 2001). Эффект раннего цветения у *rolD*-трансформированных растений связывают именно с повышением содержания пролина (Trovato et al., 2018). Аналогичный фермент у *R. radiobacter* участвует в катаболизме опинов, синтезированных из аргинина в клетках опухоли,

причем, несмотря на локализацию гена в T_i-плазмиде, он не входит в состав T-ДНК (Sans et al., 1988).

Влияние на вторичный метаболизм. К настоящему моменту нет сведений о влиянии гена *rolD* на вторичный метаболизм.

1.4. Растительные гомологи генов T-ДНК

Впервые нуклеотидная последовательность, гомологичная гену *rolB*, была обнаружена у *N. glauca* (White et al., 1983). Позднее были также обнаружены гены, гомологичные генам *rolC* и *rolD* (Furner et al., 1986). Поиск *plast* генов вне пределов группы бактерий рода *Rhizobium* привел к обнаружению растений, которые содержали клеточную T-ДНК (кТ-ДНК). Такие растения стали относить к естественным трансформантам или природно-трансгенным. К настоящему моменту известно более 23 представителей различных семейств (Matveeva and Otten, 2019). В их числе батат *Ipomoea batatas*, львиный зев *Lunaria vulgaris*, представители рода *Nicotiana*, некоторые из которых содержат несколько *plast* генов – *N. cordifolia* (*rolB*, *rolC*, *orf13*, *orf14*), *N. miersi* (*rolB*), *N. debneyi* (*rolC*) (Intrieri and Buiatti, 2001; Matveeva et al., 2015).

В большинстве случаев кТ-ДНК представляет собой частичные инвертированные повторы, исключение составляет кТ-ДНК льнянки, содержащая прямые повторы (Matveeva et al., 2012; Matveeva et al., 2015). Точное происхождение кТ-ДНК остается невыясненным, но, считается, что большинство последовательностей кТ-ДНК происходит от уже описанных для разных штаммов *R. rhizogenes* генов, которые попали в растения в результате горизонтального переноса (Chen and Otten, 2017; Matveeva and Otten, 2019).

В связи с тем, что гены кТ-ДНК являются транскрибируемыми, актуальным является вопрос их активности в растительных клетках. Ранее предполагали, что каждая пара генов T-ДНК/кТ-ДНК обладают схожими свойствами, так что, например, ген *rolC*, расположенный в кТ-ДНК, будет иметь ту же активность, что и

ген *rolC*, расположенный в бактериальной плазмиде Ri. При этом варианты формы одного гена могут кодировать продукты с разной биологической активностью, что затрудняет их аннотацию. Это справедливо также и для разных штаммов агробактерий. Например, гены *rolB* из штаммов 1855 и 2659 менее зависимы от присутствия ауксина для индукции корней в отличие от *rolB* из штамма A4 (Schmülling et al., 1993; Serino et al., 1994). Шесть различных генов *bb* из *R. radiobacter* и *R. vitis* различаются по своей способности вызывать опухоли (Helfer et al., 2002). Функциональные различия между геном кТ-ДНК и родственным геном Т-ДНК могут быть результатом различий между модельным штаммом и штаммом, который ввел кТ-ДНК, а не в результате дивергентной эволюции после переноса в растение (Aoki and Syono, 2000; Chen and Otten, 2017).

Роль кТ-ДНК в эволюции естественных трансформантов остается невыясненной. Возможно, что некоторые (или даже большинство) генов кТ-ДНК играли роль только в начальном событии трансформации/регенерации. После этого они могли утратить свою функцию либо из-за вредных эффектов, таких как, карликовость (*rolA* или *Orf13*) или некроз (*rolB*), либо потому, что они были выборочно нейтральными (Chen and Otten, 2017). В этом случае инактивация гена кТ-ДНК не будет иметь никаких эффектов и может привести к неверному выводу, что эти гены не имели значения в эволюции естественных трансформантов. Однако если гены кТ-ДНК вызывают морфологические изменения в других растениях при сильной и конститутивной экспрессии, их экспрессия в природных трансгенных организмах, вероятно, также может вызывать изменения, хотя они могут быть более ограниченными (Chen and Otten, 2017).

Очевидно, что данная тема требует дальнейших исследований как самих природно-трансгенных растений, так и генов их кТ-ДНК. Исследования механизмов дифференцировки различных типов волосистых корней и растений с синдромом «волосатого» корня важны для понимания того, как гены Т-ДНК/кТ-ДНК перенаправляют рост корней и других органов растений. Ввиду их сильной

морфогенетической активности, как гены Т-ДНК, так и кТ-ДНК могут найти применение в биотехнологии и сельском хозяйстве. Важным направлением будущих исследований будет удаление или сайленсинг генов кТ-ДНК, особенно, в геномах сельскохозяйственных сортов растений (Otten, 2018).

1.5. Структурная и функциональная организация сигнальных систем растений

В силу прикрепленного образа жизни растения вынуждены непрерывно адаптироваться к меняющимся условиям внешней среды. Внешние факторы, такие как свет, температурные колебания, состав и влажность почвы, так же, как и внутренние сигналы, включая действие регуляторов роста, метаболитов и стрессовых гормонов, а также РНК различного происхождения, оказывают непрерывное влияние на рост и развитие. В процессе эволюции у растений сформировались разнообразные системы внутри- и межклеточной регуляции, которые обеспечивают своевременную реакцию клетки и организма на молекулярном и физиологическом уровнях.

В составе компонентов внутриклеточных сигнальных систем выделяют рецепторы и сопряженные с их работой белки, молекулы вторичных мессенджеров и эффекторы, регулирующие их синтез и локализацию, адапторные белки и ферменты, выступающие посредниками в передаче сигнала, а также конечные мишени. Активация сигнального каскада начинается с взаимодействия белка-рецептора с лигандом и заканчивается изменением активности фермента-мишени или транскрипционного фактора.

На первом этапе осуществляется рецепция сигнала посредством нековалентного связывания между лигандом и участком белка-рецептора на поверхности клетки. Как правило, это взаимодействие сопровождается изменением конформации рецептора, которое передается на внутренний, цитоплазматический, участок (Falke et al., 1994). В то время как большинство рецепторов клеточной поверхности у

животных сопряжено с G-белками, большая часть рецепторов, обнаруженных у растений, обладают ферментативной активностью. Более того, в противовес широко распространенным у животных треониновым протеинкиназ, у растений наибольшее разнообразие отмечено для рецепторных Ser/Thr протеинкиназ, которые отличаются от аналогичных рецепторов животных (Rudrabhatla et al., 2006). Однако они также обнаруживают общие черты, сохраняя цитоплазматический Ser/Thr киназный и внеклеточный лиганд-связывающий домены. Последний наиболее часто содержит лейцин-богатые повторы (от англ. leucine rich repeat, LRR) вследствие чего данные белки относят к LRR-семейству. В геноме *A. thaliana* обнаружено более 600 генов рецепторных протеинкиназ, что составляет 60% от их общего количества (Shiu и Bleesker, 2003), около 300 из них – гены Ser/Thr протеинкиназ, и, по меньшей мере, 80 из них являются LRR-содержащими (Chakraborty et al., 2019). Семейство LRR-протеинкиназ является самым многочисленным у растений, однако, известны также 6 дополнительных семейств рецепторов, каждое из которых обладает уникальными особенностями внеклеточных доменов (Рисунок 4) (Tör et al., 2009). Кроме того, известны рецепторы растений PGIP- (от англ. polygalacturonase-inhibiting protein) и RLP-типа (от англ. receptor-like protein), а также внутриклеточные рецепторы NB-LRR (от англ. nucleotide binding) (Tör et al., 2009).

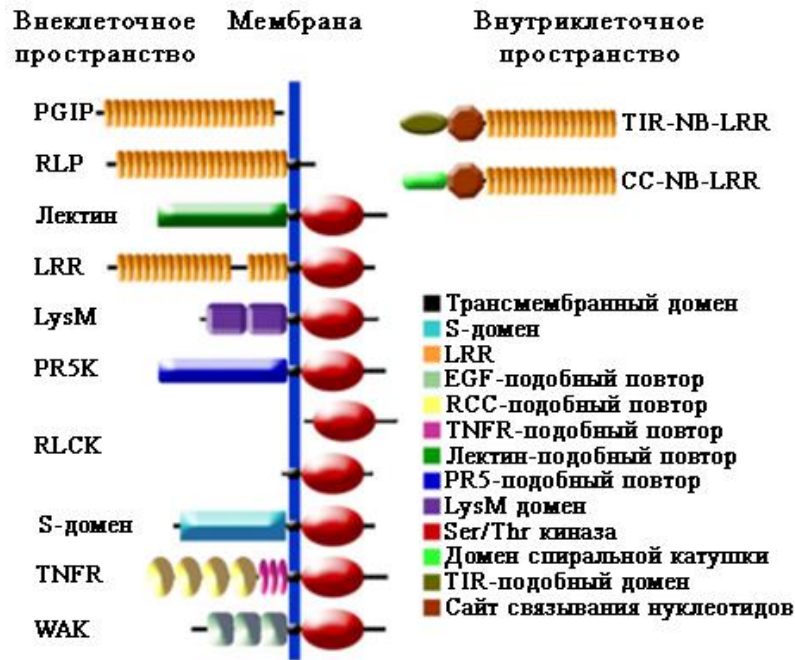


Рисунок 4 – Доменная организация внутри- и внеклеточных рецепторов растений (Tor et al., 2009).

Вторым этапом является распространение сигнала внутри клетки с помощью широкого спектра молекул – вторичных мессенджеров и белков. К вторичным мессенджерам растений относят ионы кальция, активные формы кислорода (АФК), циклические нуклеотиды и производные липидов (фосфоинозитиды, фосфатидную кислоту и другие) (Kruk et al., 2003). Трансдукция сигнала сопровождается изменением концентрации вторичных мессенджеров, процесс находится под контролем эффекторных белков. К этой группе относят как ферменты, осуществляющие синтез вторичных мессенджеров (фосфолипазы, нуклеотидциклазы), так и белки-переносчики и различные типы ионных каналов, от активности которых зависит транспорт молекул в цитоплазму или внутриклеточные депо. Отдельное звено передачи сигнала представлено адаптерными белками, которые не обладают ферментативной активностью, но являются необходимыми посредниками, через которых осуществляются межмолекулярные взаимодействия других белков-партнеров. К адаптерным белкам относят белки семейства 14-3-3 (Comparot et al., 2003; Pennington et al., 2018), RACK1 (Kundu et al., 2013), белки,

координирующие работу MAP-киназной сигнальной системы (Witzel et al., 2012; van Drogen and Peter, 2002), и другие.

Наиболее важными механизмами передачи сигнала являются взаимное связывание, ковалентные модификации и изменение микроокружения (Tuteja and Mahajan, 2007). Любое из перечисленных взаимодействий приводит к изменению конформации и, как следствие, активности белка или изменению концентрации вторичных мессенджеров. Как правило, в сигнальных системах задействовано множество участников, и изменение конформации/концентрации происходит последовательно, в связи с чем принято говорить о *каскадном* механизме передачи сигналов. Другим важным свойством внутриклеточной передачи сигнала его является *амплификация*, которая чаще всего реализуется при синтезе вторичных посредников в ответ на действие слабого стимула. Кроме того, некоторые сигнальные молекулы могут проявлять низкую специфичность, изменяя активность различных типов сигнальных посредников, расположенных «ниже по течению».

Заключительным этапом трансдукции сигнала является модуляция активности конечных мишеней. В растениях реализуются три основных сигнальных механизма, два из них связаны с увеличением/подавлением активности конечной мишени, третий – с инактивацией репрессора, или дерепрессией. Как правило, чаще всего речь идет о фосфорилировании/дефосфорилировании субстрата, однако, значительная часть сигнальных событий сопровождается активацией убиквитин-зависимого селективного протеолиза (Yu et al., 2016; Kelley, 2018; Tal et al., 2020). В другом случае результатом этих событий будет являться изменение транскрипционной активности генов, что приведет к изменению соотношения белков и, как следствие, стабильности гомеостаза растительной клетки в изменившихся условиях (Reddy et al., 2011).

В растениях обнаружены нуклеотидциклазные, MAP-киназная, фосфатидатная, липоксигеназная, НАДФН-оксидазная и кальциевая, NO-синтазная и протонная сигнальные системы. Дополнительный вклад в регуляцию вносят взаимодействия

между системами, а также пересечения с гормональной системой, опосредующей передачу сигналов, по крайней мере, девяти групп фитогормонов и гормон-подобных пептидов (Chaiwanon et al., 2016; Tavormina et al., 2015). Важную роль для функционирования всех известных сигнальных систем растений играют ионы кальция, которые обладают наиболее универсальными свойствами в передаче сигналов в качестве вторичных мессенджеров.

1.6. Кальциевая сигнальная система растений

1.6.1. Внутриклеточные токи ионов кальция

Ионы кальция (Ca^{2+}) являются универсальным вторичным посредником эукариотических организмов, и участвуют в ответных реакциях практически на все внешние стимулы и внутренние сигналы (Batistič and Kudla, 2012). Концентрация Ca^{2+} в растительных клетках достигает 100 нМ в апопласте, 200 нМ – в цитозоле и до нескольких миллимолей в основных внутриклеточных депо – вакуолях и эндоплазматическом ретикулуме (Bush et al., 1989; Clarkson et al., 1988). Такое распределение ионов кальция позволяет избежать токсичных эффектов, вызванных его избыточным содержанием в течение длительного времени (Sanders et al., 2002). Для поддержания гомеостаза кальция в клетке функционируют системы мембранного транспорта, включая каналы, насосы и переносчики, которые регулируют потоки кальция в ответ на поступающие сигналы.

Передача сигналов с участием ионов кальция происходит в три фазы: генерация, декодирование и передача сигнала к конечным мишеням (Reddy and Reddy, 2004). На первом этапе происходит активация кальциевых каналов, сопровождающаяся кратковременным локальным увеличением концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Кальций может поступать в клетки из внеклеточного пространства или высвободиться из внутриклеточных депо в результате действия вторичных мессенджеров на соответствующие каналы. Изменение концентрации кальция вызывают такие вторичные мессенджеры, как

никотиновая кислота аденин динуклеотидфосфат (NAADP), инозитол-3-фосфат (IP₃), инозитол-6-фосфат (IP₆), сфингозин-1-фосфат и циклическая АДФ-рибоза (Schumaker and Sze, 1987; Allen et al., 1995; Navazio et al., 2000; Lemtiri-Chlieh et al., 2003).

В зависимости от природы поступающего сигнала, динамика изменения концентрации кальция может варьировать по распределению внутри клеток (в цитозоле или органеллах) и органов, по кинетическим характеристикам (амплитуде, продолжительности, частоте), а также по задействованным каналам, что позволяет клетке сформировать дифференцированные ответные реакции (Keith et al., 1985). Например, отмечено накопление кальция на полюсах веретена деления во время митоза или полярное верхушечное распределение во время роста пыльцевых трубок (Nobiling and Reiss, 1987) и корневых волосков (Schiefelbein et al., 1992). Концентрация кальция изменяется в ответ на температурные колебания, изменение солености и влажности, а также доступности нитратов в почве (Mahajan and Tuteja, 2005; Tuteja, 2007; Tuteja and Mahajan, 2007; Gong et al., 1998; Scrase-Field and Knight, 2003; Riveras et al., 2015). Для каждого типа сигнала характерен свой уникальный тип распределения Ca²⁺ в клетке (Batistič and Kudla, 2012). В ответ на стрессовые условия увеличивается содержание кальция в ядре и митохондриях, причем эти изменения происходят независимо друг от друга и от концентрации кальция в цитоплазме (Pauly et al., 2000; Logan and Knight, 2003).

Выделяют три характерные кальциевые «подписи», включая одиночные всплески (спайки), повторяющиеся всплески (осцилляции) и волны, которые могут распространяться к удаленным клеткам или другим органам (Tian et al., 2020). Кальциевые спайки возникают под действием самых разнообразных стимулов, включая абиотический стресс, обработку элиситорами, воздействие светом разных спектральных характеристик и других (Tian et al., 2020). Кальциевые осцилляции возникают за счет ритмичного перераспределения кальция между цитоплазмой и органеллами благодаря координированной работе мембранных каналов и насосов.

Многие процессы предполагают формирование специфичных осцилляций, включая рост и развитие (Yang, 2008; Iwano et al., 2009; Damineli et al., 2007; Konrad et al., 2011), растительно-микробные взаимодействия (Keinath et al., 2015; Yuan et al., 2017). Большое значение для активации системной устойчивости имеют кальциевые волны, которые распространяются по сосудистой системе в удаленные части растения в ответ на контакт с насекомыми или механические повреждения. Скорость распространения такого сигнала около $1 \text{ мм} \cdot \text{с}^{-1}$, что превышает пассивный поток за счет массы (Hilleary and Gilroy, 2018). В ответ на кальциевые волны в растении активируются механизмы системной устойчивости и синтез жасмоновой кислоты (Yan et al., 2018).

Функциональное разнообразие биологических эффектов ионов кальция достигается благодаря широкому спектру кальциевых сенсоров, которые обеспечивают второй этап трансдукции кальциевого сигнала – его декодирование. Конечный клеточный ответ может проявляться в виде изменения экспрессии генов, метаболического статуса и состояния активности внутриклеточных транспортных систем. Завершающей стадией является удаление кальция из цитоплазмы с возвращением клетки в стадию покоя.

Любое изменение концентрации кальция должно быть расшифровано в клетках-мишенях и органах, чтобы своевременно реагировать на стимул. Этот процесс осуществляется кальций-связывающими сенсорными белками, которые декодируют и передают информацию, закодированную Ca^{2+} -сигналами, в конкретные белок-белковые взаимодействия, определенные каскады фосфорилирования или в виде изменения транскрипционной активности генов-мишеней.

Сенсоры кальция условно разделяют на две группы (Kudla et al., 2010; Sanders et al., 2002): «буферные» белки, которые претерпевают конформационные изменения в результате связывания с ионами кальция, но лишены других эффекторных доменов, и белки-«передатчики», которые, помимо восприятия кальциевого сигнала, способны выполнять регуляторную функцию благодаря наличию собственной

ферментативной активности. В первую группу относят кальмодулин (CaM), кальмодулин-подобные (CML) и кальцийнейрин-В-подобные (CBL) белки, которые изменяют активность белков-мишеней «ниже по течению». Вторая группа объединяет кальций-зависимые (CDPK), кальмодулин-зависимые (CaMK) и CBL-взаимодействующие (CIPK) протеинкиназы.

1.6.2. Кальций-связывающие белки

Кальмодулин и кальмодулин-подобные белки. Кальмодулины и подобные белки содержат высококонсервативный мотив типа «спираль-петля-спираль», состоящий из 29 а.о., двенадцать из которых отвечают за образование координационных связей с ионом кальция (Рисунок 5). Этот мотив также получил обозначение «EF-рука». Геном *A. thaliana* содержит, по меньшей мере, 250 генов представителей суперсемейства, содержащих «EF-руку» (Day et al., 2002). Вариабельность организации и структуры «EF-рук» в кальций-связывающих белках очень высока, различные комбинации из 4 известных структур мотивов формируют, как минимум, 9 групп отличающихся, в том числе, и по функциональной активности (La Verde et al., 2018). Количество Ca^{2+} -связывающих мотивов в белке может варьировать от 1 до 6 (как правило, 4 у CaM, от 1 до 6 – у CML, 3 – у CBL).

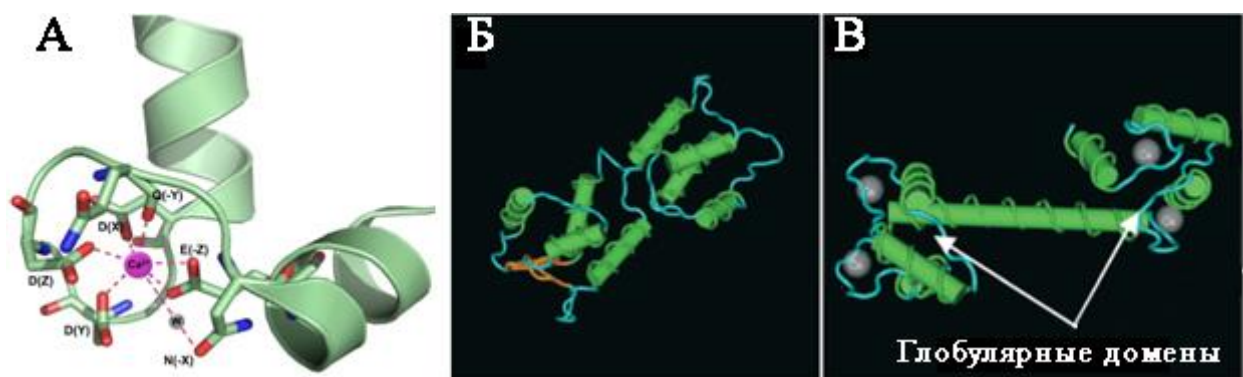


Рисунок 5 – Трехмерная модель канонической структуры EF-«руки» (А). Кальмодулин в «закрытой» (Б) и «открытой» (В) формах (La Verde et al., 2018; Luan et al., 2002).

Классификация белков этого суперсемейства основана на гомологии аминокислотных последовательностей: так, у *A. thaliana* к кальмодулинам относят белки, идентичные представителям животных и друг другу на 95% и более (CaM1–CaM7), к кальмодулин-подобным – белки, характеризующиеся 50–75% гомологии с CaM2 и обладающие соответствующим типом активности. Кроме того, некоторые представители группы могут иметь дополнительные домены, не характерные для этой группы (Luan et al., 2002).

У кальмодулина Ca^{2+} -связывающие сайты обнаруживаются в составе двух глобулярных доменов, каждый из которых содержит по паре мотивов. Связывание с кальцием приводит к изменению конформации доменов: гидрофобный участок в составе каждого из доменов экспонируется наружу, белок переходит в открытое состояние и становится доступным для взаимодействия с белками-партнерами (Yamniuk and Vogel 2005). Несмотря на то, что связывание кальция каждым из доменов является событием независимым, кооперативное изменение конформации обоих доменов является необходимым для перехода белка в активное состояние (Luan et al., 2002). Формирование контактов между кальмодулином и белком-мишенью происходит, главным образом, благодаря неспецифичным Ван-дер-Ваальсовым связям, в формировании которых принимают участие аминокислотные остатки гидрофобных участков белка. Примечательно, что данные кальциевые сенсоры высокоселективны к ионам Ca^{2+} даже при высоких концентрациях ионов Mg^{2+} и моновалентных катионов (Falke et al., 1994; Luan et al., 2002).

Известно, что определенные особенности кальциевой сигнализации формируются, в том числе, за счет ограничения доступа Ca^{2+} в определенные клеточные компартменты (Rudd and Franklin-Tong, 2001). С другой стороны, регуляция также достигается за счет компартментализации кальций-связывающих белков. Например, в случае некоторых кальмодулинов пренилирование определяет мембранную локализацию, в отсутствие данной модификации белок накапливается в ядре (Rodriguez-Concepcion et al., 1999; Dong et al., 2002).

К настоящему моменту описано более 100 белков, взаимодействующих с кальмодулинами, и этот список продолжает расти (Ranty et al., 2006; Poovaiah et al., 2013). Условно мишени CaM разделяют на белки, осуществляющие трансдукцию сигналов (протеинкиназы, транскрипционные факторы) и белки-эффекторы (ионные каналы мембран и ферменты, непосредственно участвующие в физиологических реакциях). Мишени CaM и CML представлены целым спектром протеинкиназ, включая CaM-связывающие (CBK), митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), Ca²⁺-зависимые и родственные CDPK (CRK) протеинкиназы, Ca²⁺-CaM-зависимые (ССаМК), NAD-, диацилглицерол-зависимые протеинкиназы, а также целый ряд транскрипционных факторов (WRKY, Hsf, AtMYB2, AtSR/CAMTA), белки IQD, ионные каналы, регулируемые циклическими нуклеотидами, и многие другие ферменты (Poovaiah et al., 2013; Bergey et al., 2014). Имея столь широкий перечень партнеров, кальмодулины и подобные им белки участвуют в формировании реакций в ответ на самые разнообразные стимулы. Наиболее хорошо исследована роль CaM и CML в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессам (Zeng et al., 2015). Кальмодулины выполняют важную функцию в осуществлении растительно-микробных взаимодействий и активации реакции гиперчувствительности (Cheval et al., 2013; Zeng et al., 2015). Эктопическая экспрессия генов *CaM* может запускать защитные реакции, активируемые при атаке патогенов, даже в отсутствие каких-либо элиситоров (Neo et al., 1999).

Кальцийнейрин-В-подобные белки. В отличие от кальмодулинов, кальцийнейрин-В-подобные белки (CBL) обнаружены только у высших растений (Luan et al., 2002). Представители данного семейства обнаруживают высокую гомологию с регуляторной субъединицей кальцийнейрина дрожжей – фосфатазой PPP3C, обеспечивающей устойчивость к засолению (Kudla et al., 1999). В результате анализа 38 видов растений идентифицированы от 2 до 14 генов *CBL* (Mohanta et al., 2015). В арабидопсисе обнаружены, по крайней мере, 10 генов, которые обладают схожими структурной организацией и размером. Подобно кальмодулинам, эти белки

также содержат 4 Ca^{2+} -связывающих сайта в своем составе, невелики по размеру и организованы в виде двух глобулярных доменов, соединенных коротким линкером (Batistic and Kudla, 2009). Механизм активации после связывания с ионами кальция аналогичен таковому у кальмодулинов, но белки этой группы имеют неодинаковую аффинность и специфичность к кальцию (Nagae et al., 2003; Sanchez-Barrena et al., 2005). Не все «EF-руки» содержат канонические аминокислотные последовательности, необходимые для удерживания ионов Ca^{2+} , поэтому число функциональных сайтов может варьировать или даже отсутствовать (Kolukisaoglu et al., 2004). Не считая консервативных участков, формирующих «EF-руки», CBL не обнаруживают значительного сходства с аминокислотными последовательностями кальмодулинов. Также в их составе обнаруживается высококонсервативный RFPF домен, который является мишенью для фосфорилирования белками-партнерами.

На основе строения N-терминальной области белки CBL подразделяют на 3 группы: у первой группы она относительно короткая и имеет сайты липидных модификаций, вторая содержит сигнальную последовательность для локализации в тонопласте, представители третьей группы содержат трансмембранную спираль (Batistic et al., 2008; Kim et al., 2007; Kleist et al., 2014). Некоторые представители CBL содержат сайты для N-миристоилирования и пальмитоилирования (Li et al., 2009; Mohanta et al., 2015). Например, миристоилирование или S-ацилирование может направлять их в плазматическую мембрану (Cheong et al., 2007) или мембраны микросом, что оказывает влияние и на их биологические функции (Ishitani et al., 2000).

В отличие от кальмодулинов, белки CBL имеют не такой широкий круг партнеров, взаимодействуя с ограниченным кругом представителей протеинкиназ. Это семейство CaM -зависимых Ser/Thr протеинкиназ CIPK, которые относят к семейству SnRK3 (SNF1-related kinases 3 (sucrose non-fermenting-1-related kinases, group 3; SnRK3)) ввиду их высокой гомологии с SNF1 протеинкиназой дрожжей (Shi et al., 1999; Halfter et al., 2000). Комплекс CBL-CIPK образуется при микромолярных

концентрациях Ca^{2+} и стимулирует киназную активность в отношении субстратов, локализованных в области плазматической мембраны (Batistic, Kudla, 2004; Gong et al., 2004; D'Angelo et al., 2006). Представители семейства CBL чувствительны к механическим повреждениям, обработке абсцизовой кислотой, воздействию света, холода и засухи (Luan et al., 2002). Взаимодействуя с СРК, они опосредуют физиологические реакции клетки – закрытие устьиц (Guo et al., 2002; Cheong et al., 2007), контроль экспрессии генов (Kim et al., 2003; Song et al., 2005) и потока ионов Na^+ (Xiong et al., 2002; Gong et al., 2004).

Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы. В составе Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ (CDPK/СРК) выделяют N-терминальный домен, Ser/Thr киназный домен, автоингибиторный и С-терминальный кальмодулин-подобный домены (Рисунок 6). Последний организован 4 «EF-руками», которые формируют две доли с различающейся аффинностью к ионам Ca^{2+} , что имеет значение для регуляции активности ферментов (Rutschmann et al., 2002). В неактивном состоянии каталитический центр фермента заблокирован автоингибиторным доменом, который содержит псевдосубстратную аминокислотную последовательность (Harmon et al., 1994). Связывание с ионами кальция приводит к нарушению взаимодействий и высвобождению последнего из активного центра (Harper et al., 1994). В активации фермента наибольшее значение имеют «EF-руки», расположенные ближе к N-терминальной области (Wernimont et al., 2010). Различия в аминокислотных последовательностях, вероятно, обуславливают неодинаковую чувствительность к различным концентрациям ионов кальция, продемонстрированную на 14 представителях CDPK (Boudsocq et al., 2012). Более того, по наблюдениям авторов, эти различия могут проявляться в результате взаимодействий ферментов с различными субстратами, что представляет собой дополнительный уровень регуляции. Стоит отметить, что некоторые представители CDPK оказались невосприимчивы к активации кальцием, тогда как изоформа AtСРК25 арабидопсиса вовсе не содержала «EF-рук» (Boudsocq et al., 2012).

В то время как CDPK были выявлены у растений и простейших, родственные им CRK представлены только в растениях (Hrabak et al., 2003). В геноме *A. thaliana* обнаружены 34 представителя семейства CDPK, формирующих 4 филогенетические подгруппы, а также 8 представителей CRK, организованных в дополнительную подгруппу (Hrabak et al., 2003). Филогенетический анализа установил, что семейства CDPK и CRK произошли от общего предка в результате слияния гена CaM и CaM-зависимой протеинкиназы, в результате которого стала возможна прямая активация фермента ионами кальция без дополнительных белковых взаимодействий (Zhang and Choi, 2001; Chen et al., 2017). В процессе эволюции CRK утратили эту способность из-за вырождения «EF-рук», однако, некоторые из них сохранили способность к CaM-зависимой активации (Harper et al., 2004; Wang et al., 2004; Popescu et al., 2007). К Ca²⁺-зависимым протеинкиназам также относят семейство Ca²⁺/CaM-зависимых протеинкиназ CCaMK, которые не обнаружены в *A. thaliana* и, вероятно, главным образом, участвуют в формировании растительно-микробного симбиоза у бобовых (Delormel and Boudsocq, 2019).

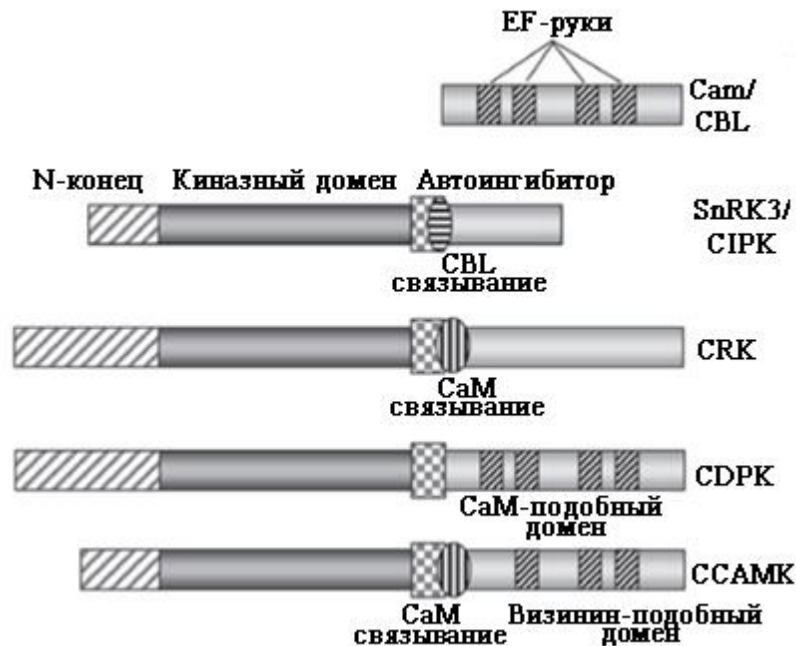


Рисунок 6 – Структурная организация Ca²⁺-зависимых протеинкиназ растений (Hrabak et al., 2003).

Некоторые CDPK/CRK оказались способны к автофосфорилированию *in vitro*, однако, биологические функции этого эффекта пока не ясны. С одной стороны, автофосфорилирование *in vitro* оказывало влияние на ферментативную активность (Hegeman et al., 2006; Nemoto et al., 2011; Oh et al., 2012; Nemoto et al., 2015), с другой, – инактивация обнаруженных фосфосайтов в одних случаях не приводила к потере активности (Romeis et al., 2001), в других – наоборот, имела негативный эффект (Matschi et al., 2013). Интересно отметить, что автофосфорилирование, как правило, не затрагивает автоингибиторный домен, часто сайты обнаруживаются в N-концевом и CaM-подобном доменах, и статус фосфорилирования определяет не активность, но локализацию, субстратную специфичность и чувствительность к ионам кальция (Ito et al., 2017). Также CDPK/CRK могут осуществлять фосфорилирование друг друга (Witte et al., 2010; Zhao et al., 2013).

Кроме фосфорилирования, CDPK/CRK подвержены регуляции посредством взаимодействий с семейством белков 14-3-3 и липидами. Такие взаимодействия, как правило, не активируют киназы напрямую, но усиливают эффект, производимый ионами Ca^{2+} (Dixit and Jayabaskaran, 2012). Некоторые из них локализованы в цитоплазматической мембране и могут определять локализацию индивидуальных изоформ протеинкиназ, тогда как другие являются вторичными посредниками и участвуют в передаче сигнала (Hou et al., 2016; Klimecka et al., 2011). Разные изоформы чувствительны к определенным липидам, что может определять специфичность в процессе передачи сигнала, однако, сайты взаимодействия CDPK с липидами пока не выявлены (Harper et al., 1993; Szczegielniak et al., 2005; Dixit, Jayabaskaran, 2012). Белки 14-3-3, которые сами могут быть субстратами CDPK (Swatek et al., 2014; Ormancey et al., 2017), кроме того, могут стимулировать ферментативную активность последних безотносительно чувствительности к ионам кальция (Camoni et al., 1998; van Kleeff et al., 2018) и предотвращать деградацию *in vivo* (Lachaud et al., 2013).

Экспрессия различных изоформ СДПК неодинакова в разных органах и тканях: некоторые обнаруживаются повсеместно, другие – тканеспецифичны. В промоторах генов *СДПК* присутствуют стресс-чувствительные *cis*-регуляторные элементы, которые определяют их восприимчивость к самым разнообразным стимулам (Wan et al., 2007). Защитная роль Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ неоднократно подтверждена на растениях, подвергшихся абиотическому стрессу различной природы (Wan et al., 2007), также установлена их необходимость для формирования иммунитета при вирусной, бактериальной, грибной инфекциях и атаке насекомых. Многообразие изоформ, как и их распределение в различных компартментах клетки, обеспечивают участие кальций-зависимых белков практически во всех сигнальных путях, предоставляя множество возможностей для осуществления тонкой настройки защитных систем в растительной клетке.

Другие Ca^{2+} -связывающие белки. Кроме белков, содержащих «EF-руку», к Ca^{2+} -регулируемым относят белки с С2 доменами, аннексины и виллины. К первой группе относят фосфолипазы С и D. Фосфоинозитид-специфичная фосфолипаза С содержит как «EF-руку», так и С2 домен для регуляции активности (Otterhag et al., 2001). Ввиду локализации ферментов данного типа в цитоплазматической мембране их стресс-индуцируемая активация под влиянием инозитол-3-фосфата может приводить к каскадному увеличению концентрации кальция в цитозоле. Различные изоформы фосфолипазы D также содержат С2 домен (Reddy and Reddy, 2004).

Аннексины, которые связывают фосфолипиды, также относят к кальций-регулируемым белкам. В геноме арабидопсиса обнаружены 8 генов аннексинов, которые активируются в ответ на засуху, изменение температуры и увеличение солености (Cantero et al., 2006). Мутанты *A. thaliana* по генам *AnnAt1* и *AnnA4* проявляли чувствительность к осмотическому стрессу и обработке абсцизовой кислотой (Lee et al., 2004).

Виллины – актин-связывающие белки цитоскелета, которые регулируют полимеризацию актина. Виллины считаются главными регуляторами актиновых филаментов, обеспечивая их нуклеацию, кэпирование, сборку и разборку. Например, одни виллины могут вызывать устойчивость к действию деполимеризующих белков (Huang et al., 2005), тогда как другие могут инициировать разборку актиновых филаментов в присутствии микромолярных концентраций ионов кальция (Khurana et al., 2010; Zhang et al., 2010). В растениях они накапливаются во многих типах тканей, что указывает на их важную регуляторную роль.

1.6.3. Кальций-связывающие белки как инструмент генетической инженерии растений

Среди адаптационных механизмов, регулируемых кальций-связывающими белками, выделяют активацию экспрессии поздних маркеров стресса (Cheong et al., 2003; Cheong et al., 2010), систем утилизации активных форм кислорода (Asano et al., 2012a; Bundo and Coca, 2017) и уровня перекисного окисления липидов (Campo et al., 2014), регуляцию работы транспортеров ионов (Cheong et al., 2007; Thoday-Kennedy et al., 2015). Один из центральных членов семейства, изоформа CBL1, в высокой степени индуцируется множественными стрессовыми сигналами, включая засуху, холод, засоление, изменение содержания ионов K⁺ (Li et al., 2009). Теоретически, совместно с белками семейства СРК, они могут образовывать более 250 комбинаций CBL/СРК, которые обеспечивают активацию генов стрессового ответа, регулируют ионный гомеостаз и обеспечивают своевременную утилизацию АФК в ходе защитных реакций. Сверхэкспрессия генов семейства CBL приводит к увеличению устойчивости к абиотическим стрессам. Например, конститутивная экспрессия *CBL5* обеспечивала устойчивость к засухе и засолению, также стимулируя накопление мРНК транскриптов *RD29A/COR78*, *RD29B*, *RAB8* и *DREB2A* (Cheong et al., 2010).

Анализ функций СРК белков риса показал, что 20 из 30 членов семейства оказались чувствительными, по меньшей мере, к одному из исследованных факторов абиотического стресса, включая засуху, засоление, холод и обработку абсцизовой кислотой. Накопленные данные позволяют утверждать, что гетерологичная экспрессия генов семейства СРК обеспечивает устойчивость, главным образом, к засухе и солевому стрессу (Lu et al., 2020; Lu et al., 2021; Ma et al., 2021).

Кальмодулины и кальмодулин-подобные белки участвуют в защитном ответе на множество стрессовых факторов, включая повышенную температуру и холод, засоление, засуху и обработку абсцизовой кислотой, окислительный и осмотический стрессы, присутствие ионов тяжелых металлов и патогенов (Zeng et al., 2015). Сверхэкспрессия генов *CaM* обеспечивает появление термотолерантности, которое сопровождается активацией генов белков, отвечающих на тепловой стресс (HSP, HSF) даже в отсутствие повышения температуры (Wu et al., 2012). Примечательно, что сверхэкспрессия гена *CaM3* также вызывает подавление генов *COR*, активируемых в ответ на холодовой стресс (Townley, Knight, 2002). Одной из отличительных особенностей кальмодулинов и подобных им белков является способность к связыванию с более чем 90 представителями семейств транскрипционных факторов, которые содержат в своей структуре домен для связывания с кальмодулином (Reddy et al., 2011).

Показано, что СДПК также участвуют в формировании устойчивости к абиотическому стрессу у различных растений, и эти белки особенно хорошо охарактеризованы у *A. thaliana*. Растения, постоянно экспрессирующие гены СДПК, проявляли повышенную устойчивость к факторам биотического стресса, например, к рисовому грибку (Asano et al., 2012a; Bundo et al., 2016) и бурой гнили картофеля (Shen et al., 2016). Однако в некоторых случаях сверхэкспрессия *СДПК* приводила к обратному эффекту, вызывая возникновение гиперчувствительности к факторам абиотического стресса (Choi et al., 2005; Ma and Wu, 2007). Было установлено, что СДПК участвуют в сигнальных путях фитогормонов (Xu and Huang, 2017).

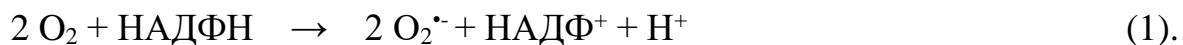
Установлено, что СРК12 является негативным регулятором сигнального пути абсцизовой кислоты (Zhao et al., 2011). Нокаун изоформы с помощью РНК-интерференции вызывал гиперчувствительность к абсцизовой кислоте и изменение уровня экспрессии ряда чувствительных к этому соединению генов. Было подтверждено взаимодействие СРК12 и 2С фосфатазы АВ12, сопровождаемое фосфорилированием последней, а также транскрипционных факторов АВF1 и АВF4. Имеются данные о роли СДРК в качестве позитивных регуляторов абсцизового сигнального каскада (Zhu et al., 2007; Jiang et al., 2013). Нокаут изоформ СРК4 и СРК11 приводил к появлению характерных для нечувствительных к абсцизовой кислоте мутантов фенотипов и понижению устойчивости к засолению. Кроме того, обработка абсцизовой кислотой стимулировала накопление белков СРК4 и СРК11 в дозо-зависимой манере, тогда как сами они индуцируют фосфорилирование транскрипционных факторы АВF1 и АВF4 *in vitro*, что указывает на их регуляторную функцию. Кроме участия в сигнальном пути абсцизовой кислоты, СДРК играют важную роль в обеспечении толерантности к абиотическому стрессу посредством регуляции содержания АФК. Изоформы СДРК4 и СДРК5 стимулируют активность НАДФН-оксидазы посредством фосфорилирования (Kobayashi et al., 2007). Также изоформы СДРК4, 5, 6 и 11 являются позитивными регуляторами транскрипционного репрограммирования растительной клетки в ответ на присутствие флагеллина – одного из ключевых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (от англ. pathogen associated molecular patterns, PAMPs) (Boudsocq et al., 2010). Кроме того, известно о пересечении сигнальных путей АФК и абсцизовой кислоты (Kwak et al., 2003; Crizel et al., 2020). Установлено, что под действием абсцизовой кислоты происходит индукция транскрипции генов НАДФН-оксидазы *AtRbohD* и *AtRbohF* и, как следствие, накопление АФК, что стимулирует закрытие устьиц, тогда как двойной мутант *atrbohD/F* оказался не способен к генерации АФК и активации кальциевых каналов цитоплазматической мембраны в присутствии абсцизовой кислоты (Kwak et al., 2003). Таким образом, регуляция

уровня содержания основных кальций-связывающих белков обладает высоким потенциалом для создания генетически-модифицированных растений с повышенной устойчивостью к стрессам различной природы.

1.7. НАДФН-оксидазная сигнальная система растений

1.7.1. НАДФН-оксидазы: структура и физико-химические свойства

Образование АФК на поверхности клетки является одной из наиболее ранних защитных реакций в ответ на неблагоприятные условия (Lamb and Dickson, 1997). Одним из наиболее ранних событий при этом является генерация супероксид анион-радикалов ($O_2^{\cdot-}$) НАДФН-оксидазами плазмалеммы. У животных НАДФН-оксидазы представлены мультиферментными комплексами, в состав которых входят мембраносвязанный цитохром b558 и цитозольные регуляторные белки (Segal and Abo, 1993). Цитохром состоит из двух субъединиц – p22^{phox} и gp91^{phox}. Растительные НАДФН-оксидазы, также известные как RВОН (от англ. respiratory burst oxidase homologs), являются гомологами субъединицы gp91^{phox} (Keller et al., 1998; Sagi and Fluhr, 2006). Как животные, так и растительные НАДФН-оксидазы содержат цитозольные ФАД- и НАДФН-связывающие домены в С-концевой области, а также 6 консервативных трансмембранных доменов (Рисунок 7). Два из них – третий и пятый – участвуют в формировании железосодержащих гемов, образованных 4 а.о. (Torres et al., 1998). Основная функция гемов – транспорт электронов через мембрану к внеклеточному акцептору кислорода (Lambeth et al., 2003). Используя цитозольный НАДФН в качестве источника электронов, НАДФН-оксидазы катализируют образование супероксид анион-радикала из молекулярного кислорода (Уравнение 1) с последующим превращением в перекись водорода в результате спонтанной реакции с водой или с участием других ферментов (супероксиддисмутаз, оксалат оксидаз, аминоксидаз и пероксидаз):



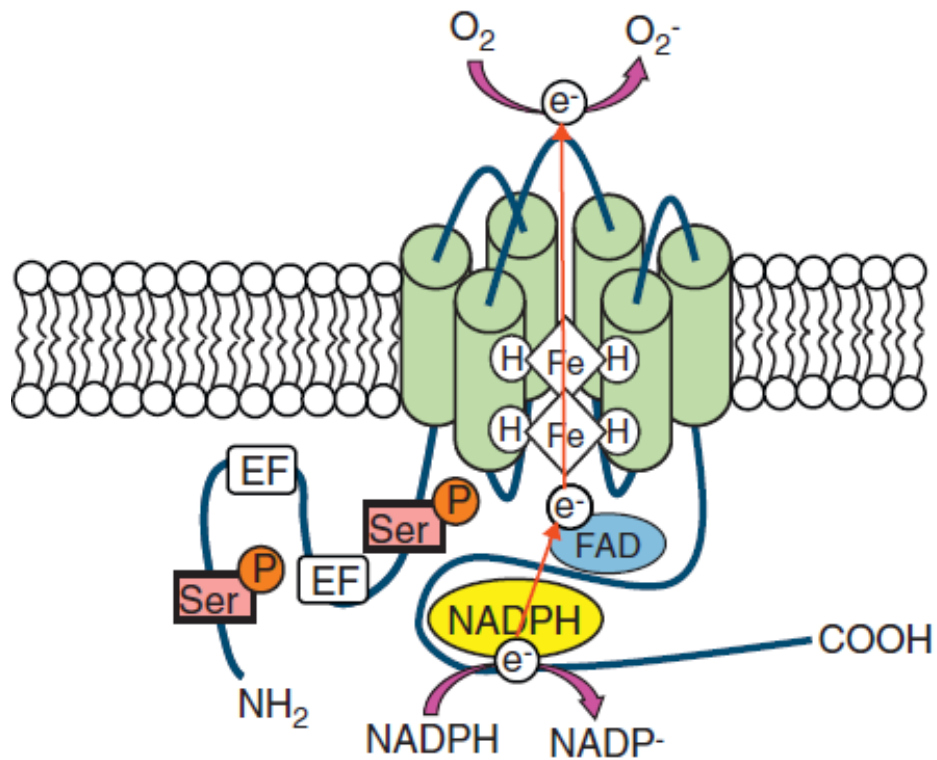


Рисунок 7 – Схематическая иллюстрация доменной организации НАДФН-оксидазы растений (Suzuki et al., 2011).

В N-терминальном участке растительных НАДФН-оксидаз также обнаруживают две «EF-руки», что делает фермент доступным для прямой регуляции ионами кальция (Keller et al., 1998; Oda et al., 2010; Рисунок 7). Активность фермента также может регулироваться цитоплазматическими белками, такими как СВЛ и взаимодействующими с ними киназами (СІРК), а также малыми ГТФазами и липидами мембран (Qu et al., 2017).

1.7.2. Регуляция активности НАДФН-оксидаз

Ионы кальция и протеинкиназы. Установлена тесная взаимосвязь между RВОН-зависимой генерацией АФК и гомеостазом кальция: наличие EF-мотивов, чувствительных к ионам кальция, обеспечивает прямую стимуляцию активности фермента (Gifford et al., 2007; Ogasawara et al., 2008). Генерация АФК вызывает активацию кальциевых каналов, что, в свою очередь, приводит к усилению сигнала (Ogasawara et al., 2008; Takeda et al., 2008). Кроме непосредственного контакта с

РВОН, цитозольные потоки кальция могут активировать СДРК протеинкиназы, которые фосфорилируют аминокислотные остатки Ser N-концевого участка РВОН, активируя фермент (Kobayashi et al., 2007; Kimura et al., 2012). Интересно отметить, что протеинкиназы могут оказывать и противоположный эффект: например, МАРКК МКК3-зависимая активация митоген-активируемой протеинкиназы 8 (MPK8) приводила к ингибированию экспрессии *AtRbohD* при механических повреждениях (Takahashi et al., 2011). Аналогичным образом кальциевая регуляция может осуществляться и через ССаМК. Например, OsDMI3 риса регулирует экспрессию генов *OsRbohB*, *OsRbohE* и *OsRbohI*, а также продукцию перекиси водорода (Shi et al., 2012). Интересно отметить СBL-зависимую протеинкиназу 26, которая обладает комплексным действием: связываясь с AtРВОНF, она оказывает ингибирующий эффект (Kimura et al., 2013), тогда как в присутствии кальцийнейрин-В-подобных сенсоров кальция СBL1 и СBL9 осуществляет фосфорилирование N-терминального участка, что приводит к активации фермента и увеличению содержания АФК (Dreger et al., 2013).

До сих пор субстратная специфичность многих протеинкиназ остается неизвестной, однако, в некоторых частных случаях были определены сайты-мишени для фосфорилирования РВОН. Так, фосфорилирование аминокислотных остатков Ser343/347 является критичным для активации *AtRbohD* (Benschop et al., 2007; Nühse et al., 2007), Ser82/87 – *StRbohB* (Kobayashi et al., 2007), а OST1 фосфорилирует Ser13 и Ser174 *AtRbohF*, регулируя её активность при закрытии устьиц (Sirichandra et al., 2009).

Rop/Rac белки. В регуляции активности НАДФН-оксидазы также принимают участие Rop белки – растительные гомологи Rac белков – цитоплазматических активаторов Nox (Wong et al., 2007), которые входят в суперсемейство малых (20-30 кДа) ГТФаз Ras (Kaur et al., 2014). Активность Rop белков определяется уровнем фосфорилирования: ГТФ-связанная форма фермента является активной, ГДФ-связанная – не активной. Конформационные изменения N-концевого участка,

осуществляемые CDPK, делают RВОН доступной для взаимодействия с Rop, тогда как увеличение концентрации кальция негативно сказывается на способности присоединения Rop к RВОН (Wong et al., 2007). Связывание происходит в N-концевом участке с участием EF-мотивов вблизи каталитического участка RВОН, что стимулирует активность фермента (Kaur et al., 2014).

Другие регуляторы. Кроме рассмотренных выше наиболее распространенных типов регуляции, на активность *Rboh* могут существенно влиять и другие факторы. Так, известны примеры, когда растительные НАДФН-оксидазы активировались в присутствии фосфатидной кислоты (Zhang et al., 2009), оксида азота (NO) (Tewari et al., 2008), АТФ (Song et al., 2006) и при обработке ксантином/ксантинооксидазой (Torres et al., 2005). PR-белки семейства 14-3-3, напротив, оказывают негативное влияние на активность RВОН, связываясь с С-концевым участком (Elmayan and Simon-Plas, 2007). Выявлена интегральная роль MAPK-киназ в активации НАДФН-оксидазного сигнального пути под действием абсцизовой кислоты (Asai et al., 2008; Lin et al., 2009) и брассиностероидов (Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2013), а также влияние посттрансляционных модификаций, в частности, Сys-нитрозилирования и Туг-нитрования, глутатионирования и убиквитинирования на активность и деградацию этих ферментов (Chu-Puga et al., 2019; Lee et al., 2020).

1.7.3. Физиологическая роль растительных НАДФН-оксидаз

В растениях НАДФН-оксидазы представлены мультигенными семействами (Sagi and Fluhr, 2006; Hu et al., 2018; Yu et al., 2020). Наилучшим образом гены *Rboh* охарактеризованы у арабидопсиса – они получили условное название *AtRbohA–AtRbohJ* (Torres et al., 1998; Sagi and Fluhr, 2001). Установлена тканеспецифичность распределения транскриптов *AtRboh*: *AtRbohD* и *AtRbohF* локализованы повсеместно, *AtRbohA, B, C, G, I* – преобладают в корнях, *AtRbohB* и *AtRbohE* – в семенах, *AtRbohH* и *AtRbohJ* – в пыльце (Chapman et al., 2019). Также были обнаружены гомологи *AtRboh*: 20 – у табака (Yu et al., 2020), 9 – в растениях риса

(Groom et al., 1996; Yoshie et al., 2005; Wong et al., 2007), 8 – в томате (Li et al., 2015) и этот список продолжает расширяться (Navathe et al., 2019; Cheng et al., 2020; Wang et al., 2020). Многообразие и тканеспецифичность изоформ *Rboh* свидетельствуют о полифункциональности растительных НАДФН-оксидаз. Установлено, что *AtRbohC* регулирует формирование корневых волосков (Foreman et al., 2003; Monshausen et al., 2007) и механочувствительность (Monshausen et al., 2009), *NtRbohH* и *AtRbohI* – рост пыльцевой трубки (Potocky et al., 2007), а *AtRbohB* – созревание (Ishibashi et al., 2010) и прорастание (Müller et al., 2009) семян.

Накопление транскриптов НАДФН-оксидаз происходит под влиянием неблагоприятных условий, причем обнаружена специфичность экспрессии *Rboh* к различным факторам. Две наиболее хорошо изученные изоформы – *AtRbohD* и *AtRbohF* – выполняют, главным образом, защитную функцию при стрессах различного происхождения, включая механические повреждения, низкие и высокие температуры (Miller et al., 2009; Zhou et al., 2012), засуху (Kwak et al., 2003), засоление (Ma et al., 2012) и атаку патогенов (Torres et al., 2001). *AtRbohD* также необходима для системного распространения сигнала по тканям растения (Miller et al., 2009). Так, при заражении *A. thaliana* плесневым грибом рода *Alternaria*, *AtRbohD*, с одной стороны, активирует клеточную гибель в инфицированных клетках, с другой – ингибирует её в соседних здоровых клетках, понижая уровень салициловой кислоты и этилена (Pogány et al., 2009). В связи с важной ролью *AtRbohD*, эта изоформа экспрессируется повсеместно, а мутации гена приводят к отсутствию генерации АФК и гиперчувствительности клеток (Xie et al., 2011). Более того, совместно с *AtRbohA–AtRbohC*, *AtRbohG* и *AtRbohI* они создают вертикальную ось распространения волны окислительного взрыва от одной верхушки побега к другой (Suzuki et al., 2011).

Сравнительное исследование защитных функций НАДФН-оксидаз (*TaRbohD* и *TaRbohF*) и пероксидаз (*TaPrx103*, *107*, *108* и *112*) при заражении растений пшеницы *Triticum aestivum* грибом *Puccinia triticina* установило, что данные изоформы *Rboh*

характеризуются комплексным действием и могут выполнять разные функции в дву- и однодольных растениях (Dmochowska-Boguta et al., 2012). Мутации в генах *AtRbohD* и *AtRbohF* у арабидопсиса приводят к подавлению роста (Torres et al., 2001), в то время как у их гомологов в томате – *Wfi1* и *LeRboh1* – вызывают дефекты листьев и плодов (Sagi et al., 2004). Нокдаун *HvRbohF2* в ячмене также вызывает аномалии в строении у взрослых растений (Proels et al., 2010). Нокдаун *OsRbohA* и *OsRbohE* позволил определить их ключевое участие в генерации перекиси водорода, необходимой для иммунного ответа против несовместимого штамма *Acidovorax avenae* на ранних и поздних стадиях заражения, соответственно (Yoshie et al., 2005). Снижение экспрессии *StRbohA* приводило к потере способности восстанавливать ткани после повреждений, а сами растения были в большей степени подвержены микробным инфекциям (Kumar et al., 2007; Razem, Bernards, 2003). Исследования роли *Rboh* в растительно-ризобиальном симбиозе показали, что *MtRbohA* *M. truncatula* и *PvRbohB* *P. vulgaris* являются необходимыми для коммуникации между растением и микросимбионтом в клубеньках, а в условиях гипоксии экспрессия гена *MtRbohA* сильно возрастала, что свидетельствует о её сенсорной роли (Marino et al., 2011; Montiel et al., 2012). Однако несмотря на интенсивные исследования *Rboh* и их функций, только некоторые изоформы охарактеризованы в достаточной мере, тогда как многие до сих пор остаются неизученными до конца (Marino et al., 2011).

1.8. Роль активных форм кислорода в сигнальной регуляции

1.8.1. Генерация активных форм кислорода в растительной клетке

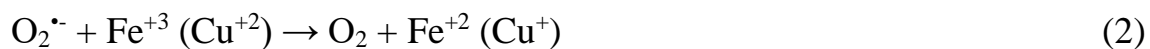
В растительной клетке многие процессы жизнедеятельности сопровождаются возможным образованием активных форм кислорода – производных молекулярного кислорода с чрезвычайно высокой реакционной способностью (Yoshie et al., 2005). Они являются продуктами неполного восстановления кислорода до воды одним, двумя или тремя электронами в результате спонтанного и ферментативного

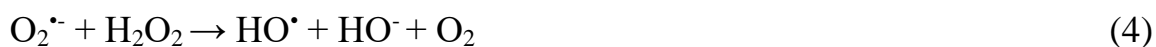
окисления различных субстратов, а также в фотоиндуцируемых реакциях (Melchiorre et al., 2009a).

На первом этапе в результате захвата молекулой кислорода (O_2) одного электрона образуется супероксид анион-радикал (супероксидрадикал, $O_2^{\cdot-}$) или его протонированная форма – гидропероксил-радикал (HO_2^{\cdot}). Присоединение второго электрона приводит к образованию пероксид-аниона (O_2^{2-}), который легко протонируется с образованием перекиси водорода (H_2O_2), а с присоединением третьего электрона молекула O_2^{3-} распадается на ионы O^{2-} и $O^{\cdot-}$. Завершающим этапом восстановления является протонирование новообразовавшихся ионов с формированием молекул H_2O и гидроксил-радикала (HO^{\cdot}), соответственно. Отдельным событием, протекающим в хлоропластах, является взаимодействие кислорода (O_2) и возбужденного светом триплетного хлорофилла с образованием синглетного кислорода (1O_2), который является короткоживущей, но очень опасной молекулой для компонентов тилакоидных мембран и фотосинтетических электрон-транспортных цепей (ЭТЦ). Важно отметить, что клеточные мембраны, особенно тилакоидов, являются основными мишенями АФК и легко ими повреждаются в процессе перекисного окисления липидов с образованием алкоксильного (RO^{\cdot}), липопероксильного (RO_2^{\cdot}) радикалов и гидроперекиси липидов ($ROOH$).

Фотосинтезирующие клетки являются активными продуцентами АФК. Образование супероксидного радикала происходит в фотосистеме I (ФС I) (Kruk et al., 2003) и II (ФС II) (Pospíšil, 2012) хлоропластов, а также в ряде реакций, протекающих в пероксисомах (van Breusegem and Dat, 2006). Формирование супероксид радикала может также происходить внутри тилакоидной мембраны с последующей дисмутацией до перекиси водорода как внутри, так и вне мембраны (Mubarakshina et al., 2006a, 2006b). Мощным источником супероксидрадикала также выступает плазмалемма, где локализована НАДФН-оксидаза (Sagi and Fluhr, 2006; Scandalios, 2002). В митохондриях образование $O_2^{\cdot-}$ сопряжено с функционированием дыхательной ЭТЦ во внутренней мембране и захватом

электронов с гемов (b_L и b_H) и семихинонов в Qin-сайте (Moller, 2001). Считается, что дыхательная цепь митохондрий менее мощный источник АФК по сравнению с ЭТЦ хлоропластов, однако, в темноте или в нефотосинтезирующих тканях митохондрии могут быть главным источником АФК (Sweetlove et al., 2002; Rhoads et al., 2006). Потенциальными источниками АФК могут также служить аминоксидазы (Cona et al., 2006), флавин-содержащие оксидазы и некоторые другие ферментные системы (Mhamdi and van Breusegem, 2018). В частности, источником АФК в апопласте являются связанные с клеточной стенкой оксидазы (Dat et al., 2000), полиаминоксидазы (Kärkönen and Kuchitsu, 2014) и пероксидазы (Passardi et al., 2004). Последние вносят особый вклад: проявляя оксидазную или пероксидазную активность в зависимости от значений pH они способны образовывать супероксидный радикал или перекись водорода (Blee et al., 2001; Mika et al., 2004). Здесь же, в апопласте, происходит преобразование супероксида в перекись при участии внеклеточной Cu/Zn-супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы (Mittler, 2002). Особенно интенсивно образование H_2O_2 происходит в пероксисомах в результате реакций окисления с участием ферментов гликолатоксидазы (Nishimura et al., 1983) и флавиновых дегидрогеназ (ксантиноксидаза, альдегидоксидаза и др.) (Yamazaki and Tolbert, 1970; Neupel and Heldt, 1994). Процессы распада запасных жиров и β -окисления жирных кислот, протекающие в глиоксисомах, также сопровождаются образованием перекиси (Cooper and Beevers, 1969). Образование самого мощного известного окислителя – гидроксильного радикала – происходит только в результате неферментативных реакций и уже на фоне достаточно высокого содержания перекиси в растительных клетках. В присутствии ионов переходных металлов, таких как медь (Cu^{2+}) и железо (Fe^{2+} , Fe^{3+}), супероксидный радикал и перекись могут вступать в реакции Фентона (Уравнения 2 и 3) и Габера-Вайса (Уравнение 4) с образованием гидроксил-радикала:





Следует отметить, что, как и все радикалы, $\text{O}_2^{\cdot-}$ и HO^{\cdot} , содержат неспаренный электрон на внешней электронной оболочке и стремятся либо вернуть себе недостающий электрон, либо отдать лишний. Поэтому эти молекулы очень активны несмотря на то, что являются короткоживущими и не способны диффундировать от места образования. Перекись, напротив, является относительно стабильной молекулой, и может не только диффундировать на значительные расстояния, но и пересекать мембраны через каналы, образованные аквапоринами, выполняя сигнальную функцию (Bienert et al., 2007).

1.8.2. Система антиоксидантной защиты растительной клетки

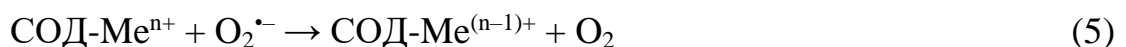
Участие АФК в защитных реакциях растения общеизвестно, однако, не вызывает сомнений, что их избыточное накопление в течение длительного времени может приводить к токсическим эффектам и гибели клетки. Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные указывают, что состояние систем детоксикации АФК является одним из факторов, определяющих устойчивость растений к стрессовым воздействиям (Shigeoka and Shao, 2014). Для контроля их содержания в растительных клетках функционирует антиоксидантная система, включающая низкомолекулярные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты.

Низкомолекулярные антиоксиданты. Основными антиоксидантами в водной фазе растительной клетки выступают глутатион и аскорбиновая кислота, которые защищают вещества гиалоплазмы и матрикса митохондрий. Эти вещества перехватывают свободные радикалы, восстанавливают АФК и продукты окислительной модификации макромолекул. Среди важных низкомолекулярных антиоксидантов, снижающих уровень АФК, следует также отметить токоферолы, каротиноиды, множество фенольных соединений, таких как флавоноиды и антоцианы, а также пролин и глицинбетаин (Suzuki et al., 2012). При этом осмолиты

могут также выполнять функцию стабилизаторов структуры белков при стрессе (Comparot et al., 2003).

Антиоксидантные ферменты. В детоксикации АФК также принимают участие высокомолекулярные ферменты антиоксидантной защиты, среди которых важнейшую роль играют супероксиддисмутаза, каталаза, группа пероксидаз и ферменты аскорбат-глутатионового цикла (Mittler, 2002; Gill and Tuteja, 2010).

Супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) – металлсодержащие ферменты, которые катализируют супероксид анион-радикалов до перекиси водорода и молекулярного кислорода. В растениях представлены три формы фермента – $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -, Fe^{2+} - и Mn^{2+} -содержащие. Сравнение данных о локализации разных форм СОД показывает, что наиболее изобильной в клетках растения является $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -СОД. Она обнаружена во всех внутриклеточных компартментах: цитозоле (Hernandez et al., 1993) митохондриях (Kuzniak and Skłodowska, 2004), пероксисомах (Corpas et al., 2001), хлоропластах и апопласте (Ogawa et al., 1997). Mn^{2+} -СОД присутствует в митохондриях (Kuzniak et al., 2004) и пероксисомах (Palma et al., 1998), а Fe^{2+} -СОД – в хлоропластах (Navari-Izzo et al., 1998) и цитоплазме клубеньков некоторых бобовых (Moran et al., 2003). Все три формы объединяет общая функция – дисмутация супероксидных радикалов (уравнения 5 и 6):



В результате ферментативной реакции, катализируемой СОД, происходит образование перекиси водорода. В связи с этим вторым необходимым звеном антиоксидантной защиты растений является группа ферментов, ликвидирующих продукт реакции супероксиддисмутаза.

Каталаза (КАТ; КФ 1.11.1.6) – тетрамерный гем-содержащий фермент, который всегда присутствует в системах, где происходят процессы клеточного дыхания с участием цитохромов, т.е. там, где в результате восстановления кислорода образуется перекись водорода (Bowler et al., 1992). У растений каталазы содержатся,

главным образом, в пероксисомах и глиоксисомах (Yamazaki and Tolbert, 1970). Каталитическая активность фермента заключается в реакции разложения перекиси водорода с выделением молекулярного кислорода (Уравнение 7):



И хотя реакция восстановления протекает с очень большой скоростью ($k=10^7$), каталаза имеет очень низкое сродство к субстрату и начинает работать только при достаточно высоком её содержании (Mohamed et al., 2003). В связи с этим, а также, поскольку каталаза практически отсутствует в ряде компартментов клетки, существует необходимость функционирования других ферментов, задействованных в детоксикации перекиси водорода.

Ферменты аскорбат-глутатионового цикла представляют собой универсальную систему для утилизации перекиси водорода и обнаружены в хлоропластах, митохондриях, цитозоле и пероксисомах (Jimenez et al., 1997; Noctor and Foyer, 1998). *Аскорбатпероксидаза* (АП; КФ 1.11.1.11) – первый и основной фермент, задействованный в восстановлении H_2O_2 до воды за счет окисления аскорбата. Различные изоформы фермента обнаружены повсеместно в клетке, часть из них ассоциирована с мембраной (тилакоидов и пероксисом). Аскорбатпероксидаза нейтрализует перекись, которая недоступна для каталазы, присутствующей, главным образом, в пероксисомах, а, кроме того, фермент имеет высокое сродство к субстрату, что обеспечивает его эффективность даже в очень низких концентрациях (Melchiorre et al., 2009b). Восстановление продуктов реакции осуществляют ферменты *редуктаза монодегидроаскорбиновой кислоты* (МДГАР; КФ 1.6.5.4) и *редуктаза дегидроаскорбиновой кислоты* (ДГАР; КФ 1.8.5.1) с использованием НАДФ•Н и глутатиона, соответственно. Замыкает цикл *глутатионредуктаза* (ГР; КФ 1.6.4.2), восстанавливающая окисленный глутатион. Следует отметить, что истощение пула аскорбиновой кислоты в хлоропластах и инактивация хлоропластных пероксидаз являются одними из основных ограничений эффективности фотосинтеза в условиях стресса, поэтому восстановление

монодегидроаскорбат- и дегидроаскорбат-радикала является определяющим фактором поддержания эффективности АП (Ishikawa and Shigeoka, 2008).

Слаженная работа антиоксидантной системы предупреждает или уменьшает темп прогрессирования перекисного окисления липидов, нуклеиновых кислот и белков (Lander et al., 1997). Однако необходимо обезвреживание и вторичных метаболитов. Для этого в клетках функционирует *глутатионтрансфераза*, образующая GSH-конъюгаты с главными продуктами окисления липидов – 4-гидроксиалкеналином и эпоксидами. *Формальдегиддегидрогеназа* и *глиоксалаза*, использующие глутатион в качестве кофермента, окисляют свои субстраты до органических кислот (Suzuki et al., 1996). Кроме того, в растительных тканях присутствует *глутатионпероксидаза* (ГПО; КФ 1.11.1.9) – этот фермент потенциально может использовать глутатион для восстановления перекиси. Однако в растительной клетке подобная реакция либо в принципе невозможна, либо протекает с низкой эффективностью (Roxas et al., 2000). Фермент имеет низкое сродство к H_2O_2 , его функции и компартментализация изучены плохо. По имеющимся данным, глутатионпероксидазы локализованы в цитозоле, хлоропластах и пероксисомах (Eshdat et al., 1997).

Стоит отметить, что детоксикация АФК при участии ферментов возможна, если константа скорости реакции субстрата с АФК в физиологических условиях низкая. В связи с этим обезвреживание таких реактивных производных кислорода, как синглетный кислород, гидроперекисный радикал, гидроксилрадикал и пероксинитрит не находится под ферментативным контролем, поскольку константы скорости их взаимодействия очень высоки ($k > 10^8$) для ферментативного катализа (Gechev et al., 2002). Ферменты-антиоксиданты катализируют преимущественно реакции детоксикации супероксида и перекиси водорода. Тем не менее, исследованию особенностей функционирования антиоксидантных ферментов в стрессовых для растений условиях посвящено большое количество работ. Так, установлена активация некоторых ферментов антиоксидантной системы при низких

(Baeka and Skinner, 2003) и высоких температурах (Rizhsky et al., 2002), в условиях засоления (Harinasut et al., 2003; Srivastava et al., 2005; Gapinska et al., 2008) и в присутствии ионов тяжелых металлов (Balestrasse et al., 2001; Cho and Seo, 2005). Кроме того, установлено, что сверхэкспрессия генов антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутаза (Badawi et al., 2004; Melchiorre et al., 2009b), каталаза (Mohamed et al., 2003; Guan et al., 2009), аскорбатпероксидаза (Sarowar et al., 2005; Wang et al., 2005) и других (Melchiorre et al., 2009a; Roxas et al., 2000), а также «закаливание» посредством умеренного окислительного стресса (Gechev et al., 2002; Gao et al., 2010) увеличивали активность антиоксидантных ферментов и, в результате, устойчивость растений к различным стрессам, что подчеркивает их важную роль в приобретении растительного иммунитета.

1.8.3. Механизм передачи сигналов с участием активных форм кислорода

Стационарный внутриклеточный уровень АФК, продолжительность, локализация и интенсивность сигнала регулируются в клетках посредством экспрессии генома. В то же время АФК могут быть сами вовлечены в регуляцию экспрессии генов (Suzuki et al., 2011).

Доказано, что первичными сенсорами АФК являются редокс-чувствительные белки: через них осуществляется дальнейшая передача сигналов к MAP-киназным каскадам и/или к факторам транскрипции, активируя систему трансляции и синтез необходимых белков (Pitzschke and Hirt, 2006; Pogson et al., 2008). Передача информации на факторы регуляции транскрипции также может осуществляться другими путями, включая систему фосфорилирования (Gupta and Luan, 2003; Rentel et al., 2004), кальциевые каналы (Mori et al., 2004) и G-белки (Joo et al., 2005). Так, было установлено, что перекись напрямую влияет как на активность тирозиновых протеинфосфатаз (ингибирует их, окисляя сульфгидрильные группы каталитического центра), так и тирозиновых протеинкиназ (активирует их, окисляя SH-группы) (Roxas et al., 2000). Кроме того, передача сигнала может осуществляться

напрямую через окисление цистеиновых остатков регуляторных белков (Pfannschmidt et al., 2009).

Отдельным аспектом является изучение особенностей функционирования сигнальных систем в условиях, когда клетки находятся в состоянии стресса, что сопровождается изменением содержания внутриклеточных АФК и сдвигом редокс-статуса. Особый интерес вызывают ферменты, ответственные за генерацию АФК: НАДФН-оксидаза, протеинкиназа С и ферменты клеточной стенки – оксалактоксидазы, пероксидазы и аминоксидазы (Shaw and Long, 2003; Rubio et al., 2004; Pauly et al., 2006).

1.8.4. Физиологическая роль в жизнедеятельности растений

Высокая реакционная способность АФК способна приводить к окислению большого перечня химических групп, что сопровождается модификацией или деградацией белков, разрушением липидов мембран и хлорофилла, повреждением структуры ДНК и дезорганизацией цитоскелета. Вследствие перекисного окисления липидов нарушаются гидрофобность и проницаемость липидного бислоя, а также функционирование ассоциированных с ним ферментных систем. Под действием АФК инактивируются структурные белки, белки-каналы и белки транспортеры, которые становятся мишенями для специальных протеиназных комплексов, осуществляющих их полную деградацию (Dat et al, 2000; Foyer and Noctor, 2005). Среди мишеней, особенно легко повреждаемых АФК, находятся ферменты и ферментные комплексы, содержащие железосерные кластеры: их контакт с $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 провоцирует реакции Фентона. Особенно опасным является гидроксильный радикал, поскольку он не только инициирует разрушение мембран и деградацию белков, но и разрушает углеводные мостики между нуклеотидами, вызывая разрыв цепей ДНК и РНК, что является одним из факторов природного мутагенеза (Dumanović et al., 2021; Mansoor et al., 2022).

Долгое время АФК рассматривали только с точки зрения проявления деструктивной функции, однако, за последние годы накоплено большое количество экспериментальных данных об их значительном вкладе в регуляцию физиологических процессов. Установлено участие АФК в активации реакций, сопровождающих процессы роста и дифференцировки (Schopfer et al., 2002; Foreman et al., 2003). Было установлено, что определенная концентрация перекиси необходима для индукции корнеобразования (Konieczny, 2014), соматического эмбриогенеза (Li et al., 2007, Agrawal and Purohit, 2012) и регенерации (Siminis et al., 1994; Kairong, 1999). АФК участвуют в развитии органов взрослых растений (Liszka et al., 2004; Foreman et al., 2003) и регулируют процессы полярного роста (Cárdenas, 2009), закрытие устьиц (Pei et al., 2000; An et al., 2008), светоиндуцированное движение хлоропластов (Maai et al., 2011) и апоптоз (Ishikawa et al., 2013), а также выполняют сигнальную функцию в неблагоприятных для растений условиях (Levine et al., 1994; Suzuki et al., 2012; Puppo et al., 2013).

1.8.5. Роль активных форм кислорода при стрессах различного происхождения

АФК играют ключевую роль в развитии устойчивости у растений к широкому спектру биотических и абиотических стресс-факторов. Среди самых первых неспецифических защитных реакций растений – быстрая транзиторная генерация АФК, или *окислительный взрыв* (Yoshioka et al., 2008). В зависимости от концентрации и места образования АФК могут оказывать токсичное действие и вызывать гибель растения, или выполнять функцию сигнальных молекул и способствовать процессу адаптации. Активация редокс-систем плазмалеммы и усиленное образование в апопласте АФК является одной из универсальных реакций растительных клеток на стресс, что также указывает на важную роль АФК в приобретении устойчивости. При этом окислительный стресс является одним из главных факторов снижения роста и урожайности (Chaki et al., 2020).

Генерация АФК при абиотических стрессах. Одной из важнейших причин повреждений от различных видов стрессов является избыточное образование и накопление АФК (Suzuki et al., 2012). Многократное увеличение внутриклеточных АФК – супероксида, перекиси и гидроксильного радикала – характерная реакция растения в ответ на солевой стресс, гипоксию затопление, а также воздействие озона (ApeI and Hirt, 2004; Gill and Tuteja, 2010). Причина данного явления связана с активацией АФК-генерирующих ферментов и инактивацией антиоксидантных ферментов, перевосстановленностью ЭТЦ митохондрий и хлоропластов, а также стохастические эффекты, приводящие к взаимодействию с молекулярным кислородом (Dumanović et al., 2021). При тепловом воздействии в тилакоидах происходит дестабилизация потоков электронов в ЭТЦ, что увеличивает вероятность стохастического образования АФК (De Ronde et al., 2004). В результате действия АФК может происходить угнетение всех процессов жизнедеятельности и гибель растительного организма. Однако растения также могут выдержать и адаптироваться к неблагоприятным условиям. АФК являются необходимыми посредниками в процессах адаптации: через регулирующее действие абсцизовой кислоты они вызывают закрытие устьиц в ответ на засуху, чрезмерную освещенность и экстремальные температуры (Postiglione and Muday, 2020). Кроме того, предварительная обработка слабым раствором перекиси повышала устойчивость растений к низким положительным температурам и интенсивному освещению (Prasad et al., 1994; Karpinski et al., 1999; Karpinska et al., 2000). Повышение устойчивости коррелировало с увеличением содержания и активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбат-, глутатионпероксидазы, гваяколовой пероксидазы и глутатиона. Добавление перекиси в суспензионную культуру сои приводило к активации антиоксидантных ферментов глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы; увеличению синтеза цитозольной аскорбатпероксидазы (Morita et al., 2006), а также стимулировало накопление белков теплового шока HSP22 в митохондриях клеток томата (Li et al.,

2015). В то же время, в растениях, подвергшихся абиотическому стрессу, зарегистрированы случаи снижения активности АФК-элиминирующих ферментов (Hasanuzzaman et al., 2020), что свидетельствует о комплексности регуляторных механизмов, индуцируемых перекисью. Кроме того, АФК также способны выполнять функцию вторичных мессенджеров и регулировать экспрессию защитных генов, продукты которых необходимы для репарации повреждений, восстановления гомеостаза и акклиматизации к новым условиям. В их числе гены, контролирующие синтез белков-шаперонов, участников сигнальных каскадов, ферментов, отвечающих за деградацию белков, а также участвующих в углеводном и энергетическом метаболизме.

Генерация АФК при биотических стрессах. Новое представление о сигнальной функции АФК появилось при исследовании гормональной сигнализации и регуляции экспрессии генов, участвующих в защите растений при биотическом стрессе. Последний может быть вызван присутствием патогенов (вирусы, бактерии, грибы), насекомых, травоядных и грызунов. В ответ на проникновение патогена в растении происходит генерация АФК, разделенная на две фазы: начальную, или неспецифическую, – она начинается через несколько минут после заражения, и вторичную, которая начинается через 1–3 часа и зависит от распознавания растением-хозяином несовместимых патогенов (Baker and Orlandi, 1995; Tenhaken et al., 1995). Было показано, что трансгенные растения картофеля (Wu et al., 1995), арабидопсиса (Bindschedler et al., 2006) и стручкового перца (Choi et al., 2007) с увеличенным уровнем H_2O_2 проявляли повышенную устойчивость к патогенам.

Примечательно, что в окружающих некрозы тканях перекись может действовать как вторичный мессенджер и индуцировать экспрессию защитных генов. Так, добавление элиситора в суспензионную культуру сои приводило к H_2O_2 -индуцируемой активации экспрессии генов, кодирующих фенилаланин-аммоний-лиазу – ключевой фермент биосинтеза фитоалексинов (Moesta et al., 1982), хитиназу и ферменты фенилпропаноидного биосинтеза (Lamb et al., 1989). Совместно с NO ,

перекись активирует экспрессию гена 2-гидроксилазы бензойной кислоты, что приводит к аккумуляции салициловой кислоты в листьях *Nicotiana tabacum* (Leon et al., 1995). В условиях повышенного содержания салициловой кислоты происходит ингибирование ферментов каталазы и аскорбатпероксидазы, утилизирующих перекись, а также активация процессов перекисного окисления липидов, что в совокупности служит сигналом для запуска защитных реакций и развития системного ответа в здоровых тканях (Chen et al., 1993; Martinez et al., 2000). Кроме того, в результате деградации липидов образуются фитогормоны, например, жасмонат и метилжасмонат, абсцизовая кислота, а также большая группа C₆ и C₁₂ оксипиринов, которые выполняют защитную и сигнальную функции при атаке патогена (Feussner and Wasternack, 2002). Также обнаружено включение ранее «молчащих» защитных генов, кодирующих синтез *de novo* экстенсинов (богатых гидроксипролином гликопротеинов), PR (pathogenesis-related)-белков и ингибиторов протеиназ как в сайте поражения, так и в тканях, удаленных от источника инфекции (Bell et al., 1986; Somssich et al., 1986). В результате этих изменений растение выживает и приобретает системную устойчивость к последующему инфицированию данным патогеном. В то же время, взаимодействуя с NO, перекись может вызывать запрограммированную гибель клеток, ограничивая распространение инфекции (Lombardi et al., 2010; Lin et al., 2012).

Таким образом, в возникновении реакций сверхчувствительности и системной устойчивости кроме АФК также участвуют другие сигнальные молекулы – NO, этилен, жасмоновая и салициловая кислоты, которые могут действовать как независимо друг от друга, запуская отдельные элементы защитных программ, так и в совокупности. Более того, вероятно, что с их помощью растения способны передавать сигнал о возникновении опасности: выделяясь в атмосферу, этилен и летучие эфиры жасмоновой и салициловой кислот действуют на здоровые растения, активируя в них защитные реакции (Maleck and Dietrich, 1999).

Очевидно, что эффекты АФК множественны и зависят от их разновидности, концентрации и локализации в растительной клетке. Например, в результате транскриптомного анализа *A. thaliana* установлено, что перекись, супероксидный радикал и синглетный кислород активируют разные гены, однако, наблюдались и определенные пересечения (Suzuki et al., 2011). Так, у перекиси и супероксидного радикала было 37% общих активированных транскриптов, перекиси и синглетного кислорода – 6%, а у супероксидного радикала и синглетного кислорода – 3%. При этом только 2% проанализированных генов неспецифично реагировали на присутствие всех трех видов АФК. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что, с одной стороны, отличные по происхождению АФК вовлечены в регуляцию различных сигнальных каскадов, а с другой – о синергизме их действия, что в совокупности делает АФК универсальным инструментом внутриклеточной сигнализации.

1.9. Вторичные метаболиты *Arabidopsis thaliana*

1.9.1. Общая характеристика и основные группы метаболитов

Растения, в отличие от представителей других царств, демонстрируют гораздо более значительное разнообразие по содержанию низкомолекулярных метаболитов, которые принято называть вторичными. Вторичные метаболиты выполняют ряд регуляторных функций, не являясь при этом жизненно необходимыми для роста и развития растений. Значительное многообразие вторичных метаболитов достигается, в том числе, за счет различных модификаций у общего предшественника (Kliebenstein, 2004). Кроме того, замена функциональных групп может приводить к регуляции биологической активности, например, гибберелинов, ауксинов и глюкозинолатов (Kastell et al., 2013). К настоящему моменту у резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) – одного из главных модельных объектов генетики растений – идентифицировано более 170 вторичных метаболитов, объединенных в 5 классов соединений (Mueller et al., 2003; D’Auria et al., 2005).

Азотсодержащие соединения. Большая часть азотсодержащих вторичных метаболитов образуется из аминокислот. Многие из них эволюционировали и функционируют как защитные соединения. Их накопление часто активируется в ходе инфицирования патогенами. Основными соединениями этой группы являются алкалоиды, цианогенные глюкозиды и глюкозинолаты, амины, а также небелковые аминокислоты.

Глюкозинолаты. Подкласс азотсодержащих соединений, богатых серой, и наиболее характерный для *A. thaliana* и других представителей семейства Brassicaceae (D'Auria et al., 2005). Это наиболее многочисленная группа (>36 структур) вторичных метаболитов арабидопсиса (Kliebenstein, 2004). Данные соединения синтезируются в растении повсеместно, их содержание значительно увеличивается в случае защиты от насекомых и патогенов (Wittstock et al., 2003). Однако биологической активностью обладают не сами глюкозинолаты, а продукты их гидролиза ферментами мирозиназами – нитрилы, изотиоцианаты, тиоцианаты, оксазолидин-2-тионы и эпитионитрилы (Bones and Rossiter, 1996; Halkier and Du, 1997). Данные соединения представляют интерес с точки зрения их защитных функций в растении и благотворного влияния на здоровье человека.

Алкалоиды. К настоящему моменту у *A. thaliana* идентифицированы только индольные алкалоиды (Facchini et al., 2004), что связывают с отсутствием в их геноме генов орнитин декарбоксилазы – ключевого фермента биосинтеза истинных алкалоидов (Allen, 2002). Однако не исключено наличие тропановых алкалоидов (D'Auria and Gershenzon, 2005). К группе индольных алкалоидов относят камалексин – это единственный представитель группы индол-серосодержащих алкалоидов у арабидопсиса. Камалексин относят к фитоалексинам – соединениям, биосинтез которых усиливается в случае биотического стресса. Кроме того, известно, что данное соединение обладает противоопухолевой активностью (Mezencev et al., 2003; Smith et al., 2014).

Фенилпропаноиды. Собирабельная группа вторичных метаболитов фенилпропаноидного пути биосинтеза, который является основным источником ароматических вторичных метаболитов. В группу относят сложные эфиры фенилпропаноидов, флавоноиды и антоцианы. Фенилпропаноиды также являются предшественниками лигнина. Основным предшественником вторичных метаболитов данного типа является аминокислота фенилаланин, из которой формируются разнообразные соединения C₆-C₃ ряда. К простейшим фенилпропаноидам арабидопсиса относят производные коричной кислоты, включая сложные эфиры, спирты, альдегиды и амиды. К этой группе также относят кумарины, в частности, скополин, обнаруженный в стеблях и корнях (Franke et al., 2002). Предполагают, что из фенилпропаноидов могут образовываться бензеноиды – вторичные метаболиты C₆-C₁ ряда. У арабидопсиса обнаружен ряд бензеноидов, включая салициловую и сиринговую кислоты, метил-*p*-гидроксилбензоат и *p*-гидроксибензамид (Lim et al., 2002), а также летучие бензеноиды – метилсалицилат и метилбензоат (Chen et al., 2003a). Обнаружено, что у цветущих растений *A. lyrata* доминирующими летучими веществами являются бензальдегид и фенилацетальдегид, что дает основание для поиска соответствующих соединений у *A. thaliana* (Peer and Murphy, 2003).

Флавоноиды. Наиболее многочисленная группа вторичных метаболитов, представленная соединениями C₆-C₃-C₆ ряда. Фенольные соединения синтезируются во всех органах растения и их накопление зависит от стадии развития и условий произрастания. У арабидопсиса наиболее часто встречаются флавонолы, в частности, гликозиды кемпферола, однако, могут встречаться также гликозиды кверцетина. Агликоны флавонолов, кемпферол и кверцетин, также обнаруживаются у арабидопсиса и играют важную роль на ранних стадиях развития растения, блокируя полярный транспорт ауксина (Brown et al., 2001; Peer et al., 2004). У арабидопсиса обнаружена еще одна группа соединений из класса флавоноидов – антоцианы. Они представлены, в основном, красными, синими и фиолетовыми пигментами в стеблях и листьях. Основной антоциан *A. thaliana* имеет цианидиновое

ядро с четырьмя присоединенными сахарами и одиночными *p*-кумароильными, синапоильными и малонильными остатками (Bloor and Abrahams, 2002). К второстепенным антоцианам относятся соединения, имеющие аналогичную структуру, но лишённые остатка сахара или остатка синапоила (Bloor and Abrahams, 2002). В семенах арабидопсиса обнаружены полимеры флавоноидов, получившие название проантоцианидинов, или конденсированных танинов. Они не играют ключевой роли для развития эндосперма и эмбриона, но могут регулировать жизнеспособность и состояние покоя (Debeaujon et al., 2003).

Терпеноиды. Второй по многочисленности (после флавоноидов) класс соединений, в состав которых входят изопреновые единицы (C_5 -единицы). В основе классификации лежит число C_5 -единиц, выделяют моно-, сескви-, ди-, три-, сестер-, поли- и тетратерпены (каротиноиды). Терпены играют значительную роль для роста и развития, а также для осуществления коммуникации между растением и окружающей средой. В арабидопсисе обнаружено около 20 моно- и сесквитерпенов, содержащих две и три изопреновые единицы, соответственно (Chen et al., 2003b). Сесквитерпены выделяются соцветиями в период цветения, они представлены сложной смесью соединений, в которой преобладает β -кариофиллен (D'Auria and Gershenzon, 2005). Примечательно, что паттерн экспрессии терпенсинтаз в органах различался, но шесть терпенсинтаз оказались специфичными для цветков и их биохимическая активность соответствовала смеси терпенов, присутствующей в цветочных летучих веществах. При повреждении насекомыми вегетативные органы арабидопсиса также выделяют смесь летучих терпенов, среди которых обнаруживаются монотерпены α -пинен, лимонен, мирцен, (E)- β -оцимен и линалоол, гомотерпен C_{16} , 4,8,12-триметил-1,3,7,11-тридекатетраен, 1,8-цинеол (в корнях), а также сесквитерпен лонгифолен (van Poescke et al., 2001; Steeghs et al., 2004). Список соединений продолжает пополняться. Вероятно также наличие тритерпенов, относящихся к высшим терпенам. В геноме арабидопсиса идентифицированы три гена, кодирующие ферменты оксидосквален циклазы, которые были способны

образовывать тритерпеновые спирты *in vitro*, однако, соответствующие вещества до сих пор не были обнаружены *in planta* (Segura et al., 2000; Fazio et al., 2004).

Производные жирных кислот. Растения синтезируют ряд производных жирных кислот, таких как замещенные кислоты и алканы, содержащиеся в поверхностных восках и суберине, а также оксипирины – продукты липоксигеназного метаболического пути. Эти соединения участвуют в широком спектре функций, включая транспорт и хранение жирных кислот, а также выполняют гормональную регуляцию, однако, большинство из перечисленных веществ обычно не относят к вторичным метаболитам. У *A. thaliana* в эту группу относят жасмоновую кислоту, травматин, а также циклогептадиены и длинноцепочечные альдегиды (van Poescke et al., 2001).

1.9.2. Пути биосинтеза вторичных метаболитов

В данном разделе будут рассмотрены наиболее полно описанные пути биосинтеза вторичных метаболитов, обнаруженных в *A. thaliana*.

Флавоноиды. Несмотря на многообразие структур, общими для всех флавоноидов являются первые этапы биосинтеза, в ходе которых к активированной молекуле гидроксикоричной кислоты (*p*-кумароил-КоА) ферментом калхонсинтазой (CHS) присоединяются молекулы малонил-КоА (D’Auria and Gershenzon, 2005) (Рисунок 8). Так образуется нарингенин халкон – первый центральный промежуточный метаболит. Он довольно легко преобразуется в следующий промежуточный продукт – нарингенин – под действием фермента калхонизомеразы (CHI). С участием калхонредуктазы он также может преобразовываться в изоликвиритигенин, который служит предшественником флаванона ликвиритигенина. Следующий шаг – внутримолекулярная циклизация халконов с участием фермента флаванон-3-гидроксилазы (F3H) – приводит к образованию **флаванонов**, в структуре которых теперь три гетероциклических кольца – А, В и С. Флаваноны нарингенин, ликвиритигенин, пентагидроксифлаванон и эриодиктиол

представляют собой центральную точку ветвления пути биосинтеза флавоноидов, выступая в качестве общих субстратов для биосинтеза структур флавонов, изофлавонов и флобафенов, а также для последующих этапов биосинтеза других групп флавоноидов. Из флаванонов далее могут образовываться **флавоны** с участием флавоносинтазы (Martens and Mithöfer, 2005). Последняя катализирует образование двойной связи в С кольце и является ключевым ферментом биосинтеза флавонов. Нарингенин и ликвиритигенин могут выступать субстратами для изофлавоносинтазы – ключевого фермента биосинтеза **изофлавонов** – с последующим образованием (при участии гидроксиизофлавоно дегидратазы) изофлавонов генистеина и дайдзеина, соответственно (Sohn et al., 2021). Нарингенин и эриодиктиол также служат предшественниками в пути биосинтеза флобафенов. Флавононы могут выступать в качестве предшественников для синтеза дигидрофлавонолов – промежуточных метаболитов биосинтеза флавонолов, антоцианов и проантоцианидинов. Фермент флавонон-3-гидроксилаза катализирует превращение нарингенина, пентагидроксифлаванона и эриодиктиола в дигидрофлавонолы дигидрокемпферол (ДНК), дигидрокверцетин (ДНҚ) и дигидромирицетин (ДНМ), соответственно. ДНК также может подвергаться превращениям с участием двух ферментов флавоноид гидроксилаз – F3'H и F3'5'H – оба они относятся к цитохром Р450-зависимым монооксигеназам и катализируют гидроксилирование флавоноидов в положениях С-3' или С-3' и С-5' кольца В, соответственно. Так, F3'H катализирует образование ДНҚ, который является предшественником цианидина в антоциановом пути и кверцетина – в пути биосинтеза флавонолов. ДНМ, образующийся из ДНК при участии F3'5'H, является прямым предшественником дельфинидина в антоциановом пути и мирицетина – в флавонольном пути, в то время как ДНК может быть преобразован в пеларгонидин (предшественник антоцианов) и кемпферол (предшественник флавонолов). Образование **флавонолов** из вышеуказанных дигидрофлавонолов происходит с участием флавонолсинтазы (FLS) – ключевого фермента этой ветви биосинтеза. С её участием образуются кемпферол, кверцетин и

мирицетин, которые затем могут подвергаться различным модификациям (преимущественно, метилированию и ацетилированию) с образованием множества производных. Флавонолы это гидроксильированные в С-3 положении кольца С флавононы, но также для этого положения характерна склонность к гликозилированию, и именно в такой форме они чаще всего обнаруживаются в растениях (Сао et al., 2018). Интересно отметить, что в силу использования одних и тех же промежуточных соединений, между флавоносинтазой, изофлавоносинтазой и флавонон-4-редуктазой (катализирует образование флобафенов) наблюдается конкуренция по отношению к субстратам (Сао et al., 2018).

Дигидрофлавонолы ДНК, ДНҚ и ДНМ могут выступать в качестве субстратов для НАДФН-зависимой редуктазы (DFR), которая катализирует их превращение в **лейкоантоцианидины** лейкопеларгонидин, лейкоцианидин и лейкодельфинидин, соответственно. Бесцветные лейкоантоцианидины далее превращаются в окрашенные антоцианидины пеларгонидин, цианидин и дельфиндин под действием фермента антоцианидинсинтазы. Антоцианидины по своей природе являются нестабильными соединениями и под действием UDP-глюкозофлавоноид-3-глюкозилтрансферазы превращаются более стабильные **антоцианы**, которые представляют собой их гликозилированные формы. Из антоцианидинов также могут быть синтезированы **проантоцианидины**, известные также как конденсированные танины (Lepiniec et al., 2006). Очевидно, что биосинтез флавоноидов должен подчиняться строгому контролю, который достигается, главным образом, посредством транскрипционной регуляции. Центральное место в ней занимают MBW комплексы, состоящие из транскрипционных факторов семейств MYB, bHLH и WD40 (Xu et al., 2015). Среди представителей семейства MYB наибольшее влияние на содержание флавоноидов оказывают транскрипционные факторы подсемейства R2R3, они активируют экспрессию биосинтетических генов – *CHS*, *CHI*, *F3H* и *DFR*. Однако эти факторы могут выступать также и в роли репрессоров (Xu et al., 2018).

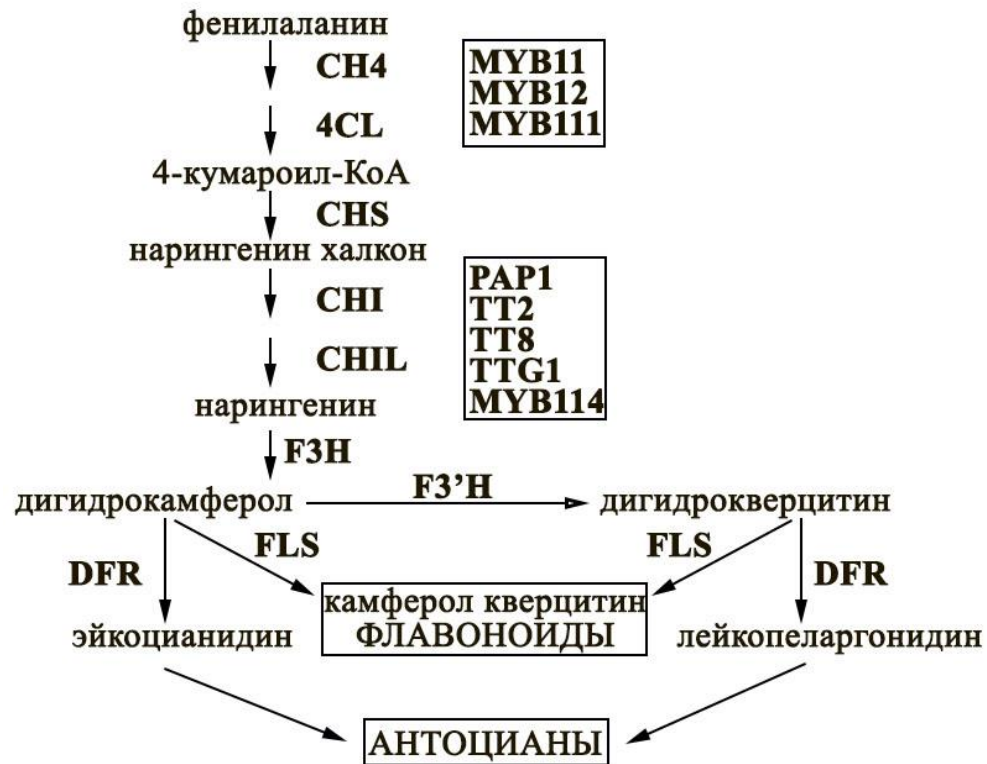


Рисунок 8 – Схема биосинтеза флавоноидов.

Глюкозинолаты. Биосинтез глюкозинолатов возможен с использованием в качестве предшественников аминокислот метионина, триптофана, фенилаланина или лейцина (Wittstock and Halkier, 2002). В соответствии с аминокислотой-предшественником глюкозинолаты классифицируют на алифатические (получены из метионина, аланина, лейцина, изолейцина, валина или глутамата), индольные (из триптофана) и ароматические (из фенилаланина и тирозина). Алифатические глюкозинолаты представляют собой наиболее разнообразную группу у арабидопсиса и многих других видов отряда Brassicales (Blažević et al., 2020).

На первом этапе биосинтеза глюкозинолатов происходит удлинение боковой цепи аминокислоты-предшественника посредством дезаминирования с последующим присоединением метиленовой группы (Рисунок 9). В некоторых случаях этот этап может отсутствовать (Chhajed et al., 2020). На втором этапе молекула предшественника подвергается окислению цитохром Р450-зависимыми

монооксигеназами семейства CYP79 и образуются альдоксимы – коровые структуры глюкозинолатов (Ishida et al., 2014). На третьем этапе CYP83 катализирует превращение альдоксимов до нитрильных оксидов, либо до аци-нитросоединений. CYP83B1 окисляет как триптофановые, так и фенилаланиновые ацетальдоксимы, а CYP83A1 превращает различные алифатические альдоксимы (Bak et al., 2001; Bak and Feyereisen, 2001; Hansen et al., 2001). Образующиеся продукты цитохрома P450 конъюгируют с донором серы глутатионом под действием глутатион-S-трансфераз с образованием S-алкил-тиогидроксиматов, которые служат субстратами для углерод-серосодержащей лиазы SUR1 (Mikkelsen et al., 2004). Это первое ферментативное превращение в основном пути биосинтеза глюкозинолатов, связывающее их сборку с ферментами серного метаболизма (Ravilious and Jez, 2012; Jez, 2019). Тиогидроксиматы, образующиеся под действием SUR1, подвергаются S-гликозилированию, катализируемому глюкозилтрансферазами семейства UGT74, с образованием десульфоглюкозинолатов. UGT74C1 гликозилирует молекулы, полученные из метионина, а UGT74B1 модифицирует соединения, полученные из ароматических аминокислот (Grubb et al., 2004; Gachon et al., 2005). Поскольку большинство модификаций последовательны, регулируя активность и содержание определенных ферментов стало возможным исследовать биологическую роль определенных модификаций (Kliebenstein et al., 2002; Kliebenstein et al., 2001).

В биосинтезе глюкозинолатов участвует множество генов, ферментов и факторов транскрипции (Sønderby et al., 2010a). Несмотря на то, что практически все ферментативные реакции превращения глюкозинолатов описаны (Bell, 2019) и идентифицировано значительное количество *cis*-регуляторных элементов генов биосинтеза, очевидно, что сеть задействованных транскрипционных факторов намного сложнее и обширнее, чем было предложено ранее. Среди наиболее специфичных для биосинтеза глюкозинолатов выделяют подгруппу R2R3 семейства MYB. Представители этой подгруппы содержат два N-концевых MYB повтора, определяющих специфичность связывания с ДНК, у некоторых также

обнаруживается транс-активирующий TAD домен в С-концевой области (Feller et al., 2011). Три представителя семейства – MYB28, MYB29, MYB76 – являются центральными позитивными регуляторами биосинтеза алифатических глюкозинолатов. Аналогично, транскрипционные факторы MYB34, MYB51 и MYB122 положительно регулируют накопление индольных глюкозинолатов (Mitreiter and Gigolashvili, 2021). В создании транскрипционного комплекса также принимают участие представители семейства bHLH со структурным мотивом спираль-петля-спираль. Наиболее значительный вклад вносят транскрипционные факторы MYC2/bHLH06, MYC3/bHLH05, MYC4/bHLH04 и, в меньшей степени, MYC5/bHLH28 – все они способны взаимодействовать с факторами MYB, описанными выше (Schweizer et al., 2013; Frerigmann et al., 2014).

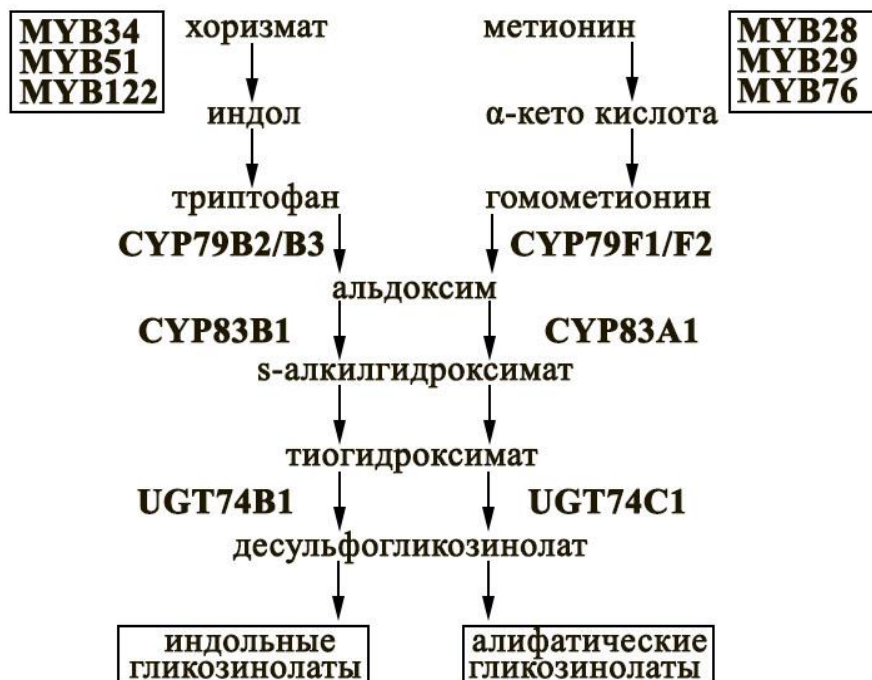


Рисунок 9 – Схема биосинтеза глюкозинолатов.

Алкалоиды. К настоящему моменту известно о присутствии в *A. thaliana* только одного алкалоида – камалексина. Значительный интерес к этому вторичному метаболиту вызван тем, что он считается основным фитоалексином, участвующим в

биотических реакциях у *A. thaliana* (Glazebrook and Ausubel, 1994). Путь биосинтеза камалексина (Рисунок 10) начинается с превращения триптофана в индол-3-ацетальдоксим под действием двух функционально перекрывающихся монооксигеназ – CYP79B2 и CYP79B3 (Glawischnig et al., 2004). За этой стадией следует дегидратация индол-3-ацетальдоксима до индол-3-ацетонитрила, катализируемая монооксигеназами CYP71A12 (Millet et al., 2010; Saga et al., 2012) и CYP71A13 (Nafisi et al., 2007). Далее IAN конъюгируется с глутатионом с помощью глутатион-S-трансферазы GSTF6 (Su et al., 2011) и метаболизируется до цис-индол-3-ацетонитрила с помощью γ -глутамилпептидаз GGP1 и GGP3 (Geu-Flores et al., 2011). Наконец, фермент PAD3/CYP71B15 катализирует две последние реакции биосинтеза, завершающиеся формированием камалексина (Zhou et al., 1999; Schuhegger et al., 2006; Böttcher et al., 2009).



Рисунок 10 – Схема биосинтеза камалексина.

Известно, что содержание камалексина значительно увеличивается в ответ на грибную (Zook, 1998) и бактериальную (Denoux et al., 2008; Koprivova et al., 2019) инфекции, а также на присутствие почвенного протиста *Plasmodiophora brassicae*, возбудителя одного из наиболее вредоносных заболеваний крестоцветных (Lemarié et al., 2015). Положительными регуляторами биосинтеза камалексина являются транскрипционные факторы MYB34, MYB51 и MYB122 (Frerigmann et al., 2015). Транскрипционный фактор WRKY33 напрямую активирует транскрипцию генов биосинтеза камалексина, связываясь с их промоторами (Birkenbihl et al., 2012). Дополнительное усиление транскрипции достигается посредством фосфорилирования WRKY33 протеинкиназами СРК5/6 и MAPK3/6 (Mao et al., 2011; Zhou et al., 2020).

Терпеноиды. Биосинтез терпеноидного остова осуществляется из двух предшественников: изопентенилпирофосфата или его изомера – диметилаллилпирофосфата (Wang et al., 2019). В геноме арабидопсиса были обнаружены гены, кодирующие более 30 терпенсинтаз (Aubourg et al., 2002). Эти гены отвечают за превращение различных аллильных пренилпирофосфатов, таких как геранилпирофосфат (C₁₀), фарнезилпирофосфат (C₁₅) и геранилгеранилпирофосфат (C₂₀), в монотерпены (C₁₀), сесквитерпены (C₁₅) и дитерпены (C₂₀), соответственно. Позднее были клонированы и охарактеризованы β-мирцен/(E)-β-оцимен монотерпенсинтаза и другие терпенсинтазы, ответственные за синтез летучих терпенов во время цветения (Bohlmann et al., 2000).

1.10. Вторичные метаболиты *Rubia cordifolia*

1.10.1. Общая характеристика и основные группы метаболитов

Семейство Rubiaceae насчитывает около 13 тысяч видов растений, что обуславливает их повсеместное распространение, включая Индию, Китай, Пакистан, Монголию, однако наиболее широко представители Rubiaceae распространены в тропической климатической зоне, являясь одним из наиболее значимых семейств

хозяйственных и лекарственных растений (Martins and Nunez, 2015). Семейство Rubiaceae обнаруживает большое разнообразие вторичных метаболитов, таких как иридоиды, терпеноиды (ди- и тритерпены), индольные алкалоиды, антрахиноны, флавоноиды и другие фенольные производные, преимущественно биоактивные алкалоиды (Martins and Nunez, 2015). Распределение вторичных метаболитов у Rubiaceae подвержено ряду закономерностей, которые часто используются для установления ботанического происхождения, описания и классификации многочисленных представителей семейства (Han et al., 2001). В качестве основных химических маркеров семейства наиболее часто указывают индольные алкалоиды (Martins and Nunez, 2015). Последние встречаются только в семействах, относящихся к порядку Gentianales, куда кроме Rubiaceae относят также семейства Loganiaceae, Аросунасеae и Naucleaceae (Deshkar et al., 2008) Индольные алкалоиды вне порядка Gentianales встречаются довольно редко, и когда они обнаруживаются, это, как правило, простые структуры. В соответствии с современной классификацией выделяют три подсемейства – Rubioideae, Cinchonoideae и Ixoroideae, каждый из которых характеризуется определенным профилем вторичных метаболитов. Так, например, в подсемействе Ixoroideae превалирует содержание иридоидов и тритерпенов, у растений подсемейства Cinchonoideae преобладают алкалоиды разных групп с бóльшим содержанием индольных алкалоидов, тогда как в подсемействе Rubioideae наибольшая доля вторичных метаболитов представлена антрахинонами и, в меньшем количестве, иридоидами (Martins and Nunez, 2015).

Типичным представителем подсемейства Rubioideae является марена сердцелистная (*Rubia cordifolia* L.), широко используемая в традиционной медицине Индии и Китая. Это многолетнее растение-лиана с очень длинными, гибкими корнями, с тонкой красной отслаивающейся корой (Wu et al., 1991). Стебли часто имеют длинное, грубое, бороздчатое, деревянистое основание. Цветки мелкие, белые или зеленоватые, в верхушечных метелках или соцветиях. Плоды шаровидные, темно-пурпурные или черные (Deshkar et al., 2008). В экстрактах *R. cordifolia*

обнаружены многочисленные вторичные метаболиты, включая алкалоиды, сапонины, таннины, фенолы, гликозиды, флавоноиды, терпены, стероиды, хиноны и каротиноиды (Humbare et al., 2022). Среди хинонов в основной массе встречаются гликозиды антрахинонов, включая 1-гидрокси-2-метоксиантрахинон, 1,4-дигидрокси-2-метил-5-метоксиантрахинон, 1,3-диметокси-2-карбоксиантрахинон и рубиадин (1,3-дигидрокси-2-метилантрахинон) (Dosseh et al., 1981). В марене сердцелистной также обнаружены антрахиноны пурпурин и муньистин, которые обуславливают окраску корней, гаранцин и ализарин, многочисленные нафтохиноны и нафтогидрохиноны (Deshkar et al., 2008; Miyazawa and Kawata, 2006). В числе иридоидов идентифицированы 6-метоксигенипозидовая кислота и её производные (Wu et al., 1991). Выделены тритерпеноиды рубипразин А, В и С вместе с арборановыми тритерпеноидами, такими как рубиарбонолы А, В, С, D, Е и F (Itokawa et al., 1989; Itokawa et al., 1990). Также в экстрактах марены обнаружены пентациклические тритерпены (Talapatra et al., 1981), эфиры нафтойной кислоты (Hua et al., 1992), а также бициклические гексапептиды, обладающие цитотоксической и противоопухолевой активностями (Deshkar et al., 2008).

1.10.2. Биосинтез антрахинонов в растениях *Rubia cordifolia*

Наиболее многочисленной группой вторичных метаболитов у подсемейства Rubioideae и *R. cordifolia*, в частности, являются антрахиноны (Martins and Nunez, 2015). Последние могут образовываться из широкого круга предшественников и, хотя многие биосинтетические процессы до сих пор неизвестны, общепризнанными являются два пути биосинтеза антрахинонов: поликетидный (обнаружен у грибов и некоторых высших растений) и более сложный хоризмат/сукцинилбензойный путь, представляющий комбинацию шикиматного и терпеноидного путей, который реализуется и у растений семейства Rubiaceae (Han et al., 2001).

В процессе биосинтеза антрахинонов формируются три ароматических кольца – А, В и С (Рисунок 11). Два из них (А и В) происходят из продуктов превращений

шикимовой кислоты (хоризмата и изохоризмата) и α -кетоглутарата с образованием *o*-сукцинилбензойной кислоты (OSB) (Leistner, 1981), тогда как кольцо С происходит из изопентенилдифосфата (IPP), универсального строительного блока для всех изопреноидов.

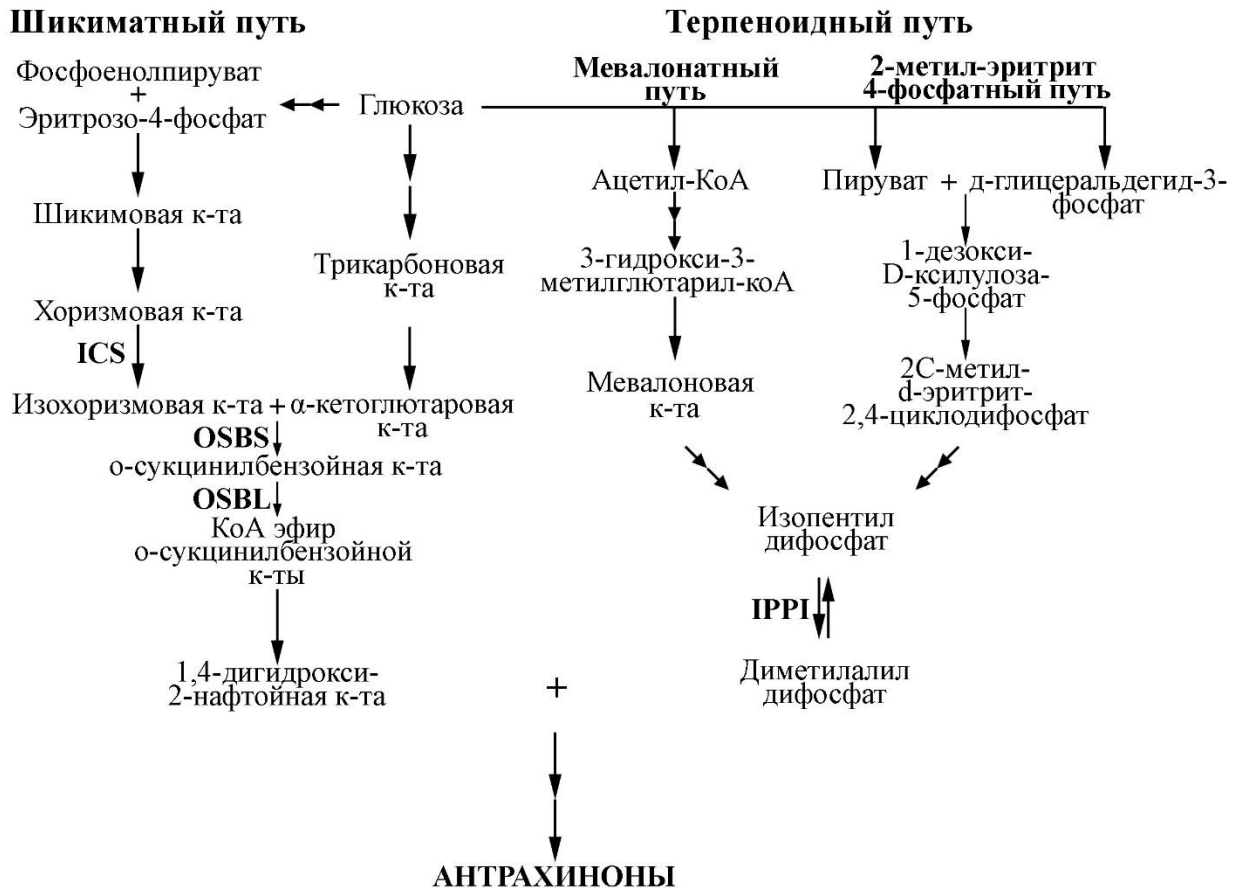


Рисунок 11 – Схема биосинтеза антрахинонов (Han et al., 2001).

При биосинтезе колец А и В хоризмат, полученный по пути шикимата, сначала превращается в изохоризмат. Эта реакция катализируется ферментом изохоризмат-гидроксимутазой, или изохоризмат-синтазой (ICS) (Poulsen and Verpoorte, 1991). Изохоризмат, в свою очередь, превращается в *o*-сукцинилбензойную кислоту в присутствии α -кетоглутарата и тиаминпирофосфата. Реакция катализируется ферментом *o*-сукцинилбензоат-КоА-синтазой (OSBS). Одним из промежуточных

продуктов образования *o*-сукцинилбензойной кислоты из изохоризмовой кислоты является 2-сукцинил-6-гидрокси-2,4-циклогексадиен-1-карбоксилат (Simantiras and Leistner, 1992). Затем происходит активация молекулы *o*-сукцинилбензойной кислоты по алифатической карбоксильной группе с образованием сложного эфира с молекулой коэнзима А (КоА). Эту реакцию катализирует фермент *o*-сукцинилбензоат-КоА-лигаза (OSBL) (Simantiras and Leistner, 1992). Замыкание кольца *o*-сукцинилбензойной кислоты с КоА приводит к образованию 1,4-дигидрокси-2-нафтойной кислоты (DHNA), которая дает начало кольцам А и В в молекуле будущего антрахинона. Дальнейшее пренилирование DHNA приводит к формированию нафтохинона. Формирование С кольца осуществляется посредством циклизации молекулы образовавшегося нафтохинона в присутствии изопентил пирофосфата (IPP), который может быть получен из мевалоната (путь мевалоновой кислоты) или 2-С-метил-D-эритриол-4-фосфата (MEP), или его изомера – 3,3-диметилаллил пирофосфата (DMAPP). На последних стадиях биосинтеза антрахиноны также могут подвергаться модификациям с присоединением гидроксильной или метильной групп к С кольцу.

Энзимология биосинтеза антрахинонов у представителей семейства Rubiaceae до сих пор полностью не изучена. В настоящее время относительно небольшое количество стадий этого пути частично охарактеризовано на уровне ферментов. Так, из культур клеток растений семейства Rubiaceae был выделен и подробно охарактеризован фермент ICS (Ledüc et al., 1991, 1997; van Tegelen et al., 1999). Изучен фермент OSBS, изолированный из суспензионных культурах клеток таких видов, как *Galium mollugo*, *G. verum*, *G. uliginosum* и *Morinda lucida* (Simantiras and Leistner, 1989, 1991). Лигаза OSBL также была очищена и охарактеризована из антрахинон-продуцирующих клеточных культур *Galium mollugo* (Heide et al., 1982; Sieweke and Leistner, 1992). Ферменты, катализирующие оставшиеся стадии и образующие промежуточные продукты, так же, как и их свойства, еще предстоит исследовать.

1.10.3. Фармакологические свойства

Полезные свойства вторичных метаболитов марены для здоровья человека получили широкое признание благодаря их использованию в традиционной медицине. Тем не менее представители семейства мареновых до сих пор являются перспективными объектами для поиска биоактивных соединений, которые позволяют создавать новые препараты природного происхождения (Pereira and Meireles, 2010). К настоящему моменту список известных терапевтических эффектов включает сведения о противовоспалительном, нейропротекторном, антипролиферативном, ранозаживляющем, иммуномодулирующем и противоопухолевом действии экстрактов марены сердцелистной (Ayesha et al., 2010). В зависимости от метода получения и части растения, используемой для получения экстракта, он может быть эффективен для лечения диареи, ротавирусной инфекции и воспалительных процессов (Sun et al., 2016; Gong et al., 2017), а также обладать кардиопротективным и противоопухолевым свойствами (Ghosh et al., 2010; Shilpa et al., 2012; Chandrashekar et al., 2018). Спиртовой экстракт корня растения обладает антитромботическим и проангиогенным действием (Chen et al., 2018). Наиболее биоактивными среди вторичных метаболитов марены являются соединения из группы хинонов, терпеноидов, алкалоидов и их производных. Эти соединения отвечают за антиоксидантную, противовоспалительную и антипролиферативную биологическую активность. В работе Gupta с соавторами (Gupta et al., 1999) из корней марены сердцелистной выделили вещества моллугин, фурумоллугин и дегидро- α -лапахон. Антрахинон моллугин показал способность ингибировать пассивную кожную анафилаксию и предотвращать дегрануляцию тучных клеток у крыс, демонстрируя защитный эффект. Он также проявлял значительную активность против лимфоидного лейкоза у мышей. В другом исследовании моллугин ингибировал провоспалительную продукцию хемокинов (Li et al., 2020). Из корня растения были также выделены фурумоллугин, который обладает противовирусной активностью в отношении вируса гепатита В, и дегидро- α -лапахон.

Пурпурин – еще один представитель группы антрахинонов – обеспечивает антиоксидантные свойства *R. cordifolia* (Singh et al., 2020). Производное пурпурина – псевдопурпурин – улучшает геометрию кости (Wu et al., 2012) и избирательно проявляет противоопухолевую активность (Lajkó et al., 2015). Предполагается, что ключевыми веществами марены, отвечающими за обезболивающие и противовоспалительные свойства, являются ализарин, 6-гидроксирубиадин, пурпурин и рубиадин (Shen et al., 2018). Недавно получены сведения о присутствии антрахинона мориндапарвина А, обладающего противолейкозным действием, в экстрактах *R. cordifolia* (Humbare et al., 2022). Ранее его получали путем химического синтеза из ализарина (1,2-метилендиоксиантрахинона) (Chang et al., 1982).

К настоящему моменту идентифицировано более 100 вторичных метаболитов *R. cordifolia*, которые могут обеспечивать терапевтические свойства (Chang et al., 2000; Shan et al., 2016). Тем не менее, выявление биологической активности и понимание механизма действия каждого обнаруженного соединения представляет собой сложную проблему, ведь многие из этих соединений ограничены в доступности в значительных объемах или обладают специфичностью к определенным растворителям.

1.11. Вторичные метаболиты *Aristolochia manshuriensis*

Кирказон (*Aristolochia* L.) принадлежит к обширному семейству Aristolochiaceae, насчитывающему около 500 видов, распространенных преимущественно в тропических и субтропических регионах (Neinhuis et al., 2005). Эти растения известны благодаря уникальным способам привлечения насекомых для опыления, используя цветочный аромат и специфическую структуру околоцветника. Также представители Aristolochiaceae играют роль растений-хозяев для личинок определенных видов бабочек-парусников (Murugan et al., 2006). Растения рода *Aristolochia* также вызывают значительный интерес в качестве источника природных соединений с лекарственными свойствами, к которым относятся азотсодержащие

метаболиты, флавоноиды, лигнаны, терпеноиды и стероиды. Исторически, в Азии кирказон использовали в народной медицине для лечения широкого спектра заболеваний, включая артрит, ревматизм, стенокардию и инфаркт миокарда, как самостоятельно, так и в сочетании с другими растениями (Lerma-Herrera et al., 2022). Современные исследования подтверждают их эффективность в качестве анальгетиков, средств против малярии, антибактериальных препаратов и антидотов от змеиных укусов (Lerma-Herrera et al., 2022). Тем не менее, использование некоторых видов *Aristolochia* ассоциировано с повышенным риском развития рака мочевыводящих путей и интерстициального фиброза почек (Grollman et al., 2016), что привело к запрету применения продуктов, содержащих кирказон, в качестве лекарственных средств или пищевых добавок в западных странах (Martena et al., 2007).

Реликтовый вид кирказон маньчжурский (*Aristolochia manshuriensis* Kom.), эндемик флоры Маньчжурии, встречается в Корее, Китае и на юго-востоке России (Nakonechnaya et al., 2021). Это растение, чьи высушенные стебли известны в традиционной китайской медицине под названием Гуань Му Тонг, содержит ряд значимых химических соединений. К ним относятся аристолохиевые кислоты I, II, IIIa, IV, аристолозид, аристоламиды, аристолактамы, а также алкалоиды, включая магнофлорин, маншуриенин, тетрандрин и аристопиридион (Cheung et al., 2006; Zhang et al., 2006). В качестве предшественника в биосинтезе рассматриваемых соединений выступает L-тирозин. При этом в процессе превращения, как фенантроновые производные, так и алкалоиды происходят из общих ключевых промежуточных продуктов, (S)-норкоклаурина и (S)-ретикулина (Cui et al., 2022).

Хотя растения *A. manshuriensis* содержат аристолохиевые кислоты, ассоциированные с нефротоксичностью и канцерогенными эффектами при продолжительном использовании, они также являются источником разнообразных соединений с выраженным терапевтическим потенциалом. Среди них, аристолактамы выделяются своим противоопухолевым действием, функционируя

как ингибиторы циклинзависимой киназы 2 (Hegde et al., 2010). Аристоламид II, извлеченный из стеблей данного растения, показал высокую эффективность в уменьшении воспалительных процессов, влияя на продукцию супероксид-анионов и выделение эластазы из нейтрофилов (Chung et al., 2011). Особый интерес представляет магнофлорин – алкалоид с широким спектром фармакологической активности, включающей антидиабетические, противовоспалительные, нейрорпсихофармакологические, иммуномодулирующие, гипотензивные, антиоксидантные и противогрибковые свойства (Xu et al., 2020). Магнофлорин также продемонстрировал способность снижать ишемическое повреждение нейронов коры головного мозга, что может быть связано с антиоксидантным действием, угнетением аутофагии и активацией метаболического пути Sirt1/AMPK (Liang et al., 2022). В этом контексте, актуальной задачей является получение растительного материала *A. manshuriensis* с оптимальным содержанием ценных соединений при одновременном минимизировании концентрации потенциально вредных веществ.

Размножение кирказона осуществляется вегетативными частями растений, семенами или методами регенерации *in vitro*. Эти процессы могут быть как времязатратными, так и довольно трудоемкими. Несмотря на разработку эффективных методов регенерации для таких видов, как *A. indica* (Pattar et al., 2012), *A. cathcartii* (Sarma and Tanti, 2017) и *A. tagala* (Remya et al., 2016), процессы опыления и оплодотворения у этих растений часто приводят к недостаточному завязыванию плодов. Дополнительные сложности включают ограниченные размеры популяций, антропогенное влияние и недостаток природных агентов для распространения семян (Nakonechnaya et al., 2007). В частности, популяции *A. manshuriensis* страдают от генетического дрейфа, вызванного уменьшением их репродуктивной и эффективной численности, в основном из-за деятельности человека (Koren et al., 2009). Поэтому разработка альтернативных источников растительной биомассы, таких как культуры растительных клеток *in vitro*, открывает новые возможности для продукции ценных вторичных метаболитов *A. manshuriensis*.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал, бактерии и плазмиды

В качестве источника эксплантов для получения клеточных культур марена сердцелистная (*Rubia cordifolia* L.) использовали растения, собранные в Анучинском районе (Приморский край, Россия). В работе также использовали части дикорастущей лианы кирказона маньчжурского (*Aristolochia manshuriensis* Kom.), собранной в Надеждинском районе Приморского края. Видовая принадлежность растений была подтверждена сотрудниками отдела ботаники ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Семена резуховидки Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) экотипа Col-0 были любезно предоставлены доктором Джен Шин (Гарвардская медицинская школа, США). Семена проращивали в почве для рассады до 4-х недельных проростков, вегетативные части которых использовали для введения в культуру *in vitro*.

В процессе молекулярного клонирования, а также для выделения плазмидной ДНК использовали штамм кишечной палочки (*Escherichia coli*) XL1–Blue (Евроген, Россия), имеющий хромосомный маркер устойчивости к тетрациклину. Для генетической трансформации растений и клеточных культур использовали штаммы агробактерии *Rhizobium radiobacter* GV3101 и ЕНА105. Штамм *R. radiobacter* GV3101 имеет хромосомный маркер устойчивости к антибиотику рифампицину, а также несет обезоруженную Ti-плазмиду рMP90RK, кодирующую *vir*-гены и маркер устойчивости к гентамицину. Штамм *R. radiobacter* ЕНА105 также имеет хромосомный маркер устойчивости к рифампицину, а вспомогательной в этом штамме является плазида рTiBo542, из которой была удалена область T-ДНК. Бактериальные штаммы были любезно предоставлены доктором Элизабет Худ (Университет штата Арканзас, США).

В качестве бинарных векторов в большинстве исследований выступали плазмиды на основе рPCV002 (Koncz, Schell, 1986), несущие белок-кодирующие части генов *rol* из штамма *R. rhizogenes* A4 (Рисунок 12). Плазмиды

pPCV002/35S:rolB и pPCV002/35S:rolC кодировали, соответственно, гены *rolB* и *rolC* под контролем промотора гена 35S pPHK вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV). Плазмиды pPCV002/rolA и pPCV002/rolABC содержали ген *rolA* и фрагмент T_L-ДНК, включающий три гена *rolA*, *B* и *C* под контролем их собственных промоторов. Кроме того, в работе использовали пустой вектор pPCV002, не содержащий генов *rol*. Все плазмиды pPCV002 имеют маркер устойчивости к ампицилину, а в качестве растительного селективного маркера содержат ген неомисин фосфотрансферазы *nptII*, обеспечивающий устойчивость трансформированных клеток к канамицину. Все описанные конструкции получены ранее (Spena et al., 1987) и были любезно предоставлены доктором Анджело Спена (Университет Вероны, Италия).

Кроме того, на отдельных этапах работы использовали бинарный вектор pPZP-RCS2 и соответствующую ему экспрессионную плазмиду pSAT6/EGFP-N1 (Tzfira et al., 2005), которые были получены из лаборатории доктора Виталия Цитовски (Университет Стони Брук, США). Вектор pPZP-RCS2 содержит детерминанту устойчивости к стрептомицину и спектиномицину, а в области T-ДНК кодирует маркер селекции растений *nptII* и уникальные сайты узнавания крупнощепящих рестриктаз, предназначенные для клонирования экспрессионных кассет. Плазида pSAT6/EGFP-N1 имеет маркер устойчивости к ампицилину и содержит промотор и терминатор 35S CaMV, между которыми располагается участок полилинкера и кодирующая последовательность усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP); экспрессионная кассета фланкирована сайтами крупнощепящих рестриктаз.

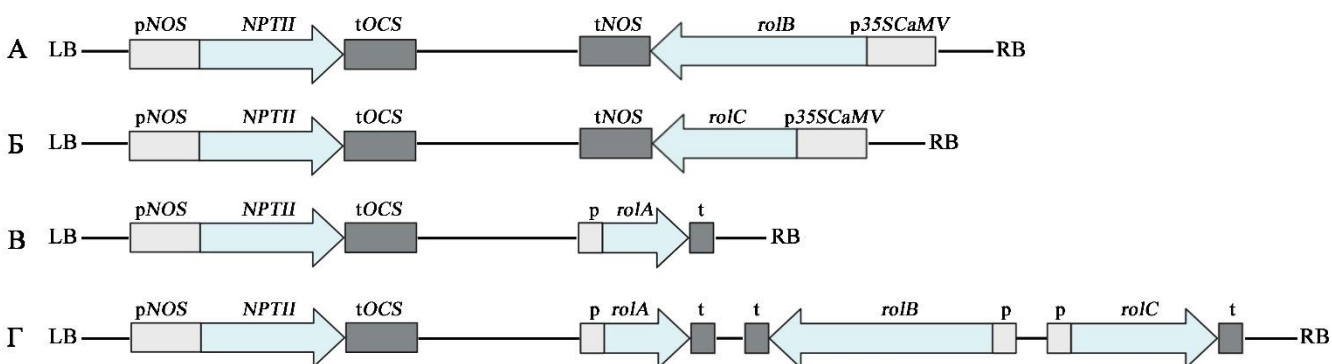


Рисунок 12 – Схема строения области Т-ДНК плазмид pPCV002, кодирующих гены *rol*. **А** – плазида pPCV002/35S:rolB, несущая ген *rolB*; **Б** – плазида pPCV002/35S:rolC, несущая ген *rolC*; **В** – плазида pPCV002/rolA, несущая ген *rolA*; **Г** – плазида pPCV002/rolABC, несущая гены *rolA*, *rolB* и *rolC*. pNOS – промотор гена нопалинсинтазы; NPTII – ген неоминин-фосфотрансферазы; tOCS – терминатор гена октопинсинтазы; p35SCaMV – промотор гена 35S рРНК вируса мозаики цветной капусты; tNOS – терминатор гена нопалинсинтазы; LB и RB – левая и правая граница области Т-ДНК. В плазидах pPCV002/rolA и pPCV002/rolABC гены *rol* находятся под контролем собственных промоторов и терминаторов.

2.2. Создание вектора для анализа внутриклеточной локализации белка RolC

Для изучения внутриклеточной локализации белка RolC использовали прижизненный генетически кодируемый флуоресцентный маркер EGFP. Полноразмерную кодирующую последовательность гена *rolC* (номер доступа в GenBank X03433) получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием плазмидной ДНК pPCV002/35S:rolC и специфических праймеров: прямого rolC-D 5'-TAC GAA TTC ATG GCT GAA GAC GAC CTG TG-3' (подчеркнут сайт рестрикции фермента *EcoRI*) и обратный rolC-R 5'-TAC GGG CCC GCC GAT TGC AAA CTT GCA CT-3' (подчеркнут сайт рестрикции фермента *ApaI*). Специфический ПЦР-фрагмент длиной 540 п.н. нарабатывали с помощью набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты ПЦР обрабатывали рестриктазами *EcoRI* и *ApaI* (Thermo Scientific, США) и лигировали в те же сайты линейаризованной плазмиды

pSAT6/EGFP-N1. Экспрессионные кассеты, содержащие кодирующую последовательность гена *rolC*, слитую в одной рамке считывания с последовательностью гена *EGFP* из плазмиды pSAT6/*rolC*-EGFP, а также отдельный ген *EGFP* из плазмиды pSAT6/EGFP-N1, фланкированные промотором и терминатором 35S CaMV, вырезали с помощью крупнощепящей рестриктазы PI-*PspI* (New England Biolabs, США) и лигировали в тот же сайт линейаризованного бинарного вектора pPZP-RCS2. Полученные конструкции pPZP/*rolC*-EGFP и pPZP/EGFP (Рисунок 13) проверяли с помощью секвенирования.

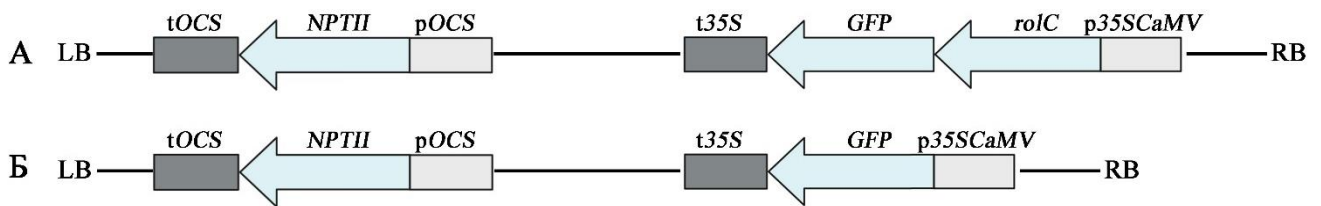


Рисунок 13 – Схема строения области Т-ДНК полученных рекомбинантных плазмид. **А** – плазида pPZP/*rolC*-EGFP, несущая ген *rolC*, слитый с геном *EGFP*; **В** – плазида pPZP/EGFP, несущая ген *EGFP*. *pNOS* – промотор гена нопалинсинтазы; *tNOS* – терминатор гена нопалинсинтазы; *NPTII* – ген неомицин-фосфотрансферазы; *pOCS* – промотор гена октопинсинтазы; *tOCS* – терминатор гена октопинсинтазы; *p35SCaMV* – промотор гена 35S рНК вируса мозаики цветной капусты; *t35S* – терминатор гена 35S рНК вируса мозаики цветной капусты; LB и RB – левая и правая граница области Т-ДНК.

2.3. Культивирование и трансформация бактерий

Бактерии культивировали на питательной среде LB, содержащей 10 г/л NaCl, 10 г/л пептона и 5 г/л дрожжевого экстракта, рН среды составлял 7,0-7,5. При необходимости в среды добавляли агар в количестве 12 г/л. Клетки *E. coli* культивировали при 37°C в течение ночи, а штаммы *R. radiobacter* выращивали при 28°C в течение двух суток.

Для трансформации бактерий генетическими конструкциями использовали прямые методы переноса. Клетки *E. coli* трансформировали с помощью CaCl₂-метода

(Dagert, Ehrlich, 1979), а клетки *R. radiobacter* методом электропорации с использованием Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Отбор трансформированных бактерий осуществляли на твердых питательных средах LB с добавлением антибиотиков, соответствующих селективным маркерным генам плазмид (глава 3.1.): ампициллина, стрептомицина или спектиномицина по 100 мг/л.

2.4. Получение модельных клеточных культур и растений

2.4.1. Каллусные культуры *Rubia cordifolia*

Контрольная каллусная культура *R. cordifolia* (R) была получена из стеблей свежесобранных растений (Mischenko et al., 1999). Трансгенные каллусные культуры были получены из тех же эксплантатов методом агробактериальной трансформации с использованием штаммов *R. radiobacter* GV3101, содержащих конструкции pPCV002/rolA, pPCV002/35S:rolB и pPCV002/35S:rolC (Рисунок 12). Линии, экспрессирующие ген *rolA* (RA), *rolB* (RB) или *rolC* (RC), отбирали с помощью селекции на питательных средах с добавлением 50 мг/л канамицина (Bulgakov et al., 2002). Клеточные культуры R, RA, RB и RC были любезно предоставлены для анализа сотрудниками лаб. биоинженерии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН н.с. Чернодед Г.К. и д.б.н. Булгаковым В.П. Культуры RB и RC были представлены гетерогенными тканями, состоящими из клеточных агрегатов желтого, темно-желтого и оранжевого цветов. С помощью многократных пересадок однотипных агрегатов были получены устойчивые линии, отличающиеся интенсивностью окраски. Молекулярный анализ показал, что цветовая дифференциация линий связана с различным уровнем экспрессии трансгенов, в соответствии с которым они были обозначены RBL, RBM, RBH или RCL, RCM, RCH (L – low, M – medium, H – high) (Shkryl et al., 2008). Также с использованием штамма *R. radiobacter* GV3101, содержащего конструкцию pPCV002/rolABC (Рисунок 12), по методу Bulgakov et al.

(2002) была получена трансгенная каллусная культура, экспрессирующая совместно гены *rolA*, *rolB* и *rolC* (RABC) (Shkryl et al., 2008).

Каллусы *R. cordifolia* культивировали на модифицированной среде Мурасиги и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), в которых концентрация NH_4NO_3 была снижена до 400 мг/л. Среды также содержали 20 мг/л сахарозы, витамины 0,2 мг/л В1 (тиамин), 0,5 мг/л В6 (пиридоксин) и 0,5 мг/л РР (никотиновая кислота), а также растительные гормоны 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (АНУ), рН среды составлял 5,6-5,8. Суспензионные культуры выращивали в жидкой среде того же состава при 100 об/мин в темноте с интервалом между пересадками 14 дней.

Для экспериментов по воздействию температурного стресса, каллусные культуры выращивали при повышенной или пониженной температуре в течение всего периода культивирования в климатической камере КС-200 (Смоленское СКТБ СПУ, Россия). Солевой стресс индуцировали добавлением хлорида натрия (NaCl) непосредственно в питательные среды на стадии их приготовления. Для каждой клеточной линии использовали не менее 10 отдельных каллусных агрегатов на один вариант опыта, каждый из которых взвешивали стерильно при помощи электронных весов. В конце пассажа, сырой вес каждого агрегата измеряли на электронных весах и использовали для выделения РНК или сушили для проведения химического анализа.

2.4.2. Каллусные культуры *Arabidopsis thaliana*

Контрольная клеточная культура *A. thaliana* (At) была получена из листовых эксплантов 4-х недельных проростков по методу Shafi et al. (2015). Трансгенные каллусные культуры были получены из тех же эксплантатов методом агробактериальной трансформации с использованием штаммов *R. radiobacter* GV3101, содержащих конструкции pPCV002/35S:rolB и pPCV002/35S:rolC (Рисунок 12). Отбор трансгенных клеточных агрегатов осуществляли на

питательных средах с добавлением 50 мг/л канамицина в течение трех пассажей. Как и в случае с культурами марены, *rolB*- и *rolC*-трансгенные культуры арабидопсиса (АВ и АС, соответственно) в дальнейшем дифференцировали по морфологическим признакам на линии с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена (АВЛ, АВМ, АВН и АСЛ, АСМ, АСН, соответственно). Каллусы культивировали на модифицированной среде Мурасиги и Скуга с добавлением 0,4 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), в темноте при 24°C с 21-дневными интервалами между пересадками. Суспензионные культуры выращивали в жидкой среде того же состава при 100 об/мин в темноте с интервалом между пересадками 14 дней. Эксперименты по воздействию абиотических стрессовых факторов на клеточные культуры арабидопсиса проводили как описано выше.

2.4.3. Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*

Трансформацию растений арабидопсиса проводили методом погружения цветочных почек (Clough et al., 1998). Для идентификации предполагаемых трансформантов использовали селекцию семян Т1 на питательных средах с добавлением 50 мг/л канамицина. Устойчивые растения переносили в грунт и культивировали до созревания семян. Полученные семена Т2 также проверяли на устойчивость к антибиотику, после чего устойчивые растения анализировали на наличие Т-ДНК. Для дальнейшего анализа использовали гомозиготные линии В2, В5 и В13, у которых наблюдалось 100-процентное прорастание Т3 семян в присутствии канамицина. Растения выращивали на безгормональной среде Мурасиги и Скуга, содержащей 10 мг/л сахарозы, при 24°C при световом режиме день 16 ч\ночь 8 ч в течение 6–10 недель.

2.4.4. Трансформированные корни *Aristolochia manshuriensis*

Контрольная нетрансформированная каллусная культура (А1) была получена ранее из однолетних стеблей *A. manshuriensis* (Bulgakov and Zhuravlev, 1989). Каллусы А1 культивировали на модифицированной среде Мурасиги и Скуга с

добавлением 1 мг/л БАП и 1 мг/л индол-3-уксусной кислоты (ИУК) в темноте при 25°C с 30-дневными интервалами между пересадками.

Для получения трансформированных корней, экспланты черешков, листьев и стеблей из 3-недельных проростков *A. manshuriensis* инокулировали штаммами *R. radiobacter* GV3101, несущими бинарные векторы pPCV002, pPCV002/rolA, pPCV002/35S:rolB и pPCV002/35S:rolC (Рисунок 12). Отбор трансгенных клеточных агрегатов осуществляли на питательных средах с добавлением 50 мг/л канамицина в течение трех пассажей. На стадии селекции было обнаружено, что первичные каллусы, трансформированные генами *rolC* и *rolB*, были способны спонтанно образовывать адвентивные корни. Кончики этих корней отделяли от каллусной массы и переносили в жидкую среду Мурасиги и Скуга с добавлением 0,5 мг/л индол-3-масляной кислоты (ИМК) для дальнейшего стимулирования корнеобразования. Полученные таким образом трансформированные корневые линии АС и АВ, культивировали на орбитальном шейкере (100 об/мин, амплитуда 20 мм) в темноте при 25°C с 28-дневными интервалами между пересадками.

2.5. Выделение ДНК, РНК и синтез первой цепи кДНК

Выделение ДНК из растительных тканей и культур клеток осуществляли с помощью набора ExtractDNA (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Выделение суммарной РНК из растительных образцов проводили с помощью метода, адаптированного для работы с тканями с высоким содержанием вторичных метаболитов (Bekesiova et al., 1999). Свежую ткань (200 мг) растирали в охлажденной фарфоровой ступке с жидким азотом и смешивали с 1 мл буфера для экстракции. Полученный гомогенат интенсивно перемешивали и инкубировали при 65°C в течение 5 мин после чего обрабатывали равным объемом хлороформа. Для разделения фаз пробирки центрифугировали при температуре 4°C со скоростью

20000 об/мин в течение 10 минут (центрифуга 5417R; Eppendorf, Германия). К водной фазе добавляли 1/4 объема 10 М LiCl, обеспечивающего осаждение РНК в течение 8–16 часов при 4°C. После инкубации образец центрифугировали при 4°C со скоростью 20000 об/мин в течение 20 мин для формирования осадка РНК. Полученный осадок промывали 70% этиловым спиртом и после кратковременного высушивания растворяли в 25 мкл стерильной деионизованной воды. Образцы нуклеиновых кислот анализировали путем электрофоретического разделения образца в 1% геле на основе агарозы с окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл). Концентрацию определяли спектрофотометрически на BioSpec-nano (Shimadzu, Япония) при длине волны 260 нм.

Синтез первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) проводили при помощи набора для обратной транскрипции (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию проводили в объеме 25 мкл, содержащем 1–5 мкг суммарной РНК и 1 мкМ олиго(dT)₁₅ праймера. Смесь инкубировали при 70°C в течение 5 мин после чего охлаждали и добавляли 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (dNTP) с конечной концентрацией 1 мМ каждого и обратную транскриптазу вируса лейкемии мышей (M-MLV) в количестве 10–20 ед. Смесь инкубировали в течение 60 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали прогреванием смеси в течение 10 минут при 70°C и охлаждали на льду. Полученные препараты кДНК разводили в стерильной воде (1:5, об/об) и использовали для ПЦР.

2.6. Химический анализ клеточных культур

2.6.1. Анализ вторичных метаболитов *Rubia cordifolia*

Высушенные и измельченные образцы каллусной ткани (50 мг) смачивали 0,2 мл 5 н. HCl и экстрагировали 2 мл этанола с использованием ультразвуковой бани Elmasonic S 10H (Elma, Германия) при 40°C в течение 10 мин. После центрифугирования при 10000 об/мин в течение 10 мин образцы фильтровали через 0,2 мкм политетрафторэтиленовую мембрану (Supelco, США).

Анализ антрахинонов в экстрактах клеток *R. cordifolia* проводили методом ВЭЖХ в сочетании с УФ-детектированием и масс-спектрометрией с помощью системы LCMS-2020 (Shimadzu, Япония). Разделение проводили на колонке Discovery HS C18 (150 × 2,1 мм, размер частиц 3 мкм; Sigma, США) с использованием градиента уксусная кислота (0,1%):метилцианид от 10% до 100% метилцианида в течение 10 мин при скорости потока 0,2 мл/мин и температуре 40°C. Масс-спектры снимали методом электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении в режиме отрицательных ионов (1,50 кВ) в диапазоне значений массы к заряду (m/z) 100–800. Антрахиноны идентифицировали путем сравнения их времени удерживания, профилей УФ-абсорбции и данных масс-спектра с таковыми для стандартных образцов. Стандартные образцы пурпурина, муньистина, ализарина и руберитриновой кислоты были выделены из культур клеток *R. cordifolia* ранее (Mischenko et al., 1999).

2.6.2. Анализ вторичных метаболитов *Arabidopsis thaliana*

Высушенные и измельченные образцы каллусной ткани (100 мг) экстрагировали 2 мл 70% метанола с использованием ультразвуковой бани Elmasonic S 10H при 40°C в течение 20 мин. Обработанные экстракты инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали через 0,2 мкм мембрану PTFE (Supelco, США). Супернатант отфильтровывали, а осадок повторно экстрагировали аналогичным образом. В качестве внутреннего стандарта в образцы добавляли глюкозинолат синигрин (0,1–0,5 мМ; Sigma, США). Аликвоты по 2 мкл использовали для ВЭЖХ-анализа флавоноидов и камалексина, а аликвоты по 1 мл использовали для десульфатации и идентификации глюкозинолатов.

Процедуру десульфатации проводили с использованием ионообменных мини-колонок, в соответствии с описанным в литературе методом (Kastell et al., 2013; Mewis et al., 2005) с использованием DEAE Sephadex A-25 (GE Healthcare Bio-

Sciences AB, Швеция). Образцы наносили двумя порциями по 0,5 мл, после чего колонки дважды промывали 1 мл натрий-ацетатного буферного раствора (20 мМ, рН 4,0). Ионообменные колонки инкубировали с 75 мкл сульфатазы из *Helix pomatia* Тип Н-1 (25 мг/мл; Sigma, США) в течение 16 ч при 25°C. После инкубации вещества элюировали добавлением 1 мл воды и использовали для ВЭЖХ-анализа.

Вторичные метаболиты идентифицировали с помощью масс-спектрометра высокого разрешения с ионной ловушкой/временем пролета LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Киото, Япония), оснащенного жидкостным хроматографом LC-20A Prominence. Разделение проводили на колонке Ascentis C18 (100 мм, внутренний диаметр 2,1 мм, размер частиц 3 мкм, Supelco, США) с использованием градиента уксусная кислота (0,1%):ацетонитрил от 0% до 100% ацетонитрила в течение 135 мин при скорости потока 0,2 мл/мин и температуре 40°C. УФ-спектры записывали в диапазоне 200–400 нм и анализировали при 229 нм (для количественного определения глюкозинолатов), 320 нм (для количественного определения камалексина) и 366 нм (для количественного определения флавоноидов). Масс-спектры снимали методом электрораспылительной ионизации при атмосферном давлении в режиме отрицательных и положительных ионов (от 3,8 до 4,5 кВ) в диапазоне m/z (отношение массы к заряду) 100–1000. При проведении тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) диссоциацию ионов-предшественников индуцировали за счет столкновения с молекулами аргона при давлении 0,003 Па, с детекцией ион-фрагментов в диапазоне m/z 50–760. Идентификацию глюкозинолатов проводили на основании полученных данных МС и УФ-спектров, а также данных из литературы (Kusznierewicz et al., 2013; Issa et al., 2013), а содержание рассчитывали с использованием синигрина в качестве внутреннего стандарта. Значения относительного фактора отклика детектора (RRF) для каждого глюкозинолата были определены ранее (Brown et al., 2003). Содержание флавоноидов и камалексина рассчитывали с использованием калибровочной кривой, построенной с

использованием коммерческих стандартов (Sigma, США), при длине волны, соответствующей максимальному поглощению.

2.6.3. Анализ вторичных метаболитов *Aristolochia manshuriensis*

Высушенные и измельченные образцы (50 мг) экстрагировали 1 мл 70% метанола с использованием ультразвуковой бани Elmasonic S 10H при 40°C в течение 30 мин и центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 минут при 4°C. Супернатанты фильтровали (нейлоновая мембрана 0,45 мкм, Millipore, Бедфорд, Массачусетс, США) и анализировали методом ВЭЖХ-МС с использованием аналитической системы Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), оснащенной детектором с фотодиодной матрицей, аналитической колонкой Zorbax C18 (150 мм, внутренний диаметр 2,1 мм, Agilent Technologies, США) и сопряженной с масс-спектрометром с ионной ловушкой Bruker HCT Ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Бремен, Германия). Масс-спектрометрию высокого разрешения (HRMS) проводили с использованием прибора Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Киото, Япония). Все хроматографические и масс-спектрометрические условия соответствовали условиям, описанным ранее (Gorpenchenko et al., 2019). Хроматограммы для количественного определения записывали при 237 нм (для магнофлорина) и 254 нм (для аристолохиевых кислот). Количественное определение магнофлорина, аристолохиевой кислоты I и II (АК-I и АК-II, соответственно) проводили по соответствующим площадям пиков, используя метод абсолютной калибровки с коммерчески доступными стандартами. Концентрацию аристолохиевой кислоты IIIa (АК-IIIa), аристолохиевой кислоты IVa/b (АК-IVa/b), глюкозида аристолохиевой кислоты IIIa (АК-IIIa-G) и глюкозида аристолохиевой кислоты IVa/b (АК-IVa/b-G), для которых коммерческие стандарты отсутствуют, рассчитывали с использованием калибровочной кривой АК-I и корректировали в соответствии с их молекулярной массой.

2.7. Определение фармакологической активности антрахинонов из каллусной культуры *Rubia cordifolia*

Для проведения фармакологических испытаний из биомассы каллусной линии R готовили препарат, содержащий комплекс антрахинонов, как описано в главе 2.6.1. Сухой экстракт (3 г) растворяли в 100 мл этанола и смешивали с 50 г лактозы. Затем этанол упаривали, а сухую смесь, состоящую из нанесенных на лактозу антрахинонов, использовали в качестве препарата в дозе 100 мг/кг.

Исследования проводили с использованием белых беспородных крыс в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите животных. Для индукции острого воспаления применяли субплантарную инъекцию 100 мкл 1% раствора каррагенина с последующим измерением объема конечности на протяжении 4 ч с момента введения флогистика. В экспериментах с хроническим воспалением определяли сухую и влажную массы гранулемы, образовавшуюся вокруг имплантированного под кожу стерильного хлопчатобумажного тампона массой 20 мг. Для оценки состояния свободно-радикального окисления применяли модель воспалительного отека задних лап крыс вследствие субплантарной инъекции 200 мкл 3% формалина. Суммарный показатель концентрации свободных радикалов оценивали по содержанию в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (тиобарбитурат-реактивные продукты) по стандартной методике (Zeb, Ullah, 2016). Антиоксидантную активность оценивали по содержанию антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы с помощью спектрофотометрического способа (Elavarthi, Martin, 2010).

2.8. Определение фармакологической активности экстрактов из клеточных культур *Aristolochia manshuriensis*

2.8.1. Антиоксидантная активность экстрактов

Антиоксидантную активность экстрактов из клеточных культур кирказона определяли с помощью фотометрического анализа по улавливанию свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ) (Mensor et al., 2001). Готовили раствор 0,3 мМ ДФПГ в этаноле, 149 мкл этого раствора смешивали с 1 мкл экстрактов в этаноле в разных концентрациях (5–500 мкг/мл). Для сравнения использовали аскорбиновую кислоту (витамин С). После инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение реакционной смеси при 517 нм с использованием микропланшетного спектрофотометра Benchmark Plus (Bio-Rad, Геркулес, Калифорния, США) и конвертировали полученные значения в процентное ингибирование (%*inh*) с помощью уравнения 7:

$$\%inh = (A_B - A_S) \times 100\% / A_B \quad (7),$$

где A_B — оптическая плотность отрицательного контроля (равное количество раствора ДФПГ), а A_S — оптическая плотность тестируемого образца. В качестве контроля использовали аналогичное количество экстракта в этаноле. Концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) рассчитывали с использованием графиков линейной регрессии, где по оси абсцисс была представлена концентрация тестируемых экстрактов, а по оси ординат — процент антиоксидантной активности.

2.8.2. Противоопухолевая активность экстрактов

Цитотоксические свойства экстрактов были протестированы на четырех клеточных линиях: трижды негативных клетках рака молочной железы (MDA-MB-231), клетках глиобластомы человека (U-87 MG), клетках рака шейки матки (HeLa SCL-2) и клетках карциномы толстой кишки человека (RKO). Эти клеточные линии хранятся и культивируются в лаборатории биомедицинских клеточных технологий Школы медицины и наук о жизни Дальневосточного федерального университета.

Перед началом эксперимента клетки высевали в 96-луночный планшет в концентрации 5×10^3 клеток на лунку в соответствующей культуральной среде. Поскольку в работе использовали метанольные экстракты, в качестве отрицательного контроля использовали 0,5% раствор чистого метанола. Эта концентрация растворителя была выбрана на основании данных о её нетоксичности. Через 24 ч после посева, в планшет добавляли экстракты из клеточных культур кирказона в объеме 120 мкл на лунку и инкубировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80%. После инкубации проводили анализ цитотоксичности с использованием общепринятого колориметрического МТТ-теста.

Для анализ клеточного цикла клетки (100×10^3 клеток на лунку) высевали в 6-луночные культуральные планшеты и обрабатывали в течение 5 дней различными концентрациями экстрактов. В качестве контроля добавляли чистый метанол до конечной концентрации 0,5%. По окончании инкубационного периода клетки отделяли от планшета с помощью 0,5% раствора трипсина и фиксировали 4% параформальдегидом. После серии промывок суспензию окрашивали интеркалирующим красителем Hoechst 33342 в концентрации 10 мкг/мл в течение 20 мин, промывали и анализировали с использованием клеточного сортера BD FACS MoFlo Astrios (BD Biosciences, Индианаполис, Индиана, США), оснащенного ультрафиолетовым лазером с длиной волны 355 нм. Эмиссию регистрировали при 488 нм. Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza 2.1 с функцией анализа клеточного цикла.

2.9. Определение активных форм кислорода (АФК)

2.9.1. Измерение содержания внутриклеточных АФК методом лазерной конфокальной микроскопии

Суспензионные культуры выращивали в жидкой питательной среде от 4 до 12 дней и фильтровали через нейлоновую сетку с размером ячеек 100 мкм для отделения крупных клеточных агрегатов. Отдельные клетки и небольшие клеточные

скопления (от 10 до 20 клеток) центрифугировали и ресуспендировали в жидкой питательной среде, содержащей 50 мкМ 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCF-DA; Molecular Probes, США) или 10 мкМ дигидрородамина 123 (H₂R123; Molecular Probes, США), и инкубировали в течение 10 мин при 25°C в темноте. Нагруженные красителем клетки промывали и ресуспендировали в свежей питательной среде. Внутриклеточное расщепление H₂DCF-DA и H₂R123 с последующим окислением флуорогенных производных детектировали с помощью микроскопии (Crow, 1997). В экспериментах с индукторами окислительного стресса суспензионные культуры, выращенные при стандартных условиях, обрабатывали 10 мкМ параквата (Aldrich, США) в течение одного часа при постоянном освещении (200 мкМ/м²•сек) или 100 мкМ менадиона (20 часов в темноте). Световой стресс индуцировали с помощью непрерывного освещения клеток лазером LSM 510 META Ar laser (эффективная мощность 30 мВт; 5,9% максимальной интенсивности). Уровень флуоресценции одиночных живых клеток определяли с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия), оснащенного Ar-лазером с эффективной мощностью 30 мВт. Интенсивность Ar-лазера составила 5,9% от максимального значения для H₂DCF-DA и 10% для H₂R123. Данные анализировали с помощью программного обеспечения LSM 510 версии 3.5 (Carl Zeiss, Германия). В каждом эксперименте было проанализировано не менее 30–40 клеток.

2.9.2. Флуориметрический метод анализ АФК

Генерацию АФК в каллусных культурах измеряли люминометрическим методом с помощью люминола (Sigma, США) по методике Piedras и соавторов (Piedras et al., 1998). Контрольные и *rolB*-трансформированные каллусы собирали через 21 и 28 дней культивирования, анализировали с помощью спектрофлуориметра RF-1501 (Shimadzu EUROPA GmbH) со следующими настройками: возбуждение $\lambda_{ex} = 355$ нм; эмиссия $\lambda_{em} = 420$ нм; реакция – 8 сек; и анализ – 5 сек. Используемая калибровочная кривая была линейной в диапазоне концентраций от 50 до 800 мМ.

2.10. Определение жизнеспособности клеток растений

Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски йодидом пропидия в соответствии с инструкцией производителя (Sigma, США). Конфокальные изображения были получены при облучении светом с длиной волны возбуждения $\lambda_{ex} = 536$ нм и максимумом эмиссии при $\lambda_{em} = 617$ нм (интенсивность лазера 20%, фильтр ILP 560 нм).

2.11. Анализ содержания восстановленного и окисленного глутатиона методом масс-спектрометрии

Количественный анализ восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH и GSSG, соответственно) из клеточной культуры *R. cordifolia* проводили по методике Rellán-Álvarez и соавторов (Rellán-Álvarez et al., 2006) в ЦКП "Биотехнология и генетическая инженерия" ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН с использованием системы HCTultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik, Германия). Система HCTultra оснащена ионной ловушкой, которая позволяет получать данные тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) ионов-предшественников. Экстракты клеточных культур или растворы стандартов GSH или GSSG (Sigma, США) вводили непосредственно в масс-спектрометр со скоростью потока 120 мл/ч. Молекулы GSH были идентифицированы на основании протонированного молекулярного иона $[M+H]^+$ с m/z 308,0, а также МС/МС-спектров продуктов его распада с характерными пиками m/z 161,9, 179,0, 233,0 и 290,1, специфичных для GSH (Рисунок 14). Молекулы GSSG были идентифицированы в виде протонированного молекулярного иона $[M+H]^+$ с m/z 613,1, а также продуктов его распада с характерными пиками m/z 355,1 и 484,1 на МС/МС-спектрах (Рисунок 14). Уровни GSH и GSSG определяли на основе сравнения усредненной высоты пиков ионов $[M+H]^+$ в концентрациях от 0,1 до 5 мкМ (GSH) и от 0,05 до 0,5 мкМ (GSSG).

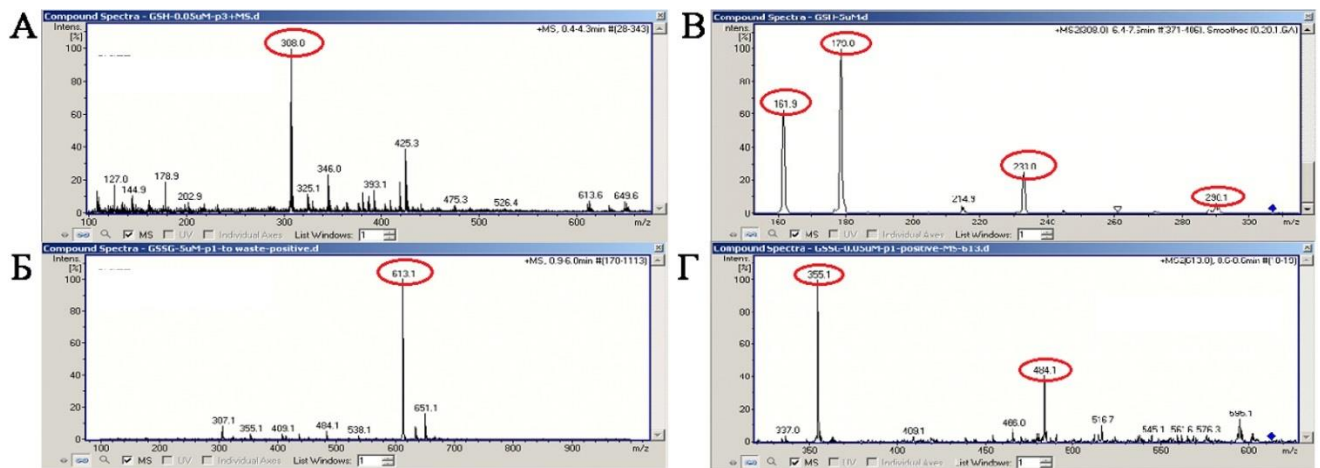


Рисунок 14 – Масс-спектры восстановленной и окисленной форм глутатиона (GSH и GSSG, соответственно). **А** – регистрация положительных ионов GSH; **Б** – регистрация положительных ионов GSSG; **В** – МС/МС-спектр продуктов распада иона-предшественника GSH с m/z 308; **Г** – МС/МС-спектр продуктов распада иона-предшественника с GSSG m/z 613.

2.12. Идентификация генов биосинтеза антрахинонов *Rubia cordifolia*

Для амплификации последовательностей, кодирующих гены *OSBS*, *OSBL* и *IPPi* *R. cordifolia*, были разработаны вырожденные праймеры к консервативным последовательностям соответствующих ферментов других видов растений из базы данных GenBank. Праймеры OSBS-Deg-D 5'-GTN GCN CAY GGN YTN GGN AC-3' и OSBS-Deg-R 5'-TCY TTN ARN CCN GGN SWN CC-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена *OSBS* длиной 250 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям VANGLGTY и SGSPGLKD. Праймеры OSBL-Deg-D 5'-CCN YTN TGY CAY ATH GGN GGN A-3' и OSBL-Deg-R 5'-CAN GCY TCN GTC ATN CCR TAN GC-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена *OSBL* длиной 282 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям PLVHIGG и YGMTEA. Праймеры IPPi-Deg-D 5'-CAY MGN GCN TTY WSN GTN TTY YT-3' и IPPi-Deg-R 5'-TAR TCN ARY TCR TGY TCN CCC CA-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена *IPPi* длиной 261 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям HRAFSVF и WGENEVD.

ПЦР реакцию проводили с использованием вышеуказанных праймеров и кДНК растений *R. cordifolia*. Полученные фрагменты предсказанной длины выделяли из агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Москва) и клонировали в плазмиду pTZ57R/T с использованием набора для Т/А-клонирования InsT/Aclone PCR (Fermentas, Литва). Клоны амплифицировали с универсальными праймерами M13 и секвенировали в ЦКП "Биотехнология и генетическая инженерия" ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН с использованием генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems, США). Идентифицированные последовательности *RcOSBL*, *RcOSBS* и *RcIPPi* депонировали в базу данных GenBank с номерами доступа KT893312, KU725713 и KT222914, соответственно.

2.13. Идентификация и анализ генов антиоксидантных ферментов

Rubia cordifolia

Для амплификации последовательностей, кодирующих изоформы аскорбатпероксидаз, Cu/Zn-супероксиддисмутаз и каталаз *R. cordifolia*, были разработаны вырожденные праймеры к консервативным последовательностям *Arx*, *CSD* и *Cat* других видов растений из базы данных GenBank.

Праймеры *Arx-Deg-D1* 5'-ACN GGN GGN CCN TTY GGN ACN-3' и *Arx-Deg-R1* 5'-GTN GAR AAR TAY GCN GCN GAY GAR-3' фланкировали белок-кодирующий участок цитозольной изоформы гена *Arx* длиной 525 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям TGGPFGT и VEKYAADE. Праймеры *Arx-Deg-D2* 5'-CAR YTN GCN GGN GTN GTN GCN GTN-3' и *Arx-Deg-R2* 5'-CAY AAR AAR YTN WSN GAR YTN-3' фланкировали белок-кодирующий участок пероксисомальной изоформы гена *Arx* длиной 441 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям QLAGVVAV и HKKLSEL. Праймеры *CSD-Deg-D* 5'-GGN GAY AYN ACN AAY GGN TG-3' и *CSD-Deg-R* 5'-GNC CNC CNY KNC CNA RRT CRT C-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена *CSD* длиной 240 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям

GDTTNGC и DDLGKGGH. Праймеры CAT-Deg-D 5'-GGN TTY GCN GTN AAR TTY TAY AC-3' и CAT-Deg-R 5'-GTN ACR TCN ARN GGR TCR AA-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена *Cat* длиной 510 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям GFAVKFYTR и FDFDPLDV.

ПЦР реакцию проводили с использованием вышеуказанных праймеров и кДНК растений *R. cordifolia*. Полученные фрагменты предсказанной длины выделяли из геля и анализировали как описано выше (глава 2.12.). На основе идентифицированных аминокислотных последовательностей антиоксидантных ферментов *R. cordifolia* и их гомологов из других растений, депонированных в базу данных GenBank, был проведен филогенетический анализ. Выравнивание последовательностей осуществляли в программе ClustalX 1.81 (Jeanmougin et al., 1998) с настройками по умолчанию. Филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей было построено методом максимального правдоподобия (МП) в программе Phyml версии 3.0 (бутстреп-анализ, 300-кратное повторение) (Guindon and Gascuel 2003). Анализ проводили с применением матриц замен LG + G, JTT + I+G и LG + I+G, которые были рассчитаны для набора последовательностей *Arx*, *CSD* и *Cat*, соответственно, на основе их анализа в программе ProtTest версии 2.4 (Abascal et al., 2005). Аналогичная по топологии кладограмма была также получена методом максимальной экономии (МЭ) с помощью пакета программ Phylip (бутстреп-анализ, 1000-кратное повторение) (Felsenstein, 1989). Неукорененные кладограммы построены с помощью программы TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

2.14. Идентификация и анализ генов НАДФН оксидаз *Rubia cordifolia*

Для амплификации последовательностей, кодирующих изоформы НАДФН-оксидаз *R. cordifolia*, были разработаны вырожденные праймеры к консервативным последовательностям *Rboh* других видов растений из базы данных GenBank. Праймеры *Rboh-Deg-D* 5'-YTN ATH ATG GAR GAR YTN-3' и *Rboh-Deg-R* 5'-GGN TTY AAY GCN TTY TGG TAY-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена

длиной 735 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям LIMEEL и GFNAFWY, соответственно.

ПЦР реакцию проводили с использованием вышеуказанных праймеров и кДНК растений *R. cordifolia*. Полученные фрагменты предсказанной длины выделяли из геля и анализировали, как описано выше. Всего было проанализировано 159 кДНК клонов, среди которых было выявлено 3 изоформы *Rboh*. Чтобы получить полноразмерные последовательности идентифицированных генов *Rboh*, проводили быструю амплификацию концов кДНК (RACE) с использованием методики Matz и соавторов (Matz et al., 1999) с некоторыми модификациями с использованием набора Mint RACE cDNA amplification set (Евроген, Россия). В модифицированном протоколе RACE (от англ. rapid amplification of cDNA ends) при проведении первичной ПЦР вместо ген-специфических праймеров использовали вырожденные праймеры *Rboh-DegD* и *Rboh-DegR*. Такой подход позволил одновременно амплифицировать все изоформы *RcRboh*. Для получения индивидуальных ампликонов каждой изоформы *RcRboh*, при проведении последующей ПЦР использовали ген-специфические праймеры. Продукты амплификации выделяли из геля и секвенировали.

На основе идентифицированных аминокислотных последовательностей НАДФН оксидаз *R. cordifolia* и их гомологов из других растений, депонированных в базу данных GenBank, был проведен филогенетический анализ. Выравнивание последовательностей осуществляли в программе MUSCLE (Edgar 2004) с настройками по умолчанию. Неукорененное филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей *Rboh* растений *R. cordifolia*, *A. thaliana*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *R. communis* и *O. sativa* было построено методом МП в программе Phylml версии 3.0 (бутстреп-анализ, 300-кратное повторение) (Guindon and Gascuel 2003). Анализ проводили с применением матрицы замен JTT+I+G+F, которая была рассчитана для данного набора

последовательностей на основе их анализа в программе ProtTest версии 2.4 (Abascal et al. 2005).

2.15. Идентификация и анализ генов кальций-зависимых протеинкиназ

Rubia cordifolia

Для амплификации последовательностей, кодирующих изоформы кальций-зависимых протеинкиназ *R. cordifolia*, были разработаны вырожденные праймеры к консервативным последовательностям *CDPK* других видов растений из базы данных GenBank. Праймеры *CDPK-Deg-D* 5'-TNT GYG ARG GNG GNG ARY TNT T-3' и *CDPK-Deg-R* 5'-ARN ACY TCN GGN GCC ATR TAR TA-3' фланкировали белок-кодирующий участок гена длиной 234 п.н. и соответствовали аминокислотным последовательностям LCEGGELF и YYMAPEVL, соответственно.

ПЦР реакцию проводили с использованием вышеуказанных праймеров и кДНК растений *R. cordifolia*. Полученные фрагменты предсказанной длины выделяли из геля и анализировали как описано выше. Всего было проанализировано 442 кДНК клона, среди которых было выявлено 14 изоформ *CDPK*.

Для выявления ближайших гомологов, а также принадлежности идентифицированных изоформ к определенному семейству, был проведен филогенетический анализ. Неукорененное филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей *CDPK* растений *R. cordifolia*, *A. thaliana* и *S. tuberosum*, было построено методом объединения ближайших соседей в программе MEGA версии 3.1 (бутстреп-анализ, 1000-кратное повторение) (Kumar et al., 2004).

2.16. Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Относительный уровень экспрессии исследуемых генов определяли с помощью метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для проведения реакции использовали 2,5-кратную реакционную смесь с интеркалирующим красителем SYBR Green I (Евроген, Россия), регистрацию нарастания флуоресценции проводили с помощью

системы Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, США). Реакцию проводили в растворе объемом 12,5 мкл, содержащем 300 нМ каждого праймера, 1 мкл разбавленного образца кДНК и 2,5 мМ MgCl₂. Все реакции проводили в следующих условиях: 5 мин при 95°C, затем 35 циклов по 10 сек при 95°C и 30 сек при 60°C в 96-луночном реакционном планшете. Отсутствие неспецифических сигналов и димеров праймеров в образцах контролировали анализом кривой плавления продуктов ПЦР. Эффективность реакции определяли с помощью калибровочной кривой, охватывающей диапазон значений пороговых циклов (СТ) в анализируемых образцах. Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в Таблице 1. Для нормализации экспрессии генов марены использовали ген *RcActin*. В качестве референтного гена арабидопсиса использовали ген *AtActin*. Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали с помощью метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001; Vandesompele et al., 2002) с помощью программного обеспечения CFX Manager версии 1.5 (Bio-Rad Laboratories, США). Для исследования использовали образцы, полученные минимум из трех независимых экспериментов, для каждого из которых анализировали по три технических повтора.

Таблица 1 – Последовательности праймеров, использованных в работе

Название гена (№ GenBank)	Прямой (5'–3')	Обратный (5'–3')
<i>Анализ экспрессии генов rol</i>		
<i>rolA</i> (X12579)	GCCCAGACCTTCGGAGTATTAT	CCAAAGGAGTGGTGCTCAGAT
<i>rolB</i> (X03433)	GTGCTGGCGACAACGATTCA	GAGAGTCGCAGGGTTAGGTC
<i>rolC</i> (X03433)	CGACGATGATGCTCTGCTTC	GCCTGAGCCCTCTATTGACC
<i>Идентификации полноразмерных последовательностей генов вторичного метаболизма R. cordifolia</i>		
<i>RcOSBS</i> (KU725713)	AAGTGGCTCAAAGAAGATGTT	CCGTCATTTTCTTGTCGCCATC
	TGGCTTTGCAGGGGCTTC	GATATTCAAGTACGGGTTCTA
	TTCAAATCAATCAAAATGTG	GCCCCTGCAAAGCCATTATT
<i>RcOSBL</i> (KT893312)	GCAGTGGTGTCTTGGGCT	ATCCGTCACCCATGCCAT
	TACGGAGATGGTGGTTGC	CATCCCTGTCAACCCACTTC
	GAAGTGGGTTGACAGGGA	GCAACCACCATCTCCGTA
<i>RcIPPi</i> (MK990819)	AGTTTGAGTTGCTGCTTC	GTAACCTTTCCGTTGGTCTGG
	GGTGAAC TGATCAACTGGAAC	ATACCCAGTTCATCAAAAA
<i>Анализ экспрессии генов вторичного метаболизма R. cordifolia</i>		
<i>RcICS</i> (EF090619)	TATCGTGCGAGAGAACATCA	GAATTCTGGCCAGTTTGCGA
<i>RcOSBS</i> (KU725713)	AAGTGGCTCAAAGAAGATG	CACATTTTGATTGATTTGAA

<i>RcOSBL</i> (KT893312)	TACGGAGATGGTGGTTGC	ATCCGTCACCCATGCCAT
<i>RcIPPi</i> (MK990819)	GTTGGTCTGGACAAAGACCTA	GTGAACTGATCAACTGGAAC
<i>RcIPPi-t</i> (MK990818)	GTTGGTCTGGACAAATACCGG	GTGAACTGATCAACTGGAAC
Анализ экспрессии генов антиоксидантных ферментов <i>R. cordifolia</i>		
<i>RcApx1</i> (GQ380494)	GAGTTCCCCATCCTTTCAC	CTCAACCTTATCCTCTCTTC
<i>RcApx2</i> (GU949549)	GTTGGCGGGAGTTGTTGCTG	CCTTCCCAATGTATGAGCG
<i>RcApx3</i> (GU949550)	AAAGGAGAAAGTGAAGGG	GGCGAAATTCAGGATCTTCA
<i>RcCSD1</i> (GQ380492)	ATCACGGTTCTCCCAAAG	CAATGATGGAATGTGGTC
<i>RcCSD2</i> (GU949547)	GCCTCATTTCAACCCTAA	GGACCAATCAGAGGAATC
<i>RcCSD3</i> (GU949548)	GCCTCATTTTAACCCACTG	CTGGGTGTCTTTGATTGAT
<i>RcCat1</i> (GQ380493)	TCCCAGTTTTCTTCATTCG	GGGATGATGCGAGAAGAAA
<i>RcCat2</i> (GU936683)	CCACCACCCTGAAAGCCTGC	CTATCTTGGCAGCATCTTC
Анализ экспрессии генов НАДФН оксидазы <i>R. cordifolia</i>		
<i>RcRboh1</i> (KP987238)	GTTGGGGTGTTTTACTGTGGG	CAGGGGAGATGAGGTGGTC
<i>RcRboh2</i> (KP987240)	GCCAAAGAGATAGGAAAАСТ	CATCCACCTCTCCTATTGT

Анализ экспрессии генов кальций-зависимых протеинкиназ <i>R. cordifolia</i>		
<i>RcCDPK1</i> (DQ531564)	CTGTGTGAGGGTGGTGAAGTGG	CACACCAGCACTCCAGACATC
<i>RcCDPK2</i> (EF090621)	GAAAGGGAGGCTGCTAAATTG	CATCCGATTCAGGTCCATAAC
<i>RcCDPK3</i> (EF090620)	TTGTTCGACCGCATCATTC	TGAGCAGAATGTATAGAATG
<i>RcCDPK4</i> (JQ954841)	GAGGGCACTACACCGAAAGGG	GATGTTTCCTTCTTGTTAGC
<i>RcCDPK5</i> (JQ954842)	CTGAGAGGGATGCTGCTAAT	CACTACCAACAACATCACG
<i>RcCDPK6</i> (JQ954843)	GGCATTACAGCGAGAAGGCG	GCCGCCTCTTCACCATCATCC
<i>RcCDPK7</i> (JQ954844)	TACACGGAGAAAGATGCTGC	TTGATGAAGTCTGAAAGGC
<i>RcCDPK8</i> (JQ954845)	ATACAGTGAGAAGAAGGCT	TAGAAAACAGATAATCCAAAAT
<i>RcCDPK9</i> (JQ954846)	CTTGTCATTCTTTGGGTGTCAT	GCCGAATCCTCCTCTCCATAG
<i>RcCDPK10</i> (JQ954847)	TTATACTGAGAGGGCTGC	TCTATGGTCTTGAGCGACG
<i>RcCDPK11</i> (JQ954848)	CTGAAATGAAGGCTGCTGGGC	GATAAGCCAAAGTCAATAGT
<i>RcCDPK12</i> (JQ954849)	GGCAGATGGTGACGGTGGTG	GACAAGCCAAAATCAGTAGC
<i>RcCDPK13</i> (JQ954850)	CGGGCATTACACTGAGCGG	ATTCTCTTTCTTATTGGCGA
<i>RcCDPK14</i> (JQ954851)	CATTCAGAGGGGGCATTATAC	GGGGTGACTCCTCCTTCTC

Нормализация экспрессии генов <i>R. cordifolia</i>		
<i>RcAct</i> (DQ531565)	GATTGAGCACGGTATTGTTAG	ACACCATCACCAGAATCCAAC
<i>Rc18S</i> (HQ730915.1)	GGAGAGGGAGCCTGAGAAAC	GATTTAGATTGTAICTCATTC
Анализ экспрессии генов вторичного метаболизма <i>A. thaliana</i>		
<i>MYB11</i> (AT3G62610)	ССААСТГТСГССААТАССТГТС	СААТСГССАТСГТСТССТАААС
<i>MYB12</i> (AT2G47460)	GTGCGGTGGTGATGGGGAG	СТТГГТГГТСГТАГТТГАГ
<i>MYB28</i> (AT5G61420)	ССТТСТССССАТСАТСГТТГ	САТТСАТАСТГТТСТССТСАТТГ
<i>MYB29</i> (AT5G07690)	GTAACAACGAAGGGGAAGAA	GAAATCGGAATGGTCAAGGAG
<i>MYB34</i> (AT5G60890)	TGGTGAAGGTGGATGGCGT	GATAGTGTCGTCTTCTTCAGG
<i>MYB51</i> (AT1G18570)	GGAAAGAGAATCAATCAGAGT	GAAATGTGGAGAACCCGATAG
<i>MYB76</i> (AT5G07700)	GATGACGACGAAAATGAGAAC	GGGATGGTCAAGAAGATAAG
<i>MYB114</i> (AT1G66380)	TTGAGGCAGTGTATTGGTAAG	CGGTGTATTAGGAGGGGGTTA
<i>MYB122</i> (AT1G74080)	GTTCTTCTCCACACATACC	ATGTCACCGACTATTTCTC
<i>TT2</i> (AT5G35550)	TCCGTCTCCATAATCTTCTTG	ССААСТСТСССААААТСТСГ
<i>PAP1</i> (AT1G13750)	СТСААТГССССАССААААГ	СССССТТТТСТГТТГТСГТС
<i>TTG1</i> (AT5G24520)	GTTCTGGTGGTGATGATAC	СТААААГСГГАГАГГГГАГСГ

<i>TT8</i> (AT4G09820)	GTAAGAGAAAAACATCGGAGG	GTGAGGCTAAAACAAAAATACG
<i>C4H</i> (AT2G30490)	CTAGCAAACAACCCCAACAG	TCCCCAAAATAGGTAATGCC
<i>4CL1</i> (AT1G51680)	GACGGTTGGCTTCATACTGG	GCTGCTTCTTCTTTCATTGC
<i>4CL2</i> (AT3G21240)	GATGGTTGGCTTCACACTGG	GGAATAGAGTCAGTGAAGAAC
<i>4CL3</i> (AT1G65060)	AGCAACAATAGACGAAGAAGG	GAACAACAGCTGCATCGGC
<i>4CL5</i> (AT3G21230)	GCTTATTTCTCATCCTTCTATC	GACCCTTGAGATCTTGCTAC
<i>CHS</i> (AT5G13930)	CTCAGACCATCCTTCCAGAC	CTCATCTTCTCTTCCTTTAG
<i>CHI</i> (AT3G55120)	CTCTTCGCTCTCTCCCCTAC	CACACCGTTCTTCCCGATG
<i>CHIL</i> (AT5G05270)	CGACGCCCTTGCCTCCGC	GCATCATTCCCACCACATTC
<i>F3H</i> (AT3G51240)	GTCACACTGACCCTGGAACC	CTCTTCCCATCTTTCTCTTAT
<i>F3'H</i> (AT5G07990)	CATCCACCAACACCACTCTC	GTGTAAGCCCATAACTCTCCTC
<i>DFR</i> (AT5G42800)	TTAGATTTCAATTAGTATTATTC	CTTGGCGGCTGCTTGTTTCG
<i>FLS</i> (AT5G08640)	CCCTCCGCCGTCATTGTTC	CGTCTTCTCTTTATCCACCG
<i>CYP83A1</i> (AT4G13770)	CTCCTTATCCCTCGTGCTTGC	GCCCCAAGACGCATTCCCG
<i>CYP71B15</i> (AT3G26830)	GAAGCAAGAGAACGATGGAG	GAGTGGAGTTGTTGGATGTA

<i>CYP79B2</i> (AT4G39950)	GTTTATCTCGTTCAGTACCGG	GTCGTCTCATCTCACTTCAC
<i>CYP79B3</i> (AT2G22330)	CCGTCTTCATCCCGTCGCCG	GCAGCACATCCTCTCTTTCC
<i>CYP79F1</i> (AT1G16410)	CCTTGGGGGTTATTTTCATTCC	GTGGCTCAACGGACAAGTG
<i>CYP79F2</i> (AT1G16400)	AAGGAGACGGAATCACAAAAG	GTGGCTCAACAGACAAAAGAAG
<i>CYP83B1</i> (AT4G31500)	CAGTCATCCCCATTCTTCTAC	CGAGGTGTTCTTTCTTGTGC
<i>UGT71C1</i> (AT2G31790)	CCGAGAGAAGCAAACACTACCC	CTCTAACCCCAATCTTCCAC
<i>UGT74B1</i> (AT1G24100)	GCCTTGTTGGTTTCTTGGTG	CTCCTTCCATCACTCCTTTC
Анализ экспрессии генов антиоксидантных ферментов <i>A. thaliana</i>		
<i>Cat1</i> (AT1G20630)	GCACAGGGATGAGGAGGTC	AGCACTTCTCACGATTTCCAG
<i>CSD1</i> (AT5G20854)	TTGTTGGTAGGGCTGTTGTTG	TGCGTTTCCAGTAGCCAGG
<i>CSD2</i> (AT2G28190)	GTGGTGTGATTGGCTTGACGC	ATCAACACAGTAGACATAAG
<i>CSD3</i> (AT5G18100)	GAGGCTGTCTTCAATTCGTA	GTCCAGTAGAGATGCAGCCA
<i>Apx1</i> (AT1G07890)	TGAGCGGAGAGAAGGAAGGC	CTTCATCAGCAGCGTATTTCTCG
<i>Apx2</i> (AT3G09640)	CACAAGGAGCGTTCAGGATTC	CCTTCTTTCTCTCCGCTTAG
<i>Apx3</i> (AT4G35000)	GAAAGGAGAATCAGAGGGCT	GAGTTTCTTGTGCGATTCCG

Анализ экспрессии генов НАДФН оксидазы <i>A. thaliana</i>		
<i>RbohD</i> (AT5G47910)	CAGTAACAACAATAGTAAAGG	TACCCGACACAACATCCAC
<i>RbohF</i> (AT1G64060)	GAAGAAGCCAAAAGCCCTC	CCCTCACCAAACCTCACCTC
Анализ экспрессии генов кальций-зависимых протеинкиназ <i>A. thaliana</i>		
<i>CDPK1</i> (AT1G18890)	AGCCTGAAACGCTAGAGGAG	CTAGTGAGCTCAGCCGCTTT
Анализ экспрессии генов биогенеза микроРНК <i>A. thaliana</i>		
<i>DCL1</i> (AT1G01040)	CTTTTGGTTTGGGAGACTGC	CCCTTCTGCTTGTTGCTGGC
<i>HYL1</i> (AT1G09700)	GAGGCAGCATTTGGGAGTGTG	GGTTCCAGATTTGGCGTTGT
<i>SE</i> (AT2G27100)	GATGATAGAGGTGGACGCAG	GAGACAACAGAAAAGGGGCAG
<i>TGH</i> (AT5G23080)	CAAGTCCAGAAGCAAACCCGA	GCTATACCGTGAAGAAGAAG
<i>DDL</i> (AT3G20550)	AGCGAAGAAAAAGGAAGAAC	CGTCCAAAGAGGTAGCAGC
<i>DCL2</i> (AT3G03300)	CAAACCTGCACAAACACATCC	CAACCGTGAAAGAATCGAAATC
<i>DCL3</i> (AT3G43920)	CAATCATAGCGACAGAGAAAC	CTCATAAAGCAATTCCACGAC
<i>HEN1</i> (AT4G20910)	GACTCTCTACTTGACTATCC	GTTGTTTTCTTCTTGGGTTTC
<i>HASTY</i> (AT3G05040)	GGACAGATGGAGAAGCGAC	CACGGGAGCGAAAGCAAAAC
<i>AGO1</i> (AT1G48410)	GCCACCCTACAGAGTTTGAC	CTTCTACCAGCCATTCCACC

<i>AGO4</i> (AT2G27040)	TGTATGATGAGATTGGTTTTTC	CGTTGTCTTTGAGTCTTGGG
<i>RDR2</i> (AT4G11130)	GAAACCAACATACATCTCTG	CAAGTGTCACATCATAAGCTAC
Анализ экспрессии регуляторных генов <i>A. thaliana</i>		
<i>VIK</i> (AT1G14000)	GTTGGAGACTTTGGACTTAG	GATACATGTTTGGCTGCTTC
<i>HSP70-6</i> (AT4G24280)	CAACCCAAGAAATCAAAGAC	GTTTTCTCATTGGCTGTCTG
<i>HSP70-7</i> (AT5G49910)	AACTCAAGAAATCAAAGACAC	CGTCAATCACATCACCGCCG
<i>HSP90-5</i> (AT2G04030)	CTTCTCCTTGTGTGCTTGTC	CTTGTTGCTTCAGTGCTCTC
<i>Cpn10</i> (AT1G14980)	GTGATAGCTGTTGGACCTGG	TCAATCCTCGTGCAAAGTTC
<i>Cpn60</i> (AT1G55490)	TATCGCCATTGTGACTGAACTC	GAAACTACCACACTACCTCACA
<i>RACK1A</i> (AT1G18080)	CTCTTGGTGGCAGCAGGAC	GTTGTTTTGCTGTGGGATTTG
<i>ROC1</i> (AT4G38740)	GGAACGGAACAGGCGGTGAG	AAGAGACACCACAATGACGAC
<i>ROC2</i> (AT3G56070)	CTTTCACCGTATAATCCCAG	CCTGTCAAGATCAACCCACCC
<i>ROC4</i> (AT3G62030)	CAATGCATCGGTCAATAGTG	CTGGTGAGAAGAAATACGGG
<i>ROC6</i> (AT2G21130)	ACCGACAAGACACCAAAGACG	CCACCTGACCAAACACCAC
<i>CYP20-2</i> (AT5G13120)	CAATGCATCGGTCAATAGTG	CTGGTGAGAAGAAATACGGG

<i>HSP70-10</i> (AT5G09590)	TCCAAGTATGCCACACCG	GCTGGTTGCTCTGGCTCACTC
<i>HSP70-14</i> (AT1G79930)	CTCATCCGCCTGCTCACCTC	CTTCCAAGTATGCCACACC
<i>HSP70-15</i> (AT1G79920)	GAGGCAGCTGTGTCTAATG	CTCTTGCCCTCATCCGCCTG
<i>HSP90-2</i> (AT5G56030)	AGAAGAAAGAAGAGCTCAAG	GAAACCAGAAGTGAGAAGAG
<i>TCP1</i> (AT1G67260)	TATCGCCATTGTGACTGAACTC	GAAACTACCACACTACCTCACA
Нормализация экспрессии генов <i>A. thaliana</i>		
<i>Act</i> (AT3G18780)	ACCTTGCTGGACGTGACCTT	GTTGTCTCGTGGATTCCAGC

2.17. Определение внутриклеточной локализации белка RolC

2.17.1. Получение и трансформация протопластов

Протопласты *R. cordifolia* выделяли согласно протоколу Yoo с соавторами (2007). Ферментный гидролиз свежесобранных листьев проводили в смеси, содержащей 1,5% целлюлазы, 0,4% мацерозима R-10, 0,4 М маннита, 20 мМ KCl, 20 мМ MES-NaOH, pH 5,7. и 0,1% БСА в течение 2 часов при комнатной температуре. После инкубации протопласты дважды промывали раствором W5, содержащим 154 мМ NaCl, 125 мМ CaCl₂, 5 мМ KCl и 2 мМ MES-NaOH, pH 5,7. Клетки центрифугировали при 100 g в течение трех минут и ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 15 мМ MgCl₂, 0,55 М маннита, 4 мМ MES-NaOH, pH 5,7. Протопласты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут перед трансфекцией.

Протопласты трансформировали плазмидными векторами pPZP/EGFP и pPZP/rolC-EGFP с помощью ПЭГ-опосредованной трансфекции. Для трансформации в смесь протопластов добавляли равное количество ПЭГ-буфера, содержащего 40% ПЭГ-4000, 0,2 М маннита, 100 мМ CaCl₂ и 30 мкг плазмидной ДНК, осторожно встряхивали и инкубировали 15 минут в темноте при 25°C. После этого, протопласты трижды промывали раствором W5 и оставляли еще на 16–18 часов в темноте при 25°C. В типичном эксперименте для трансфекции использовали 1×10^8 протопластов на 10 мкг плазмидной ДНК.

2.17.2. Визуализация слитого белка RolC-EGFP в живых клетках с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии

Детекцию флуоресценции EGFP в трансформированных клетках проводили методом конфокальной микроскопии с помощью LSM 510 META и LSM 710 LIVE (Carl Zeiss, Германия) при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 488$ нм и фильтре эмиссии 505–530 нм. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансформированные клетки. Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения ZEN 2011.

2.18. Статистический анализ

Статистическая обработка данных была произведена с помощью программы Statistica версия 10.0. Все данные в работе представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для сравнения средних значений между двумя выборками применяли t -критерий Стьюдента, а для множественного сравнения – однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием теста наименьшей значимой разности (НЗР) Фишера. Гипотезу о нормальности распределения данных проверяли с применением теста Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Вилкса. Для выявления корреляции между переменными определяли коэффициент Пирсона (r). Для оценки значимости различия дисперсий двух выборок использовали F -критерий Фишера. Уровень значимости $p < 0,05$ был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов

3.1.1. Влияние генов *rol* на рост и биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах *Rubia cordifolia*

Контрольная и трансгенные клеточные культуры *R. cordifolia*, экспрессирующие основные онкогены *R. rhizogenes* A4 (*rolA*, *rolB*, *rolC*), а также содержащие нативную форму Т-ДНК pRiA4, были получены и частично охарактеризованы в 2000–2002 гг. (Bulgakov et al., 2002). Позже дополнительно была получена трансгенная клеточная культура, экспрессирующая три гена – *rolA*, *B* и *C* вместе (Shkryl et al., 2008). При этом *rolB*- и *rolC*-культуры характеризовались наличием гетерогенных каллусных агрегатов, что позволило выделить несколько отдельных линий, различающихся скоростью накопления биомассы клеток и интенсивностью окраски. Было установлено, что наблюдаемые фенотипические отличия в *rolB*- и *rolC*-трансгенных линиях обусловлены различным уровнем экспрессии трансгенов (Shkryl et al., 2008), а также коррелируют с накоплением в трансгенных культурах антрахинонов – вторичных метаболитов шикиматного биосинтетического пути. Наиболее выраженный эффект на биосинтез оказал онкоген *rolB*. Действие этого гена проявилось еще на стадии селекции и сохранялось при дальнейшем культивировании. Гены *rolA* и *rolC* оказывали умеренное стимулирование синтеза антрахинонов, при этом в отличие от *rolB* их экспрессия не сопровождалась ингибирующим влиянием на накопление биомассы в трансгенных культурах. Трансформация клеток *R. cordifolia* штаммом *R. rhizogenes* A4 также приводила к увеличению содержания антрахинонов, сопоставимому по эффекту с совместной экспрессией генов *rol* (Shkryl et al., 2008). Следовательно, можно предположить, что активация вторичного метаболизма в клетках, трансформированных диким типом бактерии *R. rhizogenes* определяется в первую очередь действием генов *rolA*, *rolB* и *rolC*. Действительно, стимулирующего действия на вторичный метаболизм у гена *rolD*, а также у других генов Т-ДНК pRiA4, не относящихся к семейству *plast*, не обнаружено (Bulgakov, 2008).

3.1.2. Эффекты генов *rolA* и *rolB* в условиях длительного культивирования трансгенных культур *Rubia cordifolia*

Эффект генов *rolB* и *rolC* в культурах клеток марены сердцелистной оказался чрезвычайно устойчивым. Ростовые и биосинтетические характеристики трансгенных линий оставались стабильными на протяжении длительного культивирования. Между тем, клетки, трансформированные геном *rolA*, со временем приобрели более интенсивную окраску, что свидетельствует об активации в них накопления антрахинонов (Рисунок 15). Чтобы подробнее изучить наблюдаемые изменения был проведен химический и молекулярный анализ каллусных линий с использованием биомассы клеток и образцов кДНК, собранных в два периода: с 2008 по 2013 г. (до того, как культура RA изменила окраску) и с 2014 по 2018 г. (после изменения окраски культуры RA).

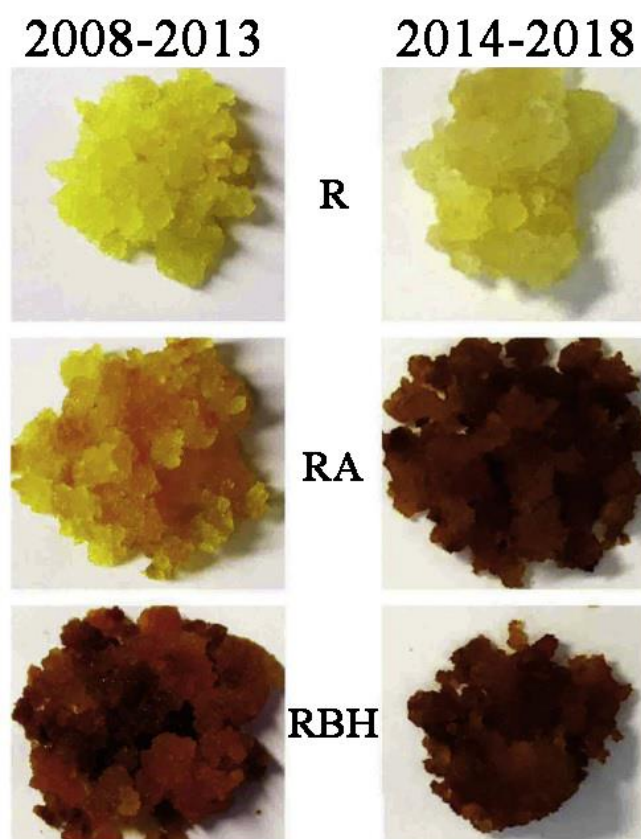


Рисунок 15 – Характерный внешний вид каллусных культур *R. cordifolia* в разные периоды культивирования. R – контрольная культура; RA – *rolA*-трансгенная культура; RBH – *rolB*-трансгенная культура с высоким уровнем экспрессии трансгена.

Было установлено, что уровень экспрессии трансгенов, *rolA* и *rolB* в разные периоды культивирования значительно не менялся (Таблица 2). Следовательно, увеличение накопления антрахинонов в культуре RA задействует более сложные молекулярные механизмы, чем у *rolB*- и *rolC*-трансгенных культурах, у которых вторичный метаболизм находится в прямой корреляционной зависимости от силы экспрессии онкогенов. Накопление свежей и сухой биомассы в клеточных культурах также оказалось стабильным (Таблица 2). Как в ранний, так и в более поздний периоды экспрессия *rolA* приводила к стимуляции роста в 1,2–1,6 раза по сравнению с контрольной культурой, тогда как ген *rolB* ингибировал накопление биомассы клеток в 2–4 раза.

Таблица 2 – Экспрессия генов *rol* и накопление биомассы клеток в контрольной (R), *rolA*- и *rolB*-трансгенных (RA и RB, соответственно) каллусных культурах *R. cordifolia*

Клеточная культура	R-I	R-II	RA-I	RA-II	RB-I	RB-II
Экспрессия гена <i>rolA</i>	н.о.	н.о.	0,51± 0,08 ^a	0,47± 0,07 ^a	н.о.	н.о.
Экспрессия гена <i>rolB</i>	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0,92± 0,03 ^a	0,91± 0,05 ^a
Прирост свежей биомассы, г/л	366,5± 14,4 ^b	355,6± 29,1 ^b	599,8±7 ^a	619,8± 35,8 ^a	163,1± 9,1 ^d	166,1± 6,1 ^d
Прирост сухой биомассы, г/л	16,4± 0,4 ^b	16,5± 0,9 ^a	19,8± 0,9 ^a	19,2±0,6 ^a	4,1±0,1 ^d	4,3±0,3 ^d

Римские числа после названия клеточной линии, I и II, обозначают два периода сбора биомассы клеток: 2008–2013 гг. и 2014–2018 гг., соответственно. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Разные надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия средних значений в строках ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера. Н.о. – не обнаружено.

Далее был проведен сравнительный анализ накопления вторичных метаболитов в культурах клеток, собранных в разные периоды культивирования (Veremeichik et al., 2019). Было установлено, что в течение первого исследуемого

временного интервала (2008–2013 гг.) суммарный уровень накопления антрахинонов в линии RA составлял 11 мг/г сухой массы клеток, тогда как во втором периоде (2014–2018 гг.) их содержание повысилось в 4 раза и составило 45 мг/г (Рисунок 16). Более того, поскольку прирост биомассы в этой клеточной линии оставался стабильно высоким, общая продукция антрахинонов достигла 874 мг/л среды. Было установлено, что данное увеличение было обусловлено, главным образом, всплеском биосинтеза руберитриновой кислоты при длительном культивировании. Содержание руберитриновой кислоты в *rolA*-трансгенных линиях увеличилось с 0,7 до 13,9 мг/г сухой массы клеток, а продукция с 14,4 до 265 мг/л среды (Рисунок 16). Таким образом, содержание руберитриновой кислоты в культуре RA оказалось в 53 раза выше, чем в контрольной культуре, и в 10 раз выше, чем в линии RBH. Кроме руберитриновой кислоты, в *rolA*-трансгенной линии более чем в 4 раза увеличилось и содержание производных муньистина, достигнув при этом 40 мг/г сухой массы клеток, что почти соответствует накоплению метаболитов данной группы в культуре RBH (Рисунок 16). Содержание производных пурпурина в линии RA не изменилось.

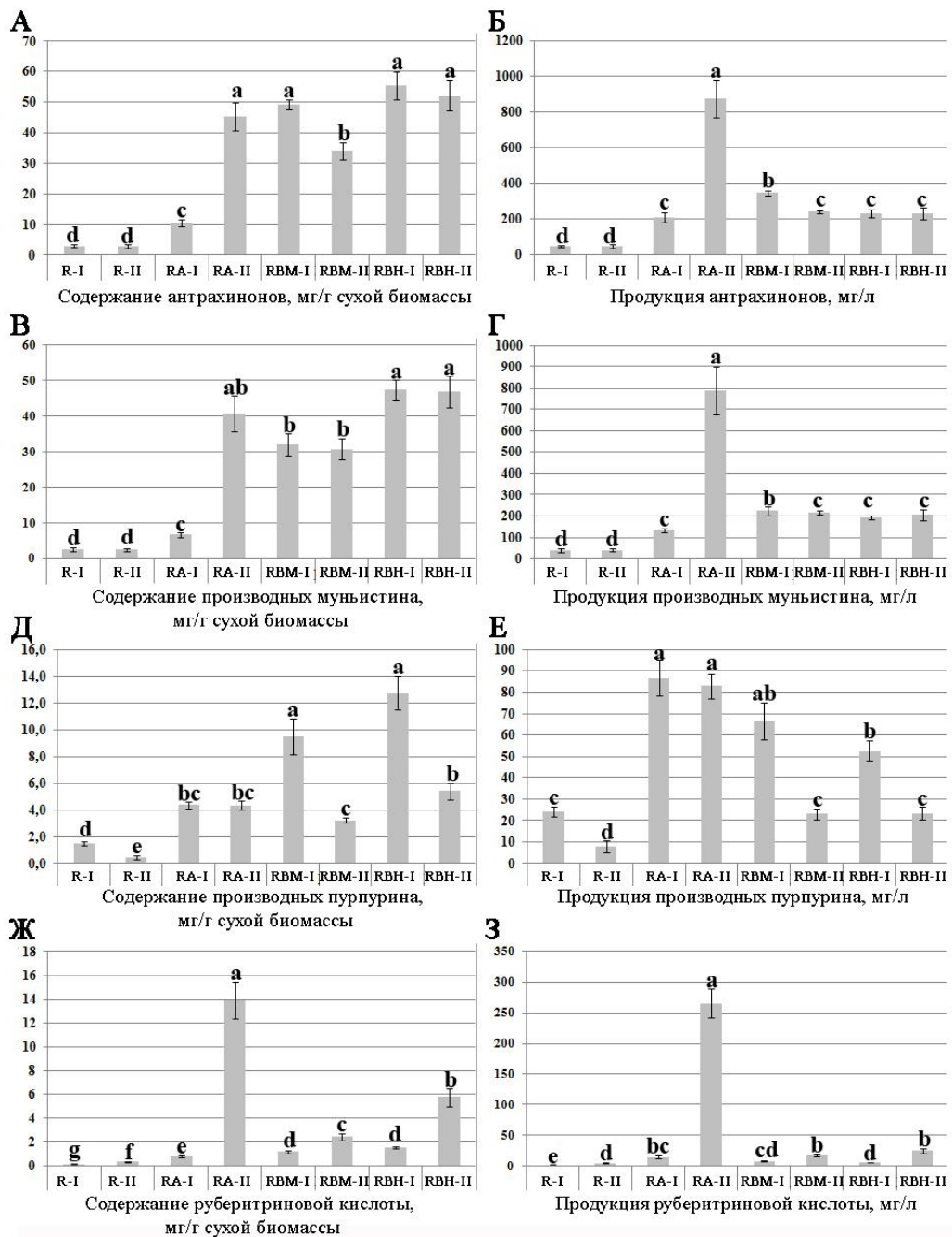


Рисунок 16 – Содержание (А, В, Д, Ж) и продукция (Б, Г, Е, З) антрахинонов в калусных культурах *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия; RA – *rolA*-трансгенная клеточная линия; RBM – *rolB*-трансгенная клеточная линия с умеренным уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Римские числа после названия клеточной линии, I и II, обозначают два периода сбора биомассы клеток: 2008–2013 гг. и 2014–2018 гг., соответственно. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Используя образцы кДНК контрольной и *rol*-трансгенных линий, полученные в разные периоды культивирования, была изучена динамика изменения экспрессии ключевых генов биосинтеза антрахинонов: изохоризмат-синтазы (*ICS*), О-сукцинилбензоат-КоА-синтазы (*OSBS*) и О-сукцинилбензоат-КоА-лигазы (*OSBL*). Было установлено, что в процессе культивирования в культуре RA произошла активация транскрипционной активности всех изученных генов (Рисунок 17). При этом наиболее выраженный эффект был обнаружен для гена *RcICS*, уровень экспрессии которого во втором периоде вырос более чем в 6 раз по сравнению с первым. Экспрессия генов *RcOSBS* и *RcOSBL* при этом выросла в 1,5 раза (Рисунок 17). Транскрипционная активность генов биосинтеза антрахинонов в *rolB*-трансформированных клеточных линиях в исследуемые периоды существенно не отличалась. Уже в первоначальный период культивирования *rolB*-трансгенные линии характеризовались наибольшим уровнем экспрессии *RcICS*, что и определяло активацию накопления в них антрахинонов (Shkryl et al., 2008). Однако при длительном культивировании экспрессия этого гена в линии RA достигла значений RBH и, вероятно, является максимально возможной для сохранения нормальных ростовых характеристик клеток *R. cordifolia*. Это свидетельствует о том, что именно изохоризмат-синтаза является лимитирующим ферментом вторичного метаболизма *R. cordifolia*.

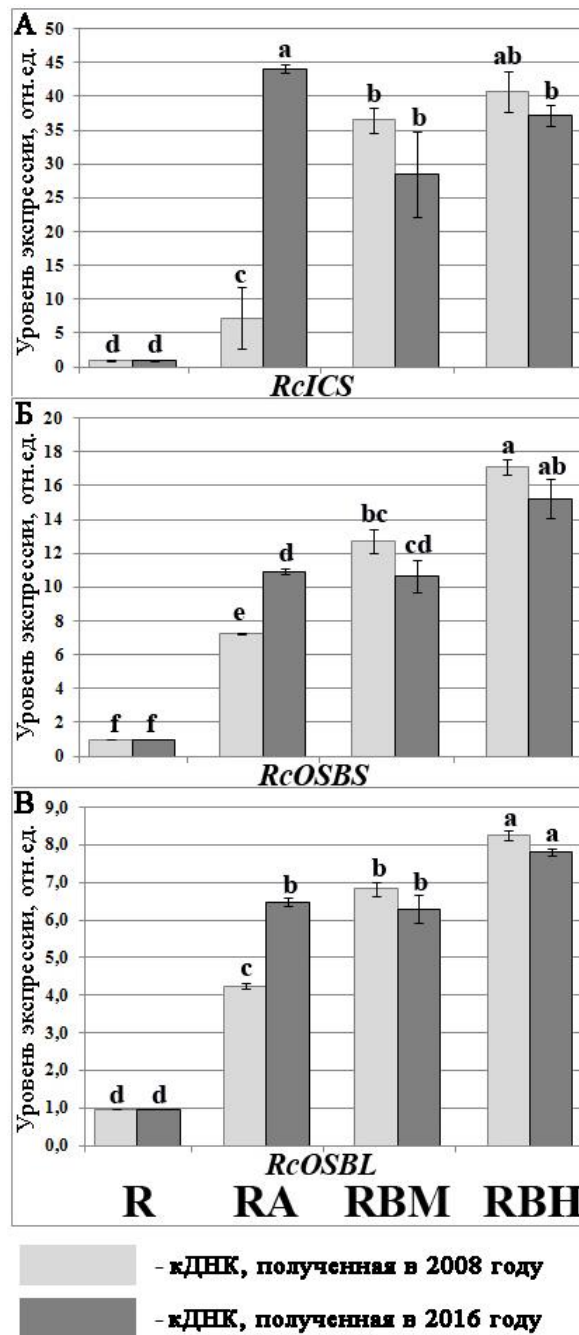


Рисунок 17 – Экспрессия генов *R. cordifolia*, участвующих в биосинтезе антрахинонов. **А** – *RcICS*, изохоризмат-синтаза; **Б** – *RcOSBS*, О-сукцинилбензоат-КоА-синтаза; **В** – *RcOSBL*, О-сукцинилбензоат-КоА-лигаза. R – контрольная клеточная линия; RA – *rolA*-трансгенная клеточная линия; RBM – *rolB*-трансгенная клеточная линия с умеренным уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Одну из конечных стадий биосинтеза антрахинонов катализирует фермент изопентенилдифосфат-дельта-изомераза (IPPi). На этапе идентификации гена, кодирующего фермент IPPi *R. cordifolia*, было выявлено наличие двух изоформ. Первая, *RcIPPi*, (номер доступа в GenBank MK990819), имела типичный для растений консервативный каталитический NUDIX домен, а также фланкирующие его аминокислотные остатки. Вторая изоформа, *RcIPPi-t* (номер доступа в GenBank MK990818), имела транзицию А→G в положении 226 п.н., которая приводила к замене цистеина на тирозин в области связывания ионов Mg^{2+} (Рисунок 18А). Анализ экспрессии этих двух изоформ в *rolA*- и *rolB*-трансгенных линиях выявил интересную закономерность. Так в начале наблюдения, экспрессия *RcIPPi* в RA культуре превышала значение контрольное культуры в 1,3 раза, а к концу исследуемого периода уже в 2 раза (Рисунок 18Б). При этом в культурах RBM и RBH изначальный 3–5 кратный прирост в уровне транскрипции *RcIPPi* в результате длительного культивирования, напротив, снизился. Аналогичная динамика транскрипционной активности наблюдалась и для изоформы *RcIPPi-t* с тем отличием, что ее уровень в культурах был ниже, чем у изоформы *RcIPPi*. Эти результаты показывают, что общий уровень экспрессии *IPPi* в процессе культивирования увеличивался только в *rolA*-трансгенной линии *R. cordifolia*. Функциональные особенности изоформы *IPPi-t* в биосинтезе антрахинонов в настоящее время неизвестны и ее значение в *rol*-опосредованной модификации вторичного метаболизма марены сердцелистной требует дальнейшего более детального анализа.

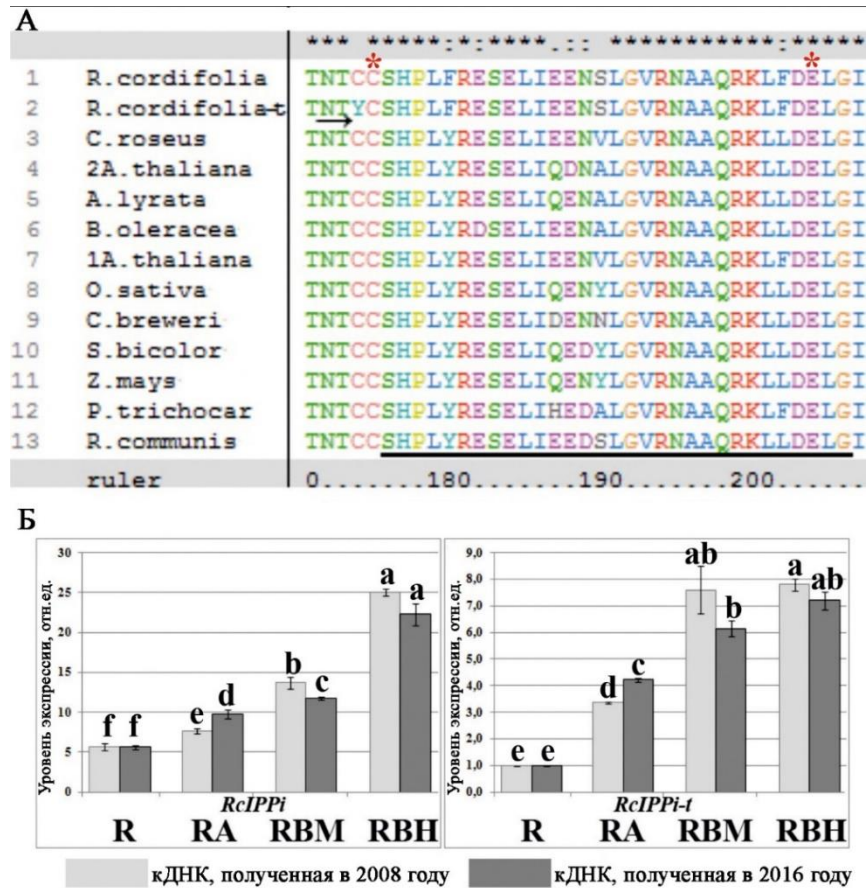


Рисунок 18 – Анализ изоформ гена изопентенилдифосфат-дельта-изомеразы (*IPPi*) *R. cordifolia*. **А** – сравнение аминокислотных последовательностей *IPPi* в области NUDIX домена (выделен подчеркиванием). Номера доступа последовательностей *IPPi* в базе GenBank: *R. cordifolia*, МК990819 и МК990818; *A. thaliana*, NP_197148 и NP_186927; *A. lyrata*, XP_002884339; *Brassica oleracea*, AAF36996; *Catharanthus roseus*, ABW98669; *Populus trichocarpa*, XP_002325469; *Ricinus communis*, XP_002514848; *Sorghum bicolor*, XP_002460827; *Zea mays*, NP_001105037; *Clarkia breweri*, AAB67743; *Oryza sativa*, AAF29978). Сайты связывания ионов Mg^{2+} обозначены звездочками, стрелка указывает на аминокислотную замену $C \rightarrow Y$ в последовательности *RcIPPi-t*. **Б** – экспрессия генов *RcIPPi* и *RcIPPi-t*. R – контрольная клеточная линия; RA – *rolA*-трансгенная клеточная линия; RBM – *rolB*-трансгенная клеточная линия с умеренным уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

3.1.3. Фармакологическая активность антрахинонов из каллусной культуры *Rubia cordifolia*

В качестве объекта исследования использовали препараты, приготовленные из каллусной биомассы линии R марены сердцелистной. До 85% суммарного содержания антрахинонов в препарате составляли два соединения – муньистин и пурпурин, еще 9% приходилось на ализарин и руберитриновую кислоту, а минорные компоненты были представлены ксантапурпурином и эфирами ксантапурпурина и муньистина (Таблица 3). В целом, процентное содержание данных антрахинонов в препарате соответствовало их накоплению в каллусах.

Таблица 3 – Содержание антрахинонов в каллусной культуре *R. cordifolia* и препарате, приготовленном из ее биомассы

	Содержание антрахинонов, %	
	Каллус	Препарат
Муньистин	60,3	62,4
Пурпурин	20,2	22,5
Руберитриновая кислота	7,4	3,5
Ализарин	4,8	5,5
Ксантапурпурин	1,2	0,8
Метилловый эфир муньистина	0,3	0,4
Этиловый эфир ксантапурина	0,2	0,3

Противовоспалительную активность препарата испытывали на модели острого воспалительного отека конечностей крыс, индуцированного каррагенином (Mishchenko et al., 2007). Было установлено, что на фоне введения антрахинонов увеличение объема конечности у опытных крыс было менее выражено (Рисунок 19А). Максимальное снижение отека на 38,5% наблюдали через 1 час после начала эксперимента. Наблюдаемый эффект несколько снижался со временем, однако оставался значимым по сравнению с контролем. Антипролиферативные свойства препарата также проявлялись и на модели индуцированной гранулемы крыс. Установлено, что антрахиноны замедляют

прирост влажной и сухой массы гранулемы на 27% по сравнению с контролем (Рисунок 19Б). Данные результаты свидетельствуют о том, что препарат антрахинонов ослабляет развитие как острого, так и хронического воспаления.

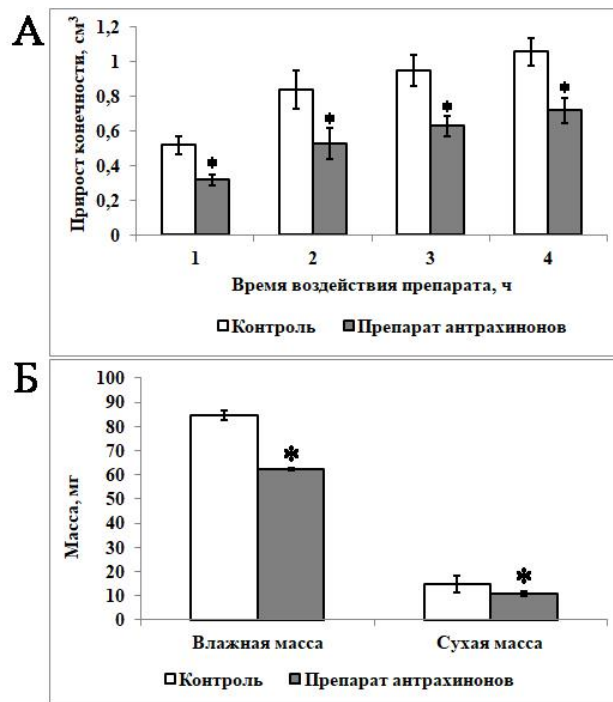


Рисунок 19 – Влияние антрахинонов из клеточной культуры *R. cordifolia* на (А) развитие каррагенин-индуцированного отека конечностей и (Б) формирование хлопчатобумажной гранулемы у крыс. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), t -тест Стьюдента.

При моделировании окислительного стресса путем субплантарного введения формалина, в плазме крови крыс возрастала концентрация тиобарбитурат-реактивных продуктов, что свидетельствовало об индукции перекисного окисления липидов (Таблица 4). Наблюдаемый эффект сопровождался активацией антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (Таблица 4). Применение препарата из каллусной биомассы уменьшало содержание тиобарбитуровых продуктов в 1,2 раза по сравнению с контрольными животными, однако оставалось на 26,5% выше уровня интактной группы. При этом индукция активности каталазы и глутатионпероксидазы в опытных животных оказалась на 18–19% ниже, чем в контроле, тогда как активность супероксиддисмутазы статистически не

отличалась (Mishchenko et al., 2007). Таким образом, можно предположить, что в условиях свободно-радикального окисления антрахиноны активируют неферментные системы антиоксидантной защиты клеток.

Противовоспалительное действие антрахинонов может быть связано с их способностью ингибировать проинфламаторные цитокины и факторы, такие как NF-κB, а также с модуляцией других клеточных путей, ответственных за воспалительные реакции (Xin et al., 2022; Chen et al., 2022; Vincendeau et al., 2016). Антиоксидантные свойства антрахинонов обусловлены их способностью нейтрализовать свободные радикалы, предотвращая окислительное повреждение клеток (Eskandarzadeh et al., 2023). Это свойство, вероятно, связано с наличием полициклической структуры, способной улавливать и стабилизировать реактивные формы кислорода (Nam et al., 2017; Trung et al., 2021).

Таблица 4 – Влияние антрахинонов из клеточной культуры *R. cordifolia* на показатели оксидантного и антиоксидантного статуса крови у крыс

	Интактные	Контрольные	Опытные
ТБРП, мкМ	2,5±0,18	4,2±0,18*	3,4±0,12*
Каталаза, %	12,2±1,27	22,4±1,02*	18,3±0,43*
Супероксиддисмутаза, %	16,9±0,81	28,3±1,05*	27,1±0,82*
Глутатионпероксидаза, Ед/мг	233±7,3	243±11,2	195,3±5*

ТБРП – тиобарбитурат-реактивные продукты. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), t -тест Стьюдента.

Противовоспалительное действие антрахинонов может быть связано с их способностью ингибировать проинфламаторные цитокины и факторы, такие как NF-κB, а также с модуляцией других клеточных путей, ответственных за воспалительные реакции (Xin et al., 2022; Chen et al., 2022; Vincendeau et al., 2016). Антиоксидантные свойства антрахинонов обусловлены их способностью нейтрализовать свободные радикалы, предотвращая окислительное повреждение клеток (Eskandarzadeh et al., 2023). Это свойство, вероятно, связано с наличием

полициклической структуры, способной улавливать и стабилизировать реактивные формы кислорода (Nam et al., 2017; Trung et al., 2021).

3.1.4. Влияние генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов в трансформированных корнях *Aristolochia manshuriensis*

Для получения "волосатых" корней кирказона, эксплантаты листьев, черешков, и стеблей подверглись трансформации с использованием генов *rolA*, *rolB*, и *rolC*. Было обнаружено, что гены *rolC* и *rolB* стимулировали формирование адвентивных корней на стеблях и черешках, в отличие от эксплантатов с *rolA*, где корнеобразование не происходило (Shkryl et al., 2023). Черешковые эксплантаты показали более низкий уровень индукции "волосатых" корней по сравнению со стеблевыми, в то время как листовые эксплантаты вовсе не демонстрировали корнеобразования. Кроме того, было выявлено, что развитие «волосатых» корней у эксплантов, трансформированных геном *rolB* было в 1,3–2 раза выше, чем при трансформации геном *rolC*. Первичные культуры, трансформированные геном *rolA* характеризовались медленным ростом и формированием компактных желтых агрегатов, и поэтому были исключены из дальнейшего анализа. Эксплантаты, трансформированные пустым бинарным вектором без включения генов *rol*, также не показали признаков индукции корней. Корневые культуры стеблевого происхождения, трансформированные генами *rolC* и *rolB*, обозначенные как АС и АВ соответственно, демонстрировали желтую окраску и интенсивное боковое ветвление, что является типичным для культур "волосатых" корней (Рисунок 20А). В качестве контроля в данном исследовании использовалась нетрансформированная каллусная культура (А1), которая была ранее получена из стеблей *A. manshuriensis* (Bulgakov and Zhuravlev, 1989).

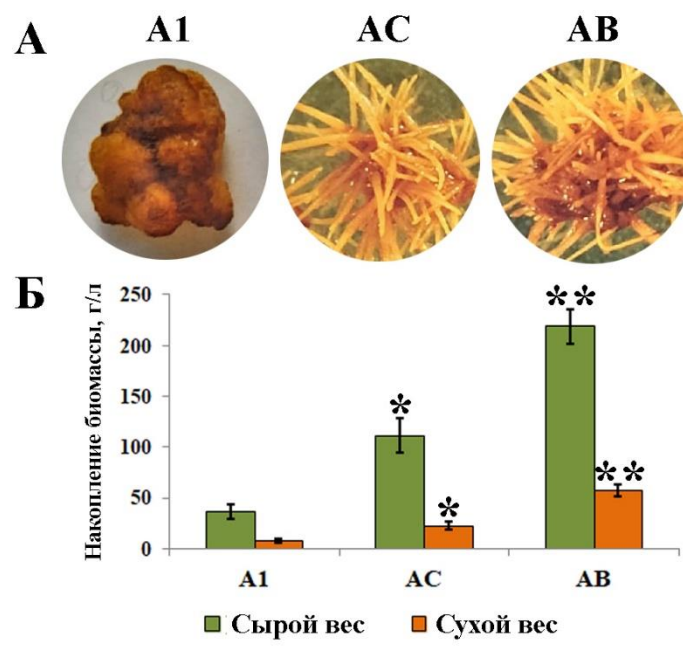


Рисунок 20 – Характерный внешний вид (А) и накопление биомассы (Б) в клеточных культурах *A. manshuriensis* (А). А1 — нетрансформированная каллусная линия; АС – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; АВ – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Статистически значимые различия средних значений обозначены * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,01$), *t*-тест Стьюдента.

Экспоненциальный рост клеточных линий был зафиксирован между третьей и четвертой неделями эксперимента (Shkryl et al., 2023), при этом максимальное увеличение биомассы клеток наблюдалось в культурах на четвертой неделе. По завершении культивирования, сырой и сухой вес для культур А1, АС и АВ достиг значений 36,6 и 7,4 г/л, 111,4 и 22,5 г/л, а также 219,0 и 57,5 г/л, соответственно (Рисунок 20Б).

С помощью ВЭЖХ-УФ-МС-анализа клеточных культур и стеблей *A. manshuriensis* было идентифицировано семь основных производных фенантреновой кислоты, включая шесть аристолохиевых кислот (АК) и один апорфиновый алкалоид (Рисунок 21). Все соединения были идентифицированы путем сравнения их УФ и МС спектров, времени удерживания, а также характера фрагментации с доступными стандартами и литературными данными (Michl et al., 2016). В результате были идентифицированы аристолохиевые кислоты I, II, IIIa, IVa/b (АК-I, АК-II, АК-IIIa, АК-IVa/b, соответственно), глюкозиды

аристолохиевых кислот IIIa и IVa/b (AK-IIIa-G и AK-IVa/b-G, соответственно), а также магнофлорин. Химические структуры обнаруженных соединений представлены на Рисунке 21.

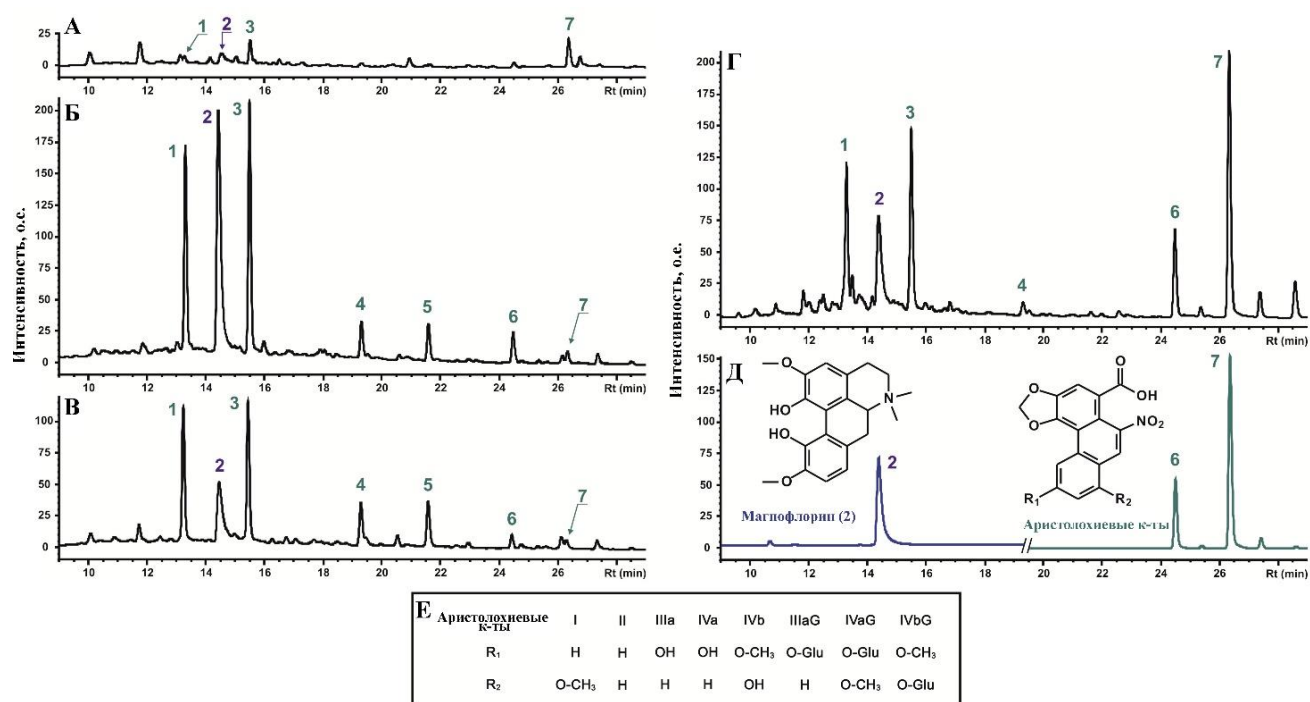


Рисунок 21 – ВЭЖХ спектр вторичных метаболитов *A. manshuriensis* в экстрактах из контрольной каллусной культуры A1 (А), *rolC*-трансгенной клеточной культуры AC (Б), *rolB*-трансгенной клеточной культуры АВ (В) и дикорастущей лианы (Г). Также представлен хроматограмма стандартов и химические структуры идентифицированных соединений (Д, Е). Идентифицированные соединения: глюкозид аристолохиевой кислоты IIIa (1), магнофлорин (2), глюкозид аристолохиевой кислоты IVa/IVb (3), аристолохиевая кислота IIIa (4), аристолохиевая кислота IVa/IVb (5), аристолохиевая кислота II (6), аристолохиевая кислота I (7).

В трансгенных клеточных линиях AC и АВ общее содержание аристолохиевых кислот оказалось в 7–8 раз выше по сравнению с контрольными каллусами A1. Однако их уровень все же был в 1,5–1,6 раза ниже, чем в стеблях *A. manshuriensis*. При сравнении эффектов генов *rolC* и *rolB* на накопление аристолохиевых кислот были выявлены определенные различия (Таблица 5). Самое заметное увеличение концентрации, в 12–40 раз, обнаружено для АК-IIIa, АК-IVa/b и АК-IIIa-G, тогда как более умеренное увеличение, в 6–8 раз,

наблюдалось для АК-II и АК-IVa/b-G. В то же время, уровень АК-I снизился в 5,5 раза. Содержание магнофлорина оказалось наивысшим в *rolC*- и *rolB*-трансформированных корнях, превышая показатели каллусной линии А1 в 5,8 и 2,8 раза, соответственно. В результате продукция этого алкалоида в четырехнедельных культурах АС и АВ достигла значений 128,7 и 158,7 мг/л, соответственно.

Таблица 5 – Содержание аристолохиевых кислот и магнофлорина (мг/г сухой массы) в клеточных культурах и стеблях *A. manshuriensis*

Метаболиты	А1	АС	АВ	Стебель
Магнофлорин	0,99 ± 0,102 ^d	5,72 ± 0,686 ^a	2,76 ± 0,304 ^c	3,39 ± 0,475 ^b
АК-I	0,11 ± 0,010 ^b	0,02 ± 0,02 ^c	0,02 ± 0,002 ^c	1,23 ± 0,139 ^a
АК-II	0,01 ± 0,001 ^c	0,08 ± 0,010 ^b	0,06 ± 0,007 ^b	0,34 ± 0,027 ^a
АК-IIIa	н.о.	0,12 ± 0,016 ^b	0,22 ± 0,033 ^a	0,04 ± 0,006 ^c
АК-IVa/b	0,01 ± 0,001 ^c	0,15 ± 0,020 ^b	0,29 ± 0,034 ^a	н.о.
АК-IIIa-G	0,02 ± 0,003 ^b	0,77 ± 0,098 ^a	0,80 ± 0,119 ^a	0,82 ± 0,109 ^a
АК-IVa/b-G	0,14 ± 0,019 ^c	0,99 ± 0,133 ^{ab}	0,94 ± 0,136 ^b	1,18 ± 0,154 ^a
Сумма аристолохиевых к-т	0,29 ± 0,037 ^c	2,13 ± 0,280 ^b	2,32 ± 0,266 ^b	3,61 ± 0,513 ^a

А1 — нетрансформированная каллусная линия; АС – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; АВ – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Разные надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия средних значений в строках ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера. н.о. – не обнаружено.

3.1.5. Фармакологическая активность экстрактов из клеточных культур

Aristolochia manshuriensis

Антиоксидантную активность оценивали по способности экстрактов связывать оксидные радикалы дифенилпикрилгидразина (ДФПГ). Исследования показали, что культуры трансформированных корней АС и АВ демонстрируют значительную антиоксидантную способность, которая была почти в 2,8 и 2,9 раза выше по сравнению с контрольными каллусами, соответственно. Более того, активность АС и АВ оказалась сопоставимой с таковой в стеблях дикорастущей лианы *A. manshuriensis* (Рисунок 22) (Shkryl et al., 2023).

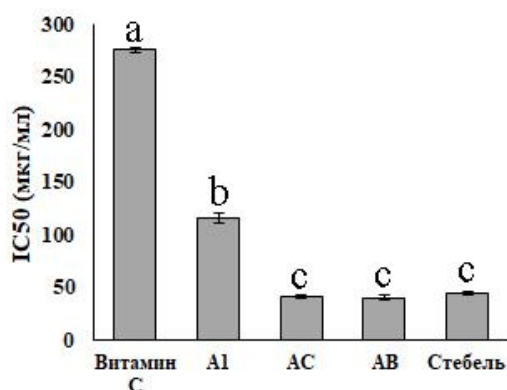


Рисунок 22 – Антиоксидантная активность экстрактов из клеточных культур и стеблей *A. manshuriensis*. A1 — нетрансформированная каллусная линия; АС – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; АВ – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Исследования антиоксидантной активности различных видов кирказона, включая *A. indica* (Subramaniyan et al., 201), *A. bracteata* (Jegadeeswari et al., 2014), *A. longa* (El Omari et al., 2019), *A. clematitidis* (Benmehdi et al., 2017), и *A. albida* (Guinnin et al., 2016), выявили значительные различия в способности улавливать радикалыДФПГ, с диапазоном активности от 20 до 550 мкг/мл. В частности, авторы отмечают, что корневые части растений проявляют более высокую антиоксидантную активность по сравнению с надземными, что, как предполагается, связано в основном с содержанием магнофлорина (Okon et al., 2020). Это соединение связывает около 71% всех свободных радикалов при концентрации всего в 50 мкг/мл (Li and Wang, 2014). Следовательно, усиление антиоксидантной активности в трансформированных корнях *A. manshuriensis* может быть обусловлено увеличением содержания магнофлорина. При этом важно учитывать, что оценка антиоксидантной способности с использованием методаДФПГ требует осторожного подхода, так как результаты могут не полностью соответствовать активности экстрактов в живых организмах.

Цитотоксическую активность экстрактов из культур A1, АС, АВ и стебля *A. manshuriensis* исследовали с помощью МТТ-анализа на четырех клеточных линиях: трижды негативных клетках рака молочной железы (MDA-MB-231),

клетках глиобластомы человека (U-87 MG), клетках рака шейки матки (HeLa CCL-2) и клетках карциномы толстой кишки человека (RKO) (Рисунок 23). Экстракт каллусной линии A1 снижал жизнеспособность раковых клеточных линий HeLa CCL-2, U87 MG, RKO и MDA-MB-231 на 47%, 35%, 30% и 19,2%, соответственно. Экстракты AC снижали метаболическую активность клеток U-87 MG на 53% и клеток HeLa CCL-2 на 36%, а также RKO на 33% и MDA-MB-231 на 23,9%. Экстракты AB снижали активность HeLa CCL-2, U-87 MG, RKO и MDA-MB-231 на 46%, 45%, 31% и 13,8%, соответственно. Экстракты стеблей показали ингибирующее действие на рост клеток U-87 MG, MDA-MB-231 и HeLa CCL-2 на 48,4%, 35,4% и 32,1%, соответственно, тогда как цитотоксичности в отношении RKO не наблюдалось (Рисунок 23). В целом, эти результаты показывают, что экстракты из трансформированных корней проявляют значительные цитотоксические эффекты, которые различаются в зависимости от различных раковых линий, из чего следуют, что воздействие было специфичным для каждого типа клеток (Shkryl et al., 2023).

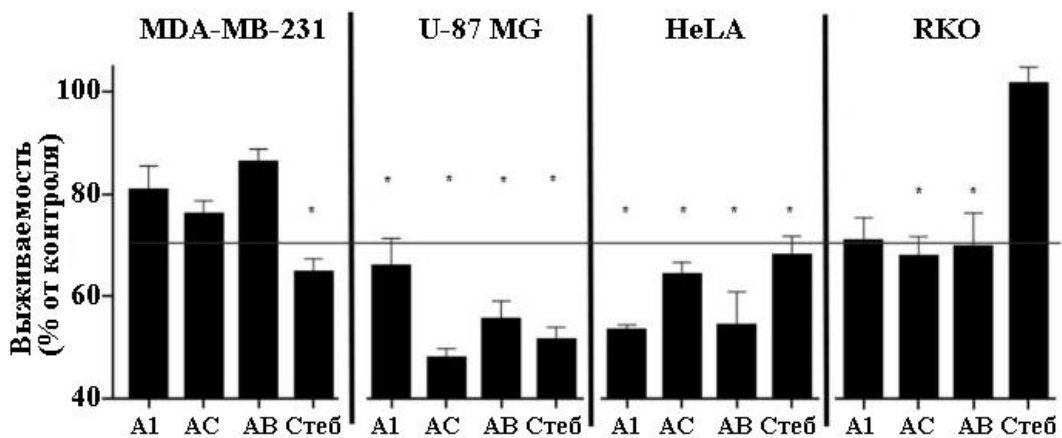


Рисунок 23 – Влияние экстрактов из клеточных культур и стеблей *A. manshuriensis* на жизнеспособность клеточных линий MDA-MB-231, U-87 MG, HeLa и RKO. A1 — нетрансформированная каллусная линия; AC – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; AB – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Все воздействия, за исключением экстракта стебля против линии RKO, значительно отличаются от соответствующих контрольных условий (принятых за 100%) при $p < 0,01$, t -тест Стьюдента. Звездочка обозначает ингибирование жизнеспособности более 30%.

Ингибирующие свойства экстрактов кирказона могут быть связаны с наличием магнофлорина (Okon et al., 2020). Магнофлорин демонстрирует цитотоксическое действие на множество раковых клеточных линий, включая опухоли мозга, желудка, молочной железы, легких, гепатоцеллюлярную карциному и другие (Mohamed et al., 2010; Xu et al., 2020). Основным механизмом противоопухолевого действия магнофлорина является стимуляция апоптоза, вызванного АФК, а также активация аутофагии через сигнальные каскады АКТ/mTOR и p38 (Sun et al., 2020; Wei et al., 2020). В отдельных исследованиях было выявлено, что магнофлорин не проявляет цитотоксического эффекта в отношении некоторых видов человеческих раковых клеток, включая KB, SiHa, A549, HaCaT, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498, HT-29, и HCT15 (Li et al., 2014). Кроме того, магнофлорин оказался безвредным для клеток эмбриональных почек человека (HEK293) и нормальных желудочных клеток (Li et al., 2014; Wei et al., 2020).

После обнаружения антипролиферативного эффекта экстрактов из культуры клеток *A. manshuriensis* был выполнен анализ фаз клеточного цикла на линии клеток RKO. Обработка экстрактами из трансформированных корней AC и AB, приводила к заметному увеличению процента клеток в фазе G2/M по сравнению с контрольными образцами (Рисунок 24А). Также наблюдалось повышение уровня анеуплоидии более чем на 10% при воздействии на раковые клетки RKO (Рисунок 24Б). Эти данные позволяют предположить, что компоненты экстрактов AC и AB могут способствовать хромосомной нестабильности, ведущей к гибели клеток и, как следствие, к антипролиферативным эффектам за счет повреждения ДНК (Shkryl et al., 2023). Исследования показали, что магнофлорин индуцирует АФК-зависимый апоптоз в раковых клетках (Sun et al., 2020; Wei et al., 2020), который может ассоциироваться с двуцепочечными разрывами ДНК (Angelova et al., 2014). Арест в контрольной точке G2/M является известным механизмом защиты, предотвращающим неправильную сегрегацию хромосом и ведущим к апоптозу до возникновения критической нестабильности генома.

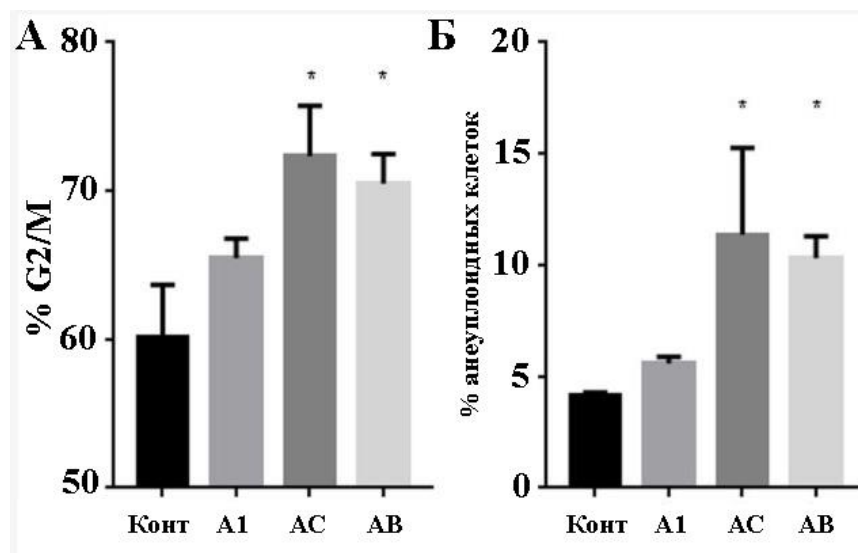


Рисунок 24 – Анализ клеточного цикла (А) и процент анеуплоидии (Б) в линии раковых клеток RKO после обработки экстрактами из клеточных культур *A. manshuriensis*. А1 — нетрансформированная каллусная линия; АС – клеточная культура, трансформированная геном *rolC*; АВ – клеточная культура, трансформированная геном *rolB*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Было установлено, что экстракты из различных видов кирказона, включая *A. clematidis*, *A. elegans*, *A. acuminata* и *A. guentheri* вызывают остановку в фазе G2/M и апоптоз в линии клеток почек человека (НК-2) (Michl et al., 2016). Было обнаружено, что уровень цитотоксичности, индукции микроядер, ареста G2/M и апоптоза коррелировал с содержанием аристолактама VI, а также АК-Ша и АА-Ша-Г. Интересно, что накопление двух последних метаболитов значительно возрастало в трансформированных корнях АС и АВ (Таблица 5). Интересно, что высокотоксичные соединения АА-I и АА-II, характерные для растений рода *Aristolochia*, не были связаны с описанными эффектами цитотоксичности (Michl et al., 2016). Эти соединения составляли значительную долю в контрольной культуре А1 и стебле растения (41–44% от общего количества аристолохиевых кислот), в то время как их относительное содержание в трансформированных корнях не превышало 3–5% (Таблица 5). Таким образом, гены *rolB* и *rolC* вызывают такое изменение вторичного метаболизма в трансформированных культурах *A. manshuriensis*, которое приводит к снижению содержания токсичных

соединений и увеличению концентрации потенциально полезных веществ. Однако для подтверждения безопасности полученных культур, необходимо проведение длительных токсикологических испытаний на лабораторных животных, что позволит оценить потенциальные риски и подтвердить их пригодность для дальнейшего применения.

3.1.6. Влияние генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов в каллусных культурах *Arabidopsis thaliana*

Несмотря на довольно длительную историю изучения генов *rol*, основными объектами для их гетерологичной экспрессии служили различные виды лекарственных и декоративных растений. При этом для проведения молекулярно-генетических исследований удобнее использовать модельные виды организмов, геномы которых секвенированы. В качестве такого модельного объекта в данной работе было выбрано растение резуховидки Таля, *Arabidopsis thaliana*. Контрольная, *rolB*- и *rolC*-трансгенные клеточные культуры были получены с помощью метода агробактериальной трансформации листовых эксплантов (Bulgakov et al., 2016). Полученные культуры были представлены рыхлой неморфогенной каллусной массой с равномерной кремовой окраской. Как и в случае с клеточными линиями марены сердцелистной, для каждого из исследуемых генов *rol* изначально было получено несколько независимых линий резуховидки Таля с разным уровнем экспрессии трансгена. Однако если у *R. cordifolia* различия в силе экспрессии генов *rol* ярко проявлялись в интенсивности окраски каллусов, у *A. thaliana* внешние отличия между трансгенными линиями были незначительны.

Было установлено, что контрольная и трансгенные каллусные культуры *A. thaliana* продуцируют только два соединения, относящиеся к индольным глюкозинолатам, а также небольшое количество индольного алкалоида – камалексина (Рисунок 25; Таблица 6). Сходный профиль вторичных метаболитов в культивируемых клетках *A. thaliana* был выявлен и ранее (Kastell et al., 2013). При этом в самих проростках *A. thaliana* было идентифицировано 25 вторичных метаболитов, характерных для данного вида растения (Рисунок 25; Таблица 6).

Эти результаты свидетельствуют о репрессированном состоянии вторичного метаболизма в каллусных клетках *A. thaliana*. Общее содержание индольных глюкозинолатов в контрольной культуре *At* составило 0,77 мкМ/г сухой массы, тогда как в *rolB*-трансгенной линии уровень их накопления достигал 2,20 мкМ/г сухой массы (Таблица 6), что соответствует всего 25% от их содержания в интактном растении. Ген *rolC* не оказал значительного влияния на накопление вторичных метаболитов. При этом каллусные культуры продуцировали равное количество камалексина, который в обычных условиях не синтезируется в растении *A. thaliana*. Таким образом, способность *rolB* активировать вторичный метаболизм в трансгенных клетках *A. thaliana* была менее выражена по сравнению с культурами *R. cordifolia* и не оказывала влияния на биосинтез алифатических глюкозинолатов и флавоноидов.

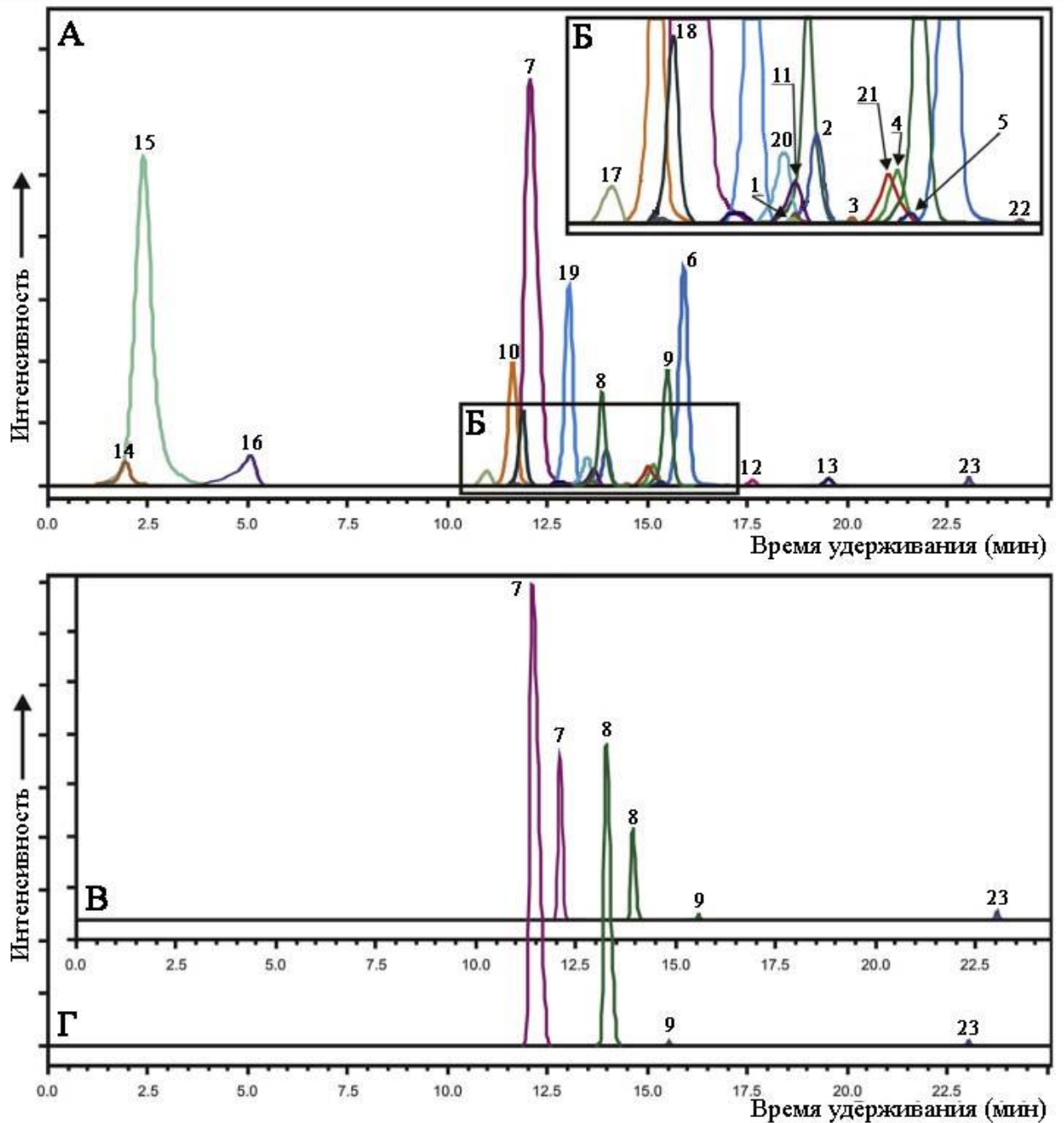


Рисунок 25 – ВЭЖХ спектр вторичных метаболитов *A. thaliana* в экстрактах из растения (А, Б), контрольной (В) и *rolB*-трансгенной (Г) каллусных культур. Номера пиков соответствуют порядковым номерам соединений в Таблице 6.

Таблица 6 – Содержание вторичных метаболитов в клеточных культурах и проростках *A. thaliana* (мкМ/г сухой массы)

№ пика	Метаболиты	At	AB	AC	Проростки
	Гликозиды флавоноидов				2,68
1	Кверцетин-гексоза-дидезоксигексоза				0,09±0,01
2	Кемпферол-гексоза-дидезоксигексоза				0,52±0,06
3	Кверцетин-гексоза-дезоксигексоза				0,46±0,05
4	Кемпферол-гексоза-дезоксигексоза				0,59±0,05
5	Изорамнетин-гексоза-дезоксигексоза				0,17±0,02
6	Кемпферол-дидезоксигексоза				0,85±0,07
	Глюкозинолаты	0,77	2,20	1,04	9,06
7	Индол-3-ил-метил-глюкозинолат	0,52±0,08	1,41±0,16*	0,53±0,10	1,85±0,21
8	4-метоксииндол-3-илметил-глюкозинолат	0,25±0,07	0,79±0,12*	0,51±0,08*	0,44±0,09
9	1-метоксииндол-3-илметил-глюкозинолат				0,52±0,09
10	4-метилтиобутил-глюкозинолат				1,63±0,25
11	5-метилтиопентил-глюкозинолат				0,11±0,02
12	7-метилтиогептил-глюкозинолат				0,06±0,01
13	8-метилтиооктил-глюкозинолат				0,13±0,03
14	3-метилсульфинилпропил-глюкозинолат				0,59±0,09
15	4-метилсульфинилбутил-глюкозинолат				3,06±0,45
16	5-метилсульфинилпентил-глюкозинолат				0,22±0,07
17	6-метилсульфинилгексил-глюкозинолат				0,01±0,008
18	7-метилсульфинилгептил-глюкозинолат				0,05±0,01
19	8-метилсульфинилоктил-глюкозинолат				0,29±0,06
20	Фенетил-глюкозинолат				0,03±0,008
21	Гексил-глюкозинолат				0,01±0,007
22	4-бензоилоксибутил-глюкозинолат				0,06±0,01
	Алкалоиды				
23	Камалексин	0,02±0,008	0,02±0,005	0,02±0,006	

At – контрольная культура, AB и AC – *rolB*- и *rolC*-трансгенные культуры, соответственно. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка.
* Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (At), *t*-тест Стьюдента.

Для того чтобы прояснить особенности химического состава клеточных линий At и АВН, был проведен анализ влияние *rolB* на экспрессию ключевых генов вторичного метаболизма *A. thaliana*. В интактном растении и контрольной культуре At обнаружен относительно высокий уровень экспрессии транскрипционных факторов *MYB11* и *MYB111*, тогда как экспрессия гена *MYB12* была снижена (Рисунок 26). Подобный транскрипционный паттерн *MYB* генов характерен для котиледонов (семядольных листьев) *A. thaliana* экотипа Col-0 (Stracke et al., 2007) и поэтому мог сохраниться и в контрольной культуре, которая была получена из листьев молодых проростков. Примечательно, что сверхэкспрессия *rolB* нарушает вышеописанный баланс, превращая его в типичный «корневой» паттерн – с высокой экспрессией *MYB12* и низкой экспрессией *MYB111* (Рисунок 26). Способность *rolB* к индукции корневых неоплазий у растений широко известна (Nilsson et al., 1997). Хотя каллусы АВН не проявляют каких-либо признаков корнеобразования, они, вероятно, сохраняют это присущее онкогену свойство на транскрипционном уровне. Таким образом, *rolB* влияет на экспрессию факторов транскрипции, связанных с вторичным метаболизмом, и эта активность может быть обусловлена его способностью индуцировать особый тип неопластической трансформации растительных клеток.

Известно, что повышенная экспрессия гена *MYB12* в проростках *A. thaliana* приводит к активации накопления в них флаваноилов, что коррелирует с уровнем экспрессии таких генов биосинтеза как халкон-синтаза (*CHS*), халкон-изомеразы (*CHI*), флаванон-3-гидроксилаза (*F3H*) и флаванол-синтазы (*FLS*), тогда как транскрипция циннамат-4-гидроксилазы (*C4H*), флавоноид-3'-монооксигеназы (*F3'H*) и ди-гидрофлавонол-4-редуктазы (*DFR*) не изменялась (Mehrtens et al., 2005). Было обнаружено, что экспрессия *rolB* способствует активации всех изученных ключевых генов биосинтеза флавоноидов в трансгенной культуре по сравнению с линией At (Рисунок 26). Однако, несмотря на этот эффект, уровень транскрипционной активности генов *CHS*, *F3H*, *DFR* и *CHIL* в культуре АВН оставался значительно ниже, чем в интактном растении (Рисунок 26). Вероятно, особенность трансгенных каллусных линий может обуславливать отсутствие в

них флавоноидов, подавление биосинтеза которых не изменяется даже в присутствии белка RolB. Анализ транскрипционной активности 4-кумарат-КоА-лигазы (*4CL*), регулирующей метаболические реакции на ранних этапах фенилпропаноидного пути (Schneider et al., 2003), показал неоднозначный результат. Гены *4CL1* и *4CL2* подавлялись *rolB*, тогда как экспрессия *4CL3* активировалась, а экспрессия *4CL5* оставалась неизменной (Рисунок 26). Способность *rolB* подавлять определенные изоформы *4CL* также могла послужить причиной отсутствия продукции флавоноидов в трансформированных каллусах.

Транскрипционный кластер MYB-bHLH-WD40 является одним из ключевых компонентов регуляции биосинтеза антоцианов у растений (Cui et al., 2021). Экспрессионный уровень комплексообразующего WD40-белка TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) в проростках *A. thaliana*, а также в клеточных культурах At и АВН значительно не отличался (Рисунок 26). Транскрипционная активность факторов TRANSPARENT TESTA 2 (TT2) и TRANSPARENT TESTA 8 (TT8) была повышена в *rolB*-трансгенном каллусе по сравнению как с контрольной культурой, так и с растением. Напротив, уровень экспрессии транскрипционного фактора PLASTID-LIPID-ASSOCIATED PROTEIN 1 (PAP1) был низким в обеих каллусных линиях по сравнению с проростками растения. Таким образом, трансформация геном *rolB* не оказала влияния на экспрессию ключевых компонентов известных активаторных транскрипционных комплексов TTG1-TT8(TT2)-PAP1 и TTG1-TT8(TT2)-MYB114 в каллусных линиях, что выражалось в отсутствии даже следовых количеств антоцианов в культивируемых клетках.

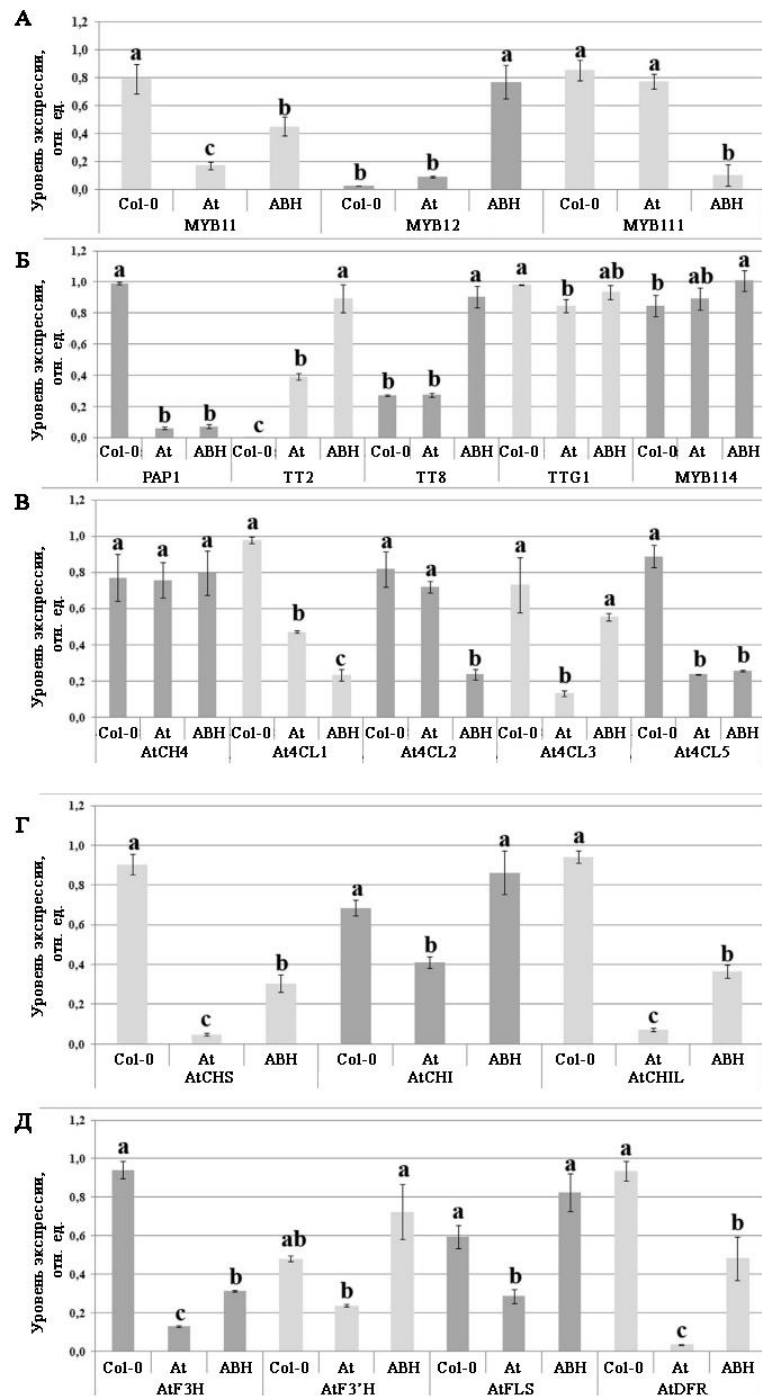


Рисунок 26 – Экспрессия транскрипционных факторов (А, Б) и ключевых генов биосинтеза (В, Г, Д) флавоноидов в растении и клеточных культурах *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; At – контрольная клеточная линия; ABH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Экспрессия транскрипционных факторов MYB, контролирующих биосинтез индольных глюкозинолатов (*MYB34*, *MYB51* и *MYB122*) в *rolB*-трансгенной линии была значительно выше, чем в контрольной культуре и растении (Рисунок 27). Данный эффект сопровождался повышенной транскрипционной активностью ферментов, отвечающих за биосинтез данных соединений - цитохром P450-зависимых монооксигеназ (*CYP79B2*, *CYP79B3* и *CYP83B1*), а также тиогидроксимат-S-глюкозилтрансферазы (*UGT74B1*). Таким образом, повышение накопления индольных глюкозинолатов в культуре АВН связано с увеличением экспрессии генов, регулирующих данный метаболический путь.

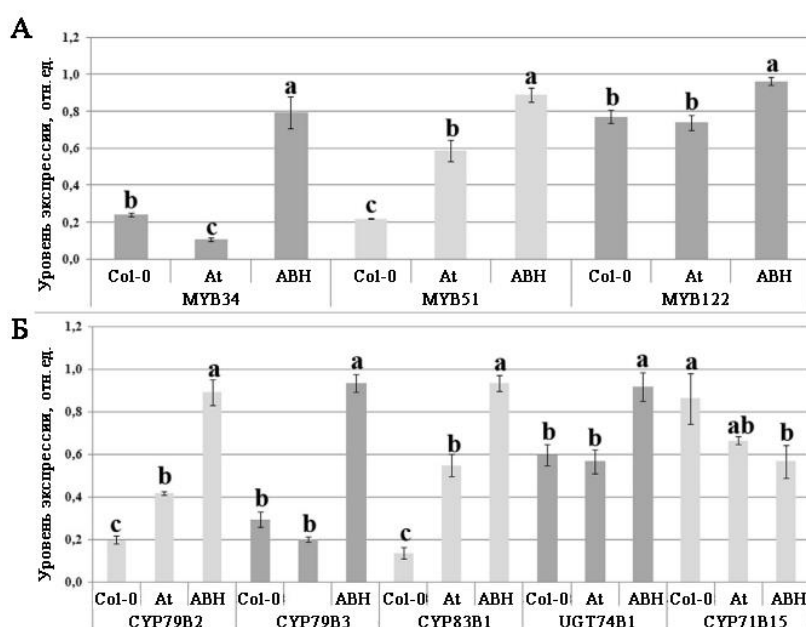


Рисунок 27 – Экспрессия транскрипционных факторов (А) и ключевых генов биосинтеза (Б) индольных глюкозинолатов в растении и клеточных культурах *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; At – контрольная клеточная линия; АВН – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Наконец, была исследована экспрессия генов, отвечающих за биосинтез алифатических глюкозинолатов. В *rolB*-трансгенной культуре уровень транскрипции *MYB29* не изменился, тогда как экспрессия *MYB28* и *MYB76* увеличилась в 4 и более раза (Рисунок 28). Из литературных данных известно, что

MYB76 играет лишь вспомогательную роль в регуляции синтеза алифатических глюкозинолатов, тогда как MYB28 является главным транскрипционным фактором, активирующим их продукцию (Hirai et al., 2007; Sønderby et al., 2010b). Тем не менее его активация под действием гена *rolB* не привела к заметному накоплению данной группы метаболитов в культуре АВН (Таблица 6). Более того, транскрипционная активность была значительно повышена и у ферментов биосинтеза: *CYP79F1*, *CYP83A1* и *UGT74C1* (Рисунок 28), но при этом оставалась ниже, чем в интактном растении.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что *rolB* проявляет явную стимулирующую активность на уровне транскрипции генов фенилпропаноидного пути. Однако общее подавление биосинтеза в каллусах *A. thaliana*, вероятно, связанное с дедифференцированным состоянием клеток, является столь значительным, что описанные выше эффекты *rolB* оказались недостаточными для перестройки метаболизма в сторону накопления вторичных соединений.

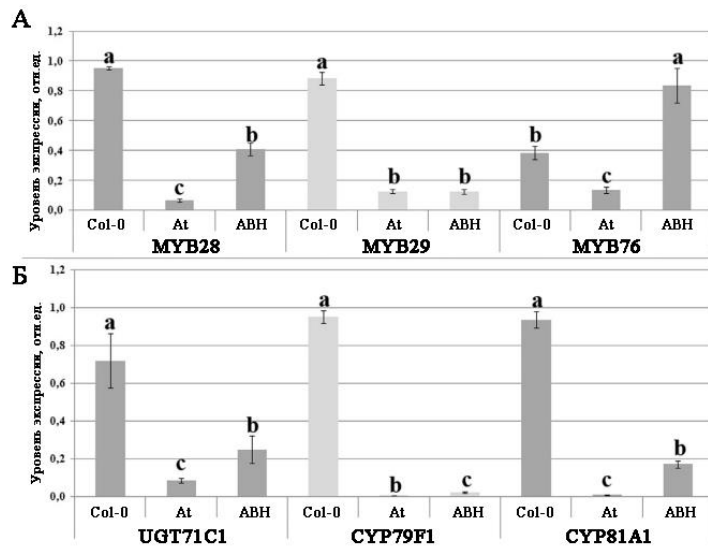


Рисунок 28 – Экспрессия транскрипционных факторов (А) и ключевых генов биосинтеза (Б) алифатических глюкозинолатов в растении и клеточных культурах *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; At – контрольная клеточная линия; АВН – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

3.1.7. Влияние генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов в растениях *Arabidopsis thaliana*

Для проверки предположения о том, что отсутствие выраженного эффекта *rolB* на накопление вторичных метаболитов в каллусной культуре *A. thaliana* связано с особенностями *in vitro* культивируемых клеток, следовало изучить его влияние в интактном растении. С помощью метода погружения цветочных почек, были получены три независимые *rolB*-трансгенные линии *A. thaliana* – В2, В5 и В13. Наиболее заметным эффектом трансформации геном *rolB* являлась карликовость: длина стебля 7-недельных проростков В2, В5 и В13 была в 1,5–2 раза ниже, чем у нетрансформированных растений (Рисунок 29А и Б). Кроме того, *rolB*-трансгенные линии отличались от контроля более ранней инициацией цветения (Рисунок 29В). Данные фенотипические признаки являются типичными проявлениями активности *rolB* у трансгенных растений и были ранее неоднократно описаны в литературе (Schmülling et al., 1988; Casanova et al., 2005; Kodahl et al., 2016). При этом другие характерные признаки *rolB*-трансгенных растений, такие как некроз и скрученность листьев, кустистость, интенсивное корнеобразование в линиях В2, В5 и В13 выявлены не были. Известно, что проявление определенных морфологических и физиологических эффектов генов *rol* зависит как от вида трансформированного растения, так и типа, используемого для гетерологичной экспрессии промотора (Casanova et al., 2005).

Было установлено, что уровень экспрессии *rolB* в трансгенных растениях второго поколения (F2) статистически значимо не отличался между линиями В2, В5 и В13, но при этом значительно превышал транскрипционную активность трансгена в растениях третьего поколения (F3). Наиболее заметное снижение обнаружено в линии В13, в которой экспрессия онкогена составляла 50–65% от его уровня в В2 и В5 на протяжении 7 недель наблюдения. Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с известным феноменом эпигенетического сайленсинга трансгенов в ряду поколений (Dehio and Schell 1994; Kodahl et al., 2016), а разная степень его проявления в независимых линиях может быть обусловлена особенностями геномных локусов, в которые произошла интеграция гена *rolB*.

Стоит также отметить, что снижение экспрессии трансгена привело и к уменьшению выраженности фенотипических особенностей *rolB*-трансгенных линий (Veremeichik et al., 2022).

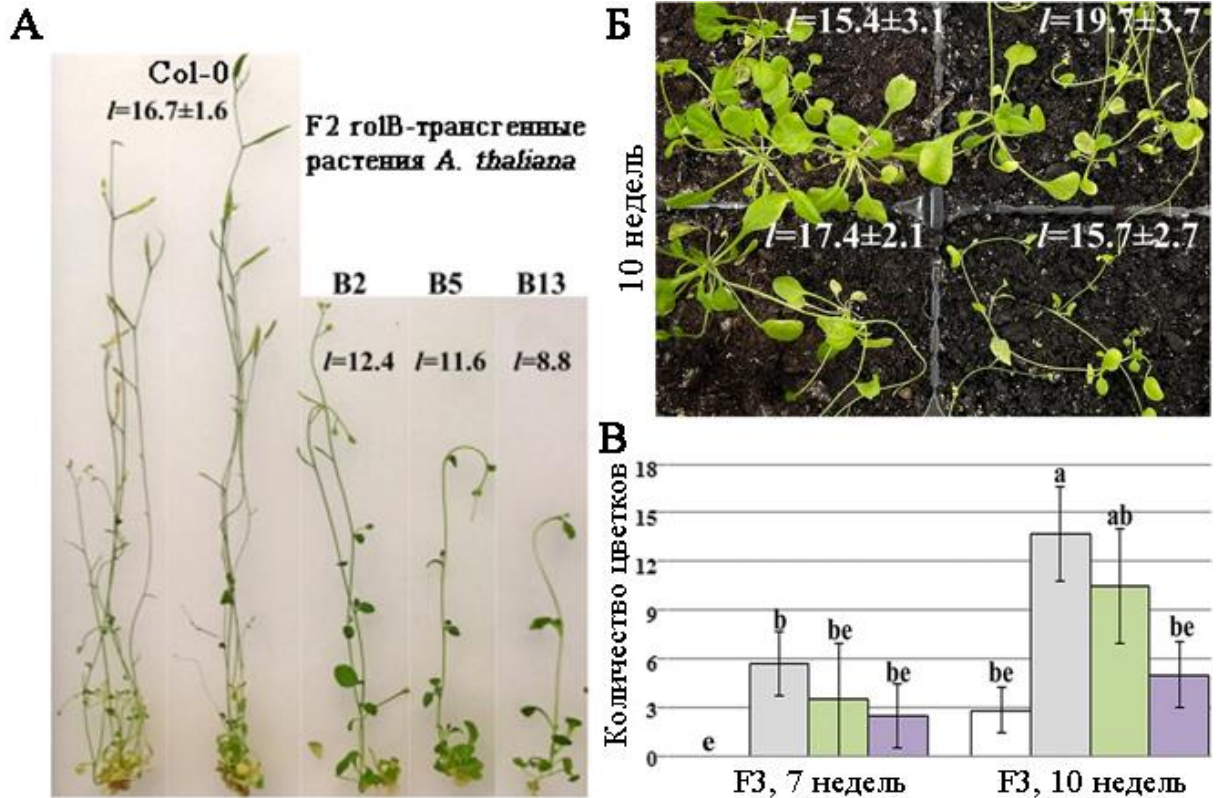


Рисунок 29 – Характерный внешний вид контрольных и трансгенных линий *A. thaliana* (А). На фотографии указана общая длина (l , см) 7-недельных проростков. Морфология контрольных и трансгенных линий *A. thaliana* третьего поколения (F3) (Б). Время цветения растений контрольных и трансгенных линий *A. thaliana* (В). Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; B2, B5 и B13 – *rolB*-трансгенные линии *A. thaliana*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Содержание индольных глюкозинолатов оказалось одинаковым во всех исследованных линиях растений (Таблица 7). При этом накопление некоторых алифатических производных в *rolB*-трансгенных линиях возрастало (8-метилтиооктил-глюкозинолат и 8-метилсульфинилоктитл-глюкозинолат) или наоборот падало (3-метилсульфинилпропил-глюкозинолат). В тоже время общее содержание глюкозинолатов в трансгенных линиях *A. thaliana* снижалось по сравнению с контрольными растениями. Таким образом, стимулирующая

активность *rolB* на биосинтез индольных глюкозинолатов в трансгенных каллусных клетках оказалась нивелирована в контексте регуляторной системы целого растения.

Флавоноидные соединения у всех исследованных растений были представлены производными кемпферола, кверцетина и изорамнетина. Было установлено, что ген *rolB* оказал существенное влияние на накопление вторичных метаболитов данной группы. При этом гликозиды кемпферола составляли основную фракцию флавоноидов и их накопление значительно увеличивалось под действием гена *rolB* (Рисунок 30А). В частности, содержание кемпферол-гексоза-дидезоксигексозы-2 в трансгенных линиях было в 7–10 раз выше, по сравнению с контрольными растениями. Накопление кемпферол-гексоза-дидезоксигексозы и кемпферол-дидезоксигексозы увеличилось в *rolB*-трансгенных проростках в 3–5 раз. Несмотря на эти изменения, все трансгенные линии обладали таким же соотношением гликозидов кемпферола, как и растения экотипа Col-0. Сверхэкспрессия *rolB* также дифференцировано повлияла и на содержание производных кверцетина (Рисунок 30Б). Наибольший уровень активации наблюдался для кверцетин-гексозо-дидезоксигексозы, содержание которой увеличилось в 9–12 раз (Рисунок 30Б). Две линии, В2 и В13, имели повышенный уровень накопления кверцетин-гексоза-дидезоксигексозы, в то время как ее содержание в линии В5 не изменилось. Содержание кверцетин-дидезоксигексозы в контрольной и трансгенных линиях не отличалось. Уровень накопления изорамнетин-гексоза-дидезоксигексозы во всех *rolB*-трансгенных линиях был в 6–7 раз выше контроля. Интересно, что *rolB* вызвал изменения в соотношении гликозидов кверцетина. Так в контрольных растениях 80% общего содержания производных кверцетина приходилось на кверцетин-дидезоксигексозу, тогда как в трансгенных линиях наблюдалось преобладание кверцетин-гексоза-дидезоксигексозы.

Таблица 7 – Содержание глюкозинолатов в контрольной и трансгенных линиях растения *A. thaliana* (мкМ/г сухой массы)

Метаболиты	Col-0	B2	B5	B13
4-гидроксииндол-3-илметил-глюкозинолат	0,07±0,03	0,02±0,01	0,03±0,02	0,04±0,03
Индол-3-илметил-глюкозинолат	1,27±0,22	1,14±0,14	1,04±0,07	1,16±0,02
4-метоксииндол-3-илметил-глюкозинолат	0,27±0,04	0,26±0,05	0,24±0,01	0,26±0,1
1-метоксииндол-3-илметил-глюкозинолат	0,23±0,08	0,38±0,15	0,19±0,02	0,22±0,1
4-метилтиобутил-глюкозинолат	0,87±0,24	0,51±0,03	0,89±0,3	0,85±0,3
5-метилтиопентил-глюкозинолат	0,07±0,02	0,06±0,02	0,08±0,04	0,06±0,02
7-метилтиогептил-глюкозинолат	0,026±0,01	0,04±0,02	0,05±0,04	0,03±0,01
8-метилтиооктил-глюкозинолат	0,037±0,02	0,13±0,06*	0,20±0,12*	0,10±0,05*
3-метилсульфинилпропил-глюкозинолат	1,36±0,26	0,79±0,19	0,80±0,33	0,65±0,18*
4-метилсульфинилбутил-глюкозинолат	3,55±0,59	2,92±0,47	2,44±0,43	2,29±0,34
5-метилсульфинилпентил-глюкозинолат	0,23±0,04	0,25±0,04	0,19±0,01	0,18±0,02
6-метилсульфинилгексил-глюкозинолат	0,01±0,002	0,01±0,001	0,01±0,001	0,01±0,003
7-метилсульфинилгептил-глюкозинолат	0,03±0,01	0,07±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
8-метилсульфинилоктил-глюкозинолат	0,09±0,01	0,26±0,08*	0,19±0,04*	0,15±0,04*
Пентил-глюкозинолат	0,03±0,02	0,02±0,002	0,02±0,004	0,02±0,0003
Фенетил-глюкозинолат	0,03±0,01	0,03±0,01	0,02±0,002	0,02±0,002
Гексил-глюкозинолат	0,02±0,01	0,03±0,002	0,02±0,0001	0,02±0,001
4-бензоилоксибутил-глюкозинолат	0,01±0,004	0,05±0,04	0,02±0,01	0,01±0,001
Сумма	8,20	6,97	6,47	6,11

Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; B2, B5 и B13 – *rolB*-трансгенные линии *A. thaliana*. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *rolB* в растениях *A. thaliana* привела к статистически значимому увеличению содержания флавоноидных соединений, что подтверждает предположение о том, что его эффект в культуре АВН может быть заблокирован на уровне специализированного метаболизма каллусных клеток. Это свидетельствует, что наблюдаемый уровень активации флавоноидов остается в пределах биологической нормы для данного вида и может способствовать защите растения от неблагоприятных внешних факторов среды благодаря своим антиоксидантным свойствам (Nakabayashi et al. 2014; Trembl and Šmejkal 2016; Singh et al. 2021; Wang et al. 2020).

Для изучения влияния *rolB* на ключевые гены, участвующие в биосинтезе флавоноидов, был проанализирован уровень экспрессии генов *MYB11*, *CHS*, и *F3H* (Рисунок 30). Было установлено, что экспрессия *MYB11* под действием трансгена была активирована в 1,7–2,4 раза. Транскрипционная активность гена *CHS* возрастала в 3,1–3,7 раз, тогда как экспрессия *F3H* увеличилась в 2,0–2,9 раз во всех трансгенных линиях *A. thaliana*. Эти результаты свидетельствуют о том, что индуцированное *rolB* накопление флавоноидов коррелирует с активацией биосинтетических и регуляторных генов, контролирующих биосинтез данной группы соединений у растений *A. thaliana*.

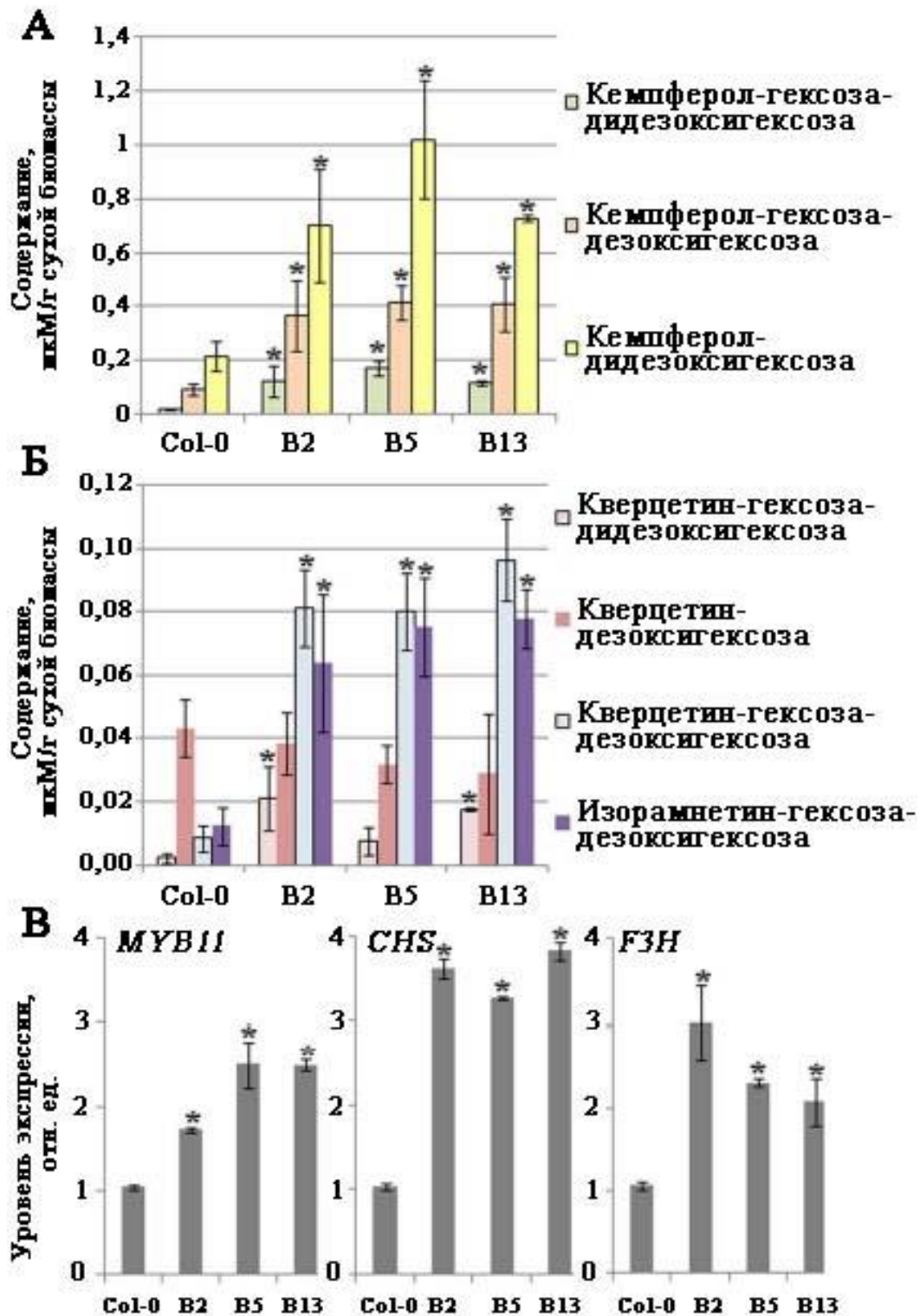


Рисунок 30 – Содержание флавоноидов (А, Б) и экспрессия ключевых генов их биосинтеза (В) в растениях *A. thaliana*. Col-0 – растение *A. thaliana* экотипа Columbia-0; B2, B5 и B13 – *rolB*-трансгенные линии *A. thaliana*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

3.1.8. Обсуждение результатов по влиянию генов *rol* на биосинтез вторичных метаболитов

Известно, что гены *rol* (за исключением *rolD*) в разной степени способны индуцировать у трансформированных растений синдром «волосатого» корня (Spina et al., 1987). При этом, совместное действие генов *rol* поддерживает неопластический ризогенез гораздо более эффективно, чем каждый ген в отдельности, что указывает на их синергетический эффект для корнеобразования. Такой синергизм не наблюдался в отношении действия генов *rol* на вторичный метаболизм трансгенных клеток *R. cordifolia*. Экспрессия отдельных *rol*-генов приводила к повышенной экспрессии гена *RcICS*, что, в свою очередь, стимулировало продукцию антрахинонов (Shkryl et al., 2008). Действуя совместно в трансформированных калусных линиях RABC и RA4, *rol*-гены не вызывали аддитивного эффекта. Эта же тенденция прослеживалась и в ростовых характеристиках изученных культур. Экспрессия *rolA* и *rolC* стимулировала прирост биомассы клеток по сравнению с нормальными каллусами, однако, совместная экспрессия генов *rolA*, *B* и *C* не приводила к стимуляции роста.

Очевидно, что ген *rolB* оказывает более выраженное влияние на рост и вторичный метаболизм трансформированных клеток, чем другие *rol*-гены (Bulgakov et al., 2011). Данный эффект коррелирует с уровнем экспрессии *rolB* – чем он выше, тем активнее происходит транскрипция биосинтетических генов, что приводит с одной стороны к повышенной продукции вторичных метаболитов, а с другой – угнетению роста трансгенных культур (Bulgakov et al., 2008). При некотором критически высоком уровне транскрипции *rolB* клетки перестают расти и подвергаются некрозу. Вероятно, отдельные популяции клеток, сверхэкспрессирующие *rolB*, в большинстве случаев погибают еще на стадии первичной селекции и поэтому получение стабильных культур с такими свойствами крайне затруднительно. Кроме того, сами клетки в процессе культивирования, по-видимому, способны подавлять избыточную экспрессию трансгена, что приводит и к закономерному снижению продукции вторичных метаболитов (Dubrovina and Kiselev, 2012). Высказанное предположение

согласуется с данными о том, что конститутивная экспрессия *rolB* вызывала клеточную гибель у трансформированных клеток табака (Schmulling et al., 1988). Более высокие уровни экспрессии *rolB* были получены авторами только у тех растений, которые одновременно экспрессировали гены *rolB* и *rolC* (Schmulling et al., 1988), что указывает на то, что *rolC* способен устранять негативное влияние *rolB* на рост каллуса. Известно также, что *rol*-трансформированные протопласты табака приобретали повышенную чувствительность к растительному гормону ауксину (Maurel et. al., 1991). В частности, было показано, что гены *rolA*, *rolB* и *rolC* увеличивали чувствительность к гормону в 1000, 10000 и 10 раз, соответственно. Интересно отметить, что для конструкции *rolABC* данный эффект также не имел аддитивного характера: протопласты, трансформированные *rolABC*, были только в 1000 раз более чувствительны к ауксину, чем контрольные клетки. Таким образом, как и в случае с влиянием на рост и вторичный метаболизм, гены *rolA* и *rolC* ослабляли действие гена *rolB*. Carone и соавторы (1989) обнаружили, что индивидуальная экспрессия гена *rolB* придает трансгенными клеткам типичные черты «волосатых» корней, тогда как ассоциация *rolB* с геном *rolC* приводит к формированию фенотипа, сходного с обычной корневой культурой. Авторы выдвинули предположение о том, что белки RolC и RolB проявляет противодействующую активность по отношению друг к другу. Данный феномен наиболее вероятно не связан с непосредственным взаимодействием продуктов рассматриваемых генов, а осуществляется на уровне подконтрольных сигнальных путей.

На основании проведенных исследований установлено, что ген *rolC* оказывает положительное действие, как на ростовые, так и биосинтетические характеристики трансформированных клеток. Изученные *rolC*-трансгенные каллусные культуры *R. cordifolia* обладают стабильным ростом и повышенным содержанием антрахинонов на протяжении многолетнего культивирования (Shkryl et al., 2008). Подобный эффект был показан и для других клеточных культур, трансформированных геном *rolC* (Bulgakov 2008). Например, *rolC*-трансгенные корни женьшеня *Panax ginseng*, полученные более 20 лет назад,

продолжают хорошо расти, тогда как обычные корни этого растения демонстрируют меньшую жизнеспособность при длительном культивировании *in vitro*. Каллусы *P. ginseng*, экспрессирующие *rolC*, также характеризуются стабильным ростом без дополнительной селекции в течение длительного периода наблюдений (Gorpenchenko et al., 2006). Следует отметить, что активация накопления биомассы клеток происходит только при низкой и умеренной экспрессии *rolC*. При этом даже повышенная экспрессия этого онкогена не приводит к подавлению роста трансформированных клеток. Таким образом, как и в случае с геном *rolB*, в данном случае наблюдается наличие условного порогового значения транскрипционной активности *rolC*. Однако в отличие от *rolB*, превышение данного порогового значения не вызывает негативного влияния на жизнеспособность трансформированных клеток, а сводится к прекращению стимулирующего действия *rolC*. Такой же эффект был ранее описан и для *rolC*-трансгенных растений табака и яблони (Gardner et al., 2006; Igarashi et al., 2002). Авторы установили, что степень проявления фенотипических изменений, вызванных *rolC*, увеличивается только до определенного уровня, после которого дальнейший рост транскрипционной активности трансгена не приводит к усилению его эффекта. Стоит также упомянуть, что трансформация геном *rolC* не всегда вызывает активацию вторичного метаболизма. Например, в данном исследовании ген *rolC* не оказал существенного влияния на накопление глюкозинолатов в каллусах резуховидки Таля. Известны примеры, когда экспрессия *rolC* приводила к ингибированию биосинтеза. Так в *rolC*-трансгенных клеточных культурах *Eritrichium sericeum* и *Lithospermum erythrorhizon* выявлено 2–3 кратное снижение концентрации рабдозиина и розмариновой кислоты (Vulgakov et al., 2005). Таким образом, эффект *rolC*, по-видимому, носит избирательный характер в отношении различных биосинтетических путей образования вторичных метаболитов растений.

Ген *rolA* является наименее изученным представителем данного семейства генов. До проведения настоящего исследования в литературе имелось лишь

единственное упоминание о способности гена стимулировать выработку никотина в культуре клеток табака (Palazón et al., 1997). Было установлено, что в каллусах *R. cordifolia*, экспрессирующих *rolA*, наблюдается почти 3-кратное увеличение содержания антрахинонов по сравнению с контрольными клетками (Shkryl et al., 2008). Более того, в процессе длительного культивирования *rolA*-трансгенной культуры *R. cordifolia*, концентрация антрахинонов в них продолжала расти. Данный эффект был обусловлен в первую очередь повышением уровня руберитриновой кислоты, которая ранее считалась минорным компонентом каллусных культур *R. cordifolia* (Mischenko et al., 1999). Это указывало на то, что в условиях длительного эксперимента *rolA* способен постепенно трансформировать биосинтетический аппарат клеток. Действительно, уровень экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты пути биосинтеза антрахинонов, включая *ICS*, *OSBS*, *OSBL* и *IPPi*, заметно повышался на протяжении всего периода наблюдений. Описанный эффект является интересной особенностью *rolA* с точки зрения биотехнологии, поскольку клеточные культуры растений при их долговременном культивировании обычно теряют потенциал к накоплению вторичных метаболитов (Kolewe et al., 2008; Mustafa et al., 2011; Li et al., 2012). Известно, что белок RolA содержит ДНК-связывающий участок, схожий по структуре с ДНК-связывающим доменом белка E2 вирусом папилломы (Rigden and Carneiro, 1999), что косвенно указывает на его способность регулировать экспрессию других регуляторных белков. Тем не менее целевые гены-мишени белка RolA до сих пор не были выявлены, а какие-либо дополнительные сведения о его биохимической функции отсутствуют. Это подчеркивает необходимость дальнейшего изучения данного гена как индуктора вторичного метаболизма у растений.

Исследование показало, что гены *rolC* и *rolB* индуцируют формирование «волосатых» корней на черешковых и стеблевых эксплантах *A. manshuriensis*, причём *rolB* демонстрирует более сильное действие, чем *rolC*. Также было выявлено, что генетическая трансформация изменения в содержании аристолохиевых кислот и магнофлорина, с различной степенью эффективности

между клеточными линиями АС и АВ. В трансформированных культурах накопление АА-I значительно снижалось, а содержание АА-IIIа, АА-IVа/б и АА-IIIа-Г увеличивалось до 40 раз. Ген *rolC* оказал наиболее существенное влияние на накопление магнофлорина: в клеточной линии АС его содержание достигло 5,72 мг/г сухого веса. Как и в случае с клеточными культурами *R. cordifolia*, активирующий эффект генов *rolC* и *rolB* на вторичный метаболизм кирказона проявился сразу после трансформации и сохранялся на протяжении длительного культивирования трансформированных корней. Кроме того, результаты показывают, что экстракты из трансформированных корней *A. manshuriensis* проявляют цитотоксическое действие по отношению к различным опухолевым клеткам человека. В свете рисков, связанных с использованием растительного материала, содержащего аристолохиевые кислоты, требуются дополнительные исследования для оценки потенциала применения полученных культур как источника противоопухолевых средств. Известно, что суспензионные клеточные культуры *A. manshuriensis*, трансформированные диким штаммом *R. radiobacter* С58, потеряли способность синтезировать аристолохиевые кислоты (Bulgakov et al., 1996). Трансформация этого же растения с использованием генов *rolC* и *rolB* не привела к полному исчезновению всех аристолохиевых кислот, однако наблюдалось заметное уменьшение уровня АК-I, которая играет ключевую роль в нефротоксичных и канцерогенных свойствах видов *Aristolochia* (Michl et al., 2016). Применение системы CRISPR/Cas9 для инактивации ключевых генов, участвующих в биосинтезе аристолохиевых кислот, открывает новые перспективы для использования клеточных культур кирказона. Недавно было выявлено 29 генов, участвующих в биосинтезе аристолохиевых кислот в геноме *A. contorta* (Cui et al., 2023; Kowalczyk et al., 2022), что обеспечивает основу выбора потенциальных мишеней для целенаправленной метаболической инженерии клеточных культур кирказона.

Несмотря на то, что резуховидка Таля является модельным растением, регуляция вторичного метаболизма в его каллусных культурах остается недостаточно изученной. Результаты данного исследования подтвердили

предыдущие наблюдения (Kastell et al., 2013), свидетельствующие о том, что каллус *A. thaliana* продуцирует малое количество и относительно бедный состав вторичных метаболитов. Ингибирование путей образования вторичных метаболитов в культивируемых клетках растений является общей проблемой для биотехнологии, которую связывают с эпигенетическими изменениями, происходящими на уровне хроматина в процессе формирования каллусной ткани (Strauss and Reyes-Dominguez, 2011). В этом отношении значительный интерес представляют результаты исследования одного из представителей семейства *plast* белков – онкогена *bb* из бактерии *R. radiobacter* (ранее *A. tumefaciens*) (Ito and Machida, 2015). Авторы предположили, что приобретению плюрипотентности клеток способствуют глобальные изменения эпигенетического статуса, связанные с заменой гистонов на их варианты в зиготе после оплодотворения, а в дифференцированных клетках – при стимуляции растительными гормонами, а также экспрессией онкогена *bb*. Ген *rolB* также является классическим представителем *plast* онкогенов, основным эффектом которого является приобретение трансформированными клетками состояния плюрипотентности, которое, как правило, выражается в неопластическом росте корней, однако, при этом не ограничивается данным типом дифференцировки (Altamura et al., 1994).

Было установлено, что в культуре *A. thaliana* ген *rolB* проявляет активность, направленную на активацию процессов вторичного метаболизма. Эта активация оказалась избирательна и определяется неизвестными пока причинами и механизмами. Например, *rolB* значительно снижает транскрипционную активность гена *MYB111* и не активирует экспрессию *PAP1*. Причина изменения экспрессии *MYB111* может заключаться в том, что *rolB*, вероятно, преобразует профиль экспрессии факторов MYB из специфического для семядолей в профиль, специфичный для корней растения. Этот вывод основан на результатах исследования экспрессии *MYB11*, *MYB12* и *MYB111* в развивающихся проростках *A. thaliana* (Stracke et al., 2007), в котором описаны сходные паттерны экспрессии данных транскрипционных факторов. Известно также, что в проростках тройного мутанта *myb11/myb12/myb111* происходит ингибирование синтеза флавонолов, в

то время как накопление антоцианов не изменяется (Stracke et al., 2007). Если отсутствие флавонолов в *rolB*-трансгенных культурах *A. thaliana* можно объяснить низкой экспрессией *MYB11*, то отсутствие антоцианов, вероятно, связано с низкой экспрессией *PAP1*. Такое выборочное действие *rolB* на экспрессию генов, кодирующих различные транскрипционные факторы, обнаружено впервые. В системе целого растения, *rolB* проявляет типичный для него эффект активации: накопление производных кверцетина и кемпферола увеличилось в 3,3 и 4,3 раза, соответственно. Наблюдаемый паттерн экспрессии транскрипционных факторов в исследованных трансгенных клеточных культурах и растениях указывает на важную роль фактора MYB11 в *rolB*-опосредованной регуляции биосинтеза флавоноидов. Поиск эффективных способов активации биосинтеза флавоноидов актуален в области биотехнологии растений в связи с широким применением их противовоспалительных, противоаллергических, противовирусных и антиканцерогенных свойств (Nijveldt et al., 2001; Tohge et al., 2017). Таким образом, полученные результаты могут быть использованы в метаболической инженерии для направленной регуляции биосинтеза данной группы соединений.

3.2. Влияние генов *rol* на содержание АФК и устойчивость трансгенных культур к абиотическим стрессам

3.2.1. Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, экспрессирующих ген *rolC*

Ген *rolC* вызывает значительные морфологические и биохимические изменения в трансформированных растениях, включая карликовость, ранее цветение, подавление апикального доминирования, пожелтение листьев, модуляцию транспорта и метаболизма сахарозы (Spena et al., 1987; Nilsson et al., 1993b; Faiss et al., 1996; Casanova et al., 2005). Гетерологичная экспрессия *rolC* в культивируемых растительных клетках приводит к изменению гормональной чувствительности (Maurel et al., 1991), активирует вторичный метаболизм (Palazón et al., 1998b; Bulgakov et al., 1998, 2002; Bonhomme et al., 2000), экспрессию белков, связанных с патогенезом (Kiselev et al., 2006), а также стимулирует

образование эмбриогенных структур (Gorpenchenko et al., 2006). Также ранее было показано, что *rolC* подавляет накопление АФК в клеточной культуре марены сердцелистной (Bulgakov et al., 2008). Это наблюдение позволило предположить, что комплексные биологические эффекты гена *rolC* зависят от внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния трансгенных клеток. Для того чтобы подтвердить данную гипотезу был проведен сравнительный анализ содержания внутриклеточных АФК в *rolC*-трансгенной культуре *R. cordifolia* RCH и трех независимых каллусных линиях *A. thaliana* AtC1, AtC2 и AtC3 с помощью флуоресцентного зонда H₂DCF-DA. Установлено, что уровень внутриклеточных АФК в *rolC*-трансгенных каллусах *A. thaliana* AtC1, AtC2 и AtC3 составлял 79%, 63% и 62%, соответственно, по сравнению с клетками контрольной культуры. При этом содержание АФК в линии RCH составляло всего 39% по отношению к контрольным клеткам *R. cordifolia* (Shkryl et al., 2022).

Так как влияние генов *rol* на трансгенные клетки напрямую связано с интенсивностью их экспрессии, необходимо было исследовать уровень транскрипции *rolC* в линиях *A. thaliana* и культуре RCH *R. cordifolia*. Установлено, что содержание транскриптов *rolC* в клетках AtC1 и AtC2 оказалось практически одинаковым и примерно в 1,6 раза ниже, чем в клетках культуры AtC3 (Рисунок 31). Более того, экспрессия трансгена *rolC* в линии AtC3 была сравнима с его уровнем в клетках RCH. С учетом всех этих факторов каллусная линия AtC3 была обозначена как ACH, т.е. клеточная линия *A. thaliana* со сравнительно высоким уровнем экспрессии гена *rolC*. Интересно отметить, что в трансгенных культурах *A. thaliana* повышение транскрипционной активности *rolC* не приводило к соразмерному снижению АФК, поскольку их накопление в линиях AtC2 и AtC3 не отличалось. Отсутствие прямой корреляции между транскрипционной активностью *rolC* и фенотипическими признаками трансформированных клеток было и другими авторами на различных растительных объектах (Gardner et al., 2006; Igarashi et al., 2002).

Для сравнительной оценки чувствительности клеток *A. thaliana* и *R. cordifolia* к абиотическим стрессовым воздействиям контрольные (At и R) и *rolC*-трансгенные (RCH и ACH) каллусные линии культивировали в условиях нормальной (24°C), повышенной (28°C и 37°C) и пониженной (12°C) температуры, а также в присутствии различных концентраций NaCl (60 и 120 мМ).

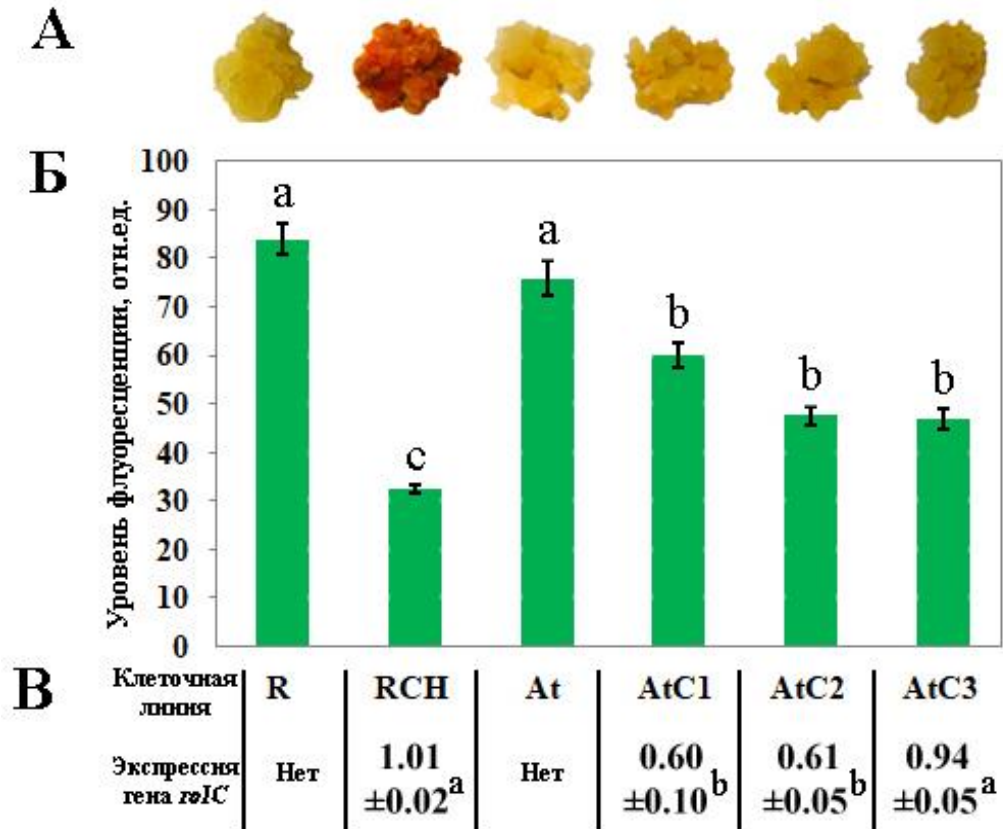


Рисунок 31 – Характеристика каллусных культур *R. cordifolia* и *A. thaliana*, используемых в экспериментах. Внешний вид культур (А), содержание внутриклеточных АФК (Б) и экспрессия гена *rolC* в трансгенных клетках (В). R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; AtC1, AtC2 и AtC3 – *rolC*-трансгенные каллусные линии *A. thaliana*. Уровень АФК оценивали по интенсивности флуоресценции DCF в отдельных клетках. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Тепловой стресс значительно ингибировало рост контрольных клеточных линий R и At (Рисунок 32). Повышение температуры на 4°C по сравнению с нормальными условиями роста привело к снижению накопления биомассы каллусов R и At более чем в 3 раза, но не оказало влияние на рост каллусных линий, экспрессирующих ген *rolC*. Более значительное повышение температуры на 13°C полностью останавливало рост контрольных каллусов, в то время как линии АСН и РСН, хотя и были ингибированы на 85% и 88%, соответственно, при этом сохраняли способность к росту.

Культивирование каллусов в условиях холода (12°C) выявило повышенную устойчивость *rolC*-экспрессирующих линий по сравнению с контрольными культурами (Рисунок 32). Накопление биомассы культуры АСН составило 36% от таковой в нормальных условиях, тогда как прирост культуры At достиг только 28%. Еще более выраженная устойчивость к холодному стрессу наблюдалась у *rolC*-трансгенных каллусов *R. cordifolia*. Холод ингибировал рост культуры РСН на 35%, а рост контрольной каллусной линии – на 81%.

Солевой стресс оказал различное влияние на рост каллусных линий *A. thaliana* и *R. cordifolia* (Рисунок 32). В целом клетки *A. thaliana* оказались более устойчивы к воздействию NaCl, чем клетки *R. cordifolia*. При этом NaCl в концентрации 60 мМ в равной степени ингибировал рост каллусов At и АСН на 23%. Различие в устойчивости к воздействию соли между контрольной и трансгенной культурами отчетливо проявилось при двукратном увеличении концентрации NaCl. Так накопление биомассы клеток в линии АСН, культивируемой в присутствии 120 мМ NaCl, составило 55% от роста в нормальных условиях, тогда как прирост культуры At достиг лишь 30% от контрольных условий. При этом уже в присутствии 60 мМ NaCl в среде, рост контрольной каллусной линии *R. cordifolia* подавлялся на 78%, а при 120 мМ NaCl ее рост практически полностью прекращался. Клетки *R. cordifolia*, экспрессирующие *rolC*, проявляли повышенную солеустойчивость, так как накопление биомассы культуры РСН в присутствии 60 и 120 мМ NaCl, составило 82 и 24% от массы клеток в нормальных условиях, соответственно.

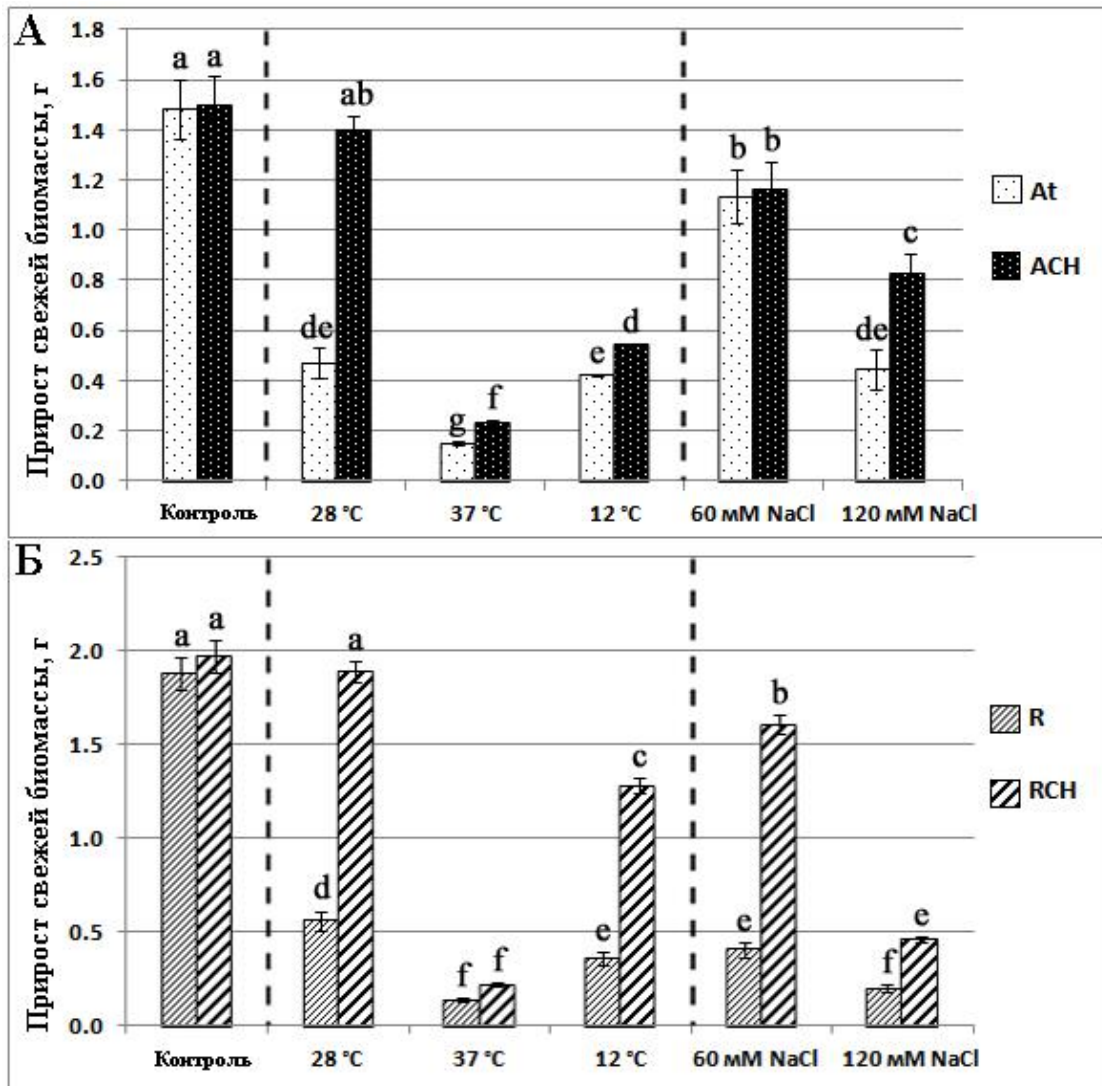


Рисунок 32 – Влияние температурного и солевого стресса на рост каллусных культур *A. thaliana* (А) и *R. cordifolia* (Б). R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ACH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

3.2.2. Внутриклеточная локализация белка RolC

Внутриклеточная локализация белка является важным показателем его функциональных особенностей. Проведенные ранее исследования внутриклеточной локализации белка RolC были выполнены на основе иммунохимического анализа суммарных клеточных фракций и свидетельствовали о его накоплении в цитоплазме (Estruch et al., 1991b; Oono et al., 1991). Для

уточнения этих данных, было исследовано накопление белка RolC, слитого с флуоресцентным маркерным белком, непосредственно в живых клетках. Для получения гибридного белка, была разработана генетическая конструкция, в которой полноразмерная последовательность гена *rolC* находилась в одной рамке считывания с геном *EGFP* (enhanced green fluorescent protein) под контролем тандемного промотора 35S CaMV. Флуоресценцию EGFP детектировали в ядре и цитоплазме клеток, за исключением вакуолей (Рисунок 33), что является типичным пространственным распределением для данного белка (Collings, 2013). Химерный белок RolC-EGFP в целом имел сходный паттерн внутриклеточной локализации (Рисунок 33), что отчасти подтверждает литературные данные. Детальный анализ ядер трансформированных клеток показал, что определенная фракция RolC накапливается также и в ядрышках трансформированных клеток (Shkryl et al., 2022). На достоверность полученных результатов указывают также отсутствие сигналов ядрышковой локализации у EGFP и известный паттерн распределения белка внутри клетки, подтверждающий необходимость использования специализированных меток для накопления EGFP в ядрышке (Martin et al., 2015).

Интересно отметить, что уже в процессе публикации вышеописанных результатов (статья была направлена в журнал в 2020 г.), другая группа исследователей под руководством профессора Генриха Люткина (Университет Копенгагена, Дания) в 2021 г. провела аналогичные исследования, которые также показали цитоплазматическую и ядерную локализацию белка RolC (Favero et al., 2021). Авторами была отмечена любопытная особенность: в том случае, когда флуоресцентный белок был слит с С-концом RolC (как и в данном исследовании) химерный белок был способен проникать в ядро трансформированных клеток, а будучи слитым с его N-концом уже нет. В последнем случае химера EGFP-RolC помимо цитоплазмы обнаруживалась только в ядерной мембране, что позволило авторам предположить позиционное влияние флуоресцентного белка, размер которого почти в 2 раза превосходит размер RolC, на конформацию и/или белок-белковые взаимодействия последнего (Favero et al., 2021). Стоит упомянуть, что

влияние EGFP на локализацию слитых с ним белков является весьма распространенным явлением (Weill et al., 2019). При этом показано, что расположение флуоресцентных белков на N-конце в гораздо большей степени нарушает естественную локализацию и верный результат в таком случае выявлен лишь в половине исследованных случаев (Palmer and Freeman, 2004). Фундаментальная причина данного расхождения может заключаться в том, что в процессе трансляции EGFP-участок химерного белка первым подвергается фолдингу и впоследствии нарушает формирование правильной пространственной структуры исследуемого белка. Кроме того, при неполном прохождении транскрипции возможно формирование укороченных версий химеры, в которых аминокислотная последовательность целевого белка окажется обрезана. Расположение флуоресцентных белков на С-конце позволяет исключить обе ошибки, т.к. в этом случае будет нарушена пространственная структура EGFP, что приведет к отсутствию флуоресцентных сигналов. Таким образом, представленные данные, а также результаты коллег в которых использовалось С-концевое слияние EGFP с RolC, вероятно, являются наиболее достоверными.

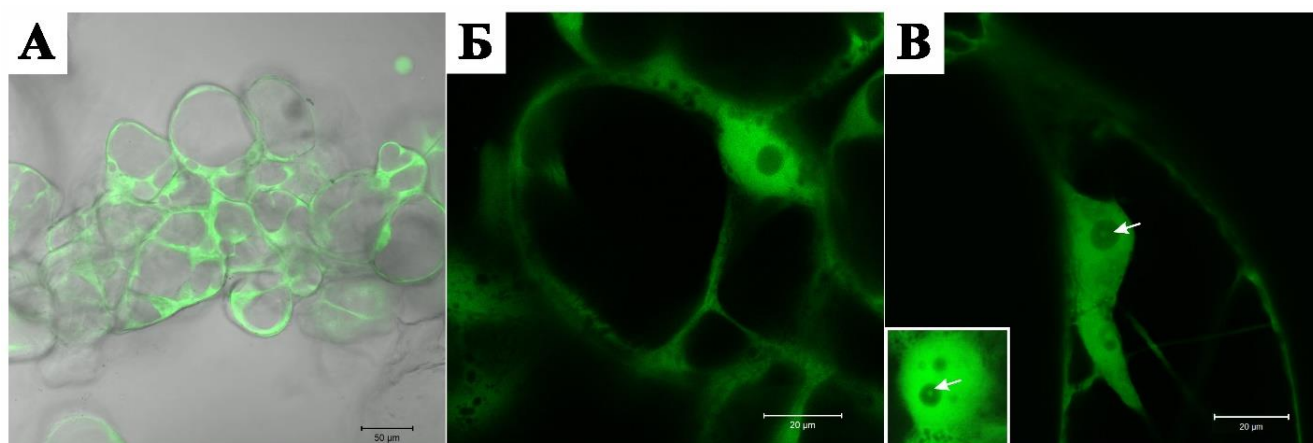


Рисунок 33 – Локализация белка RolC-EGFP в трансформированных клетках *R. cordifolia*. **А** – общий вид клеток, трансформированных конструкцией *rolC-EGFP*; **Б** – клетки, трансформированные геном *EGFP*; **В** – ядерная локализация белка RolC-EGFP (стрелки указывают точечную флуоресценцию химерного белка в ядрышках трансформированных клеток).

Ядрышко в первую очередь известно, как место транскрипции рРНК и биогенеза рибосом (Kalinina et al., 2018). Однако последние данные показывают, что ядрышки также играют важную роль в защите ядерных белков от агрегации при возникновении стрессовых условий, что позволяет клеткам обеспечивать контроль их «качества» (Frottin et al., 2019). Кроме того, ядрышко накапливает множество белков репарации ДНК и шаперонов, что указывает на его функциональную значимость для поддержания стабильности генома и регуляции структуры хроматина (Lindström et al., 2018). Стоит отметить, что другой представитель семейства *plast* генов, онкоген *bb* из *R. radiobacter* (ранее *A. tumefaciens*), был также обнаружен в ядрышке трансформированных клеток (Kitakura et al., 2002). В этом компартменте белок *bb* непосредственно взаимодействует с недавно идентифицированным в табаке гистоном H3 NtSIP2 и проявляет шаперонную активность, модулирует транскрипцию генов, приводя к перепрограммированию и неопластической трансформации растительных клеток (Ishibashi et al., 2014). Идентификация белка RolC в ядрышках растений также может косвенно свидетельствовать о его участии в эпигенетическом контроле экспрессии генов посредством сходного, но пока не идентифицированного механизма. Интересно, что *rolC*- и *bb*-индуцированные морфогенетические изменения у трансформированных растений весьма схожи (Mohajjel-Shoja et al., 2011), что гипотетически указывает на существование общего молекулярного механизма их действия.

3.2.3. Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, экспрессирующих ген *rolB*

Ген *rolB* является наиболее важным генетическим фактором для индукции «волосатых» корней у трансформированных агробактериями растений (Nilsson, Olsson, 1997). У *rolB*-трансгенных растений выявлены такие морфологические особенности, как карликовость и пожелтение листьев (Kodahl et al., 2016), формирование *de novo* меристем (Altamura et al., 1994; Koltunov et al., 2001), партенокарпия (Carmi et al., 2003), некроз (Schmulling et al., 1988) и др. Хотя гены *rolB* и *rolC* действуют синергически при индукции корней, в отношении других

эффектов они нередко проявляют антагонистическое действие. Например, ген *rolC* ослаблял негативное влияние сверхэкспрессии *rolB* на рост клеток табака (Schmülling et al., 1988). Также, *rolC* снижал повышенную чувствительность к ауксину в трансформированных клетках вызванную белком *rolB* (Maurel et al., 1991). Было обнаружено, что стимулирующий эффект гена *rolB* на биосинтез антрахинонов, а также ингибирующее действие на рост клеток были менее выражены при его совместной экспрессии с *rolC* (Shkryl et al., 2008). Эти результаты свидетельствуют, что такой неоднозначный характер взаимодействия онкогенов может проявляться и в отношении метаболизма АФК.

Для экспериментов были выбраны трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* (RBL, RBM и RBH, соответственно). Содержание АФК анализировали с использованием зондов H_2R123 и $H_2DCF-DA$. В целом, специфичность H_2R123 и $H_2DCF-DA$ для АФК сходна (Crow, 1997; Abele et al., 2002), однако H_2R123 способен преодолевать митохондриальную мембрану и отражает общий уровень цитозольных и митохондриальных АФК (Nempel et al., 1999). Было установлено, что уровень АФК в каллусных и суспензионных культурах RBL, RBM и RBH был снижен и составлял, в зависимости от уровня экспрессии *rolB*, 50–83% от уровня в культуре R (Рисунок 34).

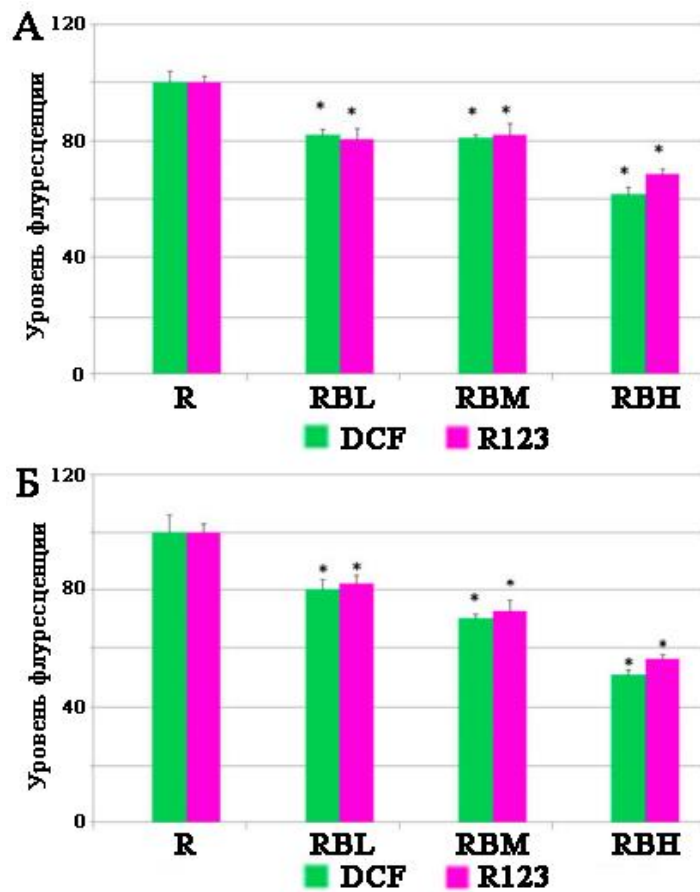


Рисунок 34 – Внутриклеточное содержание АФК в суспензионных (А) и каллусных (Б) культурах *R. cordifolia*. Уровень АФК оценивали по интенсивности флуоресценции DCF или R123 в отдельных клетках. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBL, RBM и RBH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена, соответственно. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Чтобы установить, является ли данный эффект видоспецифичным или имеет более широкое биологическое значение, в исследование были включены дополнительные модельные системы: *rolB*-трансгенные культуры женьшеня *Panax ginseng*, полученные ранее (Bulgakov et al., 1998), и *rolB*-трансгенные культуры *A. thaliana*, полученные в настоящей работе. Измерение уровня АФК в этих культурах подтвердило ингибирующее действие *rolB* (Таблица 8). Наибольший ингибирующий эффект был обнаружен у клеток *A. thaliana*, в которых высокая экспрессия трансгена подавляла образование АФК в 1,5–1,6 раз по сравнению с контролем (Bulgakov et al., 2012).

Таблица 8 – Внутриклеточное содержание АФК в контрольных и *rolB*-трансгенных клеточных культурах *P. ginseng* и *A. thaliana*

Клеточная линия	Количество проанализированных клеток	Уровень флуоресценции, отн. ед.
Контрольная каллусная культура <i>P. ginseng</i>	58	65,4 ± 3,9
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>P. ginseng</i>	79	48,2 ± 2,4*
Контрольная суспензионная культура <i>P. ginseng</i>	80	60,0 ± 4,5
<i>rolB</i> -трансгенная суспензионная культура <i>P. ginseng</i>	80	48,5 ± 2,0*
Контрольная каллусная культура <i>A. thaliana</i>	100	75 ± 3,5
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>A. thaliana</i> ABL	100	60 ± 2,5*
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>A. thaliana</i> АВН	100	47,5 ± 1,9*
Контрольная суспензионная культура <i>A. thaliana</i>	80	86,1 ± 5,0
<i>rolB</i> -трансгенная суспензионная культура <i>A. thaliana</i> ABL	80	66,4 ± 4,5*
<i>rolB</i> -трансгенная суспензионная культура <i>A. thaliana</i> АВН	80	56,5 ± 4,2*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Измерения АФК также проводили флуориметрическим методом с использованием люминола и экстрактов из контрольных и *rolB*-трансгенных каллусных культур марены сердцелистной, женьшеня настоящего и резуховидки Таля на 21-ый день культивирования (линейная фаза роста) и 28-ой день культивирования (стационарная фаза роста). В этом анализе АФК определяли как сумму перекиси водорода, супероксид анион-радикала и гидроксильного радикала (Komrskova et al., 2006). Полученные значения соответствовали данным конфокальной микроскопии и показали, что концентрация АФК в каллусах, трансформированных *rolB*, у всех видов растений была на 10-30% ниже, чем в контрольных культурах (Таблица 9).

Таблица 9 – Уровень АФК в контрольных и *rolB*-трансгенных каллусных культурах, определенный методом люминол-зависимой хемилюминесценции

Клеточная линия	Содержание H ₂ O ₂ , % от контроля	
	Линейная фаза	Стационарная фаза
Контрольная культура <i>R. cordifolia</i> R	100	100
<i>rolB</i> -трансгенная культура <i>R. cordifolia</i> RBL	92	90
<i>rolB</i> -трансгенная культура <i>R. cordifolia</i> RBM	80*	83*
<i>rolB</i> -трансгенная культура <i>R. cordifolia</i> RBH	68*	70*
Контрольная культура <i>P. ginseng</i>	100	100
<i>rolB</i> -трансгенная культура <i>P. ginseng</i>	74*	85*
Контрольная культура <i>A. thaliana</i> At	100	100
<i>rolB</i> -трансгенная культура <i>A. thaliana</i> ABL	83*	86*
<i>rolB</i> -трансгенная культура <i>A. thaliana</i> ABH	70*	72*

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

В стрессовых условиях продукция АФК у растений выполняет важную сигнальную роль, активируя защитные механизмы адаптации, а при повышенной концентрации вызывает гибель клеток (Вахтер et al., 2014). Чтобы оценить влияние *rolB* на окислительно-восстановительный гомеостаз клеток не только в нормальном состоянии, но и при стрессовом воздействии, были изучены особенности образования АФК в трансгенных культурах *R. cordifolia* при воздействии таких известных индукторов кислородных радикалов как паракват, менадион и световой стресс в присутствии зондов H₂DCF-DA и H₂R123. При обработке паракватом использовали концентрацию, которая вызывала двукратное увеличение АФК в контрольных клетках, но при этом не приводили к их гибели (10 мкМ и 1 час световой инкубации). При этих же условиях в *rolB*-трансгенных клетках происходило лишь незначительное повышение уровня АФК по

сравнению с контролем (Рисунок 35). При этом в контрольной культуре в ответ на воздействие параквата оба зонда демонстрировали схожий паттерн образования АФК – флуоресценция преобладала на периферии клеток, вокруг ядерной оболочки и в цитозоле (Рисунок 35). В культуре RBH флуоресценция R123 и в нормальных условиях, и в опыте локализовалась только в цитозоле.

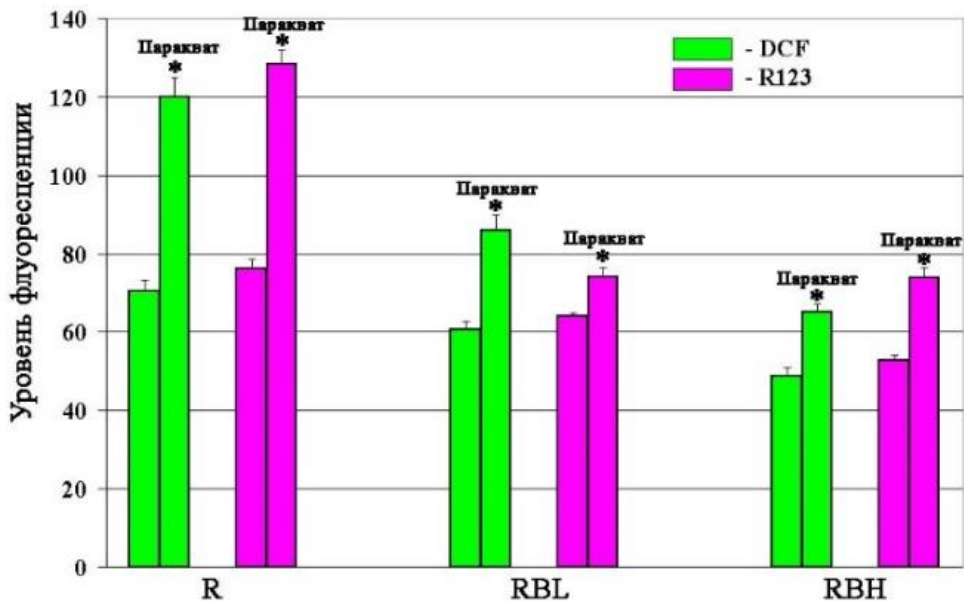
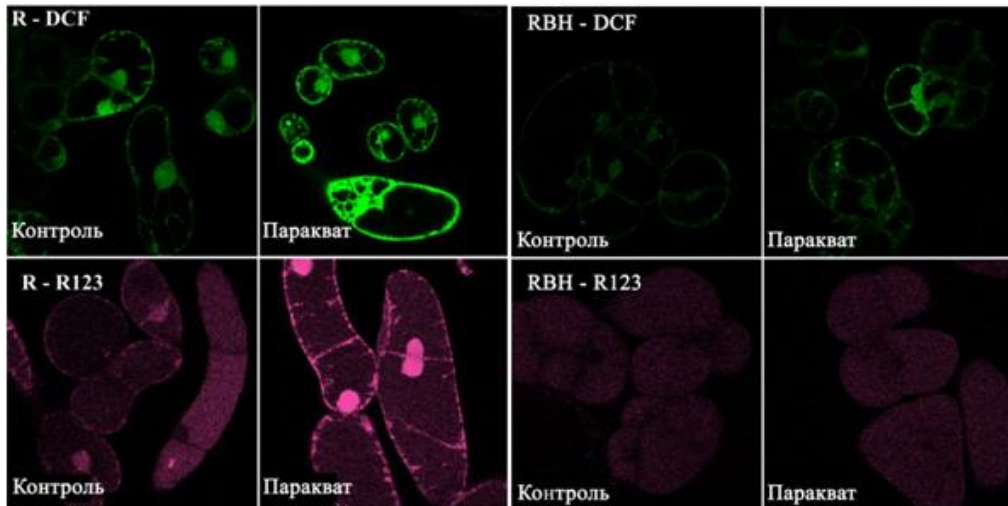


Рисунок 35 – Влияние параквата на внутриклеточное содержание АФК в контрольной (R) и *rolB*-трансгенных (RBL и RBH) культурах *R. cordifolia*. Клетки культивировали в темноте в течение 4 суток, после чего обрабатывали паракватом (10 мкМ) в течение 1 ч при непрерывном воздействии света. Уровень АФК оценивали по интенсивности флуоресценции DCF или R123 в отдельных клетках. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

В следующей серии экспериментов в качестве индуктора АФК был использован менадион, а в качестве флуоресцентного зонда – $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Для оценки жизнеспособности клеток *R. cordifolia* к этому соединению, культуры R и RBH культивировали в течение суток в присутствии 0–500 мкМ менадиона, после чего окрашивали йодидом пропидия, который способен проникать только в клетки с поврежденными мембранами. Установлено, что значения IC_{50} (концентрация менадиона, которая снижает жизнеспособность клеток на 50%) для культур R и RBH составили 100 мкМ и 250 мкМ, соответственно (Bulgakov et al., 2012). Стоит отметить, что *rolB*-трансгенные клетки были жизнеспособны даже в присутствии 500 мкМ менадиона, тогда как клетки контрольной культуры полностью погибали (Рисунок 36). Однако если паракват вызывал быстрое повышение концентрации кислородных радикалов уже через 1 час после обработки, при воздействии менадиона происходило постепенное повышение уровня АФК в течение более длительного периода. В контрольной культуре менадион в дозе 100 мкМ вызвал почти двухкратное повышение внутриклеточных АФК примерно через 20 часов с начала воздействия. При этом *rolB*-трансгенные клетки оказались практически нечувствительны к менадиону на протяжении эксперимента (Таблица 10). Известно, что менадион индуцирует образование супероксидного радикала и H_2O_2 на плазматической мембране за счет одноэлектронного восстановления O_2 в реакции, катализируемой НАДФН-зависимой хинон-редуктазой (Schopfer et al., 2008). Паракват действует как терминальный окислитель фотосистемы I; на свету он восстанавливает кислород до супероксидного радикала, который впоследствии превращается в H_2O_2 (Mehler, 1951).

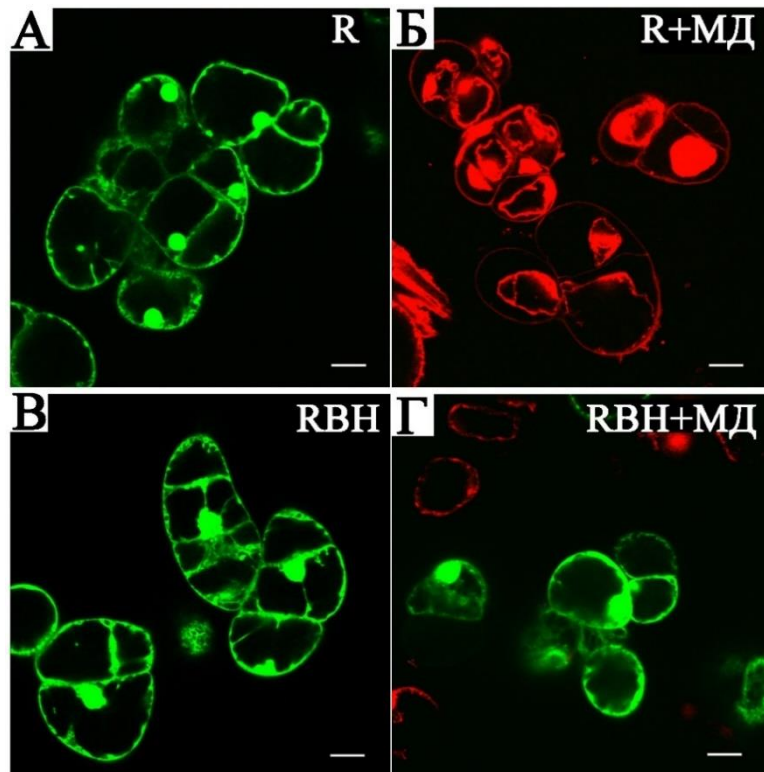


Рисунок 36 – Жизнеспособность контрольных (R) и *rolB*-трансгенных (RBH) клеток *R. cordifolia* в присутствии менадиона (МД). Микрофотографии интактных клеток (A и B), а также клеток, обработанных менадионом (500 мкМ; B и Г) в течение 24 часов. Живые клетки (зеленые) визуализировали с помощью DCF, а мертвые (красные) с использованием йодида пропидия.

Контрольные и *rolB*-трансгенные клетки подвергали световому стрессу, индуцированного воздействием аргонового лазера (488 нм) в течение 16 минут. В контрольной культуре уровень АФК в этих условиях увеличился в 1,7 раза (Таблица 10). В культуре с низкой экспрессией *rolB* повышение уровня АФК было менее значительным (в 1,45 раза), тогда как в культуре с высокой экспрессией *rolB* изменения уровня АФК под действием света не происходило (Vulgakov et al., 2012). Таким образом, *rolB* предотвращает образование АФК в трансгенных клетках, как в нормальных условиях, так и при воздействии различных стрессовых факторов.

Таблица 10 – Внутриклеточное содержание АФК в контрольных (R) и *rolB*-трансгенных (RBL и RBH) культурах *R. cordifolia* при воздействии менадиона и светового стресса

Обработка	Уровень флуоресценции DCF		
	R	RBL	RBH
Менадион, мкМ ^a			
0	82,0 ± 4,3	70,9 ± 3,9	48,0 ± 2,4
100	123,5 ± 5,0*	74,0 ± 4,6	53,4 ± 4,1
Интенсивный свет (время воздействия, сек) ^b			
2	77,0 ± 4,0	59,8 ± 5,3	62,5 ± 3,2
600	113,9 ± 5,3*	83,5 ± 3,8*	63,8 ± 5,4
1000	130,7 ± 6,4*	87,4 ± 5,2*	64,9 ± 6,1

^aМенадион добавляли в 4-х дневные суспензионные культуры. Интенсивность флуоресценции DCF анализировали по прошествии 20 дней инкубации. ^bКлетки подвергали воздействию аргонового лазера (длина волны 488 нм, 5,9% от максимальной интенсивности) Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Для изучения влияния длительного окислительного стресса на устойчивость трансгенных клеток, суспензионные культуры R, RCH и RBH инкубировали в присутствии 100 мкМ параквата как в условиях освещенности, так и в темноте (Vulgakov et al., 2012). По окончании эксперимента оценивали жизнеспособных клеток с помощью окраски йодидом пропидия. При инкубации на свету, воздействие параквата приводило к заметным внешним изменениям: в культурах R и RCH наблюдалась массовая гибель клеток, тогда как культура RBH оставалась жизнеспособной (Рисунок 37). Установлено, что в культуре R количество мертвых клеток в темноте и на свету составляло 11% и 85%, соответственно (Рисунок 37).

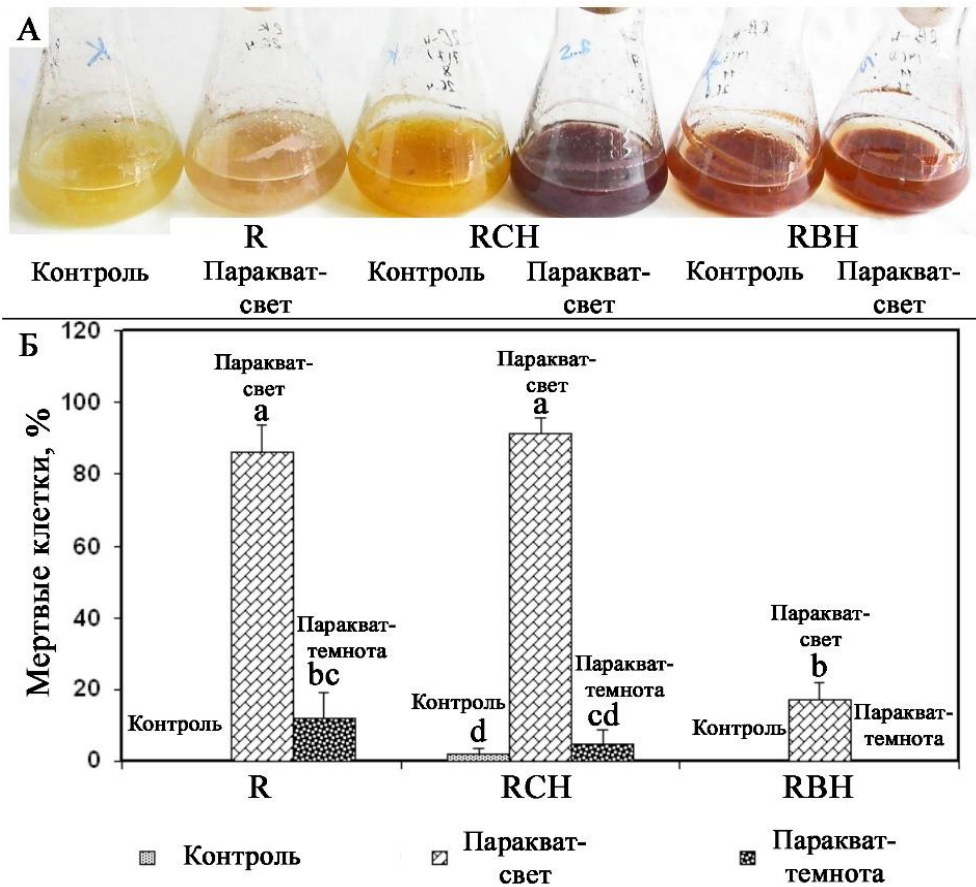


Рисунок 37 – Жизнеспособность контрольных (R), *rolC*- и *rolB*-трансгенных (RCH и RBH, соответственно) клеток суспензионных культур *R. cordifolia* в присутствии параковата. **А** – внешний вид клеточных культур; **Б** – оценка цитотоксичности параковата. Клетки культивировали в присутствии 100 мкМ параковата в течение 8 суток в темноте или на свету, окрашивали йодидом пропидия и анализировали с помощью лазерной конфокальной микроскопии. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

В культуре RBH при воздействии параковатом в темноте мертвые клетки не были обнаружены, а при освещении их количество составляло около 16%, что говорит о значительном снижении АФК-индуцированной клеточной гибели в трансгенной культуре. Ген *rolC* не предотвращал гибель клеток – их количество в темноте и на свету составляло 5% и 92%, соответственно. Дополнительно был изучен эффект экзогенного воздействия H_2O_2 на рост суспензионных культур *R. cordifolia*. При концентрации 2 мМ перекись водорода ингибировала рост контрольных и *rolC*-трансгенных культур, тогда как рост *rolB*-трансгенных

культур не изменился. Более того, культура RBH была жизнеспособной даже при воздействии 10 мМ H₂O₂.

Баланс между восстановленным и окисленным глутатионом (GSH и GSSG, соответственно) является центральным фактором в поддержании окислительно-восстановительного состояния клеток (Foyer, Noctor, 2005). Сообщалось, что при воздействии негативных внешних факторов, концентрация GSH снижается, в то время как повышение уровня GSH коррелирует со способностью растений противостоять окислительному стрессу (Melchiorre et al., 2009a).

Проведенный методом масс-спектрометрии анализ содержания GSH и GSSG в каллусных культурах *R. cordifolia* и *A. thaliana* выявил интересную закономерность. С увеличением экспрессии *rolB* уровень GSH в культурах увеличивался, а содержание GSSG снижалось (Таблица 11). Стоит заметить, что хотя кроме культуры АВН данные изменения не являлись статистически достоверными, общая тенденция сохранялась на протяжении длительного периода наблюдений.

В соответствии с полученными данными, *rolB*-трансгенные культуры характеризовались повышенным соотношением GSH/GSSG по сравнению с контролем, что особенно явно прослеживалось в линиях *A. thaliana* (Таблица 11). Таким образом, белок RolB вызывает изменение окислительно-восстановительного баланса глутатиона, обеспечивая повышенную способность трансформированных клеток к детоксикации АФК.

Таблица 11 – Содержание GSH и GSSG и их соотношение (GSH/GSSG) в каллусных культурах *R. cordifolia* и *A. thaliana*

Растительные образцы и каллусные культуры	GSH, нМ/г свежей массы	GSSG, нМ/г свежей массы	GSH/GSSG
Контрольная каллусная культура <i>R. cordifolia</i> R	118 ± 21	53 ± 0,3	2,2 ± 0,3
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>R. cordifolia</i> RBL	114 ± 10	53 ± 1,0	2,2 ± 0,3
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>R. cordifolia</i> RBH	128 ± 12	51 ± 2,0	2,5 ± 0,3
Контрольная каллусная культура <i>A. thaliana</i> At	78 ± 4,5	15 ± 3,0	5,2 ± 1,1
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>A. thaliana</i> ABL	80 ± 12	13 ± 5,0	6,2 ± 1,6
<i>rolB</i> -трансгенная каллусная культура <i>A. thaliana</i> ABH	97 ± 10*	11 ± 3,0	8,8 ± 2,1*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Для оценки устойчивости *rolB*-трансгенных клеток к воздействию абиотических стрессов, каллусные линии R и RBH культивировали при нормальной (24°C), повышенной (28°C) и пониженной (12°C) температуре, а также в присутствии NaCl (60 мМ). Воздействие высокой и низкой температуры значительно ингибировало рост контрольной клеточных линий R (Рисунок 38). При повышении температуры на 4°C по сравнению с нормальными условиями, рост каллусных линий, экспрессирующих *rolB*, статистически значимо не изменился. Культивирование каллусов в условиях холода (12°C) выявило повышенную устойчивость *rolB*-трансгенных линий по сравнению с контрольными культурами (Рисунок 38). Солевой стресс оказал негативное влияние на рост всех клеточных культур *R. cordifolia*. При этом клетки, экспрессирующие *rolB*, проявляли выраженную солеустойчивость, так как накопление биомассы культуры RBH в присутствии 60 мМ NaCl снизилось только на 35% (Рисунок 38).

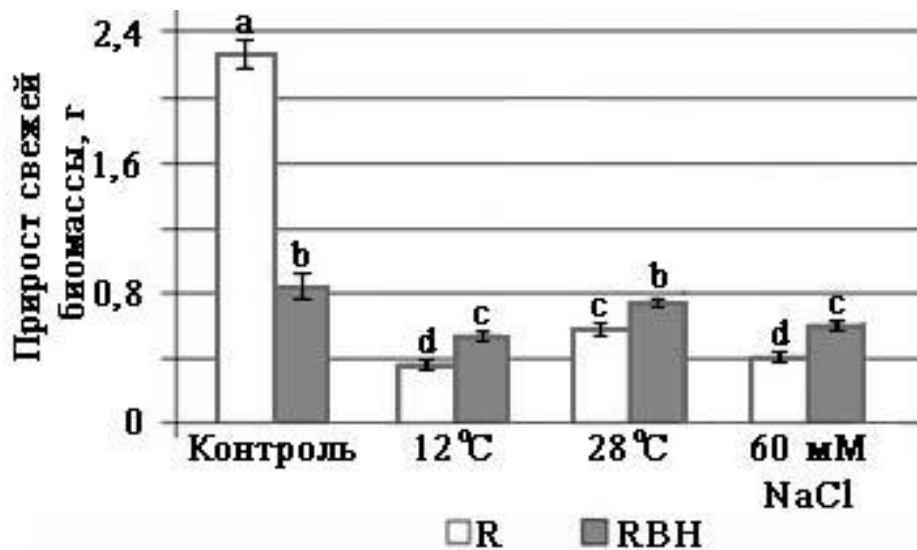


Рисунок 38 – Влияние температурного и солевого стресса на рост каллусных культур *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Каллусы культивировали при повышенной (28°C и 37°C), пониженной (12°C) температуре и в присутствии 60 mM NaCl в течение одного месяца. Нормальная температура культивирования составляла 24°C (Контроль). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

3.2.4. Продукция АФК и стрессоустойчивость клеток, трансформированных pRiA4

Результаты проведенного исследования указывали на то, что *rolC*- и *rolB*-индуцированная модификация окислительно-восстановительного баланса в трансгенных культурах должна приводить к схожему эффекту и в клетках, трансформированных диким типом *R. rhizogenes*. В составе pRiA4 данные онкогены находятся в контексте других функциональных генов, как относящихся к семейству *plast*, так и нет. К тому же, наблюдаемое снижение уровня АФК находилось в прямой зависимости от силы экспрессии трансгенов, которую в культурах обеспечивал сильный вирусный промотор 35S CaMV. В нативной плазмиде pRiA4 транскрипционный контроль осуществляется собственными промоторами, работа которых может отличаться от вирусных регуляторных элементов. Таким образом, предстояло определить, является ли данный феномен

биологическим эффектом, присущим самим агробактериям или данное свойство проявляется только в гетерологичной системе за счет сверхэкспрессии отдельных онкогенов. Чтобы проверить данное предположение, была проанализирована продукция АФК в контрольной и pRiA4-трансформированной культуре *R. cordifolila*. Для сравнения в этих экспериментах в анализ были включены и листья интактного растения. Конфокальные изображения отдельных клеток и уровень внутриклеточных АФК в них представлен на Рисунке 39. Было установлено, что содержание АФК в каллусной культуре R в 1,3 раза ниже, чем в листьях интактного растения *R. cordifolila* (Shkryl et al., 2010). Уровень АФК в pRiA4-трансформированной культуре составлял 79% от уровня АФК, наблюдаемого в клетках контрольной культуры (Рисунок 39). Следует отметить, что в культуре RA4 экспрессия трансгенов отличается и в случае гена *rolC* достигает транскрипционной активности культуры RCM (умеренный уровень экспрессии), а в случае гена *rolB* занимает промежуточное положение между культурами RBL и RBM (низкий и умеренный уровень экспрессии, соответственно) (Shkryl et al., 2008). Из этого следует, что в составе T-ДНК pRiA4 гены *rol* также вызывают снижение продукции АФК.

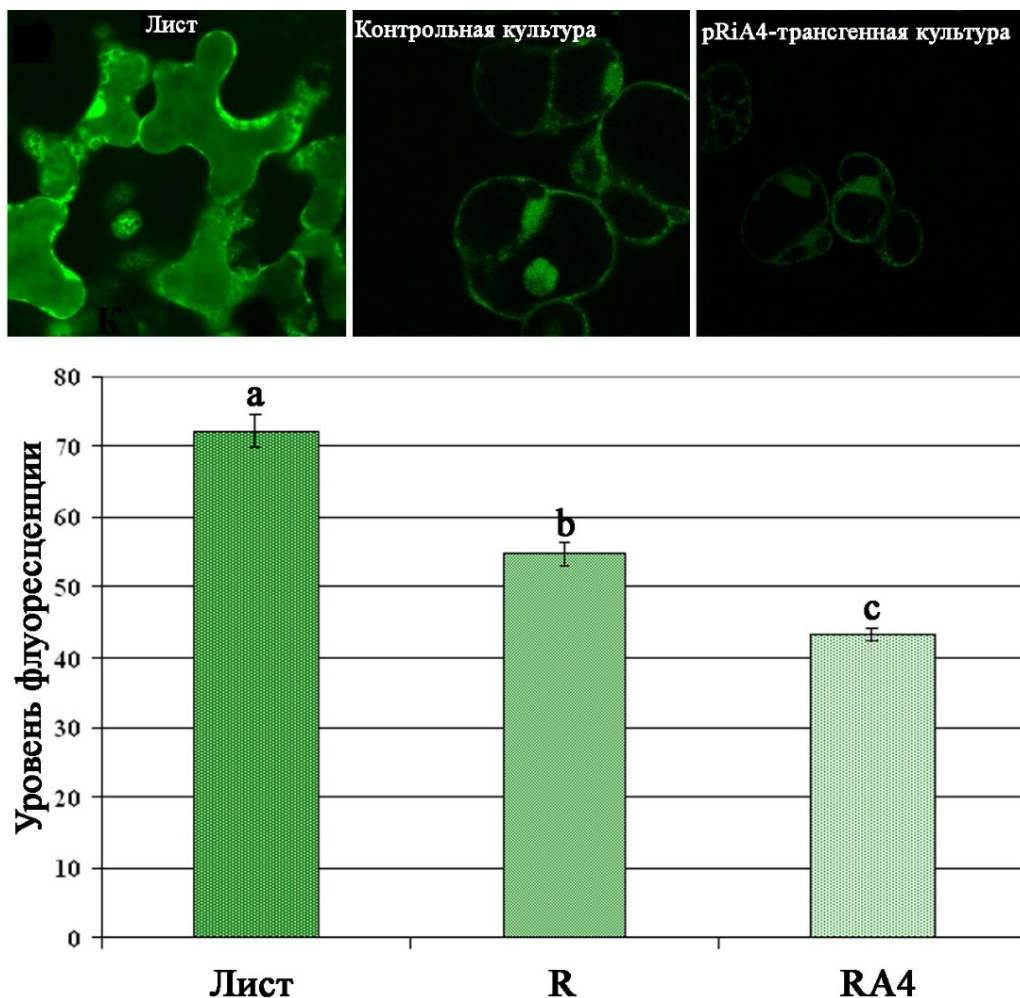


Рисунок 39 – Содержание внутриклеточных АФК в листе, контрольных (R) и pRiA4-трансформированных (RA4) каллусных культурах *R. cordifolia*. Уровень АФК оценивали по интенсивности флуоресценции DCF в отдельных клетках. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Чтобы исследовать чувствительность трансгенных клеток к окислительному повреждению, каллусы R и RA4 подвергали воздействию солевого и температурного стресса (Shkryl et al., 2010). Накопление биомассы клеток в линии RA4 при пониженной и повышенной температуре составляло, соответственно, 52% и 94% от нормальных условий культивирования, что значительно превосходит показатели линии R (Рисунок 40А). В условиях солевого стресса IC_{50} NaCl, составляла 15 мМ и 42 мМ для каллусных линий R и RA4, соответственно (Рисунок 40Б).

Корреляционный анализ Пирсона выявил высокую зависимость между устойчивостью культуры RA4 к высокой, низкой температуре и солевому стрессу и содержанием внутриклеточных АФК ($r = -0,960$, $p = 0,040$; $r = -0,935$, $p = 0,065$ и $r = -0,921$, $p = 0,079$, соответственно).

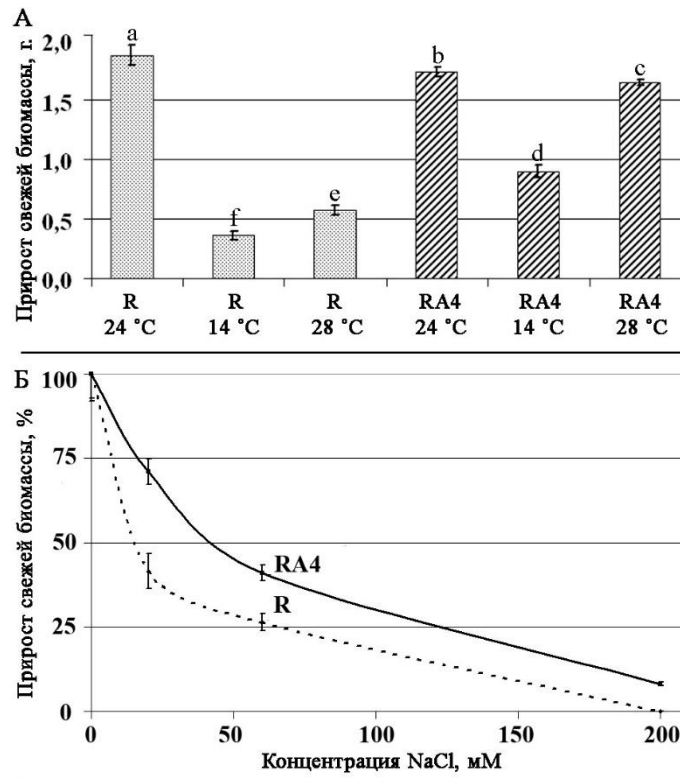


Рисунок 40 – Влияние температурного (А) и солевого (Б) стресса на рост каллусных культур *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RA4 – pRiA4-трансформированная клеточная линия *R. cordifolia*. Каллусы культивировали при повышенной (28°C), пониженной (14°C) температуре и в присутствии различных концентраций NaCl (0, 20, 60 и 200 мМ) в течение одного месяца. Нормальная температура культивирования составляла 24°C. Данные по солевому стрессу выражены в процентах ингибирования роста по отношению к значениям прироста биомассы клеток в нормальных условиях. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

3.2.5. Обсуждение результатов по влиянию генов *rol* на продукцию АФК и стрессоустойчивость клеток

Поскольку экспрессия *rolC* приводит к активации биосинтеза фитоалексинов (Bulgakov, 2008) и экспрессии белков, связанных с патогенезом (Kiselev et al.,

2006), можно было ожидать и повышение уровня АФК под действием данного онкогена. Результаты ранних исследований в этом направлении носили противоречивый характер. Например, фармакологические исследования указывали на отсутствие корреляции между системой генерации АФК и *rol*-опосредованной активацией биосинтеза антрахинонов в культуре клеток *R. cordifolia* (Bulgakov et al., 2002). Однако позже модуляция внутриклеточной концентрации АФК была выявлена в клетках *R. cordifolia*, экспрессирующих ген *rolC* (Bulgakov et al., 2008).

Настоящее исследование, проведенное на двух модельных объектах – *A. thaliana* и *R. cordifolia*, выявило значительный ингибирующий эффект гена *rolC* на уровень АФК в трансформированных клетках. Эта особенность привела к значительному повышению устойчивости клеток к солевому и температурному стрессу. Выступая в роли супрессора АФК, ген *rolC*, вероятно, может предотвращать окислительное повреждение клеточных структур и биомолекул, связанное с реакцией на абиотический стресс (Xiong et al., 2002). Хотя реакции, индуцируемые *rolC* в трансформированных клетках, такие как увеличение продукции фитоалексинов и усиление экспрессии PR-белков, напоминают эффекты, вызываемые грибковыми элиситорами, очевидно, что ген *rolC* активирует защитные реакции используя другой механизм. Основное отличие состоит в том, что экспрессия *rolC*, в отличие от элиситоров, не приводит к повышению уровня АФК, а напротив активно подавляет их генерацию при стрессе (Bulgakov et al., 2009). Комбинация защитных эффектов в сочетании с эффектом подавления АФК представляет собой уникальный случай действия одного и того же трансгена.

Фармакологические эксперименты показали, что ген *rolC* действует на биосинтез фитоалексинов независимо от стрессовых фитогормонов (Bulgakov et al., 2002). Сигнальная сеть, которая функционирует независимо от этилена, салициловой кислоты и метилжасмоновой кислоты, была ранее описана у растений *A. thaliana*, инфицированных авирулентными штаммами *Pseudomonas syringae* (Grant et al., 2002). Однако в этом случае защита растений

основывалась на устойчивой продукции АФК и последующей активации каскада MAP-киназ. Другой пример, в котором фитогормоны и сигналы АФК не участвовали в защитных реакциях, был представлен на модели растений томата, у которых фузиковцин, активатор H^+ -АТФазы, индуцировал некоторые факторы устойчивости к патогенам (Singh and Roberts, 2004). Количество таких примеров весьма ограничено, и они являются исключением из общего правила, предполагающего участие АФК и гормонов в защитных реакциях растений (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Принимая во внимание естественную историю взаимодействий агробактерий с растениями, в которой гены Т-ДНК участвовали в инфекционных процессах и играли роль на ранних этапах эволюции (Aoki and Syōno 1999; Intrieri and Buiatti, 2001), можно предположить, что *rolC* влияет на более древние регуляторные механизмы растений “выше по течению” и не затрагивает пути передачи сигналов АФК и защитных гормонов. Интересно, что, несмотря на значительное подавление продукции АФК, ген *rolC* не ухудшает рост трансформированных клеток в обычных условиях культивирования. У некоторых видов растений экспрессия *rolC* приводит к значительному увеличению роста клеток. Этот эффект наблюдался как для клеток *R. cordifolia*, так и в культурах *Eritrichium sericeum*, *Lithospermum erythrorhizon* и *P. ginseng* (Bulgakov et al., 2005; Gorpenchenko et al., 2006).

Белок RolB вызывает наиболее значительную активацию вторичного метаболизма среди других генов *rol*. При высоком уровне экспрессии трансгена этот эффект сочетается с некротическими проявлениями и подавлением роста культуры (Shkryl et al., 2008). Поскольку эти признаки обычно связаны с высоким уровнем АФК, можно было ожидать, что *rolB* способен индуцировать продукцию АФК в трансформированных клетках. Результаты проведенного исследования, однако, не подтвердили данную гипотезу. Ген *rolB* подавлял содержание АФК в растительных клетках и предотвращал или ослаблял их образование в ответ на внешние факторы. Как следует из полученных результатов, по этой причине *rolB*-трансгенные клетки проявляют повышенную устойчивость к воздействию соли, параквата, менадиона, светового стресса и перекиси водорода.

Полученный результат указывает на некоторую аналогию между эффектами, опосредованными белком RolB *R. rhizogenes* и эффекторным белком HopAO1 *P. syringae*. Было показано, что HopAO1, как и RolB, обладает тирозинфосфатазной активностью и подавляет иммунитет клеток-хозяев за счет подавления продукции АФК у инфицированных растений (Espinosa et al., 2003; Bretz et al., 2003). Гетерологичная экспрессия *HopAO1* в растениях *A. thaliana* ингибирует защитные реакции, связанные с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (Underwood et al., 2007). В частности, *HopAO1* подавляет экспрессию транскрипционного фактора *MYB122*, участвующего в регуляции вторичного метаболизма, а также белков, связанных с патогенезом (*PR-1*, *PR-2* и *PR-5*). Несмотря на функциональную аналогию между тирозинфосфатазами RolB и HopAO1, эти белки имеют лишь ограниченное сходство по аминокислотной последовательности (24% идентичности). Локализация этих белков в растительных клетках также различна. HopAO1 локализуется в растворимой фракции клеточных белков (Underwood et al., 2007), тогда как белок RolB может располагаться как в плазматической мембране (Filippini et al., 1996), так и в ядре (Moriuchi et al., 2004). Кроме того, бактерии рода *Pseudomonas* и *Rhizobium* используют разный способ доставки факторов патогенности – системы секреции III и IV типа, соответственно. Несмотря на эти различия, общая стратегия, направленная на подавление защитных реакций растений, у данных фитопатогенов представляется весьма схожей.

Известно, что *rolB* способствует формированию *de novo* меристем в культивируемых тканях (Altamura et al., 1994) и растениях (Koltunow et al., 2001). Тип органа, который формируется из этих меристем не ограничивается корнями и зависит от стадии развития, гормонального контекста и других факторов. Кроме того, *rolB* вызывает изменения морфологии растений и нарушает развитие их репродуктивных органов (Koltunow et al., 2001; Carmi et al., 2003; Cecchetti et al., 2004). Считается, что эти изменения связаны с участием *rolB* в путях восприятия и/или трансдукции сигнала ауксина (Cecchetti et al., 2004). Поскольку последние данные указывают на четкое взаимодействие между сигнальным путем ауксина и

метаболизмом АФК в регуляции программы развития органов растений (Blomster et al., 2011), взаимодействие между передачей гормональных сигналов, продукций АФК и морфологическими реакциями, вызванными *rolB*, представляет особенный интерес для дальнейших исследований. Связь между морфологическими реакциями и модуляцией уровня АФК, вызванной *rolB*, вполне вероятна.

Известно, что молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами, вызывают быстрое накопление АФК (т.н. окислительный взрыв) с последующей активацией различных защитных систем и развитием иммунного ответа растения (Torres et al., 2006; Mansoor et al., 2022). Фитопатогены, в свою очередь, используют различные механизмы, направленные на инактивацию образующихся АФК и обеспечивающие их выживание. *R. radiobacter* также использует эту стратегию для преодоления защитной системы инфицируемых клеток (Escobar and Dandekar, 2003). Этот патоген способен детоксицировать перекись водорода, основной компонент защитных АФК растений, с использованием бактериальной каталазы KatA (Xu and Pan, 2000). В экспериментальных условиях *R. radiobacter* подавлял реакцию сверхчувствительности у растений, вызванную *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Robinette and Matthysse, 1990). Несмотря на широкое применение *R. rhizogenes* в биотехнологии и его тесное родство с *R. radiobacter*, влияние этого патогена на генерацию АФК оставалось практически не изученным. Полученные результаты указывают на значительное снижение уровня внутриклеточных АФК в клетках, трансформированных диким штаммом *R. rhizogenes* A4. В отличие от *R. radiobacter*, воздействие *R. rhizogenes* связано, вероятно, с функционированием генов *rolC* и *rolB* как главных факторов неопластической трансформации клеток в составе Т-ДНК pRi. Эффект подавления АФК в трансформированных pRiA4 клетках сопровождался заметной резистентностью к абиотическим стрессам. Повышение устойчивости растений к таким стрессовым воздействиям, как соленость, экстремальные температуры и радиация, является важным аспектом биотехнологии растений. Полученные в ходе проведенного исследования результаты могут быть использованы для практического применения, поскольку в ряде стран растения,

трансформированные природными штаммами агробактерий и не содержащие рекомбинантных молекул ДНК, относятся к природно-трансгенными и не подлежат регулированию как обычные генно-модифицированные организмы (Директива 2001/18/ЕС Европейского парламента и Совета от 12 марта 2001 г.).

3.3. Влияние генов *rol* на экспрессию генов антиоксидантных ферментов

3.3.1. Идентификация и анализ генов антиоксидантной системы у растений *Rubia cordifolia*

Для анализа транскриптов аскорбатпероксидазы (Арх) были разработаны два набора вырожденных праймеров, соответствующих консервативным участкам известных генов цитозольных и пероксисомальных аскорбатпероксидаз растений. Эти праймеры использовали в реакциях ПЦР с образцами кДНК из контрольной каллусной культуры *R. cordifolia*. Полученные фрагменты, соответствующие предполагаемой длине, были клонированы в вектор pTZ57R/T и секвенированы. Всего было проанализировано 73 клон кДНК, среди которых было выявлено 3 различные изоформы гена *Арх*. Идентифицированные последовательности, *RcАрх1–RcАрх3*, были депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа GQ380494, GU949549 и GU949550, соответственно (Shkryl et al., 2010). Интересно отметить, что по частоте встречаемости среди проанализированных кДНК клонов преобладали последовательности *RcАрх1* (64 из 73 секвенированных клонов), что может косвенно указывать на транскрипционную активность этих ферментов.

Филогенетические отношения между аминокислотными последовательностями *RcАрх* и их гомологами из различных видов растений были проанализированы методом максимального правдоподобия и максимальной экономии (Рисунок 41). Филогенетический анализ показал, что *RcАрх1* и *RcАрх2* относятся к одному кластеру с гомологами изоформ *AtАрх1* (номер доступа в GenBank AT1G07890) и *AtАрх2* (номер доступа в GenBank AT3G09640) из *A. thaliana* с идентичностью по аминокислотной последовательности 80% и 85%, соответственно. Ген *RcАрх3* относится к кластеру *AtАрх3*-подобных последовательностей и на 83% идентичен белку из *A. thaliana* (номер доступа в GenBank NP_195226). Известно, что *Арх1* и *Арх2* являются цитозольным формам

аскорбатпероксидаз *A. thaliana* (Karpinski et al., 1999; Panchuk et al., 2002), тогда как *Apх3* представляет собой пероксисомальную мембраносвязанную изоформу (Narendra et al., 2006). Также известно, что изоформа *Apх1* играет ключевую роль в регуляции гомеостаза АФК у растений (Davletova et al., 2005).

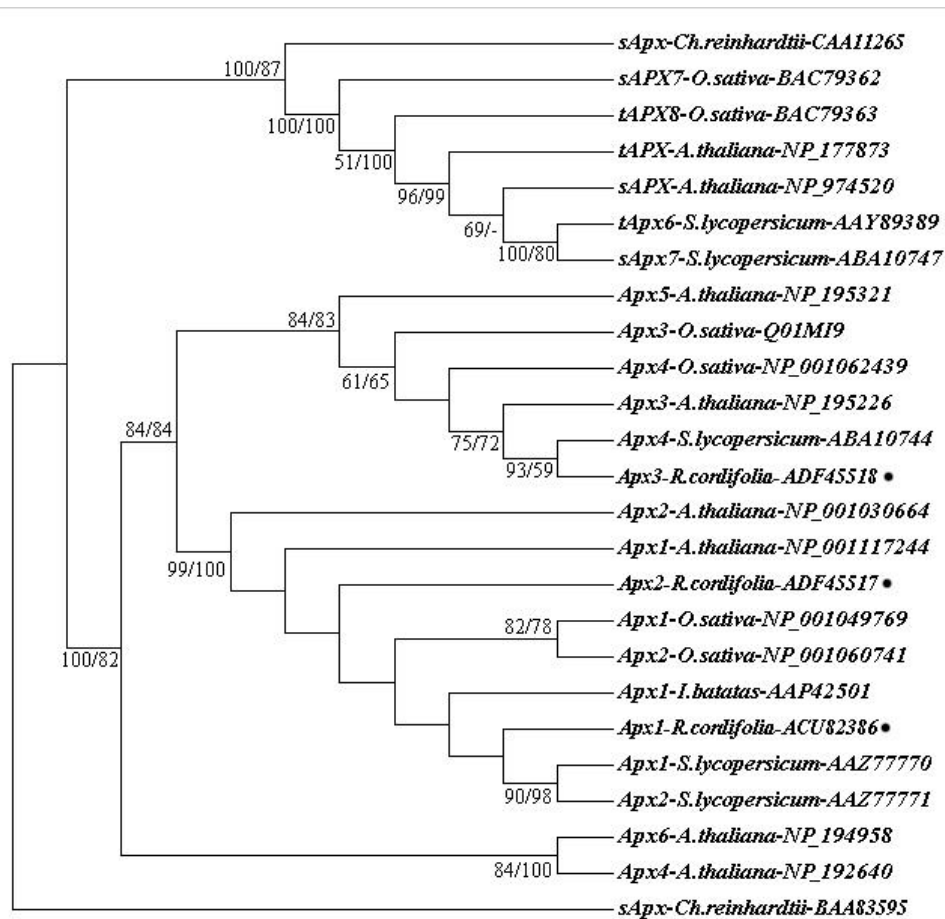


Рисунок 41 – Кладограмма, полученная в результате анализа аминокислотных последовательностей изоформ аскорбатпероксидазы методом максимального правдоподобия (МП) в программе Phylml (бутстреп-анализ, 300-кратное повторение). Аналогичная по топологии кладограмма была также получена методом максимальной экономии (МЭ) с помощью пакета программ Phylip (бутстреп-анализ, 1000-кратное повторение). В узлах кладограммы указаны показатели бутстрепа для каждого метода. Значения бутстрепа МП/МЭ указаны только для узлов с поддержкой 50% и более. Номера доступа последовательностей в GenBank приведены после латинских названий растений. Изоформы аскорбатпероксидазы из *R. cordifolia*, идентифицированные в данной работе, отмечены точками.

С помощью вырожденных праймеров были получены фрагменты кДНК, соответствующие генам Cu/Zn-супероксиддисмутазы (CSD) *R. cordifolia*. Клонирование и секвенирование отдельных кДНК клонов, позволило идентифицировать три изоформы данного фермента. Выявленные последовательности, *RcCSD1–RcCSD3*, были депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа GQ380492, GU949547 и GU949548, соответственно. Анализ распределения частоты встречаемости кДНК клонов показал преобладающее количество транскриптов *RcCSD1* (15 клонов) и более низкую представленность транскриптов *RcCSD2* (5 клонов) и *RcCSD3* (6 клонов).

По данным филогенетического анализа, аминокислотные последовательности *RcCSD1*, *RcCSD2* и *RcCSD3* кластеризовались совместно с их гомологами из *A. thaliana* – *AtCSD1* (номер доступа в GenBank AT1G08830), *AtCSD2* (номер доступа в GenBank AT2G28190) и *AtCSD3* (номер доступа в GenBank AT5G18100), степень идентичности с которыми составляла 77%, 84% и 72%, соответственно (Рисунок 42). По имеющимся сведениям, геном *A. thaliana* содержит три гена Cu/Zn-супероксиддисмутазы, включая цитозольную (*CSD1*), хлоропластную (*CSD2*) и пероксисомальную (*CSD3*) изоформы (Hindges and Slusarenko 1992; Kliebenstein et al., 1998). Три гена CSD было идентифицировано и в геноме хлопчатника *Gossypium hirsutum* (Kim et al., 2008). Также известно, что наибольшее значение для детоксикации АФК имеют цитозольная и хлоропластная изоформы фермента (Kliebenstein et al., 1998). Эти данные свидетельствуют, что в результате проведенного скрининга был идентифицирован полный набор генов *CSD* марены сердцелистной.

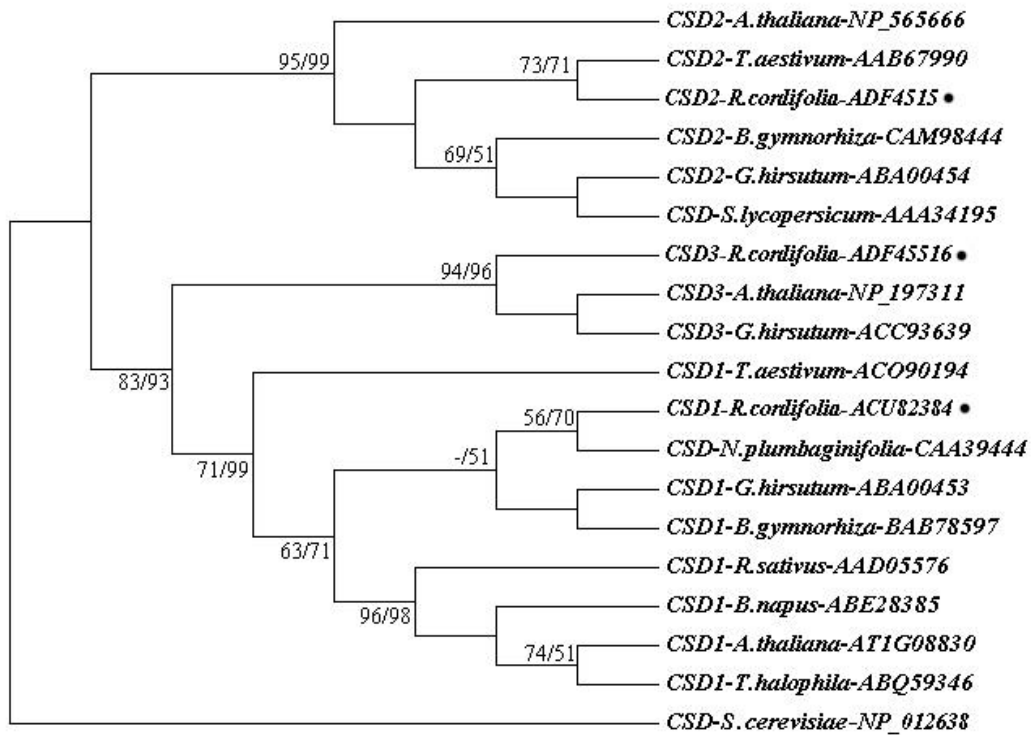


Рисунок 42 – Кладограмма, полученная в результате анализа аминокислотных последовательностей изоформ Cu/Zn-супероксиддисмутазы методом максимального правдоподобия (МП) в программе Phym1 (бутстреп-анализ, 300-кратное повторение). Аналогичная по топологии кладограмма была также получена методом максимальной экономии (МЭ) с помощью пакета программ Phylip (бутстреп-анализ, 1000-кратное повторение). В узлах кладограммы указаны показатели бутстрепа для каждого метода. Значения бутстрепа МП/МЭ указаны только для узлов с поддержкой 50% и более. Номера доступа последовательностей в GenBank приведены после латинских названий растений. Изоформы Cu/Zn-супероксиддисмутазы из *R. cordifolia*, идентифицированные в данной работе, отмечены точками.

Используя вырожденные праймеры, с помощью ПЦР было получено 52 клон кДНК каталазы (Cat) из контрольной каллусной культуры *R. cordifolia*. Анализ этих клонов показал, что все они принадлежат одному гену, *RcCat1*, последовательность которого была депонирована в базу данных GenBank с номером доступа GQ380493. Ближайшими гомологами *RcCat1* являются каталаза 1 из хлопка (номер доступа в GenBank CAA36380, 96% идентичности), женьшеня (номер доступа в GenBank ABY21704, 91% идентичности) и резуховидки Таля (номер доступа в GenBank NP_564121, 85 % идентичности).

Из трех изоформ каталазы, присутствующих в геноме *A. thaliana*, *Cat1* играет ключевую роль при детоксикации H_2O_2 в ответ на стрессовые воздействия (Frugoli et al., 1996). Функции двух других изоформ каталазы связаны с циркадными ритмами растения (Zhong and McClung, 1996). Известно, что основной функцией гомологичного гена *ZmCAT2* из кукурузы является участие в фотодыхании, а экспрессия этого гена индуцируется светом (Acevedo et al., 1991). Поскольку рост каллусных культур осуществляется в стабильных контролируемых условиях, данные изоформы не экспрессируются. Более того, когда в качестве исходного материала для поиска клонов *Cat* была использована кДНК из листьев интактных растений, удалось обнаружить еще один ген каталазы *R. cordifolia*. Последовательность *RcCat2* была депонирована в базу данных GenBank с номером доступа GU936683. Ближайшими гомологами этой формы являются каталазы 2 хлопка (номер доступа в GenBank CAA39998, 86% идентичности) и резуховидки Таля (номер доступа в GenBank NP_195235, 89% идентичности). По частоте встречаемости кДНК клонов в листе, транскрипты *RcCat1* и *RcCat2* имели равное соотношение, 19 и 18, соответственно. С помощью ПЦР со специфическими праймерами было подтверждено, что ДНК из каллусных культур содержит интактные последовательности обоих генов, т.е. отсутствие транскрипционной активности не связано с мутационными событиями в каллусах. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей *RcCat* представлен на Рисунке 43.

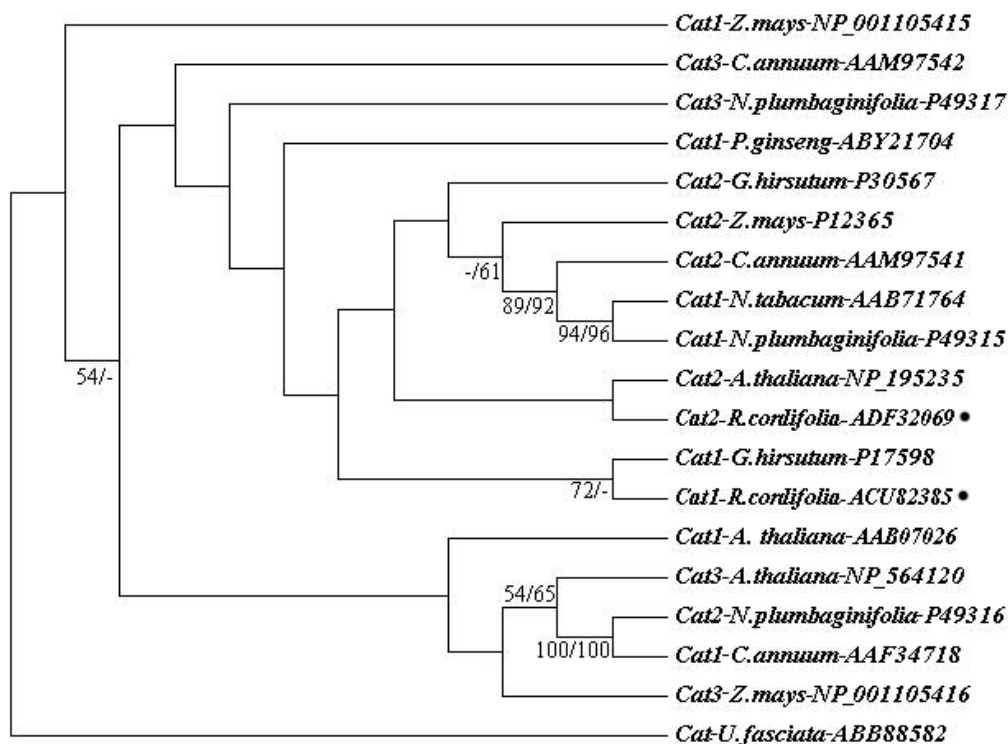


Рисунок 43 – Кладограмма, полученная в результате анализа аминокислотных последовательностей изоформ каталазы методом максимального правдоподобия (МП) в программе Phym1 (бутстреп-анализ, 300-кратное повторение). Аналогичная по топологии кладограмма была также получена методом максимальной экономии (МЭ) с помощью пакета программ Phylip (бутстреп-анализ, 1000-кратное повторение). В узлах кладограммы указаны показатели бутстрепа для каждого метода. Значения бутстрепа МП/МЭ указаны только для узлов с поддержкой 50% и более. Номера доступа последовательностей в GenBank приведены после латинских названий растений. Изоформы каталазы из *R. cordifolia*, идентифицированные в данной работе, отмечены точками.

3.3.2. Экспрессия генов антиоксидантной системы в растении

Rubia cordifolia

Для того, чтобы оценить экспрессию генов антиоксидантных ферментов в растении, была исследована транскрипционная активность изоформ *RcApx*, *RcCSD* и *RcCat* в листьях и стеблях *R. cordifolia* (Таблица 12). Ген *RcApx1* обладал наибольшей транскрипционной активностью, при этом ее уровень в стеблях в 3,6 раза превышал значение листа. Экспрессия *RcApx2* в листьях статистически значимо не отличалась от стеблей и находилась на относительно низком уровне

по сравнению с другими изоформами. Экспрессия *RcApx3* была в 2,5 раза выше в листьях по сравнению со стеблями растений. Ген *RcCSD1* экспрессировался в стеблях и листьях на одинаково высоком уровне относительно других изоформ Cu/Zn-супероксиддисмутазы. Транскрипционная активность *RcCSD2* в листьях была в 1,4 раза выше, чем в стеблях. Уровень экспрессии *RcCSD3* в листьях почти в два раза превышал это значение для стеблей. Экспрессия гена *RcCat1* в листьях была в 1,4 раза выше, чем в стеблях. Транскрипционная активность *RcCat2* в листьях была в 5 раз выше, чем в стеблях, и одинаковой по величине с *RcCat1*.

Таким образом, транскрипционная активность большинства изученных антиоксидантных генов варьировала в листьях и стеблях растений *R. cordifolia*, что предполагает функциональную специализацию изоформ. Наиболее значимые отличия были обнаружены для гена *RcApx1*, экспрессия которого была значительно повышена в стеблях, и для гена *RcCat2*, который был сверхэкспрессирован в листьях. Эти результаты согласуются с особенностями экспрессии гомологичных генов у других видов растений. Например, было показано, что экспрессия *OsApx1* в рисе значительно выше в стеблях, чем в листьях (Teixeira et al., 2006), тогда как транскрипты мРНК *Cat2* *A. thaliana* больше представлены в листьях (Frugoli et al., 1996).

Таблица 12 – Экспрессия генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, в тканях растения *R. cordifolia*

	Стебель	Лист
Аскорбатпероксидазы		
<i>RcApx1</i>	1,160 ± 0,009	0,313 ± 0,005*
<i>RcApx2</i>	0,027 ± 0,003	0,024 ± 0,001
<i>RcApx3</i>	0,100 ± 0,009	0,255 ± 0,001*
Cu/Zn-супероксиддисмутазы		
<i>RcCSD1</i>	1,016 ± 0,016	0,982 ± 0,018
<i>RcCSD2</i>	0,518 ± 0,006	0,724 ± 0,003*
<i>RcCSD3</i>	0,021 ± 0,001	0,039 ± 0,002*
Каталазы		
<i>RcCat1</i>	0,238 ± 0,008	0,340 ± 0,021*
<i>RcCat2</i>	0,078 ± 0,003	0,389 ± 0,012*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), t -тест Стьюдента.

3.3.3. Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в трансгенных культурах

Аскорбатпероксидазы проявляли высокую вариабельность экспрессии в контрольных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* (Рисунок 44). В частности, в каллусах *At* транскрипционная активность *AtApx1* увеличивалась в 1,2–2,4 раза под действием всех протестированных стрессовых факторов. Экспрессия *AtApx2* была в 4,1 и 6,3 раза выше при холодовом и тепловом стрессе, соответственно. Транскрипция изоформы *AtApx3* повышалась в 1,5–2,1 раза под действием высокой температуры и солевого стресса. В клеточной культуре *R. cordifolia*, напротив, пониженная температура и добавление NaCl вызывало 2,5- и 1,6-кратное снижение экспрессии *RcApx1* по сравнению с нормальными условиями.

При этом, транскрипция *RcApx1* увеличивалась почти в 2 раза в ответ на воздействие повышенной температуры. Холодовой стресс индуцировал экспрессию *RcApx2* в 2 раза, тогда как NaCl, вызывал двукратное ингибирование транскрипционной активности. Все испытанные стрессовые условия приводили к снижению уровня транскрипции изоформы *RcApx3* в 1,3–1,7 раза.

Ген *rolC* не оказал существенного влияния на экспрессию генов *AtApx* в трансгенной клеточной линии *A. thaliana* (Shkryl et al., 2022). При этом в *rolC*-трансгенных клетках *R. cordifolia* транскрипционная активность *RcApx1* и *RcApx3* была снижена в 1,7 и 1,4 раза соответственно, а *RcApx2* повышена в 1,6 раза по сравнению с контрольной культурой. В целом, изменение экспрессии изоформ *AtApx* в ответ на стрессовые факторы в *rolC*-трансгенных и контрольных клетках *A. thaliana* были схожи между собой. При этом влияние температурных стрессов оказалось более выраженным в культуре АСН и приводило к увеличению уровней транскрипции изоформ *AtApx1* и *AtApx2* в 4 и 6 раз, соответственно. В каллусной линии РСН температурные стрессы индуцировали экспрессию *RcApx1* и *RcApx2* в 2,2–4,2 раза по сравнению с их значениями в нормальных условиях. Наибольшее влияние обнаружено для изоформы *RcApx2* значительная активация которой наблюдалась при пониженной температуре культивирования *rolC*-трансгенных клеток. При этом солевой стресс вызывал разнонаправленный эффект на транскрипцию *RcApx2*. Уровень экспрессии этого гена при обработке NaCl понижался 1,9 раза в культуре R и, напротив, повышался в 1,4 раза в культуре РСН. Характер изменения экспрессии гена *RcApx3* при температурном и солевом стрессах был сходным: в ответ на все исследованные факторы наблюдалось снижение его уровня в 1,3–1,7 раза в контрольной культуре и повышение в 1,2–1,3 раза в *rolC*-трансгенных каллусах.

Изменения уровня экспрессии изоформ *AtCSD* и *RcCSD* в контрольных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* в условиях стресса были похожими. Как *AtCSD1*, так и *RcCSD1*, активировались более низкой температурой и солевым стрессом. Экспрессия генов *CSD2* и *CSD3* в культурах At и R оказалась наиболее подвержена влиянию повышенной температуры и соли. При нормальных

условиях культивирования, *rolC* вызывал статистически значимое понижение уровня транскрипции всех исследованных генов *CSD* в клетках АСН и РСН в 2–3 раза (Рисунок 44). В отличие от контрольных клеток, экспрессия генов *CSD1* и *CSD2* в *rolC*-трансгенных каллусах *A. thaliana* и *R. cordifolia* активировалась в 1,5–4,3 раза в ответ на все исследованные стрессовые факторы. Транскрипция *AtCSD3* в культуре АСН повышалась в 2 раза при тепловом стрессе и обработке NaCl. При этом, стрессовые воздействия не оказали значительного влияния на уровень экспрессии *RcCSD3* в каллусной культуре РСН.

Динамика экспрессии гена каталазы в условиях стресса в контрольных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* различалась (Рисунок 44). Так, в культуре *At* транскрипция мРНК *AtCat1* повышалась в 1,4 раза в ответ на воздействие 60 и 120 мМ NaCl, и не подвергалась влиянию температурных стрессов. Уровень экспрессии гомологичного гена *RcCat1* в культуре R был в 1,6 и 1,3 раза ниже при холодовом и солевом стрессах, соответственно, и повышался в 1,3 раза при воздействии высокой температуры. При этом *rolC* оказал схожее влияние на транскрипционную активность *Cat1* в обоих видах растений: его уровень экспрессии снизился в *rolC*-трансгенных линиях *A. thaliana* и *R. cordifolia* в 2,2 и 27,3 раза соответственно. Изменения экспрессии этого гена в трансгенных культурах при стрессовых стимулах также были сходными. Во всех случаях наблюдалось 1,7–2,2-кратное увеличение экспрессии гена *Cat1* в каллусных линиях АСН и РСН.

Таким образом, в обычных условиях культивирования *rolC* не только не повышал, но в некоторых случаях и снижал общий уровень экспрессии антиоксидантных генов. Этот результат свидетельствует о том, что редокс-статус *rolC*-трансгенных клеток, вероятно, связан с особенностями образования АФК.

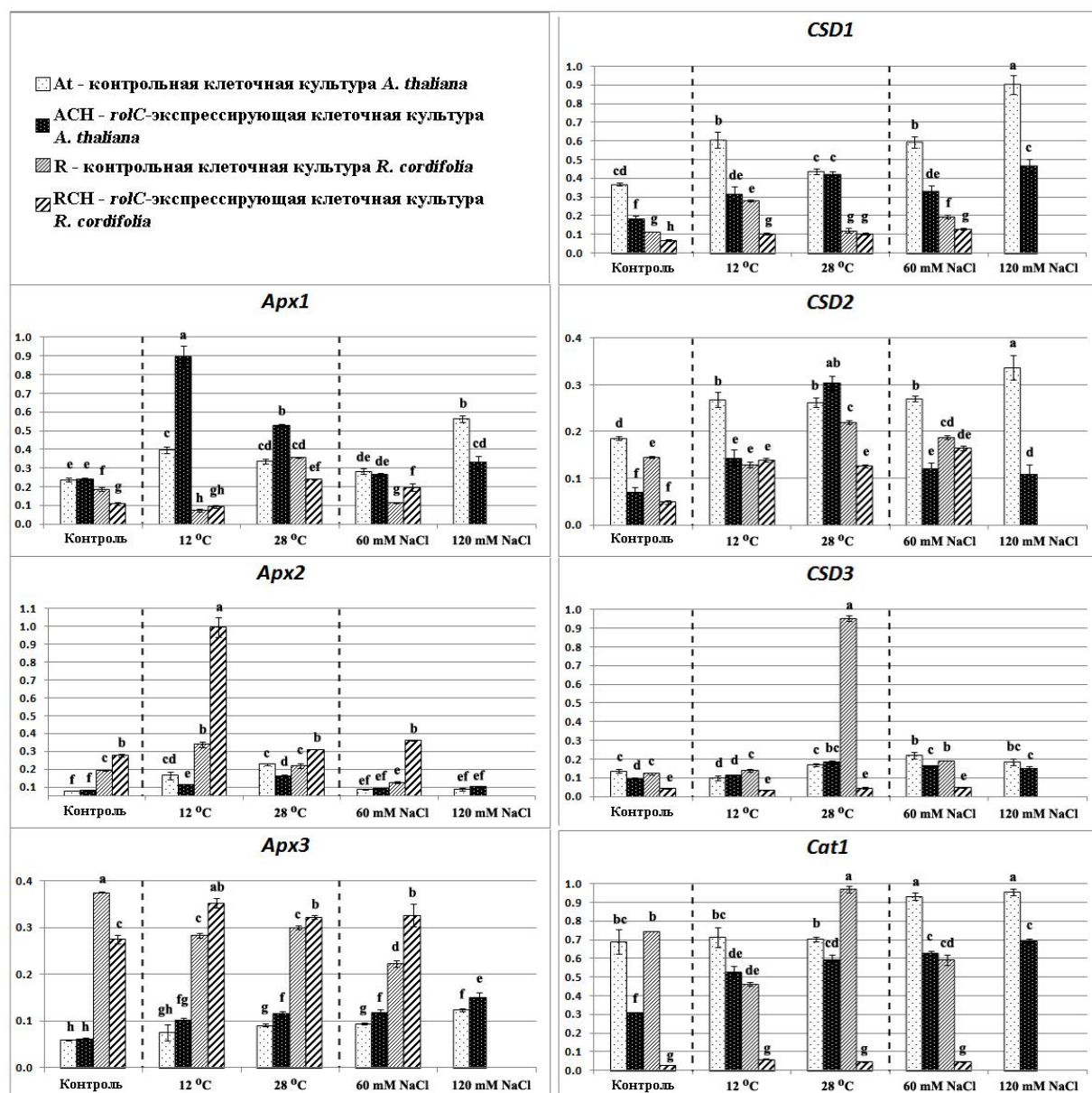


Рисунок 44 – Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в каллусных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ACH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Ген *rolB* значительно индуцировал экспрессию всех генов *Arx* в трансгенных клеточных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* (Таблица 13). Наибольшее влияние трансген оказал на цитозольные изоформы, *Arx1* и *Arx2*, транскрипционная активность которых увеличилась до 3,5 раз (Vulgakov et al., 2013). Стоит заметить,

что влияние *rolB* на экспрессию генов *Apx* в целом коррелировало с транскрипционным уровнем трансгена, но эта зависимость наблюдалась только в культурах с низким и умеренным уровнем экспрессии *rolB*. В культуре RBH транскрипционная активность изоформ *RcApx* статистически значимо не отличалась от контрольной линии.

Из трех генов Cu/Zn-супероксиддисмутазы, в *rolB*-трансгенных культурах увеличилась экспрессия только цитозольной формы *CSD1* (Таблица 13). В данном случае был также выражен эффект дозы онкогена в клетках, при этом высокий уровень *rolB* в культуре RBH оказывал максимальное влияние на транскрипцию *RcCSD1*.

Уровень экспрессии генов *AtCat1* и *RcCat1* в *rolB*-трансгенных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* был в 2–3 раза выше по сравнению с контролем, в зависимости от силы транскрипции трансгена (Таблица 13). Поскольку сверхэкспрессия каталазы может приводить к подавлению транскрипции аскорбатпероксидаз (Foyer and Shigeoka, 2011), можно предположить, что в культуре RBH реализуется компенсаторный механизм регуляции транскрипции *RcCat* и *RcApx*, препятствуя активации последней при повышенной дозе трансгена. Однако данное утверждение требует дальнейшего детального изучения.

Таким образом, *rolB* является мощным индуктором экспрессии антиоксидантных генов, что в свою очередь может обуславливать редокс-статус трансгенных клеток, а также препятствовать образованию АФК под действием стрессовых факторов.

Таблица 13 – Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в контрольных и *rolB*-трансгенных каллусных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*

<i>Arabidopsis thaliana</i>			<i>Rubia cordifolia</i>			
At	ABL	ABH	R	RBL	RBM	RBH
<i>rolB</i>						
-	0,054±0,013	0,191±0,018	-	0,062±0,004	0,266±0,018	0,706±0,059
<i>AtApx1</i>			<i>RcApx1</i>			
0,288±0,019	0,511±0,004*	0,991±0,009*	0,292±0,009	0,581±0,011*	0,978±0,021*	0,301±0,012
<i>AtApx2</i>			<i>RcApx2</i>			
0,324±0,003	0,646±0,006*	1,016±0,016*	0,164±0,013	0,324±0,042*	0,404±0,015*	0,155±0,008
<i>AtApx3</i>			<i>RcApx3</i>			
0,341±0,041	0,553±0,061*	0,901±0,099*	0,342±0,005	0,514±0,003*	0,696±0,028*	0,332±0,011
<i>AtCSD1</i>			<i>RcCSD1</i>			
0,498±0,025	0,496±0,038	0,966±0,033*	0,601±0,005	0,611±0,009	0,761±0,006*	0,873±0,009*
<i>AtCSD2</i>			<i>RcCSD2</i>			
0,882±0,013	0,911±0,051	0,915±0,086	0,571±0,054	0,611±0,006	0,535±0,011	0,598±0,038
<i>AtCSD3</i>			<i>RcCSD3</i>			
0,802±0,043	0,779±0,014	0,918±0,083	0,597±0,017	0,577±0,027	0,621±0,023	0,517±0,002
<i>AtCat1</i>			<i>RcCat1</i>			
0,278±0,014	0,651±0,027*	0,939±0,061*	0,379±0,012	0,397±0,048	0,485±0,015*	0,738±0,027*

At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ABL и ABH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *A. thaliana* с низким и высоким уровнем экспрессии трансгена; R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBL, RBM и RBH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с низким, умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

В pRiA4-трансформированной культуре *R. cordifolia* экспрессия всех изученных генов аскорбатпероксидазы была значительно выше, чем в нетрансформированной культуре (Shkryl et al., 2010). Уровень транскрипции *RcApx1*, *RcApx2* и *RcApx3* в культуре RA4 превышал значения контрольной линии в 1,3, 5 и 3 раза, соответственно (Таблица 14). Уровень экспрессии *RcCSD1* и *RcCSD3* в каллусах RA4 статистически значимо не отличался от линии R. При этом транскрипционная активность *RcCSD2* в pRiA4-трансформированной культуре была в 1,7 раза выше, чем в контроле (Таблица 14). Транскрипция *RcCat1* в каллусах RA4 всего в 1,2 раза превышала значения контрольной линии, однако это различие было статистически значимым (Таблица 14).

В совокупности, полученные результаты свидетельствуют о том, что трансформация диким штаммом *R. rhizogenes* A4 активизирует транскрипционную активность определенных изоформ ферментов антиоксидантной системы. Общий уровень экспрессии всех проанализированных генов в pRiA4-трансформированных клетках был статистически значимо выше по сравнению с клетками контрольной культуры ($F = 16,9$, $p < 0,001$). Была выявлена значительная отрицательная корреляционная связь между экспрессией антиоксидантных генов и накоплением АФК в нормальных и RA4-трансгенных каллусах с использованием анализа Пирсона ($r = - 0,977$, $p = 0,023$). Данный эффект был менее выражен, чем в *rolB*-трансгенной культуре, что, вероятно, является следствием взаимодействия различных генов Т-ДНК в трансформированных pRiA4 клетках.

Таблица 14 – Экспрессия генов антиоксидантных ферментов в контрольной (R) и pRiA4-трансформированной каллусных культурах *R. cordifolia*

	R	RA4
Аскорбатпероксидазы		
<i>RcApx1</i>	0,688 ± 0,002	0,919 ± 0,042*
<i>RcApx2</i>	0,023 ± 0,001	0,114 ± 0,005*
<i>RcApx3</i>	0,014 ± 0,001	0,042 ± 0,002*
Cu/Zn-супероксиддисмутазы		
<i>RcCSD1</i>	0,879 ± 0,006	0,901 ± 0,014
<i>RcCSD2</i>	0,070 ± 0,002	0,117 ± 0,002*
<i>RcCSD3</i>	0,012 ± 0,001	0,013 ± 0,001
Каталазы		
<i>RcCat1</i>	0,183 ± 0,001	0,215 ± 0,017*

Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

3.3.4. Обсуждение результатов по влиянию генов *rol* на гены антиоксидантной системы

Антиоксидантные ферменты играют ключевую роль в защите клеток растений от окислительного стресса, вызванного АФК (Shigeoka and Shao, 2014). Эти ферменты работают синхронно для поддержания оксидативного баланса в клетках и предотвращения повреждений жизненно важных клеточных компонентов. Регуляция активности этих ферментов является важной стратегией выживания для растений в условиях стресса, например, при повышенной интенсивности света, недостатке воды или воздействии токсичных веществ (Mittler, 2002; Gill and Tuteja, 2010). Увеличение экспрессии и активности антиоксидантных ферментов часто наблюдается в растениях, адаптирующихся к неблагоприятным условиям, что подчеркивает их роль в механизмах устойчивости растений к окружающим стрессовым факторам.

Поскольку ген *rolC* вызывал значительное снижение уровня внутриклеточных АФК и увеличение устойчивости трансгенных клеток к

неблагоприятным факторам, логичным было предположить, что его эффект связан с активацией экспрессии антиоксидантных ферментов. Однако *rolC* не только не повышал, но, в некоторых случаях, и снижал общий уровень экспрессии антиоксидантных генов. В контрольных каллусных линиях *A. thaliana* и *R. cordifolia* средние значения общего содержания транскриптов генов антиоксидантных ферментов были в 1,7 и 3,3 раза выше, чем в *rolC*-трансгенных каллусных линиях, соответственно ($F = 9,10$, $p < 0,001$). Несмотря на то, что в условиях абиотического стресса уровень экспрессии антиоксидантных ферментов в клетках, экспрессирующих *rolC*, значительно повышался, их общая транскрипционная активность оставалась на относительно низком уровне по сравнению с контролем.

Механизм, с помощью которого *rolB* постоянно поддерживает активный антиоксидантный статус трансформированных клеток, вероятно, заключается в значительной активации антиоксидантных генов. Большинство изученных генов антиоксидантных ферментов, включая Cu/Zn-супероксиддисмутазы, каталазы и аскорбатпероксидазы, повышались в клетках, экспрессирующих *rolB*. Активация их транскрипционной активности зависела от силы экспрессии *rolB*, клеточной линии и изоформы антиоксидантного гена. Например, низкий уровень экспрессии *rolB* не активировал транскрипцию генов Cu/Zn-супероксиддисмутазы, тогда как высокий уровень трансгена не оказывал влияние на аскорбатпероксидазы. Такие паттерны экспрессии генов антиоксидантной защиты в трансформированных клетках могут говорить о неспецифическом (вторичном) эффекте *rolB* на метаболизм АФК.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что *rolB* активирует защитные механизмы, направленные на индукцию АФК. Трансформированные клетки пытаются компенсировать этот эффект с помощью генов антиоксидантной защиты. Во многих случаях компенсация проходит успешно, и *rolB*-клетки сохраняют окислительно-восстановительный баланс близкий к таковому в контроле (Vulgakov et al., 2012). В случаях, когда этот механизм недостаточен вследствие чрезмерной экспрессии *rolB*, клетки погибают.

Такая гипотеза позволяет объяснить, почему высокие дозы *rolB* вызывают некротическую гибель клеток, в то время как низкие дозы предотвращают некроз (Gorpenchenko et al., 2012). Устойчивость клеток к высокой транскрипционной активности *rolB* при совместной экспрессии с геном *rolC*, вероятно, связана с действием двух факторов: активацией генов антиоксидантной защиты и снижением уровня АФК.

С физиологической точки зрения такой эффект *rolB* подобен феномену, известному как стрессовая акклиматизация или, точнее, системная приобретенная акклиматизация (Mullineaux et al., 2000; Gechev et al., 2006). Во время стрессовой акклиматизации, вызванной АФК, растения вырабатывают каталазы, аскорбатпероксидазы и другие ферменты (Gechev et al., 2006). Это приводит к формированию устойчивой антиоксидантной защиты растений от последующих стрессов.

Еще одной особенностью *rolB* является то, что этот ген активирует экспрессию генов, кодирующих пероксидазы III класса, и повышает общую активность пероксидаз в трансформированных клетках (Shkryl et al., 2013). Этот эффект коррелировал с уровнем экспрессии трансгена и наблюдался у всех изученных видов растений, экспрессирующих *rolB*. При этом ген *rolC* не влияет ни на экспрессию, ни на активность пероксидаз (Veremeichik et al., 2012). Экспрессия и активность пероксидаз не изменялась и в pRiA4-трансформированных каллусах, что указывает на совокупный уравнивающий эффект генов *rol* на эту группу ферментов (Veremeichik et al., 2012). Биологическое значение наблюдаемого *rolB*-стимулирующего эффекта в настоящее время неясно. Внеклеточные пероксидазы III класса являются важным фактором связанных с патогенезом белков семейства PR-9 и участвуют как в регуляции уровня внеклеточного H_2O_2 , так и в биосинтезе полифенольных фитоалексинов (Almagro et al., 2009). Вероятно, *rolB* может участвовать в обоих этих процессах задействуя данный класс ферментов.

3.4. Влияние генов *rol* на экспрессию генов НАДФН-оксидазы (*Rboh*)

3.4.1. Идентификация и анализ генов *Rboh* в растении *Rubia cordifolia*

Гомологи оксидазы респираторного взрыва (*Rboh*, от англ. respiratory burst oxidase homolog), которые являются специфичными НАДФН-оксидазами растений, отвечают за образование АФК как в нормальных условиях, так и в ответ на стрессовые факторы (Chu-Puga et al., 2019). Для идентификации генов *Rboh* в геноме *R. cordifolia*, проводили ПЦР с использованием вырожденных праймеров, соответствующих консервативным участкам известных гомологов из других растений. Всего было проанализировано 159 клонов кДНК, что позволило идентифицировать фрагменты трех изоформ НАДФН-оксидаз *R. cordifolia* (*RcRboh1–RcRboh3*). С помощью метода RACE ПЦР были установлены полноразмерные последовательности генов *RcRboh1*, *RcRboh3*, а также часть 3'-участка *RcRboh2*, которые были депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа KP987238, KP987240 и KP987239, соответственно (Veremeichik et al., 2016).

Аминокислотные последовательности белков *RcRboh* сравнивали с известными гомологами из разных растений с использованием алгоритма BLAST. Этот анализ показал, что ближайшими гомологами *RcRboh1* с идентичностью 74% являются белки *NtRbohD* из *Nicotiana tabacum* (номер доступа в GenBank ABN58915) и *StRbohC* из *Solanum tuberosum* (номер доступа в GenBank GenBank VAE79344). Белок *RcRboh2* оказался близок НАДФН-оксидазам из растений *Coffea canephora* (номер доступа в GenBank CDP03040, 80% идентичности) и *Vitis vinifera* (номер доступа в GenBank XP_002277540, 74% идентичности). Гомологами *RcRboh3* являются белки из *C. canephora* (номер доступа в GenBank CDP03040, 85% идентичности) и *Citrus sinensis* (номер доступа в GenBank KDO76360, 81% идентичности). Поскольку попытки идентифицировать полную последовательность гена *RcRboh2* не увенчались успехом, дальнейшее исследование включало только изоформы *RcRboh1* и *RcRboh3*.

Транскрибируемые части генов *RcRboh1* и *RcRboh3* составляют 2784 п.н. и 2823 п.н., содержат 5'- и 3'-НТП, и кодируют полипептиды длиной 927 и 929 а.о.,

соответственно. Аминокислотные последовательности обеих изоформ RcRboh включают цитозольный N-концевой домен, содержащий два сайта связывания ионов Ca²⁺ типа “спираль-петля-спираль” (EF-руки) (выделены подчеркнутыми прямоугольниками на Рисунке 45). Оба мотива EF-руки состоят из 29 а.о., разделенных участком из 15 а.о., и соответствуют канонической последовательности, включая инвариантный глицин (G, Рисунок 45), остатки глутаминовой или аспарагиновой кислоты (z, Рисунок 45), изолейцин (I, Рисунок 45) и гидрофобные остатки (n, Рисунок 45) (Nakayama and Kretsinger, 1994; Oda et al., 2010).

R. cordifolia-Rboh3	MNK-DKHIREGTLPRSLQASEEFVEVTLDDQDDTIIIVRSVEPA-----VAATGSGIDSMVDVTLTA---GALGIGVETPSTSTSRSPITRRSSSMRLRQFSQELKAEAKAKAR----	104
A. thaliana-RbohF	MKPFKMDRRRUSFDVSAACKTAVGSASTSPGTEYSINGDQEFVEVTDLQDDDTIVLRSVEPATAINVIQDIDDDNTGIMTPVSISSRSPMKRTSSNRFRQFSQELKAEAVAKAKQLSQ	120
R. cordifolia-Rboh1	---MYR-MHKMNSMDIQ-----HMRHSDSEPLMYS-----GPLTK--KGGG-----SGSSSKSARFNIIPGDMASSTNSGDDAYVEITLEVSDDAVAVHSVK	83
A. thaliana-RbohD	---MKM-RRGNSNDHELGLIRGANSDTNSDTSIASDR-----GAFSGPLGRPK-----RASKKNARFADLLPKRSNSVAGRGDDDEVTVEITLDTRDDSVAVHSV	93
R. cordifolia-Rboh3	---HFSQS-----HG-HAS--TKMLAA-----ASTSSGTGLESA--LA--ARAMRQKRAQLDRTRSSGAQKALRGLKFDISKSKTNANGVDWJSEVQNNFYKLAQDGYLFRCDFAEC	200
A. thaliana-RbohF	ELKRFNSW-----RSFSGNLTITTTAA-----NQSGGAGGLVW--SALEARALRQKRAQLDRTRSSAQALRGLRFLSMKQKIVDQWMDVQS---MFEKFEKNGYIYRSDFAOC	220
R. cordifolia-Rboh1	---AAGGGEIEPELALLARGLEKSSMV-----RNASSKFKHFSQELKRLASFSRRPQMGKYDRTKSAAAHMLGLKFLSKT--DGAAGWAA--VEKRFDLTKDNGGLLPRSQFVEC	190
A. thaliana-RbohD	QQAAGGGHLEDPELALLTKTLESSLNMWTSLSFFRSTSSRIKNASRELRRVFSRRPSPAVRRFDRTSSAAHHLKGLKFLIATK--TAAPAVDQRFDKLSA---DSNGLLSAKFVEC	208
R. cordifolia-Rboh3	IGIRG-SNEFALEFWGELSRRRRNVEKIGREELYEYWSQITDESFDSESLQLQIFFDVMDKMDGRITTEQEVKEIIMLQASANKLSRLKQAEHYACLFMEEEDPERLGYIELWQLETLIIQ	318
A. thaliana-RbohF	IGMKD-SKEFALELDALSRRRRLKVEKINHDELYEYWSQINDESFDSESLQLQIFFDVMDKMDGRITTEEEVKEIIMLQASANKLSRLKQAEHYAALIMEEDPERLGYIELWQLETLIIQ	338
R. cordifolia-Rboh1	IGMKESKDFAGELFDAMGRRRNIVGDSINKSLQKDFWEQMSDQSFDRQLQTFDMDVDDADGRISSEEVKEIISLQASANKLSNIQKQADHYAALIMEELAPNNKGYILLENPEMLLIQ	310
A. thaliana-RbohD	LGMMKESKDFADQLFRALARRNNVSGDAITKEQLRIFWEQISDESFDSESLQLQIFFDVMDKDEDEGRVTEEEVAEIIISLQASANKLSNIQKQADHYAALIMEEDPDNAGFIMENLEMLLIQ	328
R. cordifolia-Rboh3	K-DTYLNYSQAMSYTSQPLSQNLQGLRKRSPFRMSTKFAIVQVQENRRIWVLLWVLMAGLFTWKFQYKQKAAFEVNGYCVLTAKGAAETLKFNMALVLLPVCRTNITWLRST-RLG	437
A. thaliana-RbohF	K-DTYLNYSQALSYSQALSQNLQGLRKRSRHRMSSDFVYIQENMKRIWVLLWVLMIMIGLFLMKFFQYKQKDAFHVNGYCVLTAKGAAETLKFNMALVLLPVCRTNITWLRST-RLS	457
R. cordifolia-Rboh1	APHTAKHVRRESKVMQSLKQLKPTLDHNVVRRWFEEFRYFLVDNWQRIUWVLAIGVHAGLPAKYIYQYKRAAYEVHGVCVSLDKGADTTKLMMALILLPVCRTNITWLRST-RLA	430
A. thaliana-RbohD	APNQ-SVRMGDSRILSQMLSQRLRPAKESNPLVRSSEKIKYIFLDNWQRLWIMMLWLGICGGLFTYKFIQYKRAAYEVHGVCVSVARSGAAETLKFNMALVLLPVCRTNITWLRST-RLG	447
R. cordifolia-Rboh3	YVYVFPDDNINFHKTIAAGIVVGVILHAGNHACDFPRLIHESDVTEYFYLIND-FGPKPHYTDLVGGIEGLTGLVLMVIFMAIAFTLATRWFRRSLVKLPKPLDRDLTGFMNFWYSHHLLIV	556
A. thaliana-RbohF	YVYVFPDDNINFHKTIAAGIVVAVILHIGDHLACDFPRLIVRATDYDYNRYLFHY-FQTKQPTVDFLVKGPPEGITGLMLVILMISFTLATRWFRRMLVKLPKPLDRDLTGFMNFWYSHHLLIV	576
R. cordifolia-Rboh1	GAVYFPDDNINFHKVIATAIALGVGITHAIAHLTCDPRLIHAASPEKY--APTHQFFGQPKNVVHFKVSGEVTGIVMVLMAIAFTLASPWFRRMKNLVPKPLDRDLTGFMNFWYSHHLLFI	548
A. thaliana-RbohD	TVVYFPDDNINFHKVIASGVVGVLLHAGAHLPVILLYASERLLRFRSSIKPKVMKIVAVYVGMVLSLHMTKPKQGFYKYSQGFMLVNCRAVSPFEVHPFSITSAAGDYLTVHIRTLDGWT	565
R. cordifolia-Rboh3	IVYILLIHGMFLYLHVKWYKLTMMYLAVPVLVYAGERILRFRSGFYPLVLLKVAIYPGNVLTQMSKPPQFRYKSGQYMFVQC PAVSPFEVHPFSITSAAGDYLTVHIRTLDGWT	676
A. thaliana-RbohF	IVYILLLHLCIFLYFAKPVVVRTTMMYLAVPVLVYGGERTLRYFRSGYSVRLKVAIYPGNVLTQMSKPPQFRYKSGQYMFVQC PAVSPFEVHPFSITSAAGDYLTVHIRTLDGWT	696
R. cordifolia-Rboh1	IVYALLIVHGKLYLTHDQKRTTMMYLAVPLALYTGRLIRAFRSKIPVNLKVAIYVPGNVLALHMSKPPQGFYKYSQYMFVNC AAVSPFEVHPFSITSAAGDYLTVHIRTLDGWT	668
A. thaliana-RbohD	IVYALLIVHGKLYLTKIYQKRTTMMYLAVPILLYASERLLRFRSSIKPKVMKIVAVYVGMVLSLHMTKPKQGFYKYSQGFMLVNCRAVSPFEVHPFSITSAAGDYLTVHIRTLDGWT	685
R. cordifolia-Rboh3	ELKRVFSEACEPPMACKSGLLR-----ADETTKRCILPKLLIDGPGYAPAQDYKYYIVLLVGLGIGATPFISILKDLNINIIVMEEQNDAAATSSSRSDMSGSSSTPFLNKKVSPKRRK	789
A. thaliana-RbohF	ELKRVFSEVCEPPVGGKSGLLR-----ADETTKKSILPKLLIDGPGYAPAQDYKYYIVLLVGLGIGATPFISILKDLNINIIVMEE-----HADSIQDFSRSEYSTGSDGTPRRKR	804
R. cordifolia-Rboh1	QLRAVVFSEVCPPTGKSGLLRFEPDHEGLEYSFNFPKVMIIDGPGYAPAQDYKYYIVLLVGLGIGATPFMISILKDIINN-MKAIDEEEQALENGGATPPNSPFLTKRKGAAAGSGG	787
A. thaliana-RbohD	KLRTVFSEVCKPPTAGKSGLLR---ADGGDG---NLPFPKVLIDGPGYAPAQDYKYYIVLLVGLGIGATPFMISILKDIINN-MKPGD-----RDSIDEMNNS-----NNNSK	781
R. cordifolia-Rboh3	PLRITNAYFYVVTREQGSDFWFKGVINEVAELDQRGVIEHNNYLTSVYEEGDARSALITMVALHAKNGVDIVSGTFRVTRTHFAKPNKKVLSKLCCKTHANARIGVFFYCGVPLVLAKEIGK	909
A. thaliana-RbohF	ILKRTNAYFYVVTREQGSDFWFKGVINEVAELDQRGVIEHNNYLTSVYEEGDARSALITMVALHAKNGVDIVSGTFRVTRTHFAKPNKKVLSKLCCKTHANARIGVFFYCGVPLVLAKEIGK	924
R. cordifolia-Rboh1	NFKTRAYFYVVTREQGSDFWFKGIMNEVAETDKRGVIEHNNYCTSVYEEGDARSALITMVALHAKNGVDIVSGTFRVTRTHFAKPNURVYKRALMHKQQRVGVFFYCGVAPALTELKQ	907
A. thaliana-RbohD	GFKTRKAYFYVVTREQGSDFWFKGIMNEVAETDKRGVIEHNNYCTSVYEEGDARVALIAMLQSLHAKNGVDIVSGTFRVTKSHFAKPNURVYKRALMHKQQRVGVFFYCGVAPALTELKQ	901
R. cordifolia-Rboh3	LCQNFQKQKSTKFEFHKEHF 929	
A. thaliana-RbohF	LCNIFQKQKSTKFEFHKEHF 944	
R. cordifolia-Rboh1	LASIFSRKSDTKFEFHKEHF 927	
A. thaliana-RbohD	LALIFSRKSTTKFEFHKEHF 921	

Рисунок 45 – Выравнивание и анализ аминокислотных последовательностей Rboh из растений *A. thaliana* and *R. cordifolia*. Мотивы EF-рук обозначены подчеркнутыми прямоугольниками с номерами 1–4, сайт связывания флавинадениндинуклеотида, мотив 2, а также сайты связывания НАДФН-рибозы и НАДФН-аденина выделены подчеркнутыми прямоугольниками с буквами A–D. Функционально значимые консервативные аминокислотные остатки НАДФН-оксида обозначены звездочками или точками (*, •).

Домены, отвечающие за взаимодействие мембранной и цитозольной субъединиц gp91^{phox} и p47^{phox} НАДФН-оксидазы млекопитающих (De Leo et al., 1995, De Leo et al., 1996), также оказались консервативными в последовательностях Rboh *A. thaliana* и *R. cordifolia* (выделены прямоугольниками с номерами 1–4, Рисунок 45). Данное сходство позволяет предположить, что растительные гомологи оксидаз респираторного взрыва взаимодействуют с аналогичными цитозольными регуляторными компонентами (Keller et al., 1998). Четыре гистидиновых остатка (*, Рисунок 45), необходимые для связывания гема в дрожжевой Fe³⁺-редуктазе и gp91^{phox} человека, консервативны в Rboh растений (Finegold et al., 1996). В идентифицированных последовательностях RcRboh1 и RcRboh3 присутствуют консервативные остатки Pro415 и Asp500 белка Gp91^{phox}, участвующие в N-гликозилировании белка (•, Рисунок 45). Также обнаружены и типичные для оксидоредуктаз сайт связывания флавинадениндинуклеотида, мотив 2, сайты связывания НАДФН-рибозы и НАДФН-аденина (выделены прямоугольниками с буквами A–D, Рисунок 45) (Keller et al., 1998).

Фосфорилирование N-концевых остатков Ser82 и Ser97 играет важную роль в функционировании НАДФН-оксидаз (Kobayashi et al., 2007; Kobayashi et al., 2012). При этом остаток Ser82 является консервативным у всех представителей Rboh, тогда как остаток Ser97 характерен для изоформ, участвующих в ответе растений на стрессовые факторы. К стресс-активируемым изоформам относились такие белки как StRbohB–StRbohD, NbRbohB, NtRbohD, AtRbohD, а также изоформа RcRboh1 *R. cordifolia* (группа I, Рисунок 46). Изоформа RcRboh3, StRbohA и NbRbohA являются конститутивными НАДФН-оксидазами (группа II, Рисунок 46). Аминокислотные остатки, фланкирующие Ser82 и Ser97, консервативны в группе I, но не в группе II.

	Φ - - - - S - B	Φ - - B - S	
NbRbohB	SLVRNASSRIRQVSQEL	LRRLAS	
NtRbohD	SLVRNASSRIRQVSQEL	LRRLAS	
StRbohC	SLVRNASSRIRQVSQEL	LKRLAS	
RcRboh1	SMVRNASSKFKHFSQEL	LKRLAS	I
AtRbohD	SFFRSTSSRIKNASREL	LRRVFS	
StRbohB	TLGSQLSFHLRQVSKE	LKRMTS	
NbRbohA	TIRRSSSSKLRQFSQEL	KAEAV	
StRbohA	TMRRSTSNKLRQFSQEL	KAEAV	II
RcRboh3	TIRRSSSNRLRQFSQEL	KAEAK	

Рисунок 46 – Выравнивание и анализ N-концевых участков Rboh растений *R. cordifolia*, *A. thaliana*, *N. benthamiana*, *N. tabacum* и *S. tuberosum*. Прямоугольники указывают предсказанные мотивы-мишени CDPK. Φ, гидрофобная аминокислота; S, серин; B, основная аминокислота. Группы I и II соответствуют стресс-активируемым и конститутивным изоформам НАДФН-оксидаз (Kobayashi et al., 2007).

Методом максимального правдоподобия были проанализированы филогенетические отношения между аминокислотными последовательностями RcRboh и их гомологами из различных видов растений (Рисунок 47). Филогенетический анализ подтвердил разделение НАДФН-оксидаз на два кластера. При этом изоформа RcRboh1 относилась к кластеру стресс-активируемых, а RcRboh3 – конститутивных изоформ.

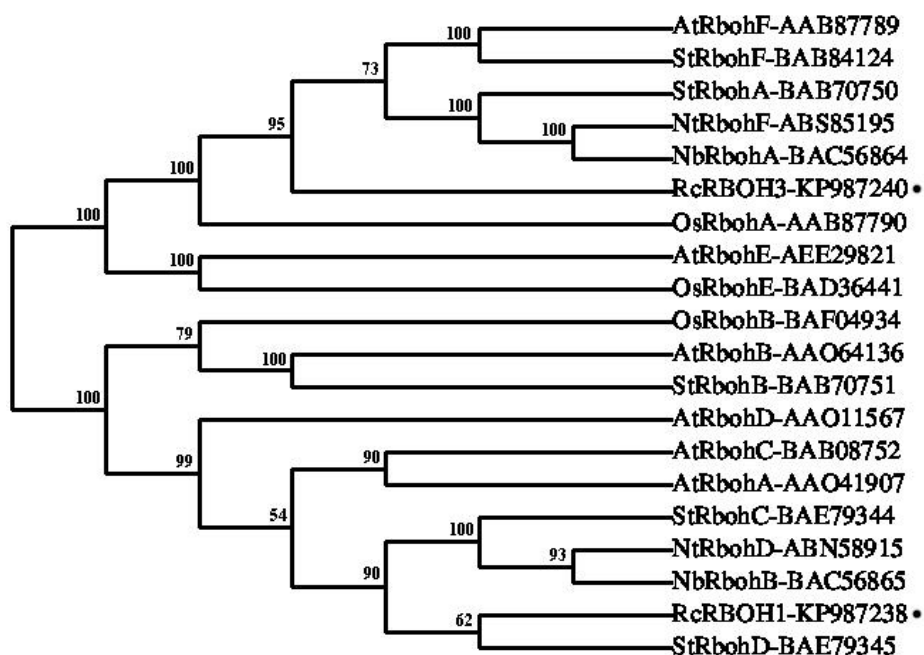


Рисунок 47 – Кладограмма, полученная в результате анализа аминокислотных последовательностей изоформ Rboh растений *R. cordifolia*, *A. thaliana*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *S. tuberosum*, *R. communis* и *O. sativa* методом максимального правдоподобия (МП) в программе Phym1 (бутстреп-анализ, 300-кратное повторение). Номера доступа последовательностей в GenBank приведены после сокращенных названий изоформ Rboh. Изоформы НАДФН-оксидаз из *R. cordifolia*, идентифицированные в данной работе, отмечены точками.

3.4.2. Влияние стрессовых факторов на экспрессию генов *Rboh* в каллусной культуре *Rubia cordifolia*

Чтобы получить экспериментальное подтверждение участия изоформ НАДФН-оксидаз *R. cordifolia* в ответе на стрессовые стимулы, было изучено влияние метилжасмоната, температурного и солевого стресса на экспрессию генов *RcRboh1* и *RcRboh3* в контрольной каллусной культуре *R.* Было установлено, что при понижении и повышении температуры культивирования клеток, экспрессия *RcRboh1* повышалась в 1,7 и 1,8 раза, соответственно, в то время как солевой стресс и метилжасмонат не оказывали влияния на транскрипционную активность данной изоформы. Уровень экспрессии *RcRboh3* при изученных воздействиях достоверно не изменялся (Рисунок 48). Эти

результаты показали, что *RcRboh1* может играть важную роль в реакции на стресс, а *RcRboh3* поддерживает гомеостаз АФК в клетках *R. cordifolia*.

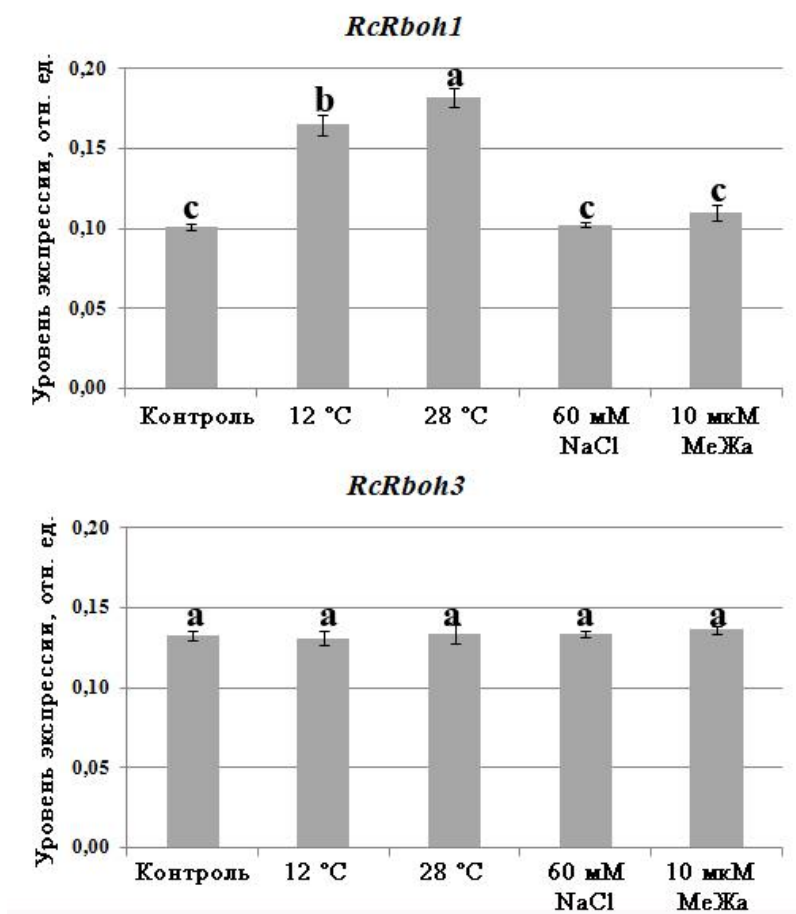


Рисунок 48 – Влияние метилжасмоната (МеЖа), температурного и солевого стресса на экспрессию генов *Rboh* в контрольной каллусной культуре *R. cordifolia*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Гены *Rboh* по-разному реагировали на стрессовые условия. У *A. thaliana* изоформа *RbohD* активировалась преимущественно холодом, а *RbohF* – солью. В клетках *R. cordifolia* только изоформа *Rboh1* регулировалась температурой, а *Rboh3* демонстрировала постоянную экспрессию в условиях стресса. Ранее было показано, что гены *Rboh* демонстрируют различные паттерны экспрессии в нормальных условиях и в ответ на воздействие различных факторов окружающей среды (Marino et al. 2012). В частности, *AtRbohD* и *AtRbohF* участвуют в координации продукции АФК при стрессовых воздействиях (Torres et al. 2002;

Kwak et al. 2003; Chang et al. 2016). Сильное повышение экспрессии гена *AtRbohD* происходит при тепловой обработке, а низкая температура вызывает ее снижение (Suzuki et al. 2011; Chang et al. 2016). Оба гена, *AtRbohD* и *AtRbohF*, активировались в ответ на обработку NaCl, хотя *RbohF* оказался менее чувствительным к соли (Ma et al. 2012).

3.4.3. Экспрессия генов *Rboh* в трансгенных культурах

Было изучено влияние *rolC* на экспрессию *AtRbohD* и *AtRbohF*, а также гомологичных генов *RcRboh1* и *RcRboh3* в трансгенных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia* как в нормальных условиях, так и при воздействии температурного и солевого стресса (Shkryl et al., 2022). Поскольку контрольная линия R не выживает на среде с добавлением 120 мМ NaCl, данные для культур *R. cordifolia* отсутствуют. Как показано на Рисунке 49, уровни экспрессии *AtRbohD* и *AtRbohF* в *rolC*-трансгенной линии *A. thaliana* были примерно в два раза ниже по сравнению с контрольной культурой. При воздействии 120 мМ NaCl и низкой температуры транскрипция *AtRbohD* в каллусной линии At увеличивалось в 2 и 3 раза, соответственно. Экспрессия гена *AtRbohF* повышалась только при воздействии высокой концентрации соли. Другие стрессовые условия не оказали существенного влияния на транскрипционную активность НАДФН-оксидаз *A. thaliana*. При этом в культуре АСН экспрессия изоформ *AtRboh* повышалась в 1,3–1,6 раза в ответ на все изученные факторы.

Сверхэкспрессия *rolC* в трансгенной культуре *R. cordifolia* привела к двукратному снижению уровня транскрипции *RcRboh3*, но не оказала существенного влияния на транскрипционную активность *RcRboh1* (Рисунок 49). При воздействии пониженной и повышенной температуры уровень экспрессии *RcRboh1* в контрольных клетках увеличился в 1,6 и 1,8 раза, соответственно, тогда как добавление NaCl не влияло на экспрессию этой изоформы НАДФН-оксидазы. Интересно, что температурный стресс оказал гораздо менее выраженный эффект на уровень экспрессии *RcRboh1* в каллусах РСН по сравнению с линией R, что может свидетельствовать о функциональных и/или регуляторных различиях,

обусловленных влиянием трансгена. Транскрипция *RcRboh3* в *rolC*-трансгенной культуре *R. cordifolia* при изученных воздействиях достоверно не изменялась.

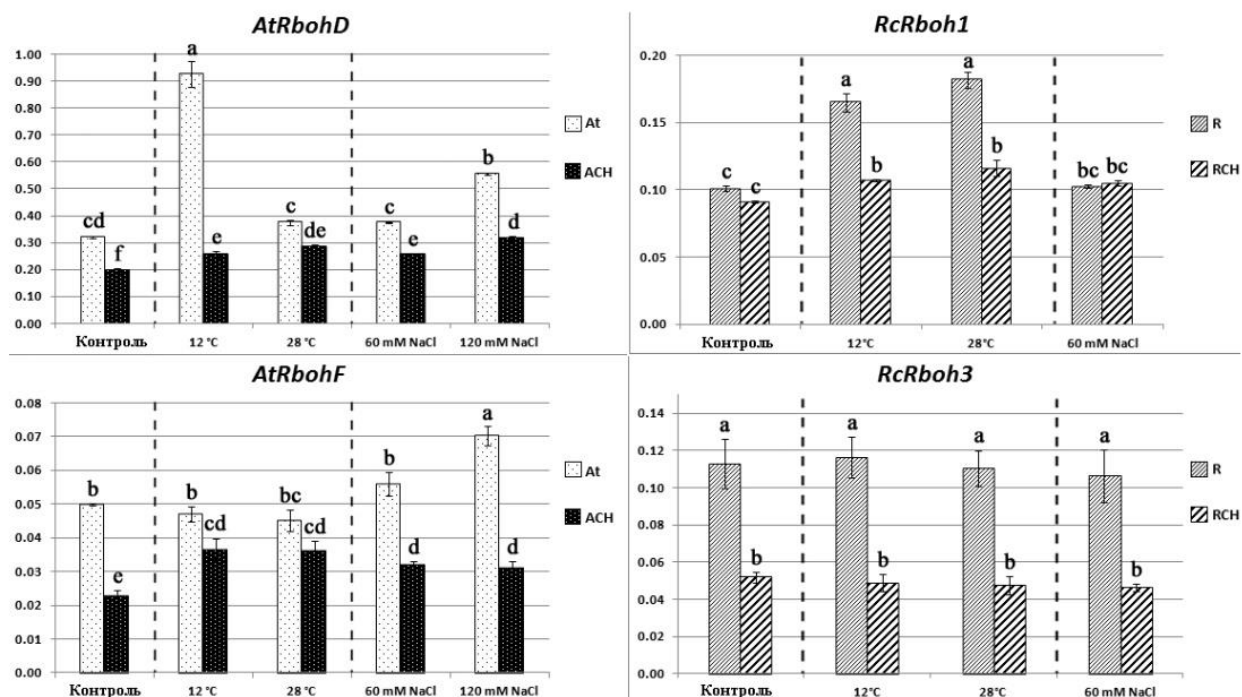


Рисунок 49 – Влияние *rolC* на экспрессию генов *Rboh* в каллусных культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ACH – *rolC*-трансгенная клеточная линия *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Полученные результаты говорят об ингибирующем влиянии *rolC* на транскрипционную активность НАДФН-оксидаз. Несмотря на различное влияние стрессовых факторов на экспрессию гомологичных изоформ *Rboh* в культурах *A. thaliana* и *R. cordifolia*, при любых воздействиях их транскрипционная активность была значительно подавлена под влиянием гена *rolC*.

Далее было изучено влияние *rolB* на экспрессию генов *Rboh* в контрольных и трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* и *A. thaliana* (Veremeichik et al., 2016). Транскрипционная активность стресс-индуцируемой изоформы *RcRboh1* была значительно повышена в клетках, экспрессирующих *rolB*, причем в

культурах RBM и RBH наблюдалось увеличение в 6 и 7 раз, соответственно (Таблица 15). Содержание транскриптов *RcRboh3* в культурах RBM и RBH также увеличилось и превышало значения контрольной культуры в 3 и 4 раза, соответственно.

Такая же тенденция изменения экспрессии НАДФН-оксидаз наблюдалась и в культурах *A. thaliana* (Таблица 15). В линиях ABL и ABH транскрипционный уровень гена *AtRbohD* увеличился в 2,5 и 3 раза, тогда как транскрипция *AtRbohF* увеличилась в 4 и 7 по сравнению с контрольной культурой, соответственно.

Таблица 15 – Экспрессия генов *Rboh* в контрольных и *rolB*-трансгенных каллусных культурах *R. cordifolia* и *A. thaliana*

<i>R. cordifolia</i>			<i>A. thaliana</i>		
R	RBM	RBH	At	ABL	ABH
<i>RcRboh1</i>			<i>AtRbohD</i>		
0,101±0,002 ^c	0,576±0,036 ^b	0,691±0,012 ^a	0,242±0,019 ^c	0,615±0,024 ^b	0,803±0,062 ^a
<i>RcRboh3</i>			<i>AtRbohF</i>		
0,132±0,002 ^c	0,399±0,019 ^b	0,521±0,003 ^a	0,119±0,011 ^c	0,432±0,043 ^b	0,801±0,025 ^a

R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBM и RBH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена; At – контрольная клеточная линия *A. thaliana*; ABL и ABH – *rolB*-трансгенные клеточные линии *A. thaliana* с умеренным и высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка. Разные надстрочные буквы указывают на статистически значимые различия средних значений в строках ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Анализ Пирсона выявил высокую корреляционную зависимость между уровнем экспрессии *rolB* и экспрессией генов *RcRboh1* и *RcRboh3* ($r = 0,89$, $p < 0,01$ и $r = 0,92$, $p < 0,01$, соответственно), а также генов *AtRbohD* и *AtRbohF* ($r = 0,85$, $p < 0,01$ и $r = 0,96$, $p < 0,01$, соответственно).

В предыдущих экспериментах было обнаружено, что индивидуальная экспрессия *rolC* и *rolB* приводит к активации и подавлению транскрипционной активности генов *Rboh*, соответственно. Чтобы выяснить, будут ли гены *rol* проявлять данные свойства в составе исходной T-ДНК, была проанализирована

экспрессия генов НАДФН-оксидаз в pRiA4-трансформированной культуре *R. cordifolia* (Рисунок 50). Транскрипционная активность стресс-индуцируемой изоформы *RcRboh1* была немного повышена в трансгенных клетках, но это различие не являлось статистически значимым (Bulgakov et al., 2013). Содержание транскриптов *RcRboh3* в культуре RA4 снизилось в 1,4 раза по сравнению с линией R.

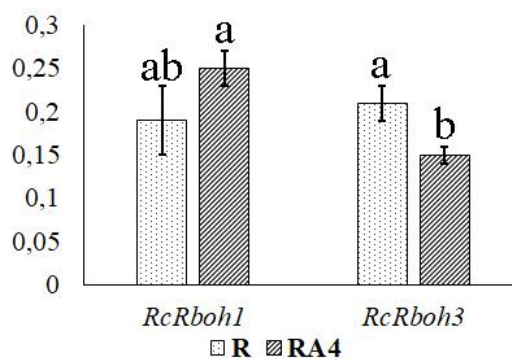


Рисунок 50 – Влияние трансформации *R. rhizogenes* A4 на экспрессию генов *Rboh* в каллусной культуре *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия; RA4 – pRiA4-трансформированная клеточная линия. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Таким образом, по характеру экспрессии изоформ *RcRboh*, трансформированные *R. rhizogenes* A4 клетки *R. cordifolia* в большей степени схожи с *rolC*-трансгенными культурами. Стоит заметить, что уровень транскрипции гена *rolC* в линии RA4 почти в 2 раза превышает *rolB* (Shkryl et al., 2008). В pRiA4-трансформированных клетках, вероятно, устанавливается такой баланс транскрипционной активности трансгенов, при котором *rolC* компенсирует негативное влияние *rolB*. Не исключено, что это соотношение в определенных условиях может сдвигаться в ту или иную сторону под действием, например, стрессовых факторов или гормональных сигналов, однако данное предположение требует дальнейшего всестороннего изучения.

3.4.4. Обсуждение результатов по влиянию генов *rol* на гены НАДФН-оксидазы

Быстрое накопление АФК является одним из самых ранних событий в клетках растений в условиях стресса (Baхter et al., 2014; Mittler, 2017), и растения используют широкий спектр ферментов, которые генерируют АФК, такие как аминоксидазы, пероксидазы III класса, липоксигеназы, хинонредуктазы, оксалатоксидазы и НАДФН-оксидазы (Marino et al., 2012). При этом НАДФН-оксидазы, известные также как гомологи оксидазы респираторного взрыва (*Rboh*), считаются основным источником АФК при росте и развитии клеток, окислительном повреждении и межклеточном взаимодействии (Wang et al., 2018).

В предварительных экспериментах было установлено, что ингибитор НАДФН-оксидазы дифенилениодония хлорид не влияет на продукцию антрахинонов в *rolC*- и *rolB*-экспрессирующих каллусах *R. cordifolia*, что указывает на то, что индукция биосинтеза вторичных метаболитов в трансгенных культурах не связана с активацией НАДФН-оксидазного сигнального пути (Bulgakov et al., 2003). При этом данный ингибитор сходным образом угнетал рост контрольных и *rolC*-трансгенных каллусов, не влияя при этом на рост *rolB*-экспрессирующей клеточной линии. Стоит отметить, что, хотя реализация НАДФН-оксидаз-независимых защитных реакций является редким явлением, этот феномен был ранее описан в литературе (Cho et al., 1988; Sasabe et al., 2000).

Установлено, что в клеточных культурах *A. thaliana* гены *Rboh* демонстрируют различную реакцию на стресс: наибольший транскрипционный ответ изоформы *AtRbohD* был вызван воздействием холода, в то время как изоформа *AtRbohF* преимущественно реагировала на солевой стресс. Ранее было показано, что у растений резуховидки Таля значительная активация экспрессии гена *AtRbohD* происходила при повышенной температуре, тогда как холод вызывал ее снижение (Suzuki et al., 2011; Chang et al., 2016). Оба гена, *AtRbohD* и *AtRbohF*, активировались в ответ на обработку NaCl, при этом транскрипционный ответ *AtRbohF* был менее выражен (Ma et al., 2012). В культивируемых клетках *R. cordifolia* абиотические факторы оказали влияние только на экспрессию

изоформы *RcRboh1*, в то время как транскрипция *RcRboh3* не изменялась в условиях стрессовых воздействий и, вероятно, участвует в поддержании гомеостаза АФК в клетках марены сердцелистной. Такой дифференциальный паттерн экспрессии генов *Rboh* у растений был ранее неоднократно описан в литературе (Torres et al., 2002; Kwak et al., 2003; Chang et al., 2016). Каждая изоформа РВОН специализируется на различных клеточных процессах и реакциях окружающей среды, что приводит к локализованной генерации АФК. Эта избирательная активация позволяет растениям адаптировать свои защитные реакции, опосредованные АФК, к конкретным стрессовым стимулам (Marino et al., 2012).

В контрольных каллусных линиях *A. thaliana* и *R. cordifolia* средние значения общего содержания транскриптов *Rboh* были в 1,7 и 1,6 раза выше, чем в *rolC*-трансгенных каллусных линиях, соответственно ($F = 5,84$, $p < 0,001$). Более того, абиотические стрессы повышали уровень экспрессии *Rboh* в 2 раза в контрольных клетках, тогда как в клетках, экспрессирующих *rolC*, наблюдалось максимальное увеличение в 1,4 раза. Удивительно, но вызванное *rolB* ингибирование продукции АФК не было связано со снижением экспрессии генов НАДФН-оксидазы. Напротив, в клетках *R. cordifolia* и *A. thaliana* ген *rolB* увеличивал количество транскриптов мРНК изоформ *RcRboh* и *AtRboh* в 3–7 раз в зависимости от силы экспрессии трансгена (Veremeichik et al., 2016). Таким образом, *rolC* подавляет экспрессию генов *Rboh* как в нормальных, так и в стрессовых условиях, тогда как *rolB* действует как активатор обеих систем, генерации и детоксикации АФК. В целом, эти результаты являются еще одним примером антагонизма генов *rolC* и *rolB*, что, вероятно, служит адаптационным механизмом, выработанным в процессе эволюции взаимоотношений агробактерий и растений-хозяев.

3.5. Влияние генов *rol* на экспрессию генов Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ (*CDPK*)

3.5.1. Идентификация и анализ генов *CDPK* в растении *Rubia cordifolia*

Известно, что Ca^{2+} -зависимые сигнальные пути играют важную роль в развитии бобово-ризобиального симбиоза (Ehrhardt et al., 1996; Gargantini et al., 2006; Gleason et al., 2006; Shimoda et al., 2012). Первые данные о влиянии Nod-факторов бактерий рода *Rhizobium* на кинетику внутриклеточных ионов Ca^{2+} были получены на модели корневых волосков люцерны (Ehrhardt et al., 1996) и фасоли обыкновенной (Cárdenas et al., 1999). Позже было установлено, что важное значение в регуляции процессов нодуляции имеют отдельные изоформы кальциевых сенсоров – Ca^{2+} -зависимых и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ (Gargantini et al., 2006; Gleason et al., 2006; Shimoda et al., 2012). Поскольку согласно современным представлениям агробактерии входят в состав различных филогенетических групп рода *Rhizobium* (Young et al., 2001; Velázquez et al., 2010), *R. rhizogenes* может использовать аналогичную стратегию воздействия на сигнальные компоненты клеток растения-хозяина. Используя вырожденные праймеры к консервативным участкам киназного домена кальций-зависимых протеинкиназ растений, с помощью ПЦР были получены специфические фрагменты *CDPK* в образцах кДНК растения и каллусных культур *R. cordifolia*. Полученные фрагменты, соответствующие предполагаемой длине, были клонированы и секвенированы. Всего было проанализировано 442 кДНК клона, среди которых было выявлено 14 изоформ *CDPK*. Идентифицированные последовательности, *RcCDPK1–RcCDPK14*, были депонированы в базу данных GenBank с номерами доступа DQ531564, EF090621, EF090620, JQ954841, JQ954842, JQ954843, JQ954844, JQ954845, JQ954846, JQ954847, JQ954848, JQ954849, JQ954850 и JQ954851, соответственно (Veremeichik et al., 2014).

Предсказанные аминокислотные последовательности *RcCDPK* соответствовали типичным представителям семейства серин/треонин-специфичных протеинкиназ и содержали три субдомена (V–VII), включая 5 из 15 инвариантных аминокислотных остатков (Рисунок 51).

	: : .:~* ** : : : : ** * : ***:** : :~: ***** : * :****.
1 RcCDPK5	DRIVSR--GHYSEDAANLTRQVNVVHICHFMGVMHRDLKPENFLLASKDEKSTLKAIDFGLSVFIIEGKQVYRDVVGSA
2 RcCDPK6	DRIIKK--GHYSEKAAAICRAIVNVVHVCHFMGVAHRDLKPENFLLADDGEEAALKATDFGLSVFIEEGRVYDDMVGSA
3 RcCDPK12	DRIITK--GHYSERAAAATVCRQMVTVVHHCHSMGVFHRDLKPENFLFLSSDETSPLKATDFGLSVFFKPGDVFKDLVGS
4 RcCDPK4	DRIVAR--GHYTERAAAIVMKTIVEVQVCHRNGVMHRDLKPENFLFANKKETSPKATDFGLSVFFKPGEHFNEIVGSP
5 RcCDPK13	DRIVAR--GHYTERAAAIVRTIVEVQLCHKHGVHRDLKPENFLFANKKENSPLKATDFGLSIFFFKPGKFESEIVGSP
6 RcCDPK1	DRIVAR--GHYTERAAAIVTRTIVEVIQICHKYGMHRDLKPENFLFGNKKETAPLKAIDFGLSVTFKGERFNEIVGSP
7 RcCDPK10	DRIVKK--GHYTERAAAIVTKTILEVVKICHQHGVIHRDLKPENFLYSDTGETASLKTIDFGLSIFFEPGQHFTEIVGSP
8 RcCDPK2	DRIVHK--GHYSEEAALKLIRTIIVGVVENCHSFGVMHRDLKPENFLFTSPDDATLKAIDFGLSMFPQPGEMFSDVVGSP
9 RcCDPK8	DRIVQR--GQYSEKAAQLMKTIIISVVEACHSLGVMHRDLKPENFLFDTPDEDAKLKAIDFGLSVFFKPGQYLSDVVGS
10 RcCDPK11	DRIIQE--GHYTEMKAAGLTRTIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLFVDQREDSLLKTIDFGLSMFFKPGDKFTDVVGSP
11 RcCDPK14	DRIIQE--GHYTEKAAELARVIIIGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLFVNEKEESPLKTIDFGLSMFFKPGDMFSDVVGS
12 RcCDPK3	DRIIQE--GHYSERAAQLTKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDFSLKAIDFGLSVFFKPGQVFTDVVGSP
13 RcCDPK9	DRIVKR--GHYSEKAAASITRTIVSGIQTCHSLGVMHRDLKPENFLFVYGEEDSAIKSIDFGLSVTFKPGEIFHDVVGS
14 RcCDPK7	DRILAKKDSRYTEKDAIVVROHLKVAEACHLHGLVHRDNKPENFLFKAPKNDCSLKAIDFGLSDFIKPGKPFHDIVGSA

V
VI
VII

Рисунок 51 – Выравнивание и анализ участка киназного домена CDPK из *R. cordifolia*. Каталитические субдомены обозначены римскими цифрами V-VII. Звездочки обозначают идентичные остатки, точки и двойные точки – аминокислотные замены с низким и высоким сходством, соответственно. Инвариантные остатки отмечены жирными точками.

В Таблице 16 приведено сравнение аминокислотных последовательностей RcCDPK между собой. Наибольшая степень гомологии показана для изоформ RcCDPK1 и RcCDPK13 (85% идентичности), а также RcCDPK4 и RcCDPK13 (86% идентичности). Самая низкая степень гомологии наблюдалась между RcCDPK7 и другими изоформами RcCDPK (49–57% идентичности). При этом BLAST-анализ выявил высокую степень гомологии между CDPK из *R. cordifolia* и из других растений (Таблица 17).

Таблица 16 – Попарное сравнение СДПК из *R. cordifolia* (% идентичности)

СДПК	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	54	51	78	64	56	53	59	67	71	65	65	85	65
2	54	100	65	61	70	60	53	74	65	59	69	66	64	68
3	51	65	100	61	72	58	49	72	65	62	77	66	63	73
4	78	61	61	100	62	58	53	63	65	72	67	68	86	68
5	64	70	72	62	100	73	51	61	58	56	61	69	61	68
6	56	60	58	58	73	100	50	59	56	59	56	68	58	56
7	53	53	49	53	51	50	100	53	51	52	51	56	57	52
8	59	74	72	63	61	59	53	100	64	59	69	62	59	71
9	67	65	65	65	58	56	51	64	100	58	72	60	65	68
10	71	59	62	82	56	59	52	59	58	100	64	60	72	59
11	65	69	77	67	61	56	51	69	72	64	100	65	68	75
12	65	66	66	68	69	68	56	62	60	60	65	100	66	65
13	85	64	63	86	61	58	57	59	65	72	68	66	100	69
14	65	68	73	68	68	56	52	71	68	59	75	65	69	100

Таблица 17 – Сравнение CDPK из *R. cordifolia* с ближайшими гомологами

Ген	Гомолог (номер доступа в GenBank)	% идентичности
RcCDPK1	<i>Nicotiana tabacum</i> NtCDPK8 (ADO79931)	82%
RcCDPK2	<i>Solanum tuberosum</i> StCDPK (BAB63464)	85%
RcCDPK3	<i>S. tuberosum</i> StCDPK4 (A5A7I7)	82%
RcCDPK4	<i>N. attenuata</i> NaCDPK8 (ABO65099)	90%
RcCDPK5	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> McCDPK1 (AAD17800)	86%
RcCDPK6	<i>Vitis amurensis</i> VaCDPK1e (ACD12690)	83%
RcCDPK7	<i>Agrostemma githago</i> AgCDPK (ACB38163)	90%
RcCDPK8	<i>Eritrichium sericeum</i> EsCDPK3 (ABX90022)	94%
RcCDPK9	<i>Ricinus communis</i> RcCDPK (EEF38301)	76%
RcCDPK10	<i>S. lycopersicum</i> SlCDPK24 (XP_004241403)	82%
RcCDPK11	<i>S. lycopersicum</i> SlCDPK1 (XP_004249931)	94%
RcCDPK12	<i>S. lycopersicum</i> SlCDPK3 (XP_004244622)	95%
RcCDPK13	<i>Panax ginseng</i> PgCDPK2 (ABQ18316)	98%
RcCDPK14	<i>N. tabacum</i> NtCDPK16 (AEY99980)	88%

Филогенетические отношения между аминокислотными последовательностями RcCDPK и их гомологами из других видов растений были проанализированы с помощью кластерного анализа методом объединения ближайших соседей (Рисунок 52). Полученный результат указывает на наличие четырех отдельных групп CDPK (I–IV); группы II и III в свою очередь разделяются на подгруппы «а» и «б». Группа I включает 5 изоформ – RcCDPK2, 8, 9, 11 и 14. К подгруппе II-а относятся изоформы RcCDPK5 и 6, а к подгруппе II-б – RcCDPK12. Подгруппа III-а включает изоформу RcCDPK10, тогда как III-б – RcCDPK1, 4, 13. В группу IV вошел единственный представитель кальций-зависимых протеинкиназ из *R. cordifolia* – изоформа RcCDPK7.

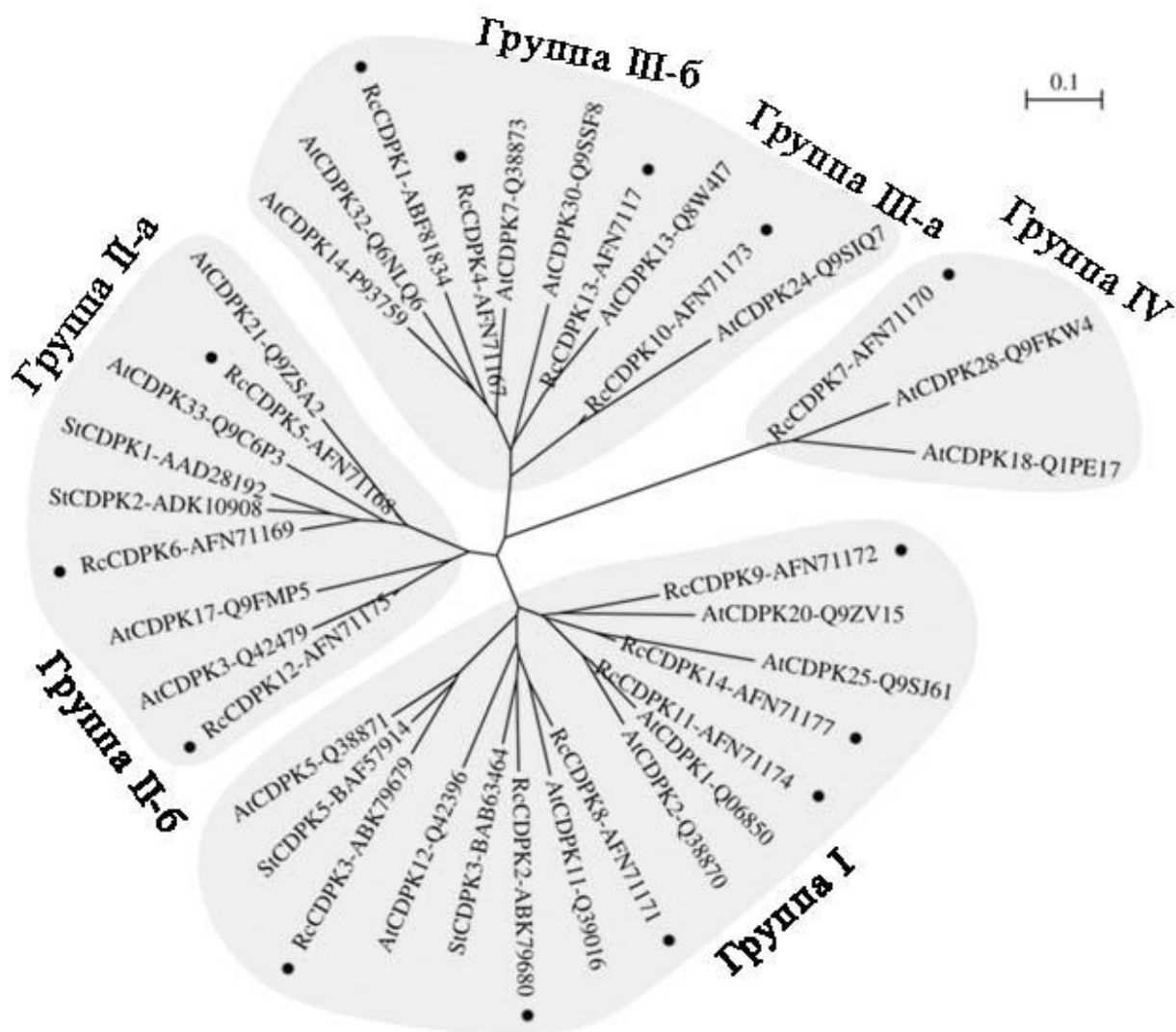


Рисунок 52 – Неукорененное филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей CDPK растений *R. cordifolia*, *A. thaliana* и *S. tuberosum*, построенное методом объединения ближайших соседей в программе MEGA3.1 (бутстреп-анализ, 1000-кратное повторение). Номера доступа последовательностей в GenBank приведены после названий изоформ CDPK. Изоформы кальций-зависимых протеинкиназ из *R. cordifolia*, идентифицированные в данной работе, отмечены точками. Также обозначены четыре семейства растительных CDPK (I, II, III и IV) и подгруппы в семействе II и III.

3.5.2. Влияние метилжасмоната на экспрессию *CDPK* в каллусах

Rubia cordifolia

Жасмонаты – жасмоновая кислота (ЖК) и ее производные, такие как метилжасмонат (МеЖа), жасмоноил-изолейцин и *цис*-жасмон играют важную роль в реакциях на стресс, росте и развитии растений (Wasternack, 2007). При этом передача сигнала ЖК может включать как активацию, так и супрессию определенных изоформ кальций-зависимых протеинкиназ (Ulloa et al., 2002; Vivek et al., 2013). Кроме того, МеЖа часто используют в качестве элиситора для увеличения продукции вторичных метаболитов в культурах растительных клеток (Zhao et al., 2005; Kastell et al., 2013). В контрольной каллусной линии *R. cordifolia* добавление МеЖа вызывало активацию биосинтеза антрахинонов, сравнимую со сверхэкспрессией генов *rolB* и *rolC* (Bulgakov et al., 2002). Чтобы выявить изоформы *RcCDPK*, связанные с передачей сигналов ЖК, был определен уровень экспрессии генов *RcCDPK1–14* в контрольной культуре при нормальных условиях роста и при обработке 10 мкМ МеЖа. Под действием элиситора экспрессия генов *RcCDPK3*, *RcCDPK7*, *RcCDPK10* и *RcCDPK11*, увеличилась в 2,8, 1,9, 1,8 и 1,7 раз, соответственно (Рисунок 53). Транскрипционная активность других генов *RcCDPK* статистически значимо не отличалась от контроля. Транскрипты изоформы *RcCDPK6* в исследуемых образцах обнаружены не были.

Известно, что жасмонатный сигналинг играет важную роль в регуляции взаимоотношений растений с симбиотическими и патогенными микроорганизмами (Pozo et al., 2004; Kazan and Manners 2008). В частности, ЖК ингибирует процесс колонизации корневой системы люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula*) азотфиксирующими микоризными бактериями *Sinorhizobium meliloti*, нарушая в них Nod-зависимые токи кальция (Sun et al., 2006).

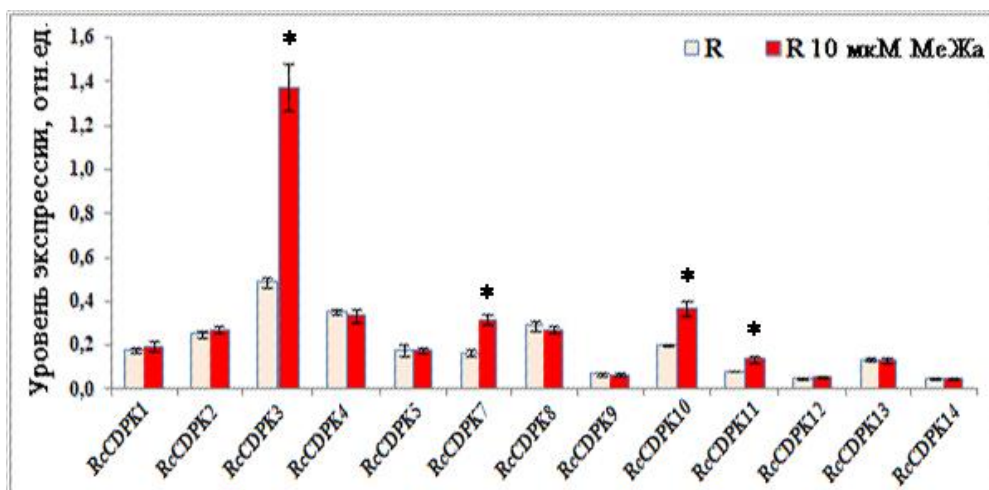


Рисунок 53 – Влияние метилжасмонат (МеЖа) на экспрессию генов *CDPK* в контрольных (R) каллусных культурах *R. cordifolia*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), *t*-тест Стьюдента.

Также известно, что фитопатогенная бактерия *Pseudomonas syringae* синтезирует коронатин, активирующий сигнальный путь ЖК, приводя тем самым к подавлению защитных механизмов инфицированного растения (Abramovitch and Martin 2004). Роль ЖК во взаимодействии растений с агробактериями еще до конца не установлена. Сообщалось, что штамм *R. radiobacter* (ранее *A. tumefaciens*) C58 индуцировал накопление ЖК в клетках *Ricinus communis* в течение первой недели инфицирования (Veselov et al., 2003). Однако другое исследование, проведенное с тем же штаммом бактерий, показало, что как уровень ЖК, так и его предшественника – 12-оксо-фитодиеновой кислоты (ОФДК) оставались неизменными у растений *A. thaliana* в течение всего периода колонизации и заражения (Lee et al., 2009). В литературе отсутствуют сведения о динамике накопления компонентов жасмонатного сигналинга у растений-хозяев на ранних стадиях заражения *R. rhizogenes*. Тем не менее, показано, что «волосатые» корни томата синтезируют ЖК, ОФДК и их производные, уровень которых в клетках меняется с возрастом культуры (Abdala et al., 2003). Регуляторная роль *rol*-генов в этих процессах вероятнее всего незначительна, поскольку ЖК и ОФДК оказались наименее подвержены влиянию гетерологичной экспрессии генов *rolA*, *rolB* и *rolC* в культуре «волосатых» корней *Centella asiatica*

(Alcalde et al., 2022). Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, индивидуальная экспрессия гена *rolB* в каллусах *A. thaliana* приводит к уменьшению количества алленоксид-циклазы 4 (АОС4), участвующей в биосинтезе ОФДК (Bulgakov et al., 2018). Было показано, что подавление экспрессии *АОС1* у *M. truncatula* не влияет на индукцию или развитие клубеньков, хотя и приводит к снижению уровня ЖК (Zdyb et al., 2011). Поскольку в геноме *A. thaliana* присутствует четыре изоформы алленоксид-циклазы (Stenzel et al., 2003), подавление одной из них может не оказать существенного влияния на взаимодействие с агробактериями. Более того, экзогенный МеЖа оказывал одинаковый эффект на биосинтез антрахинонов в контрольной и *rol*-экспрессирующих культурах *R. cordifolia*, что также косвенно указывает на разные пути передачи сигнала этого фитогормона и агробактериальных генов (Bulgakov et al., 2002). При этом ингибитор протеинфосфатазы – кантаридин, как отдельно, так и в сочетании с МеЖа вызывал индукцию накопления антрахинонов только в трансгенных культурах (Bulgakov et al., 2002). Эти данные свидетельствуют о том, что механизмы фосфорилирования и дефосфорилирования принимают участие в реализации *rol*-опосредованных эффектов и что СДПК могут быть вовлечены в регуляцию этих процессов.

3.5.3. Экспрессия СДПК в трансгенных культурах

Известно, что СДПК участвуют в регуляции практически всех процессов, которые определяют нормальный рост и развитие растений. Экспрессия разных изоформ зависит от типа ткани, стадии развития, гормонального статуса, внешних стимулов, а также комбинации этих и других факторов (Shi et al., 2018). Было установлено, что некоторые изоформы *RcCDPK* имеет различную транскрипционную активность в надземных органах (лист и стебель) растений *R. cordifolia* (Рисунок 54). Уровень экспрессии *RcCDPK2*, *RcCDPK4*, *RcCDPK8* и *RcCDPK11* был в 1,2–1,6 раза выше в листьях, чем в стеблях растения. При этом уровень транскрипции *RcCDPK1* был в 1,4 раза выше в стеблях, чем в листьях

растений *R. cordifolia*. Уровень экспрессии остальных изоформ *RcCDPK* в листьях и стеблях *R. cordifolia* не отличался.

Чтобы оценить влияние трансформации диким штаммом *R. rhizogenes* A4 на гены *CDPK*, был исследован профиль их экспрессии в контрольной и pRiA4-трансформированной клеточной культуре *R. cordifolia* (Veremeichik et al., 2014). В контрольной каллусной линии общий уровень экспрессии всех транскриптов *RcCDPK* был в 1,3 и 1,6 раза ниже, чем в стебле и листе зрелого растения, соответственно ($F = 55,4$, $p < 0,001$). Уровень экспрессии изоформ *CDPK* значительно различался в каллусных культурах R и RA4 (Рисунок 54). Транскрипционная активность *RcCDPK1*, 3, 9, 11 и 14 была в 1,8, 1,4, 1,9, 1,6 и 1,3 раза выше в контрольной линии. При этом экспрессия генов *RcCDPK4*, 5, 7 и 10 в культуре RA4 была выше контрольной линии в 1,2, 3,9, 2,7 и 2,9 раза, соответственно. Транскрипты *RcCDPK6* в ходе анализа не были выявлены ни в одной из двух каллусных линий.

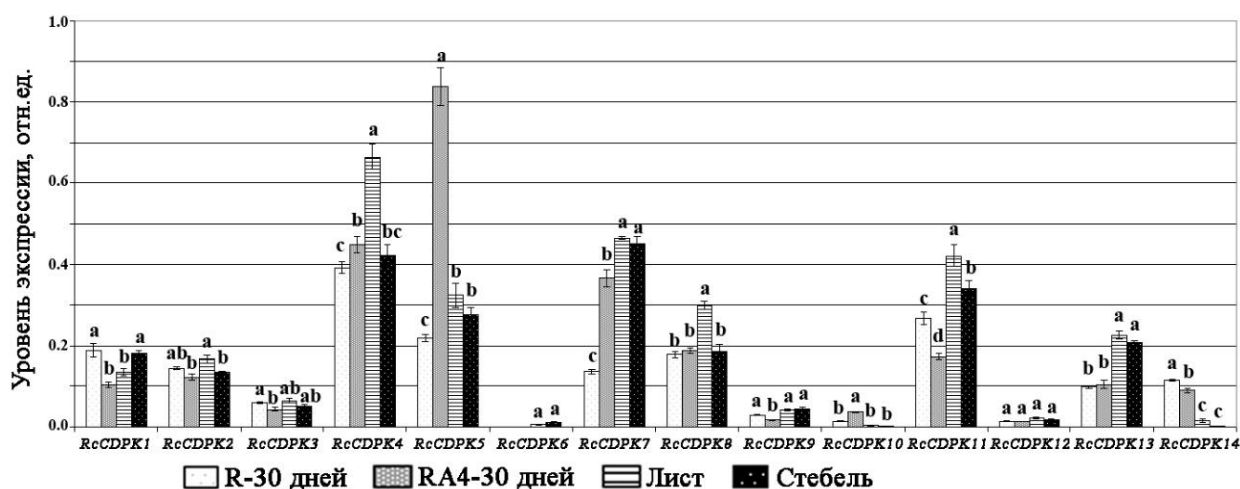


Рисунок 54 – Экспрессия генов *CDPK* в контрольных (R) и pRiA4-трансформированных (RA4) каллусных культурах, листьях и стеблях *R. cordifolia*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Наибольшим уровнем экспрессии из всех выявленных изоформ в линии R обладали гены *RcCDPK4* и *RcCDPK11*, а *RcCDPK9*, *RcCDPK10* и *RcCDPK12* были наименее распространенными среди других транскриптов *CDPK*. В культуре RA4

наибольшая транскрипционная активность выявлена у изоформ *RcCDPK4*, *RcCDPK5* и *RcCDPK7*, тогда как экспрессия *RcCDPK9* и *RcCDPK12* была сравнительно невелика. В целом, общий уровень экспрессии генов *CDPK* в pRiA4-трансформированной линии был в 1,4 раза выше, чем в контрольной культуре, и был сопоставим с таковым в органах интактного растения.

Экспрессию генов *CDPK* в контрольных и pRiA4-трансформированных линиях измеряли через 5, 15, 20 и 30 дней с начала культивирования, что соответствует лаг-фазе (1–7 дней), экспоненциальной фазе (8–15 дней), линейной фазе (16–26 дней) и стационарной фазе (27–35 дней) роста клеток, соответственно (Рисунок 55). По особенностям изменения транскрипционной активности *RcCDPK* марены сердцелистной разделились на три условные группы. Первая группа состояла из генов *RcCDPK1*, *RcCDPK5*, *RcCDPK7*, *RcCDPK8*, *RcCDPK11*, *RcCDPK13* и *RcCDPK14*, экспрессия которых со временем увеличивалась и достигла максимальных значений к концу пассажа. Вторая группа включала *RcCDPK2*, *RcCDPK3*, *RcCDPK4*, *RcCDPK9* и *RcCDPK12*, транскрипционная активность которых значительно не менялась на протяжении всего цикла культивирования. К третьей группе была отнесена изоформа *RcCDPK10*, экспрессия которого имела два пика – в экспоненциальной и стационарной фазе роста клеток.

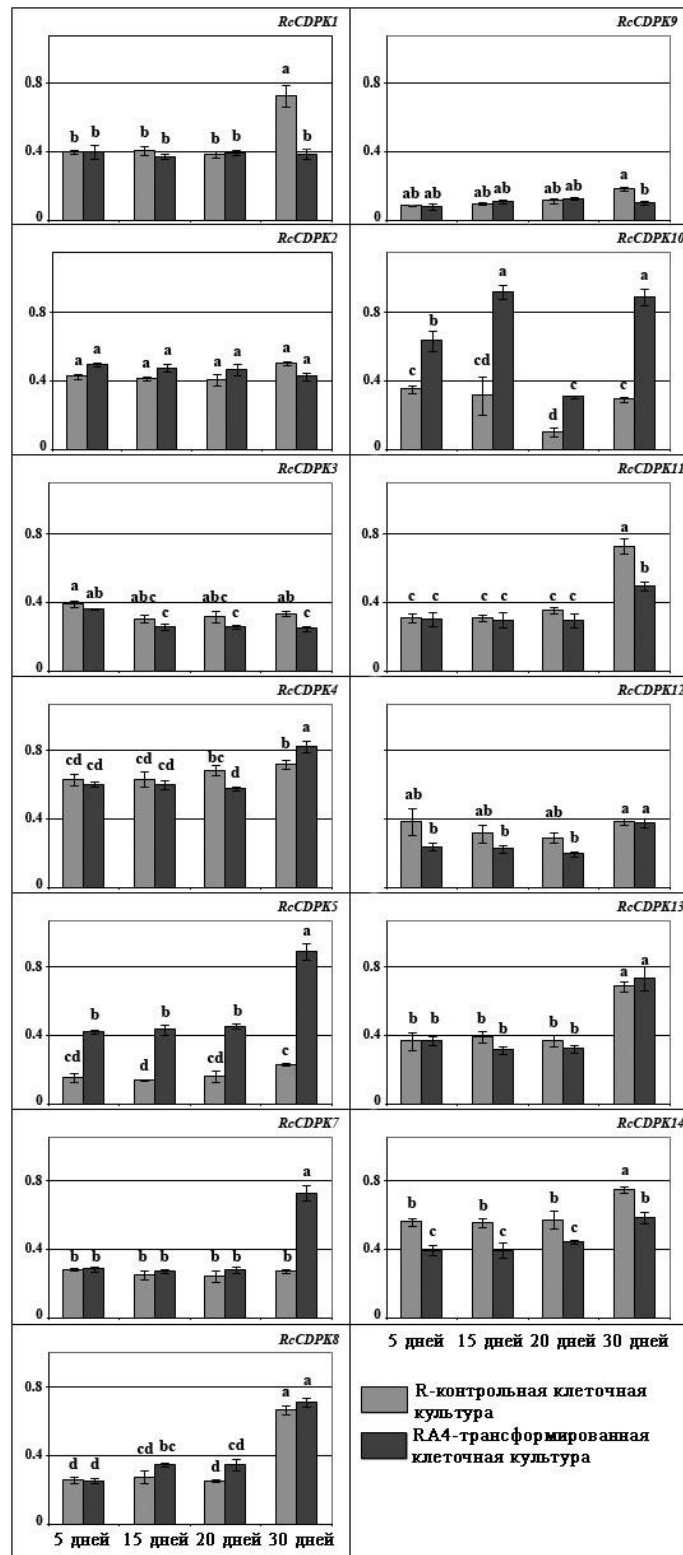


Рисунок 55 – Динамика экспрессия генов *CDPK* в контрольных (R) и pRiA4-трансформированных (RA4) каллусных культурах *R. cordifolia* в течение цикла культивирования. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Эффект трансформации *R. rhizogenes* A4 на паттерн экспрессии *RcCDPK* отличался на разных стадиях культивирования каллусных линий *R. cordifolia* (Veremeichik et al., 2014). Например, повышенная экспрессия *RcCDPK7* наблюдалась только в конце пассажа. Более низкие уровни транскрипционной активности *RcCDPK1*, *RcCDPK9* и *RcCDPK11* также были выявлены только у 30-дневных каллусов RA4. Изоформа *RcCDPK4* подавлялась в линейной фазе роста клеток RA4 и повышалась при их переходе в стационарную фазу. При этом гены, экспрессия которых не изменилась при трансформации *R. rhizogenes* A4 – *RcCDPK2*, 3, 8, 12 и 13, сохраняли стабильный уровень транскрипционной активности в течение всего периода культивирования. Различия в экспрессии *RcCDPK3*, 5, 10 и 14 между каллусными линиями R и RA4 были одинаковыми на всех исследованных стадиях развития.

Фосфорилирование различных белков протеинкиназами CDPK – важнейший механизм передачи стрессовых сигналов, обеспечивающий развитие защитных реакций растения (Asano et al., 2012a). Чтобы исследовать участие генов *RcCDPK* в pRiA4-индуцированной стрессоустойчивости трансформированных клеток *R. cordifolia*, были проанализированы изменения уровня их экспрессии под влиянием температурного (14°C и 28°C) и солевого стресса (60мМ NaCl) (Рисунок 56). Экспрессия генов *RcCDPK2* и *RcCDPK7* повышалась в контрольной культуре при воздействии температурного стресса, но при этом не менялась при солевом стрессе. Транскрипционная активность *RcCDPK8* индуцировалась только под действием NaCl, но не изменения температуры. При этом экспрессия большинства генов *RcCDPK*, за исключением изоформ *RcCDPK5*, *RcCDPK11* и *RcCDPK13*, оказалась подвержена влиянию как температурного, так и солевого стресса. В клеточной линии RA4 гены *RcCDPK2* и *RcCDPK12* активировались только под действием температурного стресса. Как и в контрольной культуре, экспрессия большинства исследованных изоформ, кроме *RcCDPK1* и *RcCDPK9*, значительно изменялась в линии RA4 под действием абиотических стрессовых факторов.

Характер транскрипционной активности генов *RcCDPK* в контрольной и pRiA4-трансформированной каллусных линиях в условиях стресса различался (Рисунок 56). Уровень экспрессии генов *RcCDPK1* и *RcCDPK9* повышался при стрессе только в линии R, тогда как гены *RcCDPK5*, *RcCDPK11* и *RcCDPK13* в этих условиях были активированы только в клетках RA4. Гены *RcCDPK7*, *RcCDPK8* и *RcCDPK10* показали разнонаправленное изменение экспрессии в контрольных и трансгенных культурах. При воздействии абиотических стрессовых факторов эти изоформы были активированы в культуре R и понижены в клетках RA4. Контрольные и трансформированные каллусы также различались по силе транскрипционного ответа определенных изоформ *RcCDPK* в ответ на стресс. Например, при понижении или повышении температуры и солевом стрессе экспрессия *RcCDPK3* в клетках контрольной культуры повышалась в 1,6, 1,4 и 2,7 раза, а в клетках RA4 – в 3,3, 2,2 и 2,6 раза, соответственно. Экспрессия *RcCDPK4* при пониженной температуре и в присутствии NaCl уменьшалась в контрольной культуре всего в 1,2 раза, тогда как в pRiA4-трансформированных клетках экспрессия этой изоформы была ингибирована в 2,1 раза. В условиях теплового стресса экспрессия *RcCDPK2* индуцировалась в каллусной линии R и RA4 в 1,3 и 2,3 раза, соответственно. В клетках R и RA4 солевой стресс ингибировал транскрипционную активность *RcCDPK14* в 1,2 и 3,1 раза соответственно. Эти результаты свидетельствуют о том, что трансформация *R. rhizogenes* модулирует транскрипционную регуляцию генов *CDPK* в условиях стресса, в результате чего клетки R и RA4 по-разному реагируют на одни и те же факторы.

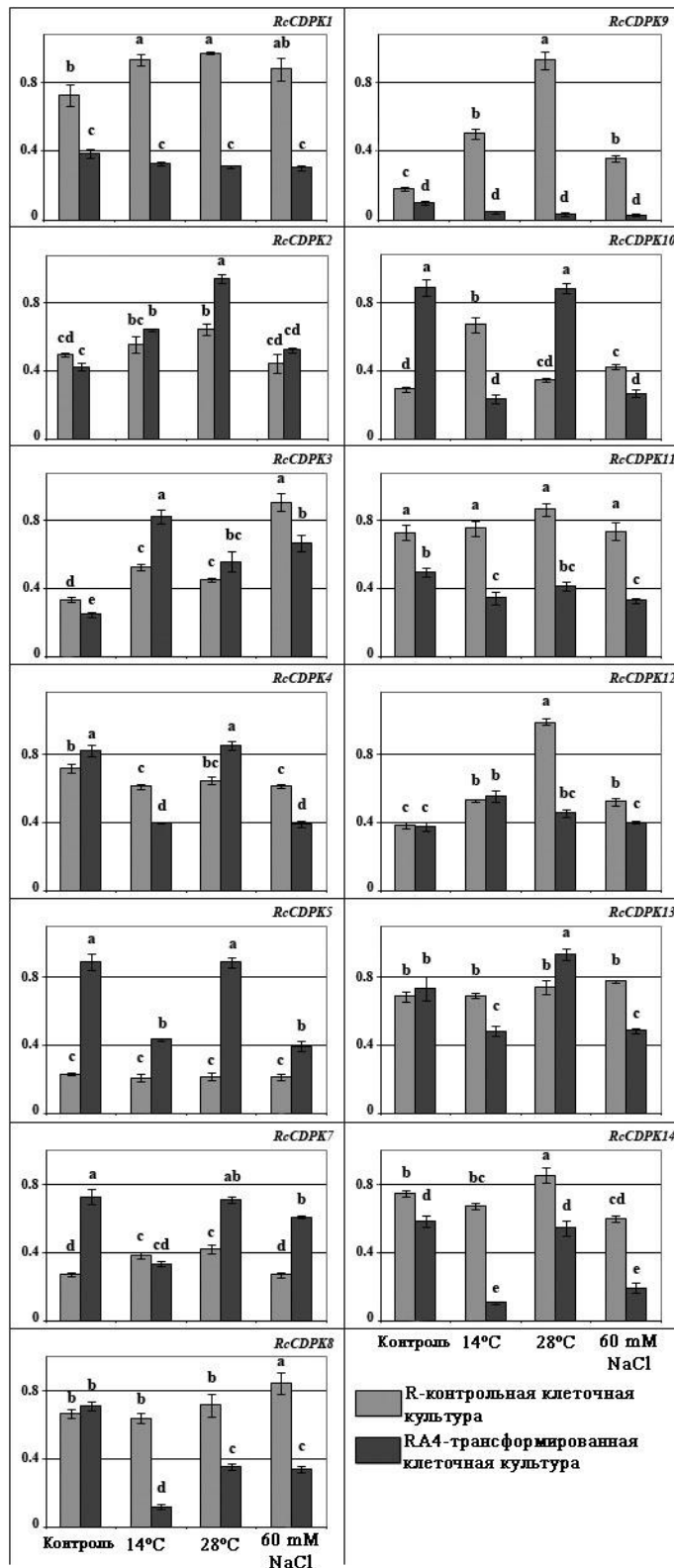


Рисунок 56 – Влияние температурного и солевого стресса на экспрессию генов *CDPK* в контрольных (R) и pRiA4-трансформированных (RA4) каллусных культурах *R. cordifolia*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Чтобы оценить влияние гетерологичной экспрессии *rolB* и *rolC* на гены *RcCDPK*, была изучена их экспрессия в каллусных культурах RBH и RCH (Рисунок 57). В контрольной каллусной линии общий уровень экспрессии всех изоформ *RcCDPK* был в 1,3 и 1,4 раза ниже, чем в *rolB*- и *rolC*-трансгенных линиях, соответственно ($F = 6,52, p < 0,002$). Экспрессия *RcCDPK2*, *RcCDPK7*, *RcCDPK8*, *RcCDPK9* и *RcCDPK11* в *rolB*- и *rolC*-трансгенных культурах была активирована в 1,3–3,5 раза, тогда как экспрессия *RcCDPK10* была в два раза ниже, чем в контрольной культуре. Уровень мРНК *RcCDPK12* под влиянием трансгенов не изменился (Shkryl et al., 2020). Экспрессия *RcCDPK1*, *RcCDPK13* и *RcCDPK14* была активирована *rolB*, а уровень транскрипции *RcCDPK4* и *RcCDPK5* был выше в *rolC*-трансгенных клетках. Ген *rolC* снижал экспрессию гена *RcCDPK3* в 1,3 раза по сравнению с контрольными клетками. Экспрессия транскриптов *RcCDPK6* не была обнаружена ни в контрольных, ни в трансгенных каллусных линиях.

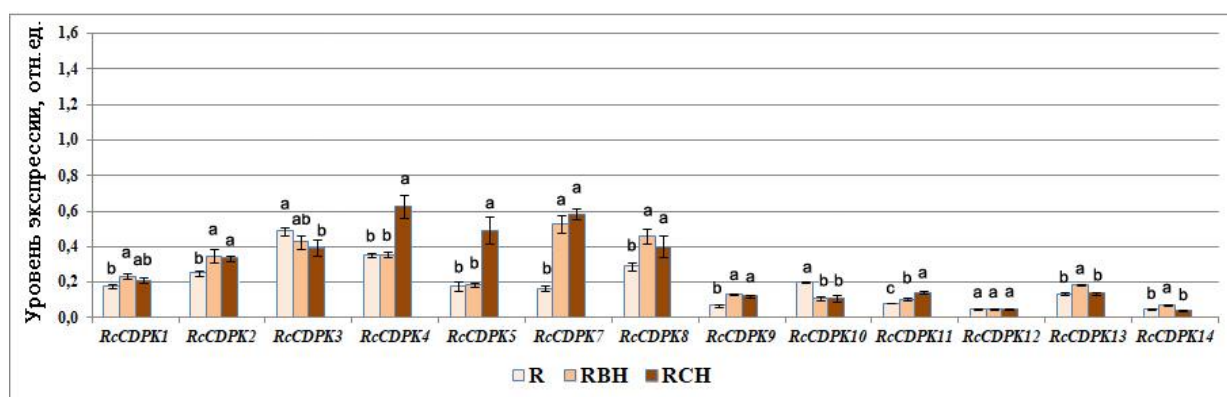


Рисунок 57 – Экспрессия генов *CDPK* в каллусных культурах *R. cordifolia*. R – контрольная клеточная линия; RCH – *rolC*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена; RBH – *rolB*-трансгенная клеточная линия с высоким уровнем экспрессии трансгена. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Экспрессию генов *CDPK* в контрольной и *rol*-трансгенных линиях измеряли на стадии лаг-фазы, экспоненциальной, линейной и стационарной фазы роста клеток (5, 15, 20 и 30 дней, соответственно). По характеру изменения

транскрипционной активности все изоформы *RcCDPK* можно условно разделить на три группы. Первая группа состоит из генов *RcCDPK5*, *RcCDPK8*, *RcCDPK9*, *RcCDPK11* и *RcCDPK13*, экспрессия которых со временем увеличивалась и достигала максимальных значений к концу цикла культивирования (Таблица 18). Вторая группа включает *RcCDPK1*, *RcCDPK2*, *RcCDPK10* и *RcCDPK12*, транскрипционная активность которых практически не менялась в процессе роста клеток (Таблица 18). К третьей группе отнесены гены, экспрессия которых в каллусных культурах демонстрировала различную динамику. Транскрипционная активность генов *RcCDPK4* и *RcCDPK14* увеличивалась в процессе роста каллусных линий RCH или RBH, соответственно. Экспрессия *RcCDPK7* со временем возрастала в обоих *rol*-трансгенных культурах, но не в контроле. Экспрессия *RcCDPK3* в течение пассажа увеличивалась в трансгенных культурах, но при этом снижалась в контрольных каллусных клетках.

Влияние экспрессии генов *rol* на транскрипционные изменения *RcCDPK* не были постоянными на разных стадиях развития каллусных линий *R. cordifolia*. Например, повышенная экспрессия генов *RcCDPK1*, *RcCDPK4*, *RcCDPK8*, *RcCDPK9*, *RcCDPK11*, *RcCDPK13* и *RcCDPK14* наблюдалась только в конце культивирования. Транскрипция изоформы *RcCDPK3* в трансгенных культурах на 5-ый день культивирования была вдвое ниже контроля, однако эта разница значительно сократилась к концу пассажа. Ген *RcCDPK12*, транскрипция которого не изменилась при генетической трансформации клеток, демонстрировал стабильный уровень экспрессии в течение всего периода культивирования. Различия в экспрессии *RcCDPK2*, *RcCDPK5*, *RcCDPK7* и *RcCDPK10* между контрольным и трансгенным каллусами были одинаковыми на всех исследованных стадиях роста клеток.

Таблица 18 – Динамика экспрессии генов *CDPK* в контрольной и трансгенных каллусных линиях *R. cordifolia*

	5 дней			15 дней			20 дней			30 дней		
	R	RBH	RCH	R	RBH	RCH	R	RBH	RCH	R	RBH	RCH
<i>RcCDPK1</i>	0,193 ± 0,005	0,193 ± 0,008	0,203 ± 0,003	0,197 ± 0,013	0,185 ± 0,006	0,176 ± 0,006	0,185 ± 0,009	0,185 ± 0,011	0,187 ± 0,005	0,173 ± 0,011	0,233 ± 0,014	0,210 ± 0,016
<i>RcCDPK2</i>	0,221 ± 0,009	0,328 ± 0,029	0,246 ± 0,009	0,216 ± 0,007	0,343 ± 0,019	0,261 ± 0,015	0,211 ± 0,016	0,323 ± 0,009	0,252 ± 0,004	0,250 ± 0,012	0,347 ± 0,039	0,335 ± 0,18
<i>RcCDPK3</i>	0,747 ± 0,035	0,383 ± 0,006	0,340 ± 0,013	0,535 ± 0,010	0,462 ± 0,007	0,402 ± 0,014	0,668 ± 0,086	0,513 ± 0,020	0,515 ± 0,019	0,487 ± 0,024	0,425 ± 0,039	0,393 ± 0,046
<i>RcCDPK4</i>	0,312 ± 0,017	0,339 ± 0,011	0,364 ± 0,011	0,312 ± 0,021	0,337 ± 0,024	0,482 ± 0,021	0,338 ± 0,015	0,377 ± 0,014	0,546 ± 0,028	0,354 ± 0,013	0,356 ± 0,016	0,628 ± 0,067
<i>RcCDPK5</i>	0,103 ± 0,017	0,088 ± 0,010	0,134 ± 0,002	0,096 ± 0,003	0,094 ± 0,015	0,207 ± 0,012	0,109 ± 0,022	0,103 ± 0,005	0,252 ± 0,014	0,193 ± 0,030	0,182 ± 0,011	0,492 ± 0,076
<i>RcCDPK7</i>	0,172 ± 0,006	0,247 ± 0,012	0,230 ± 0,025	0,152 ± 0,014	0,307 ± 0,015	0,282 ± 0,012	0,147 ± 0,021	0,323 ± 0,012	0,303 ± 0,020	0,166 ± 0,013	0,526 ± 0,050	0,582 ± 0,030
<i>RcCDPK8</i>	0,125 ± 0,009	0,130 ± 0,018	0,128 ± 0,010	0,133 ± 0,019	0,192 ± 0,020	0,191 ± 0,010	0,122 ± 0,004	0,237 ± 0,023	0,213 ± 0,021	0,289 ± 0,025	0,456 ± 0,042	0,401 ± 0,069
<i>RcCDPK9</i>	0,035 ± 0,002	0,033 ± 0,002	0,036 ± 0,005	0,038 ± 0,002	0,037 ± 0,004	0,041 ± 0,004	0,045 ± 0,006	0,064 ± 0,008	0,064 ± 0,007	0,068 ± 0,007	0,131 ± 0,006	0,123 ± 0,007
<i>RcCDPK10</i>	0,214 ± 0,007	0,106 ± 0,011	0,101 ± 0,005	0,203 ± 0,015	0,098 ± 0,014	0,107 ± 0,012	0,200 ± 0,033	0,080 ± 0,011	0,084 ± 0,011	0,191 ± 0,011	0,106 ± 0,012	0,108 ± 0,017
<i>RcCDPK11</i>	0,049 ± 0,004	0,061 ± 0,005	0,072 ± 0,007	0,049 ± 0,003	0,064 ± 0,013	0,089 ± 0,010	0,056 ± 0,003	0,067 ± 0,006	0,092 ± 0,007	0,079 ± 0,003	0,104 ± 0,008	0,143 ± 0,009
<i>RcCDPK12</i>	0,057 ± 0,012	0,026 ± 0,002	0,059 ± 0,004	0,046 ± 0,007	0,031 ± 0,004	0,047 ± 0,006	0,043 ± 0,005	0,027 ± 0,001	0,035 ± 0,006	0,050 ± 0,002	0,050 ± 0,003	0,047 ± 0,003
<i>RcCDPK13</i>	0,109 ± 0,002	0,108 ± 0,002	0,108 ± 0,013	0,106 ± 0,008	0,102 ± 0,007	0,100 ± 0,006	0,104 ± 0,010	0,102 ± 0,006	0,097 ± 0,004	0,136 ± 0,006	0,184 ± 0,005	0,138 ± 0,007
<i>RcCDPK14</i>	0,041 ± 0,002	0,039 ± 0,002	0,022 ± 0,002	0,039 ± 0,002	0,038 ± 0,003	0,024 ± 0,002	0,040 ± 0,004	0,047 ± 0,002	0,026 ± 0,003	0,046 ± 0,002	0,074 ± 0,003	0,043 ± 0,002

R – контрольная клеточная линия *R. cordifolia*; RBH и RCH – *rolB*- и *rolC*-трансгенные клеточные линии *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена. Заливка ячейки цветом указывает на статистически значимые различия средних значений в столбцах ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера. Цвет фона варьирует в зависимости от количественных изменений экспрессии генов *RcCDPK* в линиях RBH и RCH по отношению к линии R в определенный день культивирования в соответствии со шкалой:

↓>2	↓<2	0	↑<2	↑>2
-----	-----	---	-----	-----

3.5.4. Обсуждение результатов по влиянию генов *rol* на экспрессию *CDPK*

Ранее с помощью фармакологического подхода были выявлены некоторые различия в функционировании кальциевой сигнальной системы между контрольной и *rol*-трансгенными культурами *R. cordifolia* (Bulgakov et al., 2003). В частности, было установлено, что клетки, экспрессирующие ген *rolC*, обладали меньшей устойчивостью к верапамилу, ингибитору кальциевых каналов L-типа, чем обычная культура, в то время как *rolB*-трансгенная культура была более устойчива к этому препарату. Кроме того, рост *rolC*-культуры полностью подавлялся на питательной среде без ионов Ca^{2+} , в то время как рост *rolB*-культуры снижался незначительно (Bulgakov et al., 2003). Очевидно, что такие эффекты должны включать модификацию киназных реакций, которые регулируют активность различных субстратов, функционирующих ниже по течению и определяющих функциональные особенности трансгенных клеток. Важнейшими сенсорами ионов Ca^{2+} в клетке являются представители семейства кальций-зависимых протеинкиназ, которые интегрируют взаимодействие между различными сигнальными путями (Cheng et al., 2002; Ludwig et al., 2004; Harper and Harmon, 2005). В литературе имеются сведения, указывающие на участие *CDPK*-индуцированного фосфорилирования белков в активном росте «волосатых» корней *Daucus carota* (Kato et al., 2007). Эти результаты предполагают участие кальций-зависимых протеинкиназ в процессах *rol*-опосредованной модуляции биохимических и физиологических изменений.

Трансформация клеток марены сердцелистной как отдельными генами *rol*, так и диким штаммом *R. rhizogenes* A4 вызывала значительные изменения в профиле экспрессии генов *RcCDPK*. При этом в ответ на интеграцию T-ДНК pRiA4 транскрипция 4-х изоформ *RcCDPK* была активирована, тогда как экспрессия 5-ти изоформ снижалась. Сверхэкспрессия генов *rol* вызывала тот или иной транскрипционный ответ у 12 из 14 исследованных изоформ. Интересно отметить, что совокупный уровень экспрессии *RcCDPK* во всех трансгенных линиях одинаково повышался примерно в 1,4 раза по сравнению с контролем. При этом паттерн изменений отдельных изоформ в линиях RBH, RCH и RA4

значительно варьировал. Экспрессия *RcCDPK1*, *RcCDPK9*, *RcCDPK10*, *RcCDPK11* и *RcCDPK14* имела противоположные изменения в pRiA4- и *rol*-трансформированных каллусах. Например, экспрессия *RcCDPK10* в pRiA4-трансформированных каллусах была повышена по сравнению с контрольными клетками, в то время как в обеих *rol*-экспрессирующих культурах она была снижена. Напротив, в каллусах RA4 наблюдалось снижение уровней экспрессии *RcCDPK1*, *RcCDPK9*, *RcCDPK11* и *RcCDPK14*, однако, в *rolB*- и *rolC*-трансформированных клетках их транскрипционная активность была выше контроля. Экспрессия *RcCDPK2*, *RcCDPK8* и *RcCDPK13* оставалась неизменной после трансформации диким штаммом *R. rhizogenes* A4, но активировалась в *rol*-трансгенных культурах. Сходный паттерн экспрессии кальций-зависимых протеинкиназ в *rol*- и pRiA4-трансформированных клетках был обнаружен для *RcCDPK3*, *RcCDPK4*, *RcCDPK5*, *RcCDPK7* и *RcCDPK12*. Наблюдаемые отличия эффектов трансгенеза могут быть вызваны тем, что в культурах RBH и RCH транскрипцию генов *rol* обеспечивает сильный вирусный промотер 35S CaMV, тогда как в линии RA4 все гены находятся под контролем их собственных регуляторных систем. Уровни экспрессии *rolB* и *rolC* в RBH и RCH были, соответственно, в 2,8 и 2,0 раза выше, чем в RA4 (Shkryl et al., 2008), что может сказываться на выраженности эффектов. Более того, очевидно, что другие гены, входящие в состав T-ДНК, также могут оказывать собственное влияние на экспрессию кальций-зависимых протеинкиназ, однако литературные сведения на этот счет пока отсутствуют.

Интересно, что среди тех изоформ, которые оказались не подвержены влиянию агробактериальной трансформации, была выявлена изоформа *RcCDPK6*, которая является близким гомологом гена *MtCPK3* из люцерны (идентичность по аминокислотной последовательности 79%). Из литературных данных известно, что *MtCPK3* участвует в симбиотических взаимодействиях *M. truncatula* с бактерией *S. meliloti*, регулируя количество образующихся корневых клубеньков (Gargantini et al., 2006). Отсутствие транскрипционного ответа данной изоформы у клеток *R. cordifolia*, трансформированных *R. rhizogenes*, может быть связано как с

видоспецифичностью реакции, так и с различием во взаимодействии растений с данными видами бактерий. Показано, что экспрессия *MtCPK3* в процессе нодуляции имеет два выраженных пика: первый через 10–15 минут после обработки бактериями и второй по прошествии 3–4 суток (Gargantini et al., 2006). Авторы предположили, что функция *MtCPK3* важна только на ранних этапах нодуляции и не играет существенной роли в поддержании бобово-ризобияльного симбиоза (Gargantini et al., 2006). Таким образом, можно предположить, что специфический ответ *RcCDPK6* мог произойти в трансформированных клетках на ранней стадии заражения агробактериями, а в дальнейшем подавляться в процессе долговременного культивирования трансгенных клеточных линий.

Известно, что кальций-зависимые протеинкиназы регулируют образование АФК в клетках растений (Kobayashi et al., 2007). Гетерологичная экспрессия гена *AtCPK1* в протопластах томата повышает активность НАДФН-оксидазы и приводит к окислительному взрыву (Xing et al., 2001; Bulgakov et al., 2011). Сходным образом, гетерологичная экспрессия *StCDPK5* в листьях табака индуцирует продукцию АФК посредством фосфорилирования НАДФН-оксидазы (Kobayashi et al., 2007). Уровень экспрессии изоформ *RcCDPK3* и *RcCDPK11*, являющихся ближайшими гомологами генов *StCDPK5* (идентичность 81%) и *AtCDPK1* (идентичность 91%), в клетках RA4 был, соответственно, в 1,4 и 1,5 раза ниже, чем в контрольных каллусах. Индивидуальная экспрессия генов *rol* также приводила к подавлению транскрипционной активности изоформы *RcCDPK3*, тогда как экспрессия *RcCDPK11* незначительно повышалась. Другим примером регуляторной функции кальций-зависимых протеинкиназ является участие изоформы *MtCDPK1* в процессе ризобияльной и микоризной колонизации корней *M. truncatula* (Ivashuta et al., 2005). Установлено, что сайленсинг этого гена приводит к нарушению симбиотического взаимодействия, а также вызывает повышение уровня АФК и активацию защитных генов растения. У *R. cordifolia* ближайший гомолог данного гена, изоформа *RcCDPK7* (идентичность 88%), была значительно активирована в *rolB*-, *rolC*- и pRiA4-трансгенных каллусных линиях. Результаты проведенного анализа показали, что снижение продукции АФК,

вызванное агробактериальными генами, связано с подавлением экспрессии *RcCDPK3* и *RcCDPK11*, а также повышением транскрипционной активности *RcCDPK7*.

Было установлено, что некоторые изоформы кальций-зависимых протеинкиназ также участвуют и в детоксикации АФК, посредством активации различных антиоксидантных систем (Asano et al., 2012b; Ding et al., 2013). Например, гетерологичная экспрессия гена *OsCPK12* в клетках риса индуцирует экспрессию аскорбатпероксидаз и подавляет экспрессию НАДФН-оксидаз, что повышает устойчивость растений к неблагоприятным факторам за счет снижения общей продукции АФК (Asano et al., 2012b). Транскрипция ближайшего гомолога этого гена в растении *R. cordifolia* – *RcCDPK5* (идентичность 86%) – в каллусах RA4 активировалась в 3,9 раза, что является наиболее выраженным эффектом трансформации Т-ДНК дикого типа. Также значительная индукция экспрессии *RcCDPK5* обнаружена и в *rolC*-трансгенной культуре. Интересно, что стрессовые воздействия оказывали различное влияние на *RcCDPK5* в контрольных и трансгенных линиях. В культуре R экспрессия данной изоформы оставалась стабильной при любом воздействии, тогда как в pRiA4-трансформированной линии снижалась в ответ на холод и солевой стресс. Однако даже в этих условиях транскрипционный уровень *RcCDPK5* в RA4, как минимум, в 2 раза превышал таковой у контрольной культуры.

Субстратная специфичность различных представителей семейства кальций-зависимых протеинкиназ пока слабо изучена, что затрудняет интерпретацию функциональной значимости всех идентифицированных изоформ CDPK в трансгенных культурах. При этом полученные в данной работе результаты однозначно указывают на их важную роль в процессе трансформации растительных клеток, опосредованной как отдельными генами *rol*, так и генами в составе полноразмерной Т-ДНК агробактерий pRiA4. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что агробактериальные гены, в первую очередь, *rolB* и *rolC*, обеспечивают негативную регуляцию изоформ CDPK, участвующих в продукции АФК, и в то же время оказывают

положительное влияние на изоформы *CDPK*, ответственные за детоксикацию АФК. Вероятно, этот механизм вовлечен в подавление АФК, индуцируемое горизонтальным переносом генов *R. rhizogenes* в клетки растений, и обеспечивает повышение их устойчивости к абиотическим стрессовым факторам.

3.6. Влияние гена *rolB* на молекулярный механизм биогенеза микроРНК

Известно, что белок *bb* из *Ti* плазмиды *R. radiobacter* напрямую взаимодействует с ключевыми компонентами комплексов *DCL1-SE-HYL1* и *RISC/AGO1*, отвечающими за биогенез малых некодирующих РНК, подавляя способность растительных клеток к РНК-интерференции (Wang et al., 2011). Поскольку гены *rol* и *bb* относятся к одному семейству онкогенов *plast* (Otten, 2018), было изучено воздействие *rolB* на функционирование данных систем в трансгенных клетках.

В культуре ABL транскрипционная активность *DCL1*, *HYL1* и *SE* была слегка увеличена или не изменилась по сравнению с контрольной культурой (Рисунок 58). В клетках АВН было обнаружено 2–7-кратное увеличение транскриптов *DCL1*, *HYL1* и *SE*. Увеличение транскрипционной активности всех трех ключевых генов, участвующих в процессинге микроРНК, указывает на то, что молекулярный аппарат транскрипции и созревания первичных транскриптов микроРНК в *rolB*-трансгенных культурах гиперактивирован.

РНК-связывающие белки *TGH* и *DDL*, необходимые для функционирования модуля *DCL1-SE-HYL1* (Ren and Yu, 2012; Bologna and Voinnet, 2014). *DDL* взаимодействует с *DCL1*, способствуя распознаванию пре-микроРНК с помощью *DCL1* (Bologna, Voinnet, 2014). Установлено, что экспрессия как *TGH*, так и *DDL* была увеличена в клетках с высоким уровнем трансгена (Рисунок 58), что дополнительно подтверждает активацию пути биогенеза микроРНК комплексом *DCL1-SE-HYL1*.

Экспрессия *DCL2* и *DCL3* в *rolB*-трансгенных клетках была сопоставима с контрольным уровнем (Рисунок 58). Это означает, что *rolB* не влияет на *DCL2*-или *DCL3*-зависимые процессы биогенеза микроРНК. Известно, что изоформы *DCL* опосредуют разные пути биогенеза микроРНК: *DCL2* и *DCL3* отвечают за

образование популяции малых интерферирующих РНК длиной 22 и 24 п.н., соответственно, тогда как DCL1 продуцирует молекулы длиной 21 п.н. (Henderson et al., 2006).

РНК-метилтрансфераза HEN1 метилирует зрелые молекулы малых интерферирующих РНК и микроРНК, что препятствует их энзиматической деградации (Ji and Chen, 2012). Известно, что активация экспрессии *HEN1* под действием света приводит к существенному увеличению общего уровня микроРНК в клетках (Tsai et al., 2014). Экспрессия *HEN1* повышалась в трансгенных клетках более чем в 2 раза (Рисунок 58), что указывает на роль *rolB* не только в созревании, но также и в стабилизации микроРНК. Растительный гомолог экспортина-5, белок HST, играет важную роль в ядерно-цитоплазматическом транспорте пре-микроРНК (Bollman et al., 2003). Было обнаружено, что ген *rolB* не влиял на экспрессию *HST* (Рисунок 58).

Экспрессия *AGO1* в культуре АВН была увеличена в 3,5 раза (Рисунок 58), что свидетельствует об активации комплекса RISC/AGO1. Вероятно, *rolB* может активировать не только формирование и стабилизацию, но и функционирование микроРНК (связывание с мРНК-мишенями и подавление экспрессии генов-мишеней), что свидетельствует об активации всего пути биогенеза микроРНК. Кроме того, в клетках с высоким уровнем экспрессии *rolB* была в 2,7 раза индуцирована транскрипционная активность гена *AGO4*, и в 2,5 раза – гена *RDR2*. *AGO4* в комплексе с белком *RDR2* (РНК-зависимая РНК полимеразы 2) является основным эффектором РНК-направленного метилирования ДНК (Böhmdorfer et al., 2014; Bologna and Voinnet, 2014).

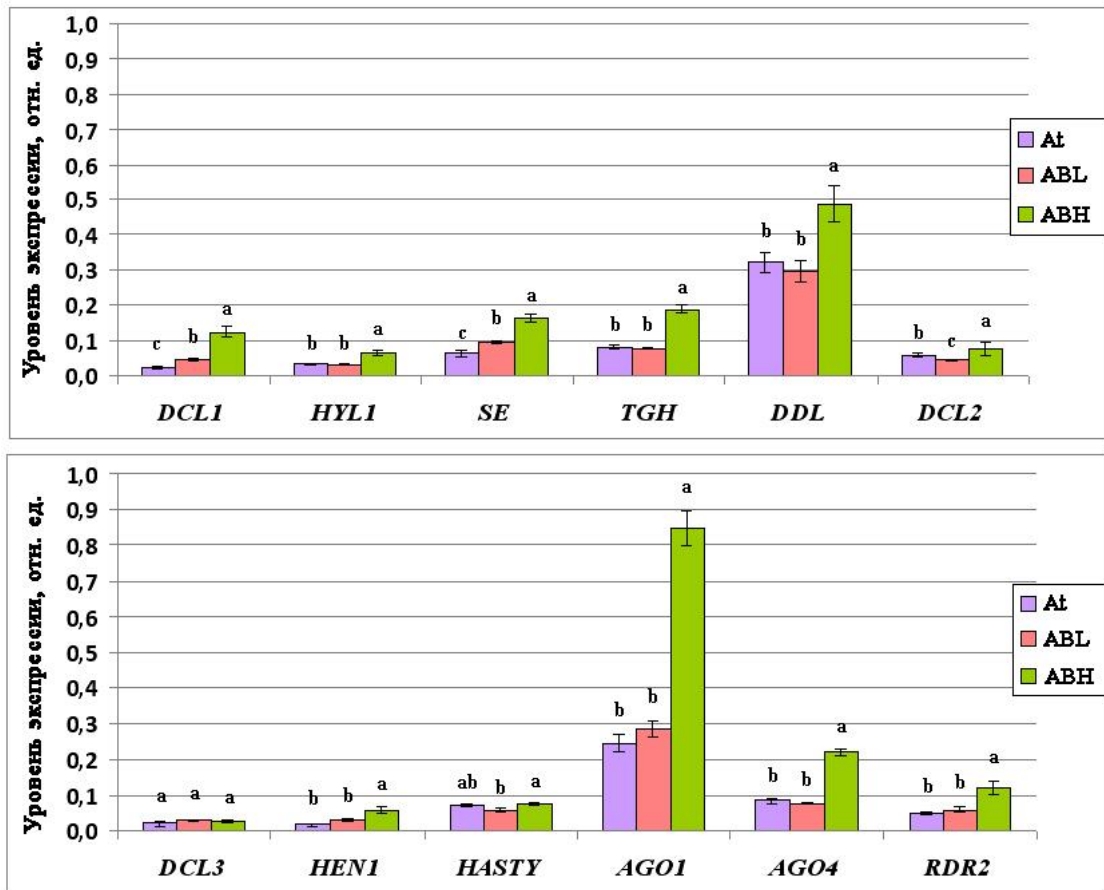


Рисунок 58 – Экспрессия генов, регулирующих биогенез малых некодирующих РНК, в контрольных (At) и трансгенных каллусных культурах *A. thaliana* с низким и высоким уровнем *rolB* (ABL и ABH соответственно). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Разные буквы над столбцами указывают на статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), НЗР-тест Фишера.

Наблюдаемое повышение экспрессия *DCL1*, *SE*, *HYL1*, *AGO1*, *TGH*, *DDL* и *HEN1* в *rolB*-трансформированных клетках потенциально должно вызывать общую активацию биогенеза микроРНК (Bulgakov et al., 2015). В научной литературе описаны различные случаи, когда микроРНК в растениях индуцируются в ответ на определенные условия. К примеру, *miR393* и *miR166* активируются в реакции на инактивированные нагреванием гифы гриба *Phytophthora sojae* (Wong et al., 2014), в то время как вирусная инфекция инициирует активацию *miR164a* (Bazzini et al., 2009). Интересные результаты были получены при изучении *miR319* в *Oryza sativa*: его сверхэкспрессия ведет к улучшению солеустойчивости, устойчивости к холоду и засухе, а также к

морфологическим изменениям в проростках трансгенного риса (Yang et al., 2013; Zhou et al., 2013). Повышенная экспрессия *miR169* в помидорах усиливает их засухоустойчивость (Zhang et al., 2011). Растения *A. thaliana* с повышенной экспрессией *miR168a* демонстрируют повышенную чувствительность к абсцизовой кислоте и устойчивость к засухе (Li et al., 2012). А сверхэкспрессия *miR172* способствует удлинению листьев у взрослых растений, а также стимулирует рост корней и гипокотилей (Kim et al., 2014). Также было показано, что сверхэкспрессия *miR171* влияет на развитие цветочной меристемы у ячменя (Curaba et al., 2013). В последнее время увеличивается количество данных, указывающих на важную регуляторную роль микроРНК в метаболизме АФК как в животных, так и в растительных клетках (Sunkar et al., 2006; Wang et al., 2010; Guleria et al., 2011; Kulcheski et al., 2011; Khraiweh et al., 2012; Jaksik et al., 2014; Dando et al., 2015). Дальнейшее исследование для этой взаимосвязи в контексте онкогенов растений, позволит лучше понять комплексные процессы, происходящие в трансформированных клетках на молекулярном уровне, и их влияние на растительный организм.

Интересная гипотеза о функциональной схожести ДНК-вирусов с Т-ДНК агробактерий в контексте их влияния на биогенез микроРНК была выдвинута Wang и соавторами (2011). В этой работе был выявлен целый ряд общих морфологических свойств между *bb*-трансгенными растениями и растениями, экспрессирующими вирусный ген *2b*, кодирующий супрессор РНК-сайленсинга и подавляющий иммунитет хозяина. Кроме того, *bb*-трансгенные растения имели сниженный уровень экспрессии *miR162*, *miR164* и *miR319*, а также проявляли фенотип, характерный для одиночных мутантов *se-1* и *ago1-27*. Это наблюдение побудило исследователей изучить потенциальные прямые взаимодействия между АК6b, SE и AGO1. Результаты показали, что белок 6b осуществляет свою супрессорную роль, напрямую воздействуя на SE и AGO1 — два ключевых компонента в механизме биогенеза микроРНК у *A. thaliana*. Таким образом, было выдвинуто предположение о важности комплексов RISC/AGO1 и DCL1-SE-HYL1 в процессе сайленсинга генов, индуцированном вирусами. РНК-сайленсинг в

растениях служит барьером против накопления вирусов, что привело к развитию вирусами многочисленных стратегий преодоления этого защитного механизма (Vaulcombe, 2004). Механизм контрзащиты включает в себя белки-супрессоры сайленсинга, кодируемые как РНК-, так и ДНК-вирусами. Эти белки, вероятно, развились независимо в различных группах вирусов, так как они структурно разнообразны и не имеют общих мотивов. Функциональная аналогия между 6b и белками-супрессорами вирусов, такими как 2b, P0, HcPro, P19 и др., подразумевает, что растительные онкогены могут подавлять врожденный иммунитет трансформированных клеток.

Стоит заметить, что идея о функциональной схожести генов *rol* и вирусных генов также не раз возникала в научной литературе. В частности, Moriuchi и соавторы (2004) высказали предположение, что несмотря на разнообразие мишеней, большинство RolB-подобных белков могут взаимодействовать с белками растений, влияющими на пластичность их развития аналогично вирусным онкопротеинам в животных клетках. Недавно в ходе анализа потенциальных мишеней белок-белковых взаимодействий RolB в «волосатых» корнях томата было идентифицировано несколько РНК-связывающих и редактирующих факторов, включая белок AGO (Gryffroy et al., 2023). Белок AGO томата является гомологом AGO10 *A. thaliana*, который репрессирует активность miR165/166 для поддержания гомеостаза ствольных клеток в апикальной меристеме побега и цветочной меристеме растения (Zhang et al., 2020). Это наблюдение согласуется с ранее установленным феноменом активации формирования цветочных и корневых меристем в клеточной культуре табака под действием *rolB* (Altamura et al., 1994).

Заражение растений патогеном *R. radiobacter* вызывает заметное, хотя и не полностью изученное влияние на процесс биогенеза малых некодирующих РНК. Исследования показали, что процесс трансформации, инициируемый агробактериями, сопровождается подавлением механизма РНК-сайленсинга в клетках растения-хозяина (Dunoyer et al., 2006). Однако этот эффект не оказывал значительного влияния на биогенез микроРНК, который продолжает

функционировать даже в инфицированных клетках. Например, в исследовании Pruss и соавторов (2008) было обнаружено, что инфицирование табака вирулентным штаммом *R. radiobacter* C58 вызывает активацию экспрессии *miR393*, подавляющей ауксиновую сигнальную систему и препятствующей гормон-зависимой трансформации клеток. Изучение процессов сайленсинга генов, вызванных вирусами и Т-ДНК-медиаторами, проведенное Dunoer и соавторами (2006), привело к интересным выводам. Анализируя штаммы *R. radiobacter* A281 с плазмидой pTiBo542 и A208 с плазмидой pTiT37 в сравнении с контрольным штаммом GV3101, исследователи обнаружили, что успешная инфекция *R. radiobacter* зависит от подавления растительного иммунного ответа, опосредованного РНК-интерференцией. Участие РНК-сайленсинга оказалось значительным только на ранних стадиях инфекции, но по мере развития неопластической трансформации растительных клеток он становился менее активным. Хотя эти наблюдения отчасти противоречат гипотезе о функциональном сходстве Т-ДНК с ДНК-вирусами, этот вопрос остается значимым для дальнейшего исследования.

3.7. Влияние гена *rolB* на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией и защитой растений

Для понимания механизмов, лежащих в основе *rolB*-индуцированных изменений в гормональной и защитной системах, был осуществлен поиск и анализ среди белков-регуляторов, обеспечивающих контроль над реализацией соответствующих процессов, и изучена их транскрипционная активность (Bulgakov et al., 2018). Полученные данные позволили реконструировать сеть белок-белковых взаимодействий, которые могут быть задействованы в множественных эффектах, индуцируемых геном *rolB* (Рисунок 59). Из группы активированных белков нас заинтересовали представители белков теплового шока (HSP, heat shock proteins), а также белки семейства шаперонов – шаперонины (Cpn). Белки комплекса HSP/шаперонов, мишенями для которых выступают различные компоненты первичного метаболизма и сигнальных каскадов,

обеспечивают регуляцию функциональных процессов в клетке, как в нормальных условиях, так и при реакциях на стрессовые воздействия (Jacob et al., 2017).

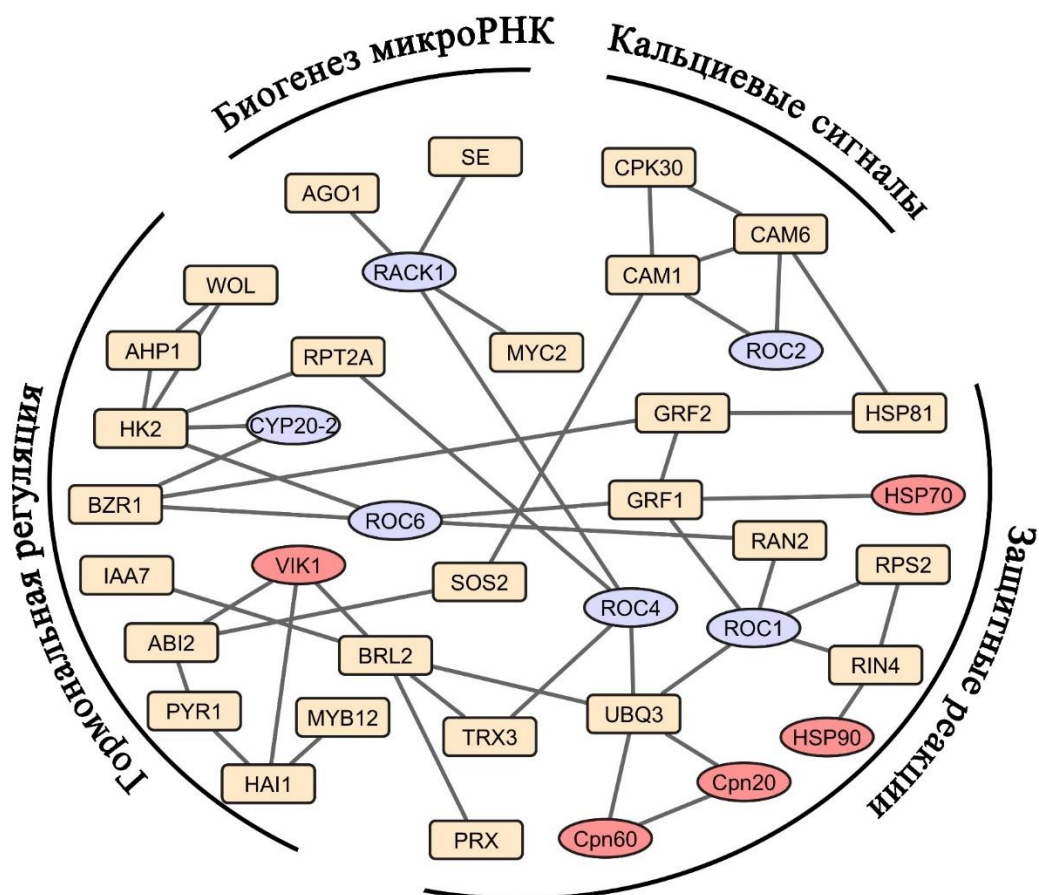


Рисунок 59 – Сеть белок-белковых взаимодействий, вовлеченных в *rolB*-опосредованную регуляцию различных клеточных процессов.

Представители шаперонинов, *Cpn10* и *Cpn60*, были значительно активированы в *rolB*-трансгенной культуре *A. thaliana* (Рисунок 60). При этом транскрипционная активность гена *TCP-1*, кодирующего шаперонин-содержащий Т-комплексный полипептид 1, в культуре АВН не изменилась (Рисунок 60). Семейство белков Hsp70 делится на два подсемейства: DnaK и Hsp110/SSE (Jungkunz et al., 2011). Транскрипционная активность *Hsp70-6* и *Hsp70-7* (подсемейство DnaK, хлоропластные изоформы) была значительно повышена в *rolB*-трансгенных клетках. Другие белки Hsp70, такие как *Hsp70-10* (подсемейство DnaK, митохондриальная изоформа), а также *Hsp70-14* и *Hsp70-15* (подсемейство Hsp110/SSE, цитозольные изоформы), не отличались на транскрипционном уровне в контрольной и трансгенной культуре (Рисунок 60).

Экспрессия представителя семейства белков Hsp90, гена *Hsp90-2*, в линии АВН также осталась неизменной. Интересно отметить, что *rolB* оказал влияние только на хлоропластные формы белков теплового шока *A. thaliana*, такие как *Hsp70-6*, *Hsp70-7*, *Hsp90-5*. Это наблюдение подтверждается исследованием, в котором показано, что *rolB*-трансформированные растения томата обладали повышенным уровнем экспрессии генов хлоропластных *Hsp* по сравнению с нормальными растениями (Bettini et al., 2016b). Hsp70 высоко консервативны у эукариот, и некоторые их функции у животных и растений схожи. Было обнаружено, что у животных сверхэкспрессия *Hsp70* обеспечивает повышенную выживаемость опухолевых клеток благодаря своей способности ингибировать разнообразные пути клеточной гибели, включая апоптоз (Murphy, 2013). В случае с геном *rolB* наблюдается аналогичная ситуация, когда увеличение экспрессии генов *Hsp70* сопровождается подавлением запрограммированной клеточной гибели трансгенных клеток (Gorpenchenko et al., 2012). Известно, что Hsp70 вместе с другими шаперонами контролируют нормальный фолдинг белков и предотвращает их агрегацию при неблагоприятных условиях (Jacob et al., 2017). Трансгенные растения *A. thaliana*, экспрессирующие ген *Hsp70*, проявляли повышенную устойчивость к тепловому, осмотическому и солевому стрессу (Montero-Barrientos et al. 2010). Таким образом, *rolB*-индуцированная активация белков теплового шока обеспечивает благоприятные условия для неопластической трансформации и роста растительной ткани.

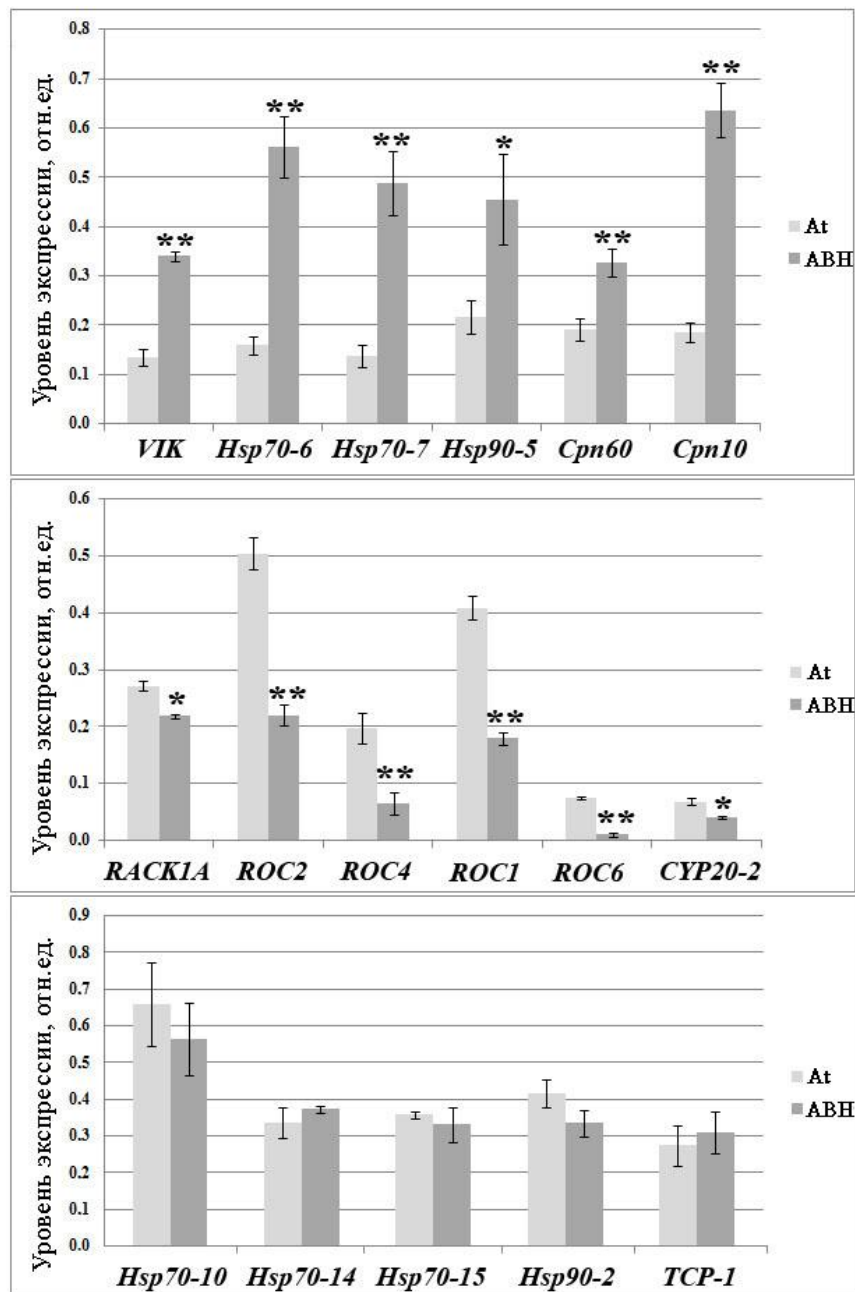


Рисунок 60 – Экспрессия регуляторных генов в контрольных (At) и трансгенных каллусах *A. thaliana* с высоким уровнем экспрессии *rolB* (ABH). Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * Статистически значимые различия средних значений ($p < 0,05$), t -тест Стьюдента.

Анализ экспрессии гена киназы, взаимодействующей с VH1 (*VIK*, VH1-interacting kinase), выявил почти 3х-кратную активацию транскрипционной активности под действием белка RolB (Рисунок 60). Белок *VIK* играет важную роль в различных биологических процессах растений. Он участвует в ауксин-активируемом сигнальном пути, защитном ответе на микробные элиситоры, негативной регуляции программируемой клеточной гибели, регуляции

гиперчувствительного ответа растений и ответах на холодовой и осмотический стресс (Ceserani et al., 2009). Интересно, что многие из этих процессов осуществляются в клетках, экспрессирующих ген *rolB*, что указывает на их взаимосвязь в регуляции физиологических ответов растений.

Некоторые представители семейства циклофилинов (пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы), такие как CYP18-3 (ROC1), CYP19-2 (ROC6), CYP19-3 (ROC2), CYP20-2 и CYP20-3 (ROC4), подавлялись в *rolB*-трансгенных клетках. Данные белки относят к одному семейству близкородственных циклофилинов, участвующих в рефолдинге и поддержании оптимальной конформации различных белков (Romano et al., 2004). ROC1 связан с развитием эффектор-активированного иммунитета растений, а также опосредуют импорт белков в ядра и клеточный ответ на солевой стресс (Shin et al., 2011; Li et al., 2014). ROC2 физически взаимодействует с кальмодулинами и таким образом влияет на широкий спектр реакций, контролируемых этими белками (Kaur et al., 2015). ROC4 связывает окислительно-восстановительные и световые сигналы с биосинтезом цистеина и стрессовыми реакциями в хлоропластах (Dominguez-Solis et al., 2008) и известен как ключевой белок-эффектор, связывающий гормональную сигнализацию с биосинтезом аминокислот и окислительно-восстановительным гомеостазом во время стрессовых реакций (Park et al., 2013). Снижение уровня ROC4 в трансформированных клетках могло привести к изменению иммунного статуса клеток. ROC6 (CYP19-2) и CYP20-2 взаимодействуют с транскрипционным репрессором BZR1 и цитокининовой сигнальной системой (Zhang et al., 2013), что свидетельствует об участии *rolB* в гормональной сигнализации и может объяснить многочисленные цитокинин-зависимые морфологические изменения, наблюдаемые у *rolB*-трансформированных растений *A. thaliana* (Kodahl et al., 2016). Повышенная экспрессия белков семейства шаперонинов в *rolB*-трансформированных каллусах также может быть связана со снижением экспрессии циклофилинов. О функциональной связи белков теплового шока с циклофилинами у растений известно мало, но в исследованиях на животных и человеке связи такого типа были продемонстрированы (Taipale et al., 2014).

Другим возможным эффектом сайленсинга циклофилинов в *rolB*-экспрессирующих клетках может являться подавление экспрессии гена рецептора для активированной С-киназы 1А (RACK1А), важного белка, регулирующего биогенез малых РНК (микроРНК и коротких интерферирующих РНК). RACK1А это регуляторный WD40-содержащий белок, который является основным представителем семейства RACK1 и участвует в регуляции множества сигнальных путей, опосредованных взаимодействиями RACK1А-циклофилины (Kundu et al., 2013; Cheng et al., 2015). Белок RACK1А обеспечивает накопление и процессинг некоторых при-микроРНК, непосредственно взаимодействуя с SERRATE и комплексом AGO1 (Speth et al., 2013). Эти взаимодействия могут быть вовлечены в модуляцию экспрессии компонентов процессинга микроРНК под действием *rolB*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе горизонтального переноса генов между почвенной бактерией *Rhizobium rhizogenes* и растениями происходит перенос и последующая интеграция Т-ДНК плазмиды Ri в геном растений, что приводит к неопластической трансформации клеток. Главными компонентами Т-ДНК являются гены *rol*, которые считаются наиболее значимыми генами *R. rhizogenes* в контексте генетической трансформации. Они играют решающую роль в индукции синдрома «волосатых» корней, что подчеркивает их особую роль в перепрограммировании молекулярных, биохимических и физиологических процессов растительных клеток.

В последние два десятилетия гены *rol* привлекли значительное внимание исследователей как ключевые регуляторы роста и гормональной регуляции растений. Обнаруженная способность генов *rol* к активации вторичного метаболизма как в различных видах растений, так и в клеточных культурах, открывала большие перспективы их использования в биотехнологии. Тем не менее, их применение оказалось сопряжено с трудностями, обусловленными недостаточным пониманием молекулярных механизмов их действия. В частности, было выяснено, что гены *rol* могут оказывать плейотропное воздействие на процессы роста и вторичного метаболизма. Это подчеркивало необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на изучение механизмов воздействия генов *rol* на биосинтетические пути растительных клеток.

В результате настоящей диссертационной работы показано, что гены *rol* обладают уникальной способностью активировать вторичный метаболизм растений и сохраняют свой эффект на протяжении длительного культивирования трансгенных клеточных культур. Изучены молекулярно-генетические механизмы активирующего сигнала отдельных генов, а также эффекты их совместного применения. Высокий уровень транскрипционной активности гена *rolB* существенно усиливает биосинтез вторичных метаболитов. Однако важно отметить, что чрезмерная экспрессия этого гена может негативно влиять на пролиферацию клеток. Это создаёт необходимость в «дозировании» его

экспрессии, осуществляемой путём отбора подходящих клеточных линий на начальных этапах создания *rolB*-трансгенных культур. Такой подход позволяет максимизировать полезные свойства гена при минимизации потенциальных нежелательных эффектов. В отличие от гена *rolB*, ген *rolC* оказывает менее выраженное активирующее действие, однако, он обладает важным преимуществом в способности увеличивать прирост клеточной биомассы, и этот эффект сохраняется даже в условиях высокой транскрипционной активности трансгена. Особенно примечательно, что при совместной экспрессии *rolC* способен компенсировать негативное влияние *rolB* на пролиферацию клеток. Также впервые было обнаружено, что в процессе длительного культивирования ген *rolA* вызывает постепенное увеличение биосинтетического потенциала клеток. Этот результат является неожиданным, учитывая общепринятое утверждение, что длительное культивирование клеток растений обычно снижает их продуктивность. Важно отметить, что активирующее действие генов *rol* может проявляться по-разному в зависимости от вида растения, что обуславливает специфичность их эффектов в различных объектах.

Гены *rol* также обеспечивают защиту растений от разнообразных стрессовых факторов, что объясняется их влиянием на метаболизм активных форм кислорода (АФК). Было установлено, что оба гена способствуют уменьшению внутриклеточной концентрации АФК, причём данный эффект зависел от уровня экспрессии трансгена. Этот феномен наблюдался как в клетках, находящихся в нормальном состоянии, так и при воздействии внешних индукторов АФК. Кроме того, снижение уровня АФК сохранялось и при трансформации клеток диким штаммом *R. rhizogenes* А4, что указывает на общую биологическую активность этого патогена. Важно отметить, что гены *rol* не проявляют синергического эффекта в отношении продукции АФК. Клетки, трансформированные диким штаммом агробактерий, показали умеренное снижение концентрации АФК, уровень которого оставался выше, чем в *rolC*-культурах, но был ниже по сравнению с *rolB*-экспрессирующими культурами. Также установлено, что ген *rolC* не оказывает влияния на клеточную систему детоксикации АФК. Уровень

экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, в *rolC*-трансгенных клетках остался неизменным по сравнению с контрольными клетками. Однако этот ген подавлял активность НАДФН-оксидазы, которая является ключевым компонентом системы генерации АФК в растениях. В отличие от гена *rolC*, ген *rolB* не подавлял транскрипционную активность НАДФН-оксидаз, напротив, вызывая ее стимуляцию. Следовательно эффект белка RolB связан с активацией защитных реакций клетки, что, в теории, могло бы привести к увеличению продукции АФК. Однако в клетках с трансгеном *rolB* наблюдалась активация и генов антиоксидантной системы. Этот защитный эффект *rolB* против избыточного накопления АФК был настолько значительным, что трансгенные клетки могли выдерживать летальные для нормальных клеток дозы индукторов АФК, таких как менадион и паракват. Кроме того, оба гена, *rolB* и *rolC*, ингибируют изоформы *CDPK*, участвующие в продукции АФК, при этом активируя изоформы *CDPK*, способствующие детоксикацию АФК. Вероятно, этот механизм также вовлечен в подавление АФК и вносит вклад в повышение устойчивости трансгенных клеток к абиотическим стрессам.

Полученные результаты демонстрируют, что трансформация растительных клеток генами *rol* оказывает влияние на сложную сеть взаимодействий, которая включает в себя контроль генов антиоксидантной системы, НАДФН-оксидаз и кальций-зависимых протеинкиназ (Рисунок 61). Эти эффекты, с одной стороны, приводят к активации генов вторичного метаболизма и защитных генов, а с другой – препятствуют чрезмерной продукции АФК, обеспечивая таким образом защиту растений от окислительного стресса. Дополнительно гены *rol* осуществляют эпигенетическую регуляцию клеточных функций посредством модуляции биогенеза микроРНК. В соответствии с этой концепцией, гормональная регуляция представляет собой лишь один из компонентов в комплексе молекулярного перепрограммирования, которое лежит в основе трансформации растительных клеток *rol*-генами. В естественных условиях эти эффекты облегчают колонизацию клеток-хозяев агробактериями. Вместе с тем, данные свидетельствуют о положительном влиянии этих генов на адаптивные

свойства растений: они увеличивают стрессоустойчивость и способствуют усиленному накоплению фитоалексинов. Для биотехнологии растений важно грамотно использовать этот природный биологический феномен в практических целях для повышения защитного потенциала растений и улучшения их биосинтетических свойств.

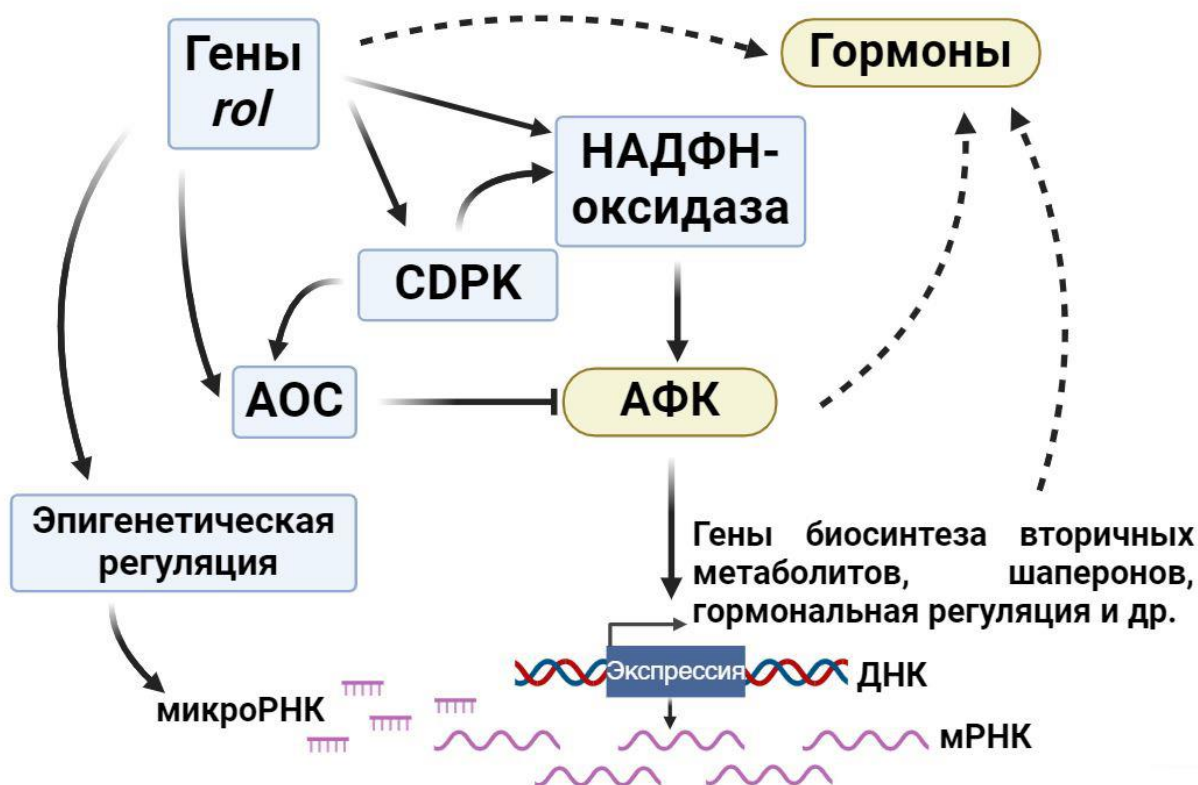


Рисунок 61 – Общая схема функционирования генов *rol*.

ВЫВОДЫ

1) На примере клеточной культуры *Rubia cordifolia* впервые выявлена способность гена *rolA* индуцировать накопление вторичных метаболитов и транскрипцию генов их биосинтеза в процессе длительного культивирования клеток. В то же время, влияние генов *rolB* и *rolC* на вторичный метаболизм остается стабильным на протяжении всего периода наблюдения. В клеточных культурах *R. cordifolia* достигнут высокий уровень продукции антрахинонов, обладающих противовоспалительными и антиоксидантными свойствами.

2) Показано, что гены *rolB* и *rolC* активируют накопление производных фенантрена, аристолохиевых кислот и магнофлорина, в трансформированных корнях *Aristolochia manshuriensis*, повышая при этом антиоксидантную и цитотоксическую активность экстрактов из этих культур. Важным достоинством *rol*-трансгенных культур является снижение концентрации токсичного соединения – аристолохиевой кислоты I.

3) Трансформация клеточных культур *Arabidopsis thaliana* геном *rolB* повышает концентрации индольных глюкозинолатов, не влияя при этом на качественный состав метаболитов. В растении экспрессия *rolB* стимулирует биосинтез флавоноидов. Данные эффекты сопряжены с модуляцией экспрессии факторов транскрипции *MYB* и *bHLH*, а также координируемых ими биосинтетических генов.

4) Выявлены новые аспекты влияния генов *rol* на редокс-статус трансформированных клеток растений. Гены *rolB* и *rolC* вызывают снижение концентрации внутриклеточных АФК, коррелирующее с уровнем их экспрессии, но при этом не оказывают синергического эффекта в клетках, трансформированных диким штаммом *R. rhizogenes* A4. Показано, что как *rol*-трансгенные, так и pRiA4-трансформированные клеточные культуры обладают повышенной устойчивостью к температурному и солевому стрессу.

5) Раскрыт молекулярный механизм действия генов *rol* на метаболизм АФК. Ген *rolB* активирует как прооксидантные (НАДФН-оксидазы), так и антиоксидантные гены (аскорбатпероксидазы, супероксиддисмутазы и каталазы),

тогда как *rolC* ингибирует активность НАДФН-оксидазы, не затрагивая антиоксидантную защитную систему. Кроме того, обнаружена дифференциальная регуляция изоформ кальций-зависимых протеинкиназ, обеспечивающая снижение уровня внутриклеточных АФК.

6) Впервые показано, что ген *rolB* влияет на молекулярный механизм биогенеза микроРНК, активируя экспрессию генов, участвующих в формировании, стабилизации и функционировании этих молекул. Действие белка RolB связано с модуляцией экспрессии гена *RACK1A*, регулирующего биогенез малых РНК.

7) Охарактеризовано влияние *rolB* на экспрессию генов, связанных с гормональной регуляцией, защитными реакциями и кальциевой сигнальной системой. Наиболее заметные изменения выявлены в регуляции транскрипционной активности белков теплового шока и некоторых представителей семейства циклофилинов.

8) Установлено, что гены *rol* представляют собой эффективный инструмент в биотехнологии для создания стабильных клеточных культур растений с повышенным содержанием вторичных метаболитов. Кроме того, они также перспективны для разработки стратегий, направленных на усиление стрессоустойчивости растений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CaM – кальмодулин,
CML – кальмодулин-подобные,
CBL – кальциневрин-В-подобные,
CIPK – CBL-взаимодействующие протеинкиназы,
CaMK – кальмодулин-зависимые протеинкиназы,
CCaMK - Ca²⁺/CaM-зависимые протеинкиназы,
CDPK/CPK – Ca²⁺-зависимые Ser/Thr протеинкиназы,
NLS – сигнал ядерной локализации
Rboh – гомологи оксидазы респираторного взрыва,
Ri – root inducing,
Ti – tumor inducing,
Vir – белок вирулентности,
а.о. – аминокислотные остатки,
АФК – активные формы кислорода,
АТФ – аденозинтрифосфат,
ГТФ – гуанозинтрифосфат,
ГДФ – гуанозиндифосфат,
п.н. – пар нуклеотидов,
ПОЛ – перекисное окисление липидов,
СОД – супероксиддисмутаза,
Т-ДНК – транспортная ДНК,
ФС I – фотосистема I,
ФС II – фотосистема II,
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулуев Б. Р. «Косматые» корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей / Б. Р. Кулуев, З. Р. Вершинина, А. В. Князев [и др.] // Биомика. – 2015. – Том 7. – № 2. – С. 70–120.
2. Медведев С. С. Кальциевая сигнальная система растений / С. С. Медведев // Физиология растений. – 2005. – Т. 52. – С. 282–305.
3. Павлова О. А. *Rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes* / О. А. Павлова, Т. В. Матвеева, Л. А. Лутова // Экологическая генетика. – 2013. – Том 11. – № 1. – С. 59–68.
4. Abele D. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria* / D. Abele, K. Heise, H. O. Pörtner [et al.] // The Journal of Experimental Biology. – 2002. – Vol. 205. – P. 1831–1841.
5. Acevedo A. Photoregulation of the *Cat2* and *Cat3* catalase genes in pigmented and pigment-deficient maize: the circadian regulation of *Cat3* is superimposed on its quasi-constitutive expression in maize leaves / A. Acevedo, J. D. Williamson, J. G. Scandalios [et al.] // Genetics. – 1991. – Vol. 127. – № 3. – P. 601–608.
6. Agrawal M. Changes in antioxidant enzymes activity during *in vitro* morphogenesis of carnation and the effect of antioxidants on plant regeneration / M. Agrawal, S. Purohit // World Journal of Science. – 2012. – Vol. 2. – P. 87–92.
7. Alcalde M. A. Using machine learning to link the influence of transferred *Agrobacterium rhizogenes* genes to the hormone profile and morphological traits in *Centella asiatica* hairy roots / M. A. Alcalde, M. Müller, S. Munné-Bosch // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13. – P. 1001023.
8. Allen G. J. Release of Ca^{2+} from individual plant vacuoles by both InsP3 and cyclic ADP-ribose / G. J. Allen, S. R. Muir, D. Sanders // Science. – 1995. – Vol. 268. – № 5211. – P. 735–737.

9. Allen K. D. Assaying gene content in *Arabidopsis* / K. D. Allen // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2002. – Vol. 99. – № 14. – P. 9568–9572.
10. Almagro L. Class III peroxidases in plant defence reactions / L. Almagro, L. V. Gómez Ros, S. Belchi-Navarro [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2009. – Vol. 60. – № 2. – P. 377–390.
11. Altamura M. M. *Agrobacterium rhizogenes rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development / M. M. Altamura // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol. 77. – P. 89–101.
12. Altamura M. M. The plant oncogene *rolB* stimulates the formation of flowers and root meristemoids in tobacco thin cell layers / M. M. Altamura, F. Capitani, L. Gazza [et al.] // New Phytologist. – 1994. – Vol. 126. – № 2. – P. 283–293.
13. An S. Reversible compartmentalization of *de novo* purine biosynthetic complexes in living cells / S. An, R. Kumar, E. D. Sheets [et al.] // Science. – 2008. – Vol. 320. – № 5872. – P. 103–106.
14. Anand A. Identification and characterization of plant genes involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation by virus-induced gene silencing / A. Anand, Z. Vaghchhipawala, C. M. Ryu [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2007. – Vol. 20. – № 1. – P. 41–52.
15. Anand A. Several components of SKP1/Cullin/F-box E3 ubiquitin ligase complex and associated factors play a role in *Agrobacterium*-mediated plant transformation / A. Anand, C. M. Rojas, Y. Tang [et al.] // New Phytologist. – 2012. – Vol. 195. – № 1. – P. 203–216.
16. Ancillotti C. Changes in polyphenol and sugar concentrations in wild type and genetically modified *Nicotiana langsdorffii* Weinmann in response to water and heat stress / C. Ancillotti, P. Bogani, S. Biricolti [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2015. – Vol. 97. – P. 52–61.
17. Angelova A. L. Complementary induction of immunogenic cell death by oncolytic parvovirus H-1PV and gemcitabine in pancreatic cancer / A. L. Angelova, S. P. Grekova, A. Heller [et al.] // Journal of Virology. – 2014. – Vol. 88. – P. 5263–5276.

18. Aoki S. Horizontal gene transfer and mutation: *Ngrol* genes in the genome of *Nicotiana glauca* / S. Aoki, K. Syōno // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1999. – Vol. 96. – № 23. – P. 13229–13234.
19. Aoki S. Resurrection of an ancestral gene: functional and evolutionary analyses of the *Ngrol* genes transferred from *Agrobacterium* to *Nicotiana* / Journal of Plant Research. – 2004. – Vol. 117. – № 4. – P. 329–337.
20. Aoki S. Synergistic function of *rolB*, *rolC*, *ORF13* and *ORF14* of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* in hairy root induction in *Nicotiana tabacum* / S. Aoki, K. Syono // Plant & Cell Physiology. – 1999. – Vol. 40. – № 2. – P. 252–256.
21. Aoki S. The roles of *Rirol* and *Ngrol* genes in hairy root induction in *Nicotiana debneyi* / S. Aoki, K. Syōno // Plant Science. – 2000. – Vol. 159. – № 2. – P. 183–189.
22. Apel K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // Annual Review of Plant Biology. – 2004. – Vol. 55 – P. 373–399.
23. Arshad W. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with *rolB* gene results in enhancement of fruit quality and foliar resistance against fungal pathogens / W. Arshad, I. Haq, M. T. Waheed [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. e96979.
24. Asai S. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana* / S. Asai, K. Ohta, H. Yoshioka // The Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – № 5. – P. 1390–1406.
25. Asano T. Functional characterisation of *OsCPK21*, a calcium-dependent protein kinase that confers salt tolerance in rice / T. Asano, M. Hakata, H. Nakamura [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2011. – Vol. 75. – P. 179–191.
26. Asano T. CDPK-mediated abiotic stress signaling / T. Asano, N. Hayashi, S. Kikuchi [et al.] // Plant Signaling & Behavior. – 2012a. – Vol. 7. – № 7. – P. 817–821.

27. Asano T. A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK12* oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance / T. Asano, N. Hayashi, M. Kobayashi [et al.] // *The Plant Journal*. – 2012b. – Vol. 69. – № 1. – P. 26–36.
28. Ashraf M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers / M. Ashraf // *Biotechnology Advances*. – 2009. – Vol. 27. – № 1. – P. 84–93.
29. Aubourg S. Genomic analysis of the terpenoid synthase (*AtTPS*) gene family of *Arabidopsis thaliana* / S. Aubourg, A. Lecharny, J. Bohlmann // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2002. – Vol. 267. – № 6. – P. 730–745.
30. Ayesha A. A review on pharmacognostic and therapeutic uses of *Rubia cordifolia* / A. Ayesha, A. Mohd, S. C. Shahid // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 195–202.
31. Badawi G. H. Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit / G. H. Badawi, N. Kawano, Y. Yamauchi [et al.] // *Physiologia Plantarum*, 2004. – Vol. 121. – № 2. – P. 231–238.
32. Baeka K.-H. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines / K.-H. Baeka, D. Z. Skinner // *Plant Science*. – 2003. – Vol. 165. – № 6. – P. 1221–1227.
33. Bagyan I. L. 5'-regulatory region of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene *6b* directs organ-specific, wound-inducible and auxin-inducible expression in transgenic tobacco / I. L. Bagyan, E. V. Revenkova, G. E. Pozmogova [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1995. – Vol. 29. – № 6. – P. 1299–1304.
34. Bak S. CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* / S. Bak, F. E. Tax, K. A. Feldmann [et al.] // *The Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13. – № 1. – P. 101–111.
35. Bak S. The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis / S. Bak, R. Feyereisen // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 127. – № 1. – P. 108–118.

36. Baker C. J. Active oxygen in plant pathogenesis / C. J. Baker, E. W. Orlandi // *Annual Review of Phytopathology*. – 1995. – Vol. 33. – P. 299–321.
37. Bakó L. The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants / L. Bakó, M. Umeda, A. F. Tiburcio [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 17. – P. 10108–10113.
38. Balestrasse K. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress / K. Balestrasse, L. Gardey, S. M. Gallego [et al.] // *Australian Journal of Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 28. – № 6. – P. 497–504.
39. Batistič O. Analysis of calcium signaling pathways in plants / O. Batistič, J. Kudla // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1820. – № 8. – P. 1283–1293.
40. Batistic O. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca²⁺ signaling complexes in *Arabidopsis* / O. Batistic, N. Sorek, S. Schültke [et al.] // *The Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20. – № 5. – P. 1346–1362.
41. Batistic O. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network / O. Batistic, J. Kudla // *Planta*. – 2004. – Vol. 219. – № 6. – P. 915–924.
42. Batistic O. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases / O. Batistic, J. Kudla // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2009. – Vol. 1793. – № 6. – P. 985–992.
43. Baulcombe D. RNA silencing in plants / D. Baulcombe // *Nature*. – 2004. – Vol. 431. – № 7006. – P. 356–363.
44. Baumann K. The DNA binding site of the Dof protein *NtBBF1* is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants / K. Baumann, A. de Paolis, P. Costantino [et al.] // *The Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – P. 323–333.

45. Baxter A. ROS as key players in plant stress signaling / A. Baxter, R. Mittler, N. Suzuki // *Journal of Experimental Botany*. – 2014. – Vol. 65. – № 5. – P. 1229–1240.
46. Bell J. N. Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant-pathogen interactions / J. N. Bell, R. A. Dixon, J. A. Bailey [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1986. – Vol. 81. – № 11. – P. 3384–3388.
47. Bell L. The biosynthesis of glucosinolates: insights, inconsistencies, and unknowns / L. Bell // *Annual Plant Reviews Online*. – 2019. – Vol. 2. – № 3. – P. 969–1000.
48. Bellincampi D. Oligogalacturonides prevent *Rhizogenesis* in *rolB*-transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the *rolB* gene / D. Bellincampi, M. Cardarelli, D. Zaghi [et al.] // *The Plant Cell*. – 1996. – Vol. 8. – № 3. – P. 477–487.
49. Benmehdi H. Free radical scavenging activity, kinetic behaviour and phytochemical constituents of *Aristolochia clematitis* L. roots / H. Benmehdi, A. Behilil, F. Memmou [et al.] // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2017. – Vol. 10. – P. S1402–S1408.
50. Benschop J. J. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis* / J. J. Benschop, S. Mohammed, M. O'Flaherty [et al.] // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2007. – Vol. 6. – № 7. – P. 1198–1214.
51. Bergey D. R. The role of calmodulin and related proteins in plant cell function: an ever-thickening plot / D. R. Bergey, R. Kandel, B. K. Tyree [et al.] // *Springer Science Reviews*. – 2014. – Vol. 2. – P. 145–159.
52. Bettini P. Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes rolD* gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / P. Bettini, S. Michelotti, D. Bindi [et al.] // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2003. – Vol. 107. – № 5. – P. 831–836.

53. Bettini P. P. *Agrobacterium rhizogenes rolA* gene promotes tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) / P. P. Bettini, E. Santangelo, R. Baraldi [et al.] // Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. – 2016a. – Vol. 25. – P. 225–233.
54. Bettini P. P. *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene affects photosynthesis and chlorophyll content in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants / P. P. Bettini, M. Marvasi, F. Fani [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2016b. – Vol. 204. – P. 27–35.
55. Bhattacharjee S. IMPa-4, an *Arabidopsis* importin alpha isoform, is preferentially involved in *Agrobacterium*-mediated plant transformation / S. Bhattacharjee, L. Y. Lee, H. Oltmanns [et al.] // The Plant Cell. – 2008. – Vol. 20. – № 10. – P. 2661–2680.
56. Bienert G. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes / G. P. Bienert, A. L. Møller, K. A. Kristiansen [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Vol. 282. – № 2. – P. 1183–1192.
57. Bindschedler L. V. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance / L. V. Bindschedler, J. Dewdney, K. A. Blee [et al.] // The Plant Journal. – 2006. – Vol. 47. – № 6. – P. 851–863.
58. Binns A. N. The *Agrobacterium* oncogenes / A. N. Binns, P. Costantino // The Rhizobiaceae. – 1998. – pp. 251–266.
59. Birkenbihl R.P. *Arabidopsis WRKY33* is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection / R. P. Birkenbihl, C. Diezel, I. E. Somssich // Plant Physiology. – 2012. – Vol. 159. – № 1. – P. 266–285.
60. Blažević I. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants / I. Blažević, S. Montaut, F. Burćul [et al.] // Phytochemistry. – 2020. – Vol. 169. – P. 112100.
61. Blee K. A. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in *French bean* (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family / K. A. Blee, S. C. Jupe, G. Richard [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2001. – Vol. 47. – № 5. – P. 607–620.

62. Blomster T. Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis* / T. Blomster, J. Salojärvi, N. Sipari [et al.] // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 157. – № 4. – P. 1866–1883.
63. Bloor S. J. The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana* / S. J. Bloor, S. Abrahams // *Phytochemistry*. – 2002. – Vol. 59. – № 3. – P. 343–346.
64. Bohlmann J. Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization and functional expression of a Myrcene/ (E)- β -Ocimene synthase / J. Bohlmann, D. Martin, N. J. Oldham [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2000. – Vol. 375. – № 2. – P. 261–269.
65. Böhmdorfer G. RNA-directed DNA methylation requires stepwise binding of silencing factors to long non-coding RNA / G. Böhmdorfer, M. J. Rowley, J. Kuciński [et al.] // *The Plant Journal*. – 2014. – Vol. 79. – № 2. – P. 181–191.
66. Bollman K. M. HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis / K. M. Bollman, M. J. Aukerman, M. Y. Park [et al.] // *Development*. – 2003. – Vol. 130. – № 8. – P. 1493–1504.
67. Bologna N. G. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis* / N. G. Bologna, O. Voinnet // *Annual Review of Plant Biology*. – 2014. – Vol. 65. – P. 473–503.
68. Bones A. M. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry / A. M. Bones, J. T. Rossiter // *Physiologia Plantarum*. – 1996. – Vol. 97. – № 1. – P. 194–208.
69. Bonhomme V. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* / V. Bonhomme, D. Laurain-Mattar, M. A. Fliniaux // *Journal of Natural Products*. – 2000. – Vol. 63. – № 9. – P. 1249–1252.
70. Bonnard G. Sequence and distribution of IS866, a novel T region-associated insertion sequence from *Agrobacterium tumefaciens* / G. Bonnard, F. Vincent, L. Otten // *Plasmid*. – 1989. – Vol. 22. – № 1. – P. 70–81.

71. Böttcher C. The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana* / C. Böttcher, L. Westphal, C. Schmotz [et al.] // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – № 6. – P. 1830–1845.
72. Bouchez D. Identification of a putative *rolB* gene on the TR-DNA of the *Agrobacterium rhizogenes* A4 Ri plasmid / D. Bouchez, C. Camilleri // *Plant Molecular Biology*. – 1990. – Vol. 14. – № 4. – P. 617–619.
73. Boudsocq M. Characterization of *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases: activated or not by calcium? / M. Boudsocq, M.-J. Droillard, L. Regad [et al.] // *The Biochemical Journal*. – 2012. – Vol. 447. – № 2. – P. 291–299.
74. Boudsocq M. Differential innate immune signalling via Ca⁽²⁺⁾ sensor protein kinases / M. Boudsocq, M. R. Willmann, M. McCormack [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 464. – № 7287. – P. 418–422.
75. Bowler C. Superoxide dismutase and stress tolerance / C. Bowler, M. van Montagu, D. Inze // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1992. – Vol. 43. – P. 83–116.
76. Bretz J. R. A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 modulates plant defence response to infection / J. R. Bretz, N. M. Mock, J. C. Charity [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2003. – Vol. 49. – № 2. – P. 389–400.
77. Brown D. E. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis* / D. E. Brown, A. M. Rashotte, A. S. Murphy [et al.] // *Plant Physiology*. – 2001. – Vol. 126. – № 2. – P. 524–535.
78. Bulgakov, V.P.; Zhuravlev, Y.N. Generation of *Aristolochia manshuriensis* Kom. callus tissue cultures / V. P. Bulgakov, Y. N. Zhuravlev // *Rastitelnye Resursy*. – 1989. – Vol. 25. – P. 266–270.
79. Bulgakov V. P. Constituents of *Aristolochia manshuriensis* cell suspension culture possessing cardiogenic activity / V. P. Bulgakov, Y. N. Zhuravlev, S. A. Fedoreyev [et al.] // *Fitoterapia*. – 1996. – Vol. 67. – P. 238–240.

80. Bulgakov V. P. The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures / V. P. Bulgakov, M. V. Khodakovskaya, N. V. Labetskaya [et al.] // *Phytochemistry*. – 1998. – Vol. 49. – № 7. – P. 1929–1934.
81. Bulgakov V. P. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes / V. P. Bulgakov, G. K. Tchernoded, N. P. Mischenko [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2002. – Vol. 97. – № 3. – P. 213–221.
82. Bulgakov V. P. Increase in anthraquinone content in *Rubia cordifolia* cells transformed by *rol* genes does not involve activation of the NADPH oxidase signaling pathway / V. P. Bulgakov, G. K. Tchernoded, N. P. Mischenko [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2003. – Vol. 68. – № 7. – P. 795–801.
83. Bulgakov V. P. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene on radosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures / V. P. Bulgakov, M. V. Veselova, G. K. Tchernoded [et al.] // *Planta*. – 2005. – Vol. 221. – № 4. – P. 471–478.
84. Bulgakov V. P. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism // *Biotechnology Advances*. – 2008. – Vol. 26. – № 4. – P. 318–324.
85. Bulgakov V. P. Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the *rolC* oncogene / V. P. Bulgakov, D. L. Aminin, Y. N. Shkryl [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2008. – Vol. 21. – № 12. – P. 1561–1570.
86. Bulgakov V. P. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with *rol* genes / V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik // *Plant Secondary Metabolism Engineering. Methods and Applications. Series: Methods in Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 643. – pp. 229–242.
87. Bulgakov V. P. Application of *Agrobacterium rol* genes in plant biotechnology: A natural phenomenon of secondary metabolism regulation, genetic

transformation / V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik [et al.] // Genetic Transformation. – 2011. – P. 261–270.

88. Bulgakov V. P. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense / V. P. Bulgakov, T. Y. Gorpenchenko, G. N. Veremeichik [et al.] // Plant Physiology. – 2012. – Vol. 158. – № 3. – P. 1371–1381.

89. Bulgakov V. P. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism / V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik [et al.] // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2013. – Vol. 134. – P. 1–22.

90. Bulgakov V. P. The *rolB* gene activates the expression of genes encoding microRNA processing machinery / V. P. Bulgakov, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl // Biotechnology Letters. – 2015. – Vol. 37. – № 4. – P. 921–925.

91. Bulgakov V. P. The *rolB* gene activates secondary metabolism in *Arabidopsis* calli via selective activation of genes encoding *MYB* and *bHLH* transcription factors / V. P. Bulgakov, G. N. Veremeichik, V. P. Grigorchuk [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 102. – P. 70–79.

92. Bulgakov V. P. The *rolB* plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone signaling and plant defense / V. P. Bulgakov, Y. V. Vereshchagina, D. V. Bulgakov // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – P. 2285.

93. Bundó M. Calcium-dependent protein kinase *OsCPK10* mediates both drought tolerance and blast disease resistance in rice plants / M. Bundó, M. Coca // Journal of Experimental Botany. – 2017. – Vol. 68. – № 11. – P. 2963–2975.

94. Bundo M. Enhancing blast disease resistance by overexpression of the calcium-dependent protein kinase *OsCPK4* in rice / M. Bundo, M. Coca // Plant Biotechnology Journal. – 2016. – Vol. 14. – № 6. – P. 1357–1367.

95. Bush D. S. Gibberellic-acid-stimulated Ca^{2+} accumulation in endoplasmic reticulum of barley aleurone: Ca^{2+} transport and steady-state levels / D. S. Bush, A. K. Biswas, R. L. Jones // Planta. – 1989. – Vol. 178. – № 3. – P. 411–420.

96. Camoni L. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) / L. Camoni, J. F. Harper, M. G. Palmgren // FEBS Letters. – 1998. – Vol. 430. – № 3. – P. 381–384.
97. Campo S. Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation / S. Campo, P. Baldrich, J. Messeguer [et al.] // Plant Physiology. – 2014. – Vol. 165. – № 2. – P. 688–704.
98. Cantero A. Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress / A. Cantero, S. Barthakur, T. J. Bushart [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2006. – Vol. 44. – № 1. – P. 13–24.
99. Cao Y. Biosynthesis of flavonol and its regulation in plants / Y. Cao, M. Xing, C. Xu [et al.] // Acta Horticulturae Sinica. – 2018. – Vol. 45. – P. 177–192.
100. Capone I. Expression in different populations of cells of the root meristem is controlled by different domains of the *rolB* promoter / I. Capone, G. Frugis, P. Costantino [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1994. – Vol. 25. – № 4. – P. 681–691.
101. Capone I. Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA / I. Capone, L. Spanò, M. Cardarelli [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1989. – Vol. 13. – № 1. – P. 43–52.
102. Cardarelli M. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype / M. Cardarelli, D. Mariotti, M. Pomponi [et al.] // Molecular & General Genetics. – 1987. – Vol. 209. – № 3. – P. 475–480.
103. Cárdenas L. Rhizobium nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs / L. Cardenas, J. A. Feijo, J. G. Kunkel [et al.] // The Plant Journal. – 1999. – Vol. 19. – № 3. – P. 347–352.
104. Cárdenas L. New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells / L. Cárdenas // Plant Signaling & Behavior. – 2009. – Vol. 4. – № 1. – P. 4–8.

105. Carmi N. Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary / N. Carmi, Y. Salts, B. Dedicova [et al.] // *Planta*. – 2003. – Vol. 217. – № 5. – P. 726–735.
106. Carneiro M. Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development / M. Carneiro, F. Vilaine // *The Plant Journal*. – 1993. – Vol. 3. – № 6. – P. 785–792.
107. Casanova E. Influence of *rol* genes in floriculture / E. Casanova, M. I. Trillas, L. Moysset [et al.] // *Biotechnology Advances*. – 2005. – Vol. 23. – № 1. – P. 3–39.
108. Cecchetti V. Expression of *rolB* in tobacco flowers affects the coordinated processes of anther dehiscence and style elongation / V. Cecchetti, M. Pomponi, M. M. Altamura [et al.] // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 3. – № 3. – P. 512–525.
109. Ceserani T. VH1/BRL2 receptor-like kinase interacts with vascular-specific adaptor proteins VIT and VIK to influence leaf venation / T. Ceserani, A. Trofka, N. Gandotra [et al.] // *The Plant Journal*. – 2009. – Vol. 57. – № 6. – P. 1000–1014.
110. Chaiwanon J. Information integration and communication in plant growth regulation / J. Chaiwanon, W. Wang, J. Y. Zhu [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 164. – № 6. – P. 1257–1268.
111. Chaki M. Oxidative stress in plants / M. Chaki, J. C. Begara-Morales, J. B. Barroso // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – № 6. – P. 481.
112. Chakraborty S. Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK): structure, ligand perception, and activation mechanism / S. Chakraborty, B. Nguyen, S. D. Wasti [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 17. – P. 3081.
113. Chandrashekar B. Characterization of *Rubia cordifolia* L. root extract and its evaluation of cardioprotective effect in *Wistar rat* model / B. Chandrashekar, S. Prabhakara, T. Mohan [et al.] // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2018. – Vol. 50. – № 1. – P. 12–21.
114. Chang C. Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis / C. Chang, I. Damiani, A. Puppo [et al.] // *Molecular Plant*. – 2009. – Vol. 2. – № 3. – P. 370–377.

115. Chang L. C. Rubiasins A-C, new anthracene derivatives from the roots and stems of *Rubia cordifolia* / L. C. Chang, D. Chavez, J. J. Gills [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2000. – Vol. 41. – № 37. – P. 7157–7162.

116. Chang P. Antitumor agents 50. 1 Morindaparvin-A, a new antileukemic anthraquinone, and alizarin-1-methyl ether from *Morinda parvifolia*, and the antileukemic activity of the related derivatives / P. Chang, K. H. Lee, T. Shingu [et al.] // Journal of Natural Products. – 1982. – Vol. 45. – № 2. – P. 206–210.

117. Chapman J. M. *RBOH*-dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses / J. M. Chapman, J. K. Muhlemann, S. R. Gayomba // Chemical Research in Toxicology. – 2019. – Vol. 32. – № 3. – P. 370–396.

118. Chen C. Emodin accelerates diabetic wound healing by promoting anti-inflammatory macrophage polarization / C. Chen, Z. Lin, W. Liu [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2022. – Vol. 936. – P. 175329.

119. Chen F. An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense / F. Chen, J. C. D'Auria, D. Tholl [et al.] // The Plant Journal. – 2003a. – Vol. 36. – № 5. – P. 577–588.

120. Chen F. Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from *Arabidopsis* flowers / F. Chen, D. Tholl, J. C. D'Auria [et al.] // The Plant Cell. – 2003b. – Vol. 15. – № 2. – P. 481–494.

121. Chen F. The calmodulin fused kinase novel gene family is the major system in plants converting Ca^{2+} signals to protein phosphorylation responses / F. Chen, L. Zhang, Z. M. Cheng // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 4127.

122. Chen K. Morphological analysis of the *6b* oncogene-induced enation syndrome / K. Chen, L. Otten // Planta. – 2016. – Vol. 243. – № 1. – P. 131–148.

123. Chen K. Natural *Agrobacterium* transformants: recent results and some theoretical considerations / K. Chen, L. Otten // Frontiers in Plant Science. – 2017. – Vol. 8. – P. 1600.

124. Chen K. Organization of the TC and TE cellular T-DNA regions in *Nicotiana otophora* and functional analysis of three diverged *TE-6b* genes / K. Chen, D. F. de Borne, N. Sierro[et al.] // *The Plant Journal*. – 2018. – Vol. 94. – № 2. – P. 274–287.
125. Chen L. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Botryosphaeria dothidea* / L. Chen, Q. Wang, H. Chen [et al.] // c. – 2016. – Vol. 32. – № 7. – P. 106.
126. Chen Y. Anti-thrombotic and pro-angiogenic effects of *Rubia cordifolia* extract in zebrafish / Y. Chen, P.-D. Chen, B.-H. Bao [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2018. – Vol. 219. – P. 152–160.
127. Chen Z. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid / Z. Chen, H. Silva, D. F. Klessig // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – № 5141. – P. 1883–1886.
128. Cheng C. Genome-wide identification and characterization of respiratory burst oxidase homolog genes in six *Rosaceae* species and an analysis of their effects on adventitious rooting in apple / C. Cheng, Q. Che, S. Su [et al.] // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15. – № 9. – P. e0239705.
129. Cheng S. H. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts / S. H. Cheng, J. Sheen, C. Gerrish [et al.] // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 503. – № 2–3. – P. 185–188.
130. Cheng Z. Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway / Z. Cheng, J. F. Li, Y. Niu [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 521. – № 7551. – P. 213–216.
131. Cheong Y. H. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis* / Y. H. Cheong, K. N. Kim, G. K. Pandey [et al.] // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – № 8. – P. 1833–1845.
132. Cheong Y. H. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase *CIPK23*, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in

Arabidopsis / Y. H. Cheong, G. K. Pandey, J. J. Grant [et al.] // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. 52. – № 2. – P. 223–239.

133. Cheong Y. H. Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis* / Y. H. Cheong, S. J. Sung, B. G. Kim [et al.] // *Molecules and Cells*. – 2010. – Vol. 29. – № 2. – P. 159–165.

134. Cheung T. P. Aristolochic acids detected in some raw Chinese medicinal herbs and manufactured herbal products – a consequence of inappropriate nomenclature and imprecise labelling? / T. P. Cheung, C. Xue, K. Leung [et al.] // *Clinical Toxicology*. – 2006. – Vol. 44. – № 4. – P. 371–378.

135. Cheval C. Calcium/calmodulin-mediated regulation of plant immunity / C. Cheval, D. Aldon, J. P. Galaud [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – Vol. 1833. – № 7. – P. 1766–1771.

136. Chhajed S. Glucosinolate biosynthesis and the glucosinolate–myrosinase system in plant defense / S. Chhajed, I. Mostafa, Y. He [et al.] // *Agronomy*. – 2020. – Vol. 10. – № 11. – P. 1786.

137. Cho U. H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation / U. H. Cho, N. H. Seo // *Plant Science*. – 2005. – Vol. 168. – № 1. – P. 113–120.

138. Choi H. I. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase *AtCPK32* interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity / H. I. Choi, H. J. Park, J. H. Park [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139. – № 4. – P. 1750–1761.

139. Choi H. W. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO₂ activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens / H. W. Choi, Y. J. Kim, S. C. Lee [et al.] // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 145. – № 3. – P. 890–904.

140. Christodoulou J. Evidence for differing roles for each lobe of the calmodulin-like domain in a calcium-dependent protein kinase / J. Christodoulou, A. Malmendal, J. F. Harper [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 28. – P. 29092–29100.

141. Chung Y. M. A novel alkaloid, aristopyridinone A and anti-inflammatory phenanthrenes isolated from *Aristolochia manshuriensis* / Y. M. Chung, F. R. Chang, T. F. Tseng [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2011. – Vol. 21. – № 6. – P. 1792–1794.
142. Chu-Puga Á. NADPH oxidase (*Rboh*) activity is up regulated during sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit ripening / Á. Chu-Puga, S. González-Gordo, M. Rodríguez-Ruiz [et al.] // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8. – № 1. – P. 9.
143. Citovsky V. Protein interactions involved in nuclear import of the *Agrobacterium* VirE2 protein *in vivo* and *in vitro* / V. Citovsky, A. Kapelnikov, S. Oliel [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 28. – P. 29528–29533.
144. Clarkson D. T. Cytoplasmic calcium measurements in intact higher plants cells: results from fluorescence ratio imaging of fura-2 / D. T. Clarkson, C. Brownlee, S. M. Ayling // *Journal of Cell Science*. – 1988. – Vol. 91. – № 1. – P. 71–80.
145. Clément B. The *Agrobacterium vitis T-6b* oncoprotein induces auxin-independent cell expansion in tobacco / B. Clément, S. Pollmann, E. Weiler [et al.] // *The Plant Journal*. – 2006. – Vol. 45. – № 6. – P. 1017–1027.
146. Clément B. Abnormal accumulation of sugars and phenolics in tobacco roots expressing the *Agrobacterium T-6b* oncogene and the role of these compounds in *6b*-induced growth / B. Clément, J. Perot, P. Geoffroy [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2007. – Vol. 20. – № 1. – P. 53–62.
147. Coca M. *AtCPK1* calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis* / M. Coca, B. San Segundo // *The Plant Journal*. – 2010. – Vol. 63. – № 3. – P. 526–540.
148. Coelho S. M. A tip-high, Ca⁽²⁺⁾-interdependent, reactive oxygen species gradient is associated with polarized growth in *Fucus serratus* zygotes / S. M. Coelho, C. Brownlee, J. H. Bothwell // *Planta*. – 2008. – Vol. 227. – № 5. – P. 1037–1046.
149. Collings D. A. Subcellular localization of transiently expressed fluorescent fusion proteins / D. A. Collings // *Methods in Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 1069. – P. 227–258.

150. Comparot S. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism / S. Comparot, G. Lingiah, T. Martin // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – Vol. 54. – № 382. – P. 595–604.
151. Cona A. Functions of amine oxidases in plant development and defence / A. Cona, G. Rea, R. Angelini [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2006. – Vol. 11. – № 2. – P. 80–88.
152. Cool R. H. *Rac1*, and not *Rac2*, is involved in the regulation of the intracellular hydrogen peroxide level in HepG2 cells / R. H. Cool, E. Merten, C. Theiss [et al.] // *Biochemical Journal*. – 1998. – Vol. 332. – P. 5–8.
153. Cooper T. G. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity / T. G. Cooper, H. Beevers // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – Vol. 244. – № 13. – P. 3507–3513.
154. Corpas F. J. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells / F. J. Corpas, J. B. Barroso, L. A. del Río // *Trends in Plant Science*. – 2001. – Vol. 6. – № 4. – P. 145–150.
155. Costantino P. Bacterial plant oncogenes: the *rol* genes' saga / P. Costantino, I. Capone, M. Cardarelli [et al.] // *Genetica*. – 1994. – Vol. 94. – P. 203–211.
156. Crane Y. M. RNAi-mediated gene silencing reveals involvement of *Arabidopsis* chromatin-related genes in *Agrobacterium*-mediated root transformation / Y. M. Crane, S. B. Gelvin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 38. – P. 15156–15161.
157. Crizel R. L. Abscisic acid and stress induced by salt: effect on the phenylpropanoid, L-ascorbic acid and abscisic acid metabolism of strawberry fruits / R. L. Crizel, E. C. Perin, T. J. Siebeneichler [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2020. – Vol. 152. – P. 211–220.
158. Crow J. P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species / J. P. Crow // *Nitric Oxide*. – 1997. – Vol. 1. – № 2. – P. 145–157.

159. Cui D. The interaction of MYB, bHLH and WD40 transcription factors in red pear (*Pyrus pyrifolia*) peel / D. Cui, S. Zhao, H. Xu [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2021. – Vol. 106. – P. 407–417.
160. Cui X. Chromosome-level genome assembly of *Aristolochia contorta* provides insights into the biosynthesis of benzyloquinoline alkaloids and aristolochic acids / X. Cui, F. Meng, X. Pan [et al.] // *Horticulture Research*. – 2022. – Vol. 9. – P. uhac005.
161. D'Angelo C. Alternative complex formation of the Ca²⁺-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis* / C. D'Angelo, S. Weinl, O. Batistic [et al.] // *The Plant Journal*. – 2006. – Vol. 48. – № 6. – P. 857–872.
162. D'Auria J. C. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed / J. C. D'Auria, J. Gershenzon // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2005. – Vol. 8. – № 3. – P. 308–316.
163. Damineli D. S. Oscillatory signatures underlie growth regimes in *Arabidopsis* pollen tubes: computational methods to estimate tip location, periodicity, and synchronization in growing cells / D. S. Damineli, M. T. Portes, J. A. Feijó // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 68. – № 12. – P. 3267–3281.
164. Dat J. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses / J. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranová [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2000. – Vol. 57. – № 5. – P. 779–795.
165. Davletova S. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis* / S. Davletova, L. Rizhsky, H. Liang [et al.] // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – № 1. – P. 268–281.
166. Day I. S. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis* / I. S. Day, V. S. Reddy, G. S. Ali, A. S. Reddy // *Genome Biology*. – 2002. – Vol. 3. – research0056.
167. De Leo F. R. Mapping sites of interaction of p47phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries / F. R. de Leo, L. Yu,

J. B. Burritt [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – Vol. 92. – № 15. – P. 7110–7114.

168. De Leo F. R. Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67phox and flavocytochrome b to a common functional domain in p47phox / F. R. de Leo, K. V. Ulman, A. R. Davis [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – № 29. – P. 17013–17020.

169. De Paolis A. A *rolB* regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins / A. de Paolis, S. Sabatini, L. de Pascalis [et al.] // The Plant Journal. – 1996. – Vol. 10. – № 2. – P. 215–223.

170. De Ronde J. A. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress / J. A. de Ronde, W. A. Cress, G. H. Krüger [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2004. – Vol. 161. – № 11. – P. 1211–1224.

171. Debeaujon I. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development / I. Debeaujon, N. Nesi, P. Perez [et al.] // The Plant Cell. – 2003. – Vol. 15. – № 11. – P. 2514–2531.

172. Dehesh K. GT-2: a transcription factor with twin autonomous DNA-binding domains of closely related but different target sequence specificity / K. Dehesh, H. Hung, J. M. Tepperman [et al.] // The EMBO Journal. – 1996. – Vol. 11. – № 11. – P. 4131–4144.

173. Dehio C. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA / C. Dehio, K. Grossmann, J. Schell [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1993. – Vol. 23. – № 6. – P. 1199–1210.

174. Dehio C. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically reversible transgene silencing / C. Dehio, J. Schell // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – Vol. 91. – № 12. – P. 5538–5542.

175. Delbarre A. The *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* does not increase the auxin sensitivity of tobacco protoplasts by modifying the intracellular auxin

concentration / A. Delbarre, P. Muller, V. Imhoff [et al.] // *Plant Physiology*. – 1994. – Vol. 105. – № 2. – P. 563–569.

176. Delormel T. Y. Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in *Arabidopsis thaliana* / T. Y. Delormel, M. B. Boudsocq // *New Phytologist*. – 2019. – Vol. 224. – № 2. – P. 585–604.

177. Deng W. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins / W. Deng, L. Chen, D. W. Wood [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95. – № 12. – P. 7040–7045.

178. Deng X. *TaCIPK29*, a CBL-interacting protein kinase gene from wheat, confers salt stress tolerance in transgenic tobacco / X. Deng, W. Hu, S. Wei [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e69881.

179. Denoux C. Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings / C. Denoux, R. Galletti, N. Mammarella [et al.] // *Molecular Plant*. – 2008. – Vol. 1. – № 3. – P. 423–445.

180. Deshkar N. A comprehensive review of *Rubia cordifolia* Linn / N. Deshkar, S. Tilloo, V. B. Pande // *Pharmacognosy Reviews*. – 2008. – Vol. 2. – № 3. – P. 124–134.

181. Dilshad E. Genetic transformation of *Artemisia carvifolia* Buch with *rol* genes enhances artemisinin accumulation / E. Dilshad, R. M. Cusido, K. R. Estrada [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 10. – P. e0140266.

182. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC – Commission Declaration. DIRECTIVE 2001/18/EC // *Official Journal L 106*. – 17/04/2001. – P 0001–0039.

183. Dixit A. K. Phospholipid mediated activation of calcium dependent protein kinase 1 (*CaCDPK1*) from chickpea: a new paradigm of regulation / A. K. Dixit, C. Jayabaskaran // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. e51591.

184. Djamei A. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling / A. Djamei, A. Pitzschke, H. Nakagami [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 318. – № 5849. – P. 453–456.
185. Dmochowska-Boguta M. Roles of peroxidases and NADPH oxidases in the oxidative response of wheat (*Triticum aestivum*) to brown rust (*Puccinia triticina*) infection / M. Dmochowska-Boguta, A. Nadolska-Orczyk, W. Orczyk // *The Plant Pathology Journal*. – 2012. – Vol. 62. – № 5. – P. 993–1002.
186. Dominguez-Solis J. R. A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts / J. R. Dominguez-Solis, Z. He, A. Lima [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 42. – P. 16386–16391.
187. Dong A. The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform, *OsCaM61*, depends on its prenylation status / A. Dong, H. Xin, Y. Yu [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 48. – № 3. – P. 203–210.
188. Doran P. M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: incentives and limitations / P. M. Doran // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – Vol. 103. – № 1. – P. 60–76.
189. Dosseh C. *Rubia cordifolia* roots. II: new quinones / C. Dosseh, A. M. Tessier, P. Delaveau // *Planta Medica*. – 1981. – Vol. 43. – № 2. – P. 141–147.
190. Drerup M. M. The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase *CIPK26* regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF / M. M. Drerup, K. Schlücking, K. Hashimoto [et al.] // *Molecular Plant*. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 559–569.
191. Dubrovina A. S. Effect of long-term cultivation on resveratrol accumulation in a high-producing cell culture of *Vitis amurensis* / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2012. – Vol. 34. – P. 1101–1106.
192. Dumanović J. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview / J. Dumanović, E. Nepovimova, M. Natić [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – Vol. 11. – P. 552969.

193. Durand-Tardif M. Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*. Organ and phenotypic specificity / M. Durand-Tardif, R. Broglie, J. Slightom // Journal of Molecular Biology. – 1985. – Vol. 186. – № 3. – P. 557–564.
194. El Omari N. Evaluation of *in vitro* antioxidant and antidiabetic activities of *Aristolochia longa* extracts / N. El Omari, K. Sayah, S. Fettach [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2019. – P. 7384735.
195. Elmayan T. Regulation of plant NADPH oxidase / T. Elmayan, F. Simon-Plas // Plant Signaling & Behavior. – 2007. – Vol. 2. – № 6. – P. 505–507.
196. Escobar M. A. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease / M. A. Escobar, A. M. Dandekar // Trends in Plant Science. – 2003. – Vol. 8. – P. 380–386.
197. Eshdat Y. Plant glutathione peroxidases / Y. Eshdat, D. Holland, Z. Faltin [et al.] // Physiologia Plantarum. – 1997. – Vol. 100. – № 2. – P. 234–240.
198. Eskandarzadeh M. Genus *Rubia*: therapeutic effects and toxicity: a review / M. Eskandarzadeh, A. Esmaeili, M. Nikbakht [et al.] // Herbal Medicines Journal. – 2023. – Vol. 8. – P. 1–14.
199. Espinosa A. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants / A. Espinosa, M. Guo, V. C. Tam [et al.] // Molecular Microbiology. – 2003. – Vol. 49. – № 2. – P. 377–387.
200. Estruch J. J. The protein encoded by the *rolB* plant oncogene hydrolyses indole glucosides / J. J. Estruch, J. Schell, A. Spena // The EMBO Journal. – 1991a. – Vol. 10. – № 11. – P. 3125–3128.
201. Estruch J. J. Cytosolic localization in transgenic plants of the *rolC* peptide from *Agrobacterium rhizogenes* / J. J. Estruch, A. Parets-Soler, T. Schmülling [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1991b. – Vol. 17. – № 3. – P. 547–550.
202. Estruch J. J. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates / J. J. Estruch, D. Chriqui, K. Grossmann [et al.] // The EMBO Journal. – 1991c. – Vol. 10. – № 10. – P. 2889–2895.

203. Facchini P. J. Can *Arabidopsis* make complex alkaloids? / P. J. Facchini, D. A. Bird, B. St.-Pierre // Trends Plant Science. – 2004. – Vol. 9. – № 3. – P. 116–122.
204. Faiss M. Chemically induced expression of the *rolC*-encoded B-glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta / M. Faiss, M. Strnad, P. Redig [et al.] // The Plant Journal. – 1996. – Vol. 10. – № 1. – P. 33–46.
205. Falasca G. The *rolD* oncogene promotes axillary bud and adventitious root meristems in *Arabidopsis* / G. Falasca, M. M. Altamura, S. D'Angeli [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2010. – Vol. 48. – № 9. – P. 797–804.
206. Falke J. J. Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins / J. J. Falke, S. K. Drake, A. L. Hazard [et al.] // Quarterly Reviews of Biophysics. – 1994. – Vol. 27. – № 3. – P. 219–290.
207. Favero B. T. Transgenic *Kalanchoë blossfeldiana*, containing individual *rol* genes and open reading frames under 35s promoter, exhibit compact habit, reduced plant growth, and altered ethylene tolerance in flowers / B. T. Favero, Y. Tan, Y. Lin [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12. – P. 672023.
208. Fazio G. C. Genome mining to identify new plant triterpenoids / G. C. Fazio, R. Xu, S. P. Matsuda // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – Vol. 126. – № 18. – P. 5678–5679.
209. Feller A. Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors / A. Feller, K. Machemer, E. L. Braun // The Plant Journal. – 2011. – Vol. 66. – № 1. – P. 94–116.
210. Feussner I. The lipoxygenase pathway / I. Feussner, C. Wasternack // Annual Review of Plant Biology. – 2002. – Vol. 53. – P. 275–297.
211. Filetici P. Specific interaction between a *Nicotiana tabacum* nuclear protein and the *Agrobacterium rhizogenes rolB* promoter / P. Filetici, F. Moretti, G. Camilloni [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 1997. – Vol. 151. – № 2. – P. 159–165.

212. Filippini F. The plant oncogene *rolB* alters binding to auxin to plant cell membranes / F. Filippini, F.L. Schiavo, M. Terzi [et al.] // *Plant & Cell Physiology*. – 1994. – Vol. 35. – № 6565. – P. 767–771.
213. Filippini F. The *rolB* protein is located at the plasma membrane in *rolB*-transformed carrot cells / F. Filippini, O. Marin, V. Rossi [et al.] // *Plant Biosystems*. – 1995. – Vol. 129. – № 1. – P. 1003–1004.
214. Filippini F. A plant oncogene as a phosphatase / F. Filippini, V. Rossi, O. Marin // *Nature*. – 1996. – Vol. 379. – P. 499–500.
215. Finegold A. A. Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase / A. A. Finegold, K. P. Shatwell, A. W. Segal [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 49. – P. 31021–31024.
216. Foreman J. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth / J. Foreman, V. Demidchik, J. H. Bothwell [et al.] // *Nature*. – 2003. – Vol. 422. – № 6930. – P. 442–446.
217. Foyer C. H. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses / C. H. Foyer, G. Noctor // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – № 7. – P. 1866–1875.
218. Foyer C. H. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis / C. H. Foyer, S. Shigeoka // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 155. – № 1. – P. 93–100.
219. Franke R. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis* / R. Franke, M. R. Hemm, J. W. Denault [et al.] // *The Plant Journal*. – 2002. – Vol. 30. – № 1. – P. 47–59.
220. Frerigmann H. bHLH05 is an interaction partner of MYB51 and a novel regulator of glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* / H. Frerigmann, B. Berger, T. Gigolashvili // *Plant Physiology*. – 2014. – Vol. 166. – № 1. – P. 349–369.
221. Frerigmann H. The role of MYB34, MYB51 and MYB122 in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / H. Frerigmann, E. Glawischnig, T. Gigolashvili // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 654.

222. Frottin F. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment / F. Frottin, F. Schueder, S. Tiwary [et al.] // *Science*. – 2019. – Vol. 365. – № 6451. – P. 342–347.
223. Frugoli J. A. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh / J. A. Frugoli, H. H. Zhong, M. L. Nuccio [et al.] // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol. 112. – № 1. – P. 327–336.
224. Furner I. J. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana* / I. J. Furner, G. A. Huffman, R. M. Amasino [et al.] // *Nature*. – 1986. – Vol. 319. – P. 422–427.
225. Gachon C. M. Transcriptional co-regulation of secondary metabolism enzymes in *Arabidopsis*: Functional and evolutionary implications / C. M. Gachon, M. Langlois-Meurinne, Y. Henry [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 58. – № 2. – P. 229–245.
226. Gális I. Resistance of transgenic tobacco seedlings expressing the *Agrobacterium tumefaciens* C58-6b gene, to growth-inhibitory levels of cytokinin is associated with elevated IAA levels and activation of phenylpropanoid metabolism / I. Gális, P. Simek, H. A. van Onckelen [et al.] // *Plant & Cell Physiology*. – 2002. – Vol. 43. – № 8. – P. 939–950.
227. Gális I. Salicylic acid-, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris* / I. Gális, J. L. Smith, P. E. Jameson // *Journal of Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 161. – № 4. – P. 459–466.
228. Gális R. Resonances as the general cause of the outbursts in the symbiotic system AG Draconis / R. Gális, L. Hric, M. Friedjung [et al.] // *Astronomy and Astrophysics*. – 1999. – Vol. 348. – P. 533–541.
229. Gao L. P. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes / L. P. Gao, H. L. Wei, H. S. Zhao [et al.] // *Die Pharmazie*. – 2010. – Vol. 60. – № 1. – P. 62–65.
230. Gapinska M. Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots / M. Gapinska,

M. S. Skłodowska, B. Gabara // *Acta Physiologia Plantarum*. – 2008. – Vol. 30. – P. 11–18.

231. Gardner N. Differential expression of *rolC* results in unique plant phenotypes / N. Gardner, T. Melberg, M. George [et al.] // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2006. – Vol. 131. – № 1. – P. 82–88.

232. Garfinkel D. J. Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis / D. J. Garfinkel, R. B. Simpson, L. W. Ream [et al.] // *Cell*. – 1981. – Vol. 27. – № 1. – P. 143–153.

233. Gechev T. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes / T. Gechev, I. Gadjev, F. van Breusegem [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2002. – Vol. 59. – № 4. – P. 708–714.

234. Gelvin S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool / S. B. Gelvin // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – Vol. 67. – № 1. – P. 16–37.

235. Gelvin S. B. Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome / S. B. Gelvin // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 3. – P. 52.

236. Gelvin S. B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome / S. B. Gelvin // *Annual Review of Genetics*. – 2017. – Vol. 51. – P. 195–217.

237. Geu-Flores F. Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis* / F. Geu-Flores, M. E. Møldrup, C. Böttcher [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 6. – P. 2456–2469.

238. Ghosh S. Anti-inflammatory and anticancer compounds isolated from *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn / S. Ghosh, M. Das Sarma, A. Patra [et al.] // *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2010. – Vol. 62. – P. 1158–1166.

239. Gifford J. L. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs / J. L. Gifford, M. P. Walsh, H. J. Vogel // *The Biochemical Journal*. – 2007. – Vol. 405. – № 2. – P. 199–221.

240. Gill S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S. S. Gill, N. Tuteja // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2010. – Vol. 48. – № 12. – P. 909–930.

241. Glawischnig E. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis* / E. Glawischnig, B. G. Hansen, C. E. Olsen [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 21. – P. 8245–8250.

242. Glazebrook J. Isolation of phytoalexindeficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens / J. Glazebrook, F. M. Ausubel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91. – № 19. – P. 8955–8959.

243. Gong D. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis* / D. Gong, Y. Guo, K. S. Schumaker [et al.] // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 134. – № 3. – P. 919–926.

244. Gong M. Heat-shock-induced changes in intracellular Ca²⁺ level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance / M. Gong, A. H. Van der Luit, M. R. Knight [et al.] // *Plant Physiology*. – 1998. – Vol. 116. – № 1. – P. 429–437.

245. Gong X. P. Anti-diarrheal and anti-inflammatory activities of aqueous extract of the aerial part of *Rubia cordifolia* / X. P. Gong, Y. Y. Sun, W. Chen [et al.] // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 20.

246. Gordon J. E. The *Agrobacterium* Ti plasmids / J. E. Gordon, P. J. Christie // *Microbiology Spectrum*. – 2014. – Vol. 2. – № 6. – P. 10.1128.

247. Gorpenchenko T. Y. The *Agrobacterium rhizogenes rolC*-gene-induced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses / T. Y. Gorpenchenko, K. V. Kiselev, V. P. Bulgakov [et al.] // *Planta*. – 2006. – Vol. 223. – P. 457–467.

248. Gorpenchenko T. Y. Can plant oncogenes inhibit programmed cell death? The *rolB* oncogene reduces apoptosis-like symptoms in transformed plant cells /

T. Y. Gorpenchenko, D. L. Aminin, Y. V. Vereshchagina [et al.] // *Plant Signaling & Behavior*. – 2012. – Vol. 7. – № 9. – P. 1058–6101.

249. Gorpenchenko T. Y. Tempo-spatial pattern of stepharine accumulation in *Stephania glabra* morphogenic tissues / T. Y. Gorpenchenko, V. P. Grigorchuk, D. V. Bulgakov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 4. – P. 808.

250. Grant J. J. Oxidative burst and cognate redox signaling reported by luciferase imaging: Identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity / J. J. Grant, B.-W. Yun, G. J. Loake [et al.] // *The Plant Journal*. – 2000. – Vol. 24. – № 5. – P. 369–582.

251. Grishchenko O. V. The influence of the *rolC* gene on isoflavonoid production in callus cultures of *Maackia amurensis* / O. V. Grishchenko, K. V. Kiselev, G. K. Tchernoded [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2013. – Vol. 113. – P. 429–435.

252. Grollman A. P. Global hazards of herbal remedies: lessons from *Aristolochia*: The lesson from the health hazards of *Aristolochia* should lead to more research into the safety and efficacy of medicinal plants / A. P. Grollman, D. M. Marcus // *EMBO Reports*. – 2016. – Vol. 17. – P. 619–625.

253. Groom Q. J. *rbohA*, a rice homologue of the mammalian *gp91phox* respiratory burst oxidase gene / Q. J. Groom, M. A. Torres, A. P. Fordham-Skelton [et al.] // *The Plant Journal*. – 1996. – Vol. 10. – № 3. – P. 515–522.

254. Grubb C. D. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis / C. D. Grubb, B. J. Zipp, J. Ludwig-Müller [et al.] // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 40. – № 6. – P. 893–908.

255. Gryffroy L. Rhizogenic *Agrobacterium* protein RolB interacts with the TOPLESS repressor proteins to reprogram plant immunity and development / L. Gryffroy, E. Ceulemans, N. M. Pérez [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2023. – Vol. 120. – № 3. – P. e2210300120.

256. Guan B. Germination responses of *Medicago ruthenica* seeds to salinity, alkalinity, and temperature / B. Guan, D. Zhou, H. Zhang [et al.] // Journal of Arid Environments. – 2009. – Vol. 73. – № 1. – P. 135–138.
257. Guinnin F. F. D. Physico-chemical composition and radical scavenging activity evaluation of the extracts of *Aristolochia albida* Duch. (*Aristolochiaceae*) of Benin / F. F. D. Guinnin, I. T. Sacramento, J. M. Ategbo [et al.] // Journal of Applied Biosciences. – 2016. – Vol. 107. – P. 10460–10470.
258. Guivarch A. Tissue-specific expression of the *rolA* gene mediates morphological changes in transgenic tobacco / A. Guivarch, M. Carneiro, F. Vilaine [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1996. – Vol. 30. – № 1. – P. 125–134.
259. Guo Y. A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* / Y. Guo, L. Xiong, C. P. Song [et al.] // Developmental Cell. – 2002. – Vol. 3. – № 2. – P. 233–244.
260. Gupta P. P. Biological activity of *Rubia cordifolia* and isolation of an active principle / P. P. Gupta, R. C. Srimal, N. Verma [et al.] // Pharmaceutical Biology – 1999. – Vol. 37. – P. 46–49.
261. Gupta R. Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants / R. Gupta, S. Luan // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 132. – № 3. – P. 1149–1152.
262. Gutierrez-Valdes N. Hairy root cultures-a versatile tool with multiple applications / N. Gutierrez-Valdes, S. T. Häkkinen, C. Lemasson [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2020. – Vol. 11. – P. PMC7064051.
263. Halfter U. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3 / U. Halfter, M. Ishitani, J. K. Zhu // Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. – 2000. – Vol. 97. – № 3. – P. 3735–3740.
264. Halkier B. A. The biosynthesis of glucosinolates / B. A. Halkier, L. Du // Trends in Plant Science. – 1997. – Vol. 2. – № 11. – P. 425–431.

265. Hammond-Kosack K. E. Resistance gene-dependent plant defense responses / K. E. Hammond-Kosack, J. D. G. Jones // *Plant Cell*. – 1996. – Vol. 8. – P. 1773–1179.
266. Han Y. S. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the *Rubiaceae* / Y. S. Han, R. Van der Heijden, R. Verpoorte // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2001. – Vol. 67. – P. 201–220.
267. Hansen C. H. CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis* / C. H. Hansen, L. Du, P. Naur [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 27. – P. 24790–24796.
268. Hansen G. Phenotypic effects of overexpression of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA *ORF13* in transgenic tobacco plants are mediated by diffusible factor(s) / G. Hansen, D. Vaubert, J. N. Héron [et al.] // *The Plant Journal*. – 1993. – Vol. 4. – P. 581–585.
269. Harinasut P. Salinity effect on antioxidant enzymes in mulberry cultivar / P. Harinasut, D. Poonsopa, K. Roengmongkol, R. Charoensataporn // *Science Asia*. – 2003. – Vol. 29. – P. 109–113.
270. Harmon A. C. Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain / A. C. Harmon, B. Yoo, C. Mccaffery // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – № 23. – P. 7278–7287.
271. Harper J. F. Calcium and lipid regulation of an *Arabidopsis* protein kinase expressed in *Escherichia coli* / J. F. Harper, B. M. Binder, M. R. Sussman // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32. – P. 3282–3290.
272. Harper J. F. Genetic identification of an autoinhibitor in *CDPK*, a protein kinase with a calmodulin-like domain / J. F. Harper, J. F. Huang, S. J. Lloyd // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – № 23. – P. 7267–7277.
273. Harper J. F. Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases / J. F. Harper, G. Breton, A. Harmon // *Annual Review of Plant Biology*. – 2004. – Vol. 55. – P. 263–288.
274. Hasanuzzaman M. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator /

M. Hasanuzzaman, M. H. M. B. Bhuyan, F. Zulfiqar [et al.] // *Antioxidants*. –2020. – Vol. 9. – № 8. – P. 681.

275. Hegde V. R. New potential antitumor compounds from the plant *Aristolochia manshuriensis* as inhibitors of the CDK2 enzyme / V. R. Hegde, S. Borges, M. Patel [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2010. – Vol. 20. – № 4. – P. 1344–1346.

276. Hegeman A. D. A phyloproteomic characterization of *in vitro* autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases / A. D. Hegeman, M. Rodriguez, B. W. Han [et al.] // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6. – № 12. – P. 3649–3664.

277. Heide L. Enzymatic synthesis of o-succinylbenzoyl-CoA in cell-free extracts of AQ producing *Galium mollugo* L. cell suspension cultures / L. Heide, R. Kolkman, S. Arendt [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 1982. – Vol. 1. – P. 180–182.

278. Helfer A. Functional diversity and mutational analysis of *Agrobacterium 6B* oncoproteins / A. Helfer, S. Pien, L. Otten // *Molecular Genetics and Genomics*. – 2002. – Vol. 267. – P. 577–586.

279. Helfer A. The *Agrobacterium* oncogene *AB-6b* causes a graft-transmissible enation syndrome in tobacco / A. Helfer, B. Clement, P. Michler [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 52. – P. 483–493.

280. Hempel S. L. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123 / S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1999. – Vol. 27. – P. 146–159.

281. Henderson I. R. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning / I. R. Henderson, X. Zhang, C. Lu [et al.] // *Nature Genetics*. – 2006. – Vol. 38. – P. 721–725.

282. Heo W. D. Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses / W. D. Heo, S. H. Lee,

M. C. Kim [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1999. – Vol. 96. – № 2. – P. 766–771.

283. Hernández J. A. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria / J. A. Hernández, F. J. Corpas, M. Gómez [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 1993. – Vol. 89. – № 1. – P. 103–110.

284. Heupel R. Protein organization in the matrix of leaf peroxisomes. A multi-enzyme complex involved in photorespiratory metabolism / R. Heupel, H. W. Heldt // *European Journal of Biochemistry*. – 1970. – Vol. 220. – P. 165–172.

285. Hilleary R. Systemic signaling in response to wounding and pathogens / R. Hilleary, S. Gilroy // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2018. – Vol. 43. – P. 57–62.

286. Hindges R. cDNA and derived amino acid sequence of a cytosolic Cu, Zn superoxide dismutase from *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn / R. Hindges, A. Slusarenko // *Plant Molecular Biology*. – 1992. – Vol. 18. – № 1. – P. 123–125.

287. Hirai M. Y. Omics-based identification of *Arabidopsis Myb* transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis / M. Y. Hirai, K. Sugiyama, Y. Sawada [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – Vol. 104. – № 15. – P. 6478e6483.

288. Hooykaas P. J. The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene *6(b)* is an onc gene / P. J. Hooykaas, H. den Dulk-Ras, R. A. Schilperoort // *Plant Molecular Biology*. – 1988. – Vol. 11. – P. 791–794.

289. Hou Q. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress / Q. Hou, G. Ufer, D. Bartels // *Plant, Cell & Environment*. – 2016. – Vol. 39. – P. 1029–1048.

290. Hrabak E. M. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases / E. M. Hrabak, C. W. Chan, M. Gribskov [et al.] // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 132. – № 2. – P. 666–680.

291. Hu C.-H. Wide identification and functional analysis of NADPH oxidase family genes in wheat during development and environmental stress responses / C.-H. Hu, X.-Y. Wei, B. Yuan [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 906.

292. Hua H. M. Studies on naphthoic acid esters from the roots of *Rubia cordifolia* / H. M. Hua, S. X. Wang, L. J. Wu [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 1992. – Vol. 27. – № 4. – P. 279–282.
293. Huang S. J. *Arabidopsis* VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization / S. J. Huang, R. C. Robinson, L. Y. Gao [et al.] // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 486–501.
294. Huimin, R. The expression of constitutively active *CPK3* impairs potassium uptake and transport in *Arabidopsis* under low K⁺ stress / R. Huimin, J. Hussain, L. Wenjie [et al.] // *Cell Calcium*. – 2021. – Vol. 98. – № 2. – 102447.
295. Humbare R. B. Phytochemical characterization, antioxidant and anti-proliferative properties of *Rubia cordifolia* L. extracts prepared with improved extraction conditions / R. B. Humbare, J. Sarkar, A. A. Kulkarni [et al.] // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – P. 1006.
296. Igarashi M. Introduction of *rolC* into Marubakaidou [*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami Mo 84-A] apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens* / M. Igarashi, H. Ogasawara, Y. Hatsuyama [et al.] // *Plant Science*. – 2002. – Vol. 163. – № 3. – P. 463–473.
297. Intrieri M. C. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana* / M. C. Intrieri, M. Buiatti // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2001. – Vol. 20. – № 1. – P. 100–110.
298. Ishibashi N. Protein encoded by oncogene *6b* from *Agrobacterium tumefaciens* has a reprogramming potential and histone chaperone-like activity / N. Ishibashi, S. Kitakura, S. Terakura [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – Vol. 5. – P. 572.
299. Ishibashi Y. NADPH oxidases act as key enzyme on germination and seedling growth in barley (*Hordeum vulgare* L.) / Y. Ishibashi, T. Tawaratsumida, S. H. Zheng [et al.] // *Plant Production Science*. – 2010. – Vol. 13. – P. 45–52.
300. Ishida M. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of *Brassicaceae* vegetables / M. Ishida, M. Hara, N. Fukino [et al.] // *Breeding Science*. – 2014. – Vol. 64. – № 1. – P. 48–59.

301. Ishikawa H. Diurnal changes in shoot water dynamics are synchronized with hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* / H. Ishikawa, K. Sato-Nara, T. Takase [et al.] // *Plant Signaling & Behavior*. – 2013. – Vol. 8. – P. e23250.
302. Ishikawa T. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms / T. Ishikawa, S. Shigeoka // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2008. – Vol. 72. – P. 1143–1154.
303. Ishitani M. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding/ M. Ishitani, J. Liu, U. Halfter [et al.] // *The Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12. – № 9. – P. 1667–1678.
304. Ismail H. Optimization of cell suspension culture of transformed and untransformed lettuce for the enhanced production of secondary metabolites and their pharmaceutical evaluation / H. Ismail, S. S. Kayani, S. I. Kayani [et al.] // *3 Biotech*. – 2019. – Vol. 9. – № 9. – P. 339.
305. Ito T. Autophosphorylation affects substrate-binding affinity of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase1 / T. Ito, S. Ishida, S. Oe [et al.] // *Plant Physiology*. – 2017. – Vol. 174. – № 4. – P. 2457–2468.
306. Itokawa H. Nor-clerodane diterpenes from *C. cajucara* / H. Itokawa, Y. Ichihara, H. Kogima [et al.] // *Phytochemistry*. – 1989. – Vol. 28. – № 6. – P. 1667–1669.
307. Itokawa H. Cajucarins A and B, new clerodane diterpenes from *C. cajucara*, and their conformations / H. Itokawa, Y. Ichihara, M. Shimizu [et al.] // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1990. – Vol. 38. – P. 701–705.
308. Iwakawa H. Perturbation of H3K27me3-associated epigenetic processes increases *Agrobacterium*-mediated transformation / H. Iwakawa, B. C. Carter, B. C. Bishop [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2017. – Vol. 30. – № 1. – P. 35–44.
309. Iwano M. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration is essential for pollen tube growth / M. Iwano, T. Entani, H. Shiba [et al.] // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 150. – № 3. – P. 1322–1334.

310. Jacob P. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance / P. Jacob, H. Hirt, A. Bendahmane // *Plant Biotechnology Journal*. – 2017. – Vol. 15. – № 4. – P. 405–414.
311. Jamra G. Ectopic expression of finger millet calmodulin confers drought and salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana* / G. Jamra, A. Agarwal, N. Singh [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2021. – Vol. 40. – № 11. – P. 2205–2223.
312. Jegadeeswari P. Quantification of total phenolics, flavonoid and *in vitro* antioxidant activity of *Aristolochia bracteata* Retz / P. Jegadeeswari, E. Daffodil, V. R. Mohan // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2014. – Vol. 6. – P. 747–752.
313. Jez J. M. Structural biology of plant sulfur metabolism: From sulfate to glutathione / J. M. Jez // *Journal of Experimental Botany*. – 2019. – Vol. 70. – P. 4089–4103.
314. Ji L. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond / L. Ji, X. Chen // *Cell Research*. – 2012. – Vol. 22. – № 4. – P. 624–636.
315. Jiang S. A maize calcium-dependent protein kinase gene, *ZmCPK4*, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* / S. Jiang, D. Zhang, L. Wang [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2013. – Vol. 71. – P. 112–120.
316. Jimenez A. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves / A. Jimenez, J. A. Hernandez, L. A. Del Rio, F. Sevilla // *Plant Physiology*. – 1997. – Vol. 114. – № 1. – P. 275–284.
317. Jin S. G. The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes / S. G. Jin, T. Roitsch, P. J. Christie [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1990. – Vol. 172. – № 2. – P. 531–537.
318. Jin Y. *T-6b* allocates more assimilation product for oil synthesis and less for polysaccharide synthesis during the seed development of *Arabidopsis thaliana* / Y. Jin, J. Hu, X. Liu [et al.] // *Biotechnology for Biofuels*. – 2017. – Vol. 10. – P. 19.

319. Joo J. H. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone / J. H. Joo, S. Wang, J. G. Chen [et al.] // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 957–970.
320. Jungkuntz I. *AtHsp70-15*-deficient *Arabidopsis* plants are characterized by reduced growth, a constitutive cytosolic protein response and enhanced resistance to *TuMV* / I. Jungkuntz, K. Link, F. Vogel [et al.] // *The Plant Journal*. – 2011. – Vol. 66. – P. 983–995.
321. Kado C. I. Horizontal gene transfer: sustaining pathogenicity and optimizing host-pathogen interactions / C. I. Kado // *Molecular Plant Pathology*. – 2009. – Vol. 10. – P. 143–150.
322. Kairong C. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. / C. Kairong, X. Gengsheng, L. Xinmin [et al.] // *Plant Science*. – 1999. – Vol. 146. – P. 9–16.
323. Kakiuchi Y. Reduction of polar auxin transport in tobacco by the tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens AK-6b* gene / Y. Kakiuchi, I. Gális, S. Tamogami [et al.] // *Planta*. – 2006. – Vol. 223. – P. 237–247.
324. Kalinina N. O. The multiple functions of the nucleolus in plant development, disease and stress responses / N. O. Kalinina, S. Makarova, A. Makhotenko [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – № 9. – P. 132.
325. Kalogeraki V. S. Wound-released chemical signals may elicit multiple responses from an *Agrobacterium tumefaciens* strain containing an octopine-type Ti plasmid / V. S. Kalogeraki, S. C. Winans // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – Vol. 180. – № 21. – P. 5660–5667.
326. Kärkönen A. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants / A. Kärkönen, K. Kuchitsu // *Phytochemistry*, 2015. – Vol. 112. – P. 22–32.
327. Karpinska B. Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis* / B. Karpinska, G. Wingsle, S. Karpinski // *IUBMB Life*. – 2000. – Vol. 501. – 1. – P. 21–6.

328. Karpinski S. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis* / S. Karpinski, H. Reynolds, B. Karpinska [et al.] // *Science*. – 1999. – Vol. 284. – № 5411. – P. 654–657.
329. Kastell A. Hairy roots, callus, and mature plants of *Arabidopsis thaliana* exhibit distinct glucosinolate and gene expression profiles / A. Kastell, I. Smetanska, M. Schreiner [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2013. – Vol. 115. – P. 45–54.
330. Kaur G. Intracellular calcium levels can regulate Importin-dependent nuclear import / G. Kaur, J. D. Ly-Huynh, D. A. Jans // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 450. – № 1. – P. 812–817.
331. Kaur G. Characterization of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase- and calmodulin-binding activity of a cytosolic *Arabidopsis thaliana* cyclophilin AtCyp19-3 / G. Kaur, S. Singh, H. Singh [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 8. – P. e0136692.
332. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction / T. Kawano // *Plant Cell Reports*. – 2003. – Vol. 21. – № 9. – P. 829–837.
333. Keinath N. F. Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on *flg22*- and chitin-induced transient $[Ca^{2+}]_{cyt}$ patterns in *Arabidopsis* / N. F. Keinath, R. Waadt, R. Brugman [et al.] // *Molecular Plant*. – 2015. – Vol. 8. – № 8. – P. 1188–1200.
334. Keith C. H. Local cytoplasmic calcium gradients in living mitotic cells / C. H. Keith, R. Ratan, F. R. Maxfield [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol. 316. – P. 848–850.
335. Keller T. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase *gp91phox* subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca^{2+} binding motifs / T. Keller, H. G. Damude, D. Werner [et al.] // *The Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – P. 255–266.
336. Kelley D. R. E3 ubiquitin ligases: key regulators of hormone signaling in plants / D. R. Kelley // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2018. – Vol. 17. – P. 1047–1054.

337. Khurana P. Arabidopsis VILLIN1 and VILLIN3 have overlapping and distinct activities in actin bundle formation and turnover / P. Khurana, J. L. Henty, S. J. Huang [et al.] // *The Plant Cell*. – 2010. – Vol. 22. – № 8. – P. 2727–2748.

338. Kim B. G. The calcium sensor *CBL10* mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis* / B. G. Kim, R. Waadt, Y. H. Cheong [et al.] // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. 52. – № 3. – P. 473–484.

339. Kim H. J. Cu/Zn superoxide dismutases in developing cotton fibers: evidence for an extracellular form / H. J. Kim, N. Kato, S. Kim [et al.] // *Planta*. – 2008. – Vol. 228. – № 2. – P. 281–292.

340. Kim K. N. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis* / K. N. Kim, Y. H. Cheong, J. J. Grant [et al.] // *The Plant Cell*. – 2003. – Vol. 15. – № 2. – P. 411–423.

341. Kim S.-I. Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions / S.-I. Kim, Veena, S. B. Gelvin // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. – 51. – № 5. – P. 779–791.

342. Kimura S. Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca²⁺-dependent activation of *Arabidopsis* NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca²⁺ and reactive oxygen species / S. Kimura, H. Kaya, T. Kawarazaki [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – Vol. 1823. – № 2. – P. 398–405.

343. Kimura S. The CBL-interacting protein kinase *CIPK26* is a novel interactor of *Arabidopsis* NADPH oxidase *AtRbohF* that negatively modulates its ROS-producing activity in a heterologous expression system / S. Kimura, T. Kawarazaki, H. Nibori [et al.] // *Journal of Biochemistry*. – 2013. – Vol. 153. – № 2. – P. 191–195.

344. Kiselev K. V. The *rolC* gene induces expression of pathogenesis-related β -1, 3-glucanase in transformed ginseng cells / K. V. Kiselev, M. I. Kusaykin, A. S. Dubrovina [et al.] // *Phytochemistry*. – 2006. – Vol. 67. – № 20. – P. 2225–2231.

345. Kiselev K. V. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina, M. V. Veselova [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 123. – № 3. – P. 681–692.
346. Kitakura S. The protein encoded by oncogene *6b* from *Agrobacterium tumefaciens* interacts with a nuclear protein of tobacco / S. Kitakura, T. Fujita, Y. Ueno [et al.] // The Plant Cell. – 2002. – Vol. 14. – P. 451–463.
347. Kitakura S. Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* oncoprotein *6b* and a tobacco nucleolar protein that is homologous to *TNPI* encoded by a transposable element of *Antirrhinum majus* / S. Kitakura, S. Terakura, Y. Yoshioka [et al.] // Journal of Plant Research. – 2008. – Vol. 121. – № 4. – P. 425–433.
348. Kleist T. J. Comparative phylogenomics of the CBL-CIPK calcium-decoding network in the moss *Physcomitrella*, *Arabidopsis*, and other green lineages / T. J. Kleist, A. L. Spencley, S. Luan // Frontiers in Plant Science. – 2014. – Vol. 5. – P. 187.
349. Kliebenstein D. J. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization / D. J. Kliebenstein, R. A. Monde, R. L. Last // Plant Physiology. – 1998. – Vol. 118. № 2. – P. 637–650.
350. Kliebenstein D. J. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation / D. J. Kliebenstein, J. Kroymann, P. Brown [et al.] // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 126. – № 2. – P. 811–825.
351. Kliebenstein D. J. Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana* / D. J. Kliebenstein, A. Figuth, T. Mitchell-Olds // Genetics. – 2002 – Vol. 161. – № 4. – P. 1685–1696.
352. Kliebenstein D. J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses / D. J. Kliebenstein // Plant, Cell & Environment. – 2004. – Vol. 27. – № 6. – P. 675–684.
353. Klimecka M. Regulation of wound-responsive calcium-dependent protein kinase from maize (*ZmCPK11*) by phosphatidic acid / M. Klimecka, J. Szczegieliak, L. Godecka [et al.] // Acta Biochimica Polonica. – 2011. – Vol. 58. – № 4. – P. 589–595.

354. Kobayashi M. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase / M. Kobayashi, I. Ohura, K. Kawakita [et al.] // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – № 3. – P. 1065–1080.

355. Kobayashi M. *StCDPK5* confers resistance to late blight pathogen but increases susceptibility to early blight pathogen in potato via reactive oxygen species burst / M. Kobayashi, M. Yoshioka, S. Asai [et al.] // *New Phytologist*. – 2012. – Vol. 196. – № 1. – P. 223e237.

356. Kodahl N. The *Agrobacterium rhizogenes* oncogenes *rolB* and *ORF13* increase formation of generative shoots and induce dwarfism in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh / N. Kodahl, R. Müller, H. Lütken // *Plant Science*. – 2016. – Vol. 252. – P. 22–29.

357. Koltunow A. M. Expression of *rolB* in apomictic *Hieracium piloselloides* Vill. causes ectopic meristems in planta and changes in ovule formation, where apomixis initiates at higher frequency / A. M. Koltunow, S. D. Johnson, M. Lynch [et al.] // *Planta*. – 2001. – Vol. 214. – № 2. – P. 196–205.

358. Kolukisaoglu U. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice *CBL-CIPK* signaling networks / U. Kolukisaoglu, S. Weinl, D. Blazevic [et al.] // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 134. – P. 43–58.

359. Komrskova D. A comparison of chemical systems for luminometric determination of antioxidant capacity towards individual reactive oxygen species / D. Komrskova, A. Lojek, J. Hrbac [et al.] // *Luminescence*. – 2006. – Vol. 21. – № 4. – P. 239–244.

360. Konieczny R. Pattern of antioxidant enzyme activities and hydrogen peroxide content during developmental stages of rhizogenesis from hypocotyl explants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. / R. Konieczny, A. K. Banaś, E. Surówka [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2014. – Vol. 33. – № 1. – P. 165–177.

361. Konrad K. R. Calcium regulation of tip growth: new genes for old mechanisms / K. R. Konrad, M. M. Wudick, J. A. Feijó // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2011. – Vol. 14. – № 6. – P. 721–730.

362. Koprivova A. Root-specific camalexin biosynthesis controls the plant growth-promoting effects of multiple bacterial strains / A. Koprivova, S. Schuck, R. P. Jacoby [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – Vol. 116. – № 31. – P. 15735–15744.

363. Körber H. T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants / H. Körber, N. Strizhov, D. Staiger [et al.] // The EMBO Journal. – 1991. – Vol. 10. – P. 3983–3991.

364. Koren O. G. Genetic structure of natural populations of the relict species *Aristolochia manshuriensis* (*Aristolochiaceae*) in disturbed and intact habitats / O. G. Koren, O. V. Nakonechnaya, Y. N. Zhuravlev // Russian Journal of Genetics. – 2009. – Vol. 45. – P. 678–684.

365. Kowalczyk T. Genetic manipulation and bioreactor culture of plants as a tool for industry and its applications / T. Kowalczyk, A. Merecz-Sadowska, L. Picot [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – P. 795.

366. Kruk J. Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes / J. Kruk, M. Jemioła-Rzemińska, K. Burda [et al.] // Biochemistry. – 2003. – Vol. 42. – № 28. – P. 8501–8505.

367. Kudla J. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals / J. Kudla, Q. Xu, K. Harter [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1999. – Vol. 96. – № 3. – P. 4718–4723.

368. Kudla J. Calcium signals: the lead currency of plant information processing / J. Kudla, O. Batistic, K. Hashimoto // Plant Cell. – 2010. – Vol. 22. – № 3. – P. 541–563.

369. Kumar G. N. *Strboh* A homologue of NADPH oxidase regulates wound-induced oxidative burst and facilitates wound-healing in potato tubers / G. N. Kumar, S. Iyer, N. R. Knowles // Planta. – 2007. – Vol. 227. – № 1. – P. 25–36.

370. Kundu N. *Arabidopsis* scaffold protein RACK1A interacts with diverse environmental stress and photosynthesis related proteins / N. Kundu, U. Dozier, L. Deslandes [et al.] // *Plant Signaling & Behavior*. – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. e24012.

371. Kuzniak E. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves / E. Kuzniak, M. Skłodowska // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – Vol. 55. – № 397. – P. 605–612.

372. Kwak J. M. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis* / J. M. Kwak, I. C. Mori, Z. M. Pei [et al.] // *The EMBO Journal*. – 2003. – Vol. 22. – № 11. – P. 2623–2633.

373. La Verde V. Towards understanding plant calcium signaling through calmodulin-like proteins: a biochemical and structural perspective / V. La Verde, P. Dominici, A. Astegno // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 5. – P. 1331.

374. Lachaud C. 14-3-3-regulated Ca^{2+} -dependent protein kinase *CPK3* is required for sphingolipid-induced cell death in *Arabidopsis* / C. Lachaud, E. Prigent, P. Thuleau [et al.] // *Cell Death & Differentiation*. – 2013. – Vol. 20. – P. 209–217.

375. Lacroix B. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners / B. Lacroix, T. Tzfira, A. Vainstein [et al.] // *Trends in Genetics*. – 2006. – Vol. 22. – № 1. – P. 29–37.

376. Lacroix B. Association of the *Agrobacterium* T-DNA-protein complex with plant nucleosomes / B. Lacroix, A. Loyter, V. Citovsky // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 40. – P. 15429–15434.

377. Lacroix B. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation / B. Lacroix, V. Citovsky // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2013. – Vol. 57. – P. 467–481.

378. Lajkó E. Targeted tumor therapy by *Rubia tinctorum* L.: analytical characterization of hydroxyanthraquinones and investigation of their selective cytotoxic, adhesion and migration modulator effects on melanoma cell lines (A2058 and HT168-

M1) / E. Lajkó, P. Bányai, Z. Zábó [et al.] // *Cancer Cell International*. – 2015. – Vol. 15. – P. 119.

379. Lamb C. J. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack / C. J. Lamb, M. A. Lawton, M. Dron [et al.] // *Cell*. – 1989. – Vol. 56. – № 2. – P. 215–224.

380. Lamb C. The oxidative burst in plantdisease resistance/ C. Lamb, R. A. Dixon // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 48. – P. 251–275.

381. Lambeth J. D. Novel homologs of *gp91phox* / J. D. Lambeth, G. Cheng, R. S. Arnold [et al.] // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2003. – Vol. 25. – № 10. – P. 459–461.

382. Lander H. M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction / H. M. Lander // *The FASEB Journal*. – 1997. – Vol. 11. – № 2. – P. 118–124.

383. Ledüç C. Isochorismate hydroxymutase from *Rubiaceae* cell suspension cultures / C Ledüç, P. Ruhna, E. Leistner // *Plant Cell Reports*. – 1991. – Vol. 10. – P. 334–337.

384. Ledüç C. Isochorismate hydroxymutase from cell-suspension culture of *Galium mollugo* L. / C. Ledüç, I. Birgel, R. Müller [et al.] // *Planta*. – 1997. – Vol. 202. – P. 206–210.

385. Lee D. Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of *RBOHD* / D. Lee, N. K. Lal, Z. D. Lin [et al.] // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1838.

386. Lee L.-Y. Screening a cDNA library for protein–protein interactions directly in planta / L.-Y. Lee, F.-H. Wu, C.-T. Hsu [et al.] // *The Plant Cell*. – 2012. – Vol. 24. – № 5. – P. 1746–1759.

387. Lee S. Proteomic identification of annexins, calciumdependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* / S. Lee, E. J. Lee, E. J. Yang [et al.] // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – № 6. – P. 1378–1391.

388. Leemans J. Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown galls / J. Leemans, R. Deblaere, L. Willmitzer [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1982. – Vol. 1. – № 1. – P. 147–152.
389. Leistner E. Biosynthesis of iso-chorismate-derived quinines / E. Leistner // *Recent Advances in Phytochemistry*. – 1986. – Vol. 20. – P. 243–261.
390. Lemarié S. Camalexin contributes to the partial resistance of *Arabidopsis thaliana* to the biotrophic soilborne protist *Plasmodiophora brassicae* / S. Lemarié, A. Robert-Seilaniantz, C. Lariagon [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 539.
391. Lemcke K. Gain of function assays identify non-*rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA that alter plant morphogenesis or hormone sensitivity / K. Lemcke, T. Schmulling // *The Plant Journal*. – 1998. – Vol. 15. – № 3. – P. 423–433.
392. Lemtiri-Chlieh F. Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells / F. Lemtiri-Chlieh, E. MacRobbie, A. Webb [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2003. – Vol. 100. – № 17. – P. 10091–10095.
393. Leon J. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco / J. Leon, M. A. Lawton, I. Raskin // *Plant Physiology*. – 1995. – Vol. 108. – № 4. – P. 1673–1678.
394. Lepiniec L. Genetics and biochemistry of seed flavonoids / L. Lepiniec, I. Debeaujon, J. M. Routaboul [et al.] // *Annual Review of Plant Biology*. – 2006. – Vol. 57. – P. 405–430.
395. Lerma-Herrera M. A. Biological activities of organic extracts of the genus *Aristolochia*: A review from 2005 to 2021 / M. A. Lerma-Herrera, L. Beiza-Granados, A. Ochoa-Zarzosa [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – P. 3937.
396. Levesque H. Common evolutionary origin of the central portions of the Ri TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and the Ti T-DNAs of *Agrobacterium tumefaciens* / H. Levesque, P. Delepelaire, P. Rouzé [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1988. – Vol. 11. – № 6. – P. 731–744.

397. Levine A. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response / A. Levine, R. Tenhaken, R. Dixon [et al.] // *Cell*. – 1994. – Vol. 79. – № 4. – P. 583–593.
398. Levy A. T-DNA integration: Pol θ controls T-DNA integration / A. Levy // *Nature Plants*. – 2016. – Vol. 2. – № 11. – P. 16170.
399. Li C. Potential biological activities of magnoflorine: A compound from *Aristolochia debilis* sieb. et Zucc. / C. Li, M. H. Wang // *The Korean Journal of Plant Resources*. – 2014. – Vol. 27. – P. 223–228.
400. Li J. Anti-inflammatory activity of mollugin on DSS-induced colitis in mice / J. Li, J. L. Zhang, X. P. Gong [et al.] // *Current Medical Science*. – 2020. – Vol. 40. – P. 910–916.
401. Li M. Proline isomerization of the immune receptor-interacting protein RIN4 by a cyclophilin inhibits effector-triggered immunity in *Arabidopsis* / M. Li, X. Ma, Y. H. Chiang [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2014. – Vol. 16. – № 4. – P. 473–483.
402. Li R. Functions and mechanisms of the CBL–CIPK signaling system in plant response to abiotic stress / R. Li, J. Zhang, J. Wei [et al.] // *Progress in Natural Science*. – 2009. – Vol. 19. – № 6. – P. 667–676.
403. Li S. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber / S. Li, L. Xue, S. Xu [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2007. – Vol. 52. – P. 173–180.
404. Li X. Tomato *SIRbohB*, a member of the NADPH oxidase family, is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and tolerance to drought stress / X. Li, H. Zhang, L. Tian [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 23. – P. 463.
405. Liang H. Magnoflorine attenuates cerebral ischemia-induced neuronal injury via autophagy/sirt1/AMPK signaling pathway / H. Liang, X. Chang, R. N. Xia [et al.] // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2022. – P. 2131561.

406. Lim E. K. The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates / E. K. Lim, C. J. Doucet, Y. Li [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 1. – P. 586–592.
407. Lin A. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice / A. Lin, Y. Wang, J. Tang [et al.] // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 158. – № 1. – P. 451–464.
408. Lin F. Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signaling / F. Lin, H. Ding, J. Wang [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol. 60. – № 11. – P. 3221–3238.
409. Lindström M. S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis / M. S. Lindström, D. Jurada, S. Bursac [et al.] // *Oncogene*. – 2018. – Vol. 37. – № 18. – P. 2351–2366.
410. Liskay A. Production of reactive oxygen intermediates, O₂, H₂O₂, and OH by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth / A. Liskay, E. van der Zalm, P. Schopfer // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 136. – № 2. – P. 3114–3123.
411. Liu J. Design principle for decoding calcium signals to generate specific gene expression via transcription / J. Liu, G. Lenzoni, M. R. Knight // *Plant Physiology*. – 2020. – Vol. 182. – № 4. – P. 1743–1761.
412. Liu W. The flavonoid biosynthesis network in plants / W. Liu, Y. Feng, S. Yu [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 23. – P. 12824.
413. Logan D. C. Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants / D. C. Logan, M. R. Knight // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 133. – № 1. – P. 21–24.
414. Lohar D. P. A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis / D. P. Lohar, S. Haridas, J. S. Gantt [et al.] // *New Phytologist*. – 2007. – Vol. 173. – № 1. – P. 39–49.

415. Lombardi L. Nitric oxide and hydrogen peroxide involvement during programmed cell death of *Sechium edule* nucellus / L. Lombardi, N. Ceccarelli, P. Picciarelli [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 2010. – Vol. 140. – P. 89–102.
416. Loyter A. The plant VirE2 interacting protein 1. a molecular link between the *Agrobacterium* T-complex and the host cell chromatin? / A. Loyter, J. Rosenbluh, N. Zakai [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 138. – № 3. – P. 1318–1321.
417. Lu L. *NtCIPK9*: a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase from the halophyte nitraria tangutorum, enhances *Arabidopsis* salt tolerance / L. Lu, X. Chen, L. Zhu [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1112.
418. Lu L. CIPK11: a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase from *Nitraria tangutorum*, confers tolerance to salt and drought in *Arabidopsis* / L. Lu, X. Chen, P. Wang [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2021. – Vol. 21. – P. 123.
419. Luan S. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants / S. Luan, J. Kudla, M. Rodriguez-Concepcion [et al.] // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14 (Suppl). – P. S389–400.
420. Ma L. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress / L. Ma, H. Zhang, L. Sun [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2012. – Vol. 63. – № 1. – P. 305–317.
421. Ma S. Y. *AtCPK23* functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses / S. Y. Ma, W. H. Wu // *Plant Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 65. – № 4. – P. 511–518.
422. Ma X. The *CaCIPK3* gene positively regulates drought tolerance in pepper / X. Ma, Y. Li, W.-X. Gai [et al.] // *Horticulture Research*. – 2021. – Vol. 8. – P. 216.
423. Maai E. The avoidance and aggregative movements of mesophyll chloroplasts in C(4) monocots in response to blue light and abscisic acid / E. Maai, S. Shimada, M. Yamada [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 62. – № 9. – P. 3213–3221.
424. Magnan F. Mutations in *AtCML9*, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid /

F. Magnan, B. Ranty, M. Charpentreau [et al.] // *The Plant Journal*. – 2008. – Vol. 56. № 4. – P. 575–589.

425. Mahajan S. Cold, salinity and drought stresses: an overview / S. Mahajan, N. Tuteja // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2005. – Vol. 444. – № 2. – P. 139–158.

426. Maleck K. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? / K. Maleck, R. A. Dietrich // *Trends in Plant Science*. – 1999. – Vol. 4. – № 6. – P. 215–219.

427. Mansoor S. Reactive oxygen species in plants: from source to sink / S. Mansoor, O. A. Wani, J. K. Lone [et al.] // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11. – № 2. – P. 225.

428. Mao G. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis* / G. Mao, X. Meng, Y. Liu [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 4. – P. 1639–1653.

429. Marino D. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning / D. Marino, E. Andrio, E. G. Danchin [et al.] // *The New Phytologist*. – 2011. – Vol. 189. – № 2. – P. 580–592.

430. Marino D. A burst of plant NADPH oxidases / D. Marino, C. Dunand, A. Puppo [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2012. – Vol. 17. – № 1. – P. 9–15.

431. Martena M. J. Enforcement of the ban on aristolochic acids in Chinese traditional herbal preparations on the Dutch market / M. J. Martena, J. C. A. van der Wielen, L. F. J. van de Laak // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – Vol. 389. – P. 263–275.

432. Martens S. Flavones and flavone synthases / S. Martens, A. Mithöfer // *Phytochemistry*. – 2005. – Vol. 66. – № 20. – P. 2399–2407.

433. Martin R. M. Principles of protein targeting to the nucleolus / R. M. Martin, G. Ter-Avetisyan, H. D. Hecce [et al.] // *Nucleus*. – 2015. – Vol. 6. – № 4. – P. 314–332.

434. Martinez C. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of

Xanthomonas campestris pv *malvacearum* / C. Martinez, J. C. Baccou, E. Bresson [et al.] // *Plant Physiology*. – 2000. – Vol. 122. – № 3. – P. 757–766.

435. Martins D. Secondary metabolites from *Rubiaceae* species / D. Martins, C. V. Nunez // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – № 7. – P. 13422–13495.

436. Matschi S. Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development / S. Matschi, S. Werner, W. X. Schulze [et al.] // *The Plant Journal*. – 2013. – Vol. 73. – № 6. – P. 383–396.

437. Matsuki R. Tissue-specific expression of the *rolC* promoter of the Ri plasmid in transgenic rice plants / R. Matsuki, H. Onodera, T. Yamauchi [et al.] // *Molecular Genetics and Genomics*. – 1989. – Vol. 220. – P. 12–16.

438. Matveeva T. V. Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature / T. V. Matveeva, D. I. Bogomaz, O. A. Pavlova [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2012. – Vol. 25. – № 12. – P. 1542–1551.

439. Matveeva T. V. Influence of *Agrobacterium* oncogenes on secondary metabolism of plants / T. V. Matveeva, S. V. Sokornova, L. A. Lutova // *Phytochemistry Reviews*. – 2015. – Vol. 14. – P. 541–554.

440. Matveeva T. V. Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium* / T. V. Matveeva, L. Otten // *Plant Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 101. – № 4–5. – P. 415–437.

441. Maurel C. Auxin regulates the promoter of the root-inducing *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco / C. Maurel, J. Brevet, H. Barbier-Brygoo [et al.] // *Molecular & General Genetics*. – 1990. – Vol. 223. – № 1. – P. 58–64.

442. Maurel C. Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum* / C. Maurel, H. Barbier-Brygoo, A. Spina [et al.] // *Plant Physiology*. – 1991. – Vol. 97. – № 1. – P. 212–216.

443. Mauro M. L. The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants / M. L. Mauro, M. Trovato, A. De Paolis [et al.] // *Developmental Biology*. – 1996. – Vol. 180. – № 2. – P. 693–700.

444. Mauro M. L. The never ending story of *rol* genes: a century after / M. L. Mauro, P. Costantino, P. P. Bettini [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2017. – Vol. 31. – № 2. – P. 201–212.
445. Mauro M. L. *Agrobacterium rhizogenes rolB* oncogene: an intriguing player for many roles / M. L. Mauro, P. P. Bettini // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2021. – Vol. 165. – P. 10–18.
446. McClure B. Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean / B. A. McClure, G. Hagen, C. S. Brown [et al.] // *The Plant Cell*. – 1989. – Vol. 1. – № 2. – P. 229–239.
447. Mehler A. H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen / A. H. Mehler // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1951. – Vol. 34. – № 2. – P. 339–351.
448. Mehlmer N. The Ca⁽²⁺⁾-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis* / N. Mehlmer, B. Wurzinger, S. Stael [et al.] // *The Plant Journal*. – 2010. – Vol. 63. – № 3. – P. 484–498.
449. Mehrrens F. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis / F. Mehrrens, H. Kranz, P. Bednarek [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 138. – № 2. – P. 1083e1096.
450. Melchers L. S. Octopine and nopaline strains of *Agrobacterium tumefaciens* differ in virulence; molecular characterization of the *virF* locus / L. S. Melchers, M. J. Maroney, A. den Dulk-Ras [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1990. – Vol. 14. – № 2. – P. 249–59.
451. Melchiorre M. Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state / M. Melchiorre, G. Robert, V. Trippi [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2009a. – Vol. 57. – P. 57–68.
452. Melchiorre, M. Tolerance to photooxidative stress given by of Mn-SOD or GR overexpression in wheat protoplast depends on their effects over the intracellular redox state / M. Melchiorre, G. Robert, V. S. Trippi [et al.] // *Plant Growth Regulation*. – 2009b. – Vol. 57. – P. 57–68.

453. Mensor L. L. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method / L. L. Mensor, F. S. Menezes, G. G. Leitaó [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2001. – Vol. 15. – P. 127–130.
454. Mezencev R. Antiproliferative and cancer chemopreventive activity of phytoalexins: focus on indole phytoalexins from crucifers / R. Mezencev, J. Mojzic, M. Pilatova [et al.] // *Neoplasma*. – 2003. – Vol. 50. – № 4. – P. 239–245.
455. Mhamdi A. Reactive oxygen species in plant development / A. Mhamdi, F. van Breusegem // *Development*. – 2018. – Vol. 145. – № 15. – P. dev164376.
456. Michl J. LC-MS- and ¹H NMR-based metabolomic analysis and *in vitro* toxicological assessment of 43 *Aristolochia* species / J. Michl, G. C. Kite, S. Wanke [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2016. – Vol. 79. – P. 30–37.
457. Mika A. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species / A. Mika, F. Minibayeva, R. Beckett [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2004. – Vol. 3. – P. 173–193.
458. Mikkelsen M. D. *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis / M. D. Mikkelsen, P. Naur, B. A. Halkier [et al.] // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 37. – № 5. – P. 770–777.
459. Miller G. The plant NADPH oxidase *RBOHD* mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli / G. Miller, K. Schlauch, R. Tam [et al.] // *Science Signaling*. – 2009. – Vol. 2. – № 84. – P. ra45.
460. Millet Y. A. Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns / Y. A. Millet, C. H. Danna, N. K. Clay [et al.] // *The Plant Cell*. – 2010. – Vol. 22. – № 3. – P. 973–990.
461. Miranda A. *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism / A. Miranda, G. Janssen, L. Hodges [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1992. – Vol. 174. – № 7. – P. 2288–2297.
462. Mishchenko N. P. Chemical composition and pharmacological activity of anthraquinones from *Rubia cordifolia* cell culture / N. P. Mishchenko, S. A. Fedoreev,

V. M. Bryukhanov [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2007. – Vol. 41. – P. 605–609.

463. Mitreiter S. Regulation of glucosinolate biosynthesis / S. Mitreiter, T. Gigolashvili // *Journal of Experimental Botany*. – 2021. – Vol. 72. – № 1. – P. 70–91.

464. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // *Trends in Plant Science*. – 2002. – Vol. 7. – P. 405–410.

465. Miyazawa M. Identification of the key aroma compounds in dried roots of *Rubia cordifolia* / M. Miyazawa, J. Kawata // *Journal of Oleo Science*. – 2006. – Vol. 55. – № 1. – P. 37–39.

466. Moesta P. Detection of glyceollin on the cellular level in infected soybean by laser microprobe mass analysis / P. Moesta, U. Seydel, B. Lindner [et al.] // *Zeitschrift für Naturforschung*. – 1982. – Vol. 37. – P. 748–751.

467. Mohajjel-Shoja H. Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *trolC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other plast genes / H. Mohajjel-Shoja, B. Clément, J. Perot [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2011. – Vol. 24. – № 1. – P. 4–53.

468. Mohamed E.-A. Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplasts enhances photo-oxidative stress tolerance / E.-A. Mohamed, T. Iwaki, I. Munir [et al.] // *Plant, Cell & Environment*. – 2003. – Vol. 26. – № 12. – P. 2037–2046.

469. Mohamed S. Cytotoxic and antiviral activities of aporphine alkaloids of *Magnolia grandiflora* L. / S. Mohamed, E. Hassan, N. Ibrahim // *Natural Product Research*. – 2010. – Vol. 24. – P. 1395–1402.

470. Mohanta T. K. Genome-wide identification of *Calcineurin B-Like (CBL)* gene family of plants reveals novel conserved motifs and evolutionary aspects in calcium signaling events / T. K. Mohanta, N. Mohanta, Y. K. Mohanta [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2015. – Vol. 15. – P. 189.

471. Moller I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // *Annual*

review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.

472. Monshausen G. B. Ca^{2+} regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots / G. B. Monshausen, T. N. Bibikova, M. H. Weisenseel [et al.] // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – P. 2341–2356.

473. Monshausen G. B. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs / G. B. Monshausen, T. N. Bibikova, M. A. Messerli [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 52. – P. 20996–21001.

474. Montero-Barrientos M. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses / M. Montero-Barrientos, R. Hermosa, R. E. Cardoza [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 167. – № 8. – P. 659–665.

475. Montiel J. A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root infection by *Rhizobia* / J. Montiel, N. Nava, L. Cárdenas [et al.] // *Plant & Cell Physiology*. – 2012. – Vol. 53. – № 10. – P. 1751–1767.

476. Moran J. F. Characterization of phenolic glucosides from soybean root nodules by ion-exchange high performance liquid chromatography, ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry / J. F. Moran, R. J. Grayer, J. Abian [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 1998. – Vol. 9. – № 4. – P. 171–176.

477. Mori M. X. Functional stoichiometry and local enrichment of calmodulin interacting with Ca^{2+} channels / M. X. Mori, M. G. Erickson, D. T. Yue // *Science*. – 2004. – Vol. 304. – P. 432–435.

478. Morita A. Changes in peroxidase activity and lignin content of cultured tea cells in response to excess manganese / A. Morita, H. Yokota, M. R. Ishka [et al.] // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 2006. – Vol. 52. – № 1. – P. 26–31.

479. Moritz T. The gibberellin content of *rolA* transgenic tobacco plants is specifically altered / T. Moritz, T. Schmülling // *Journal of Plant Physiology*. – 1998. – Vol. 153. – P. 774–776.

480. Moriuchi H. Nuclear localization and interaction of *rolB* with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rolB* / H. Moriuchi, C. Okamoto, R. Nishihama [et al.] // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 38. – № 2. – P. 260–275.
481. Mubarakshina M. Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane / M. Mubarakshina, S. Khorobrykh, B. Ivanov // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006a. – Vol. 1757. – № 11. – P. 1496–1503.
482. Mubarakshina M. M. Intramembrane formation of hydrogen peroxide during oxygen reduction in thylakoids of higher plants / M. M. Mubarakshina, S. A. Khorobrykh, M. A. Kozuleva [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2006b. – Vol. 408. – P. 113–116.
483. Mueller L. A. AraCyc: a biochemical pathway database for *Arabidopsis* / L. A. Mueller, P. Zhang, S. Y. Rhee // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 132. – № 2. – P. 453–460.
484. Müller K. The NADPH-oxidase *AtrbohB* plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening / K. Müller, A. C. Carstens, A. Linkies [et al.] // *The New Phytologist*. – 2009. – Vol. 184. – № 4. – P. 885–897.
485. Murphy M. E. The HSP70 family and cancer / M. E. Murphy // *Carcinogenesis*. – 2013. – Vol. 34. – № 6. – P. 1181–1188.
486. Murugan R. Pollination biology of *Aristolochia tagala*, a rare species of medicinal importance / R. Murugan, K. R. Shivanna, R. R. Rao // *Current Science*. – 2006. – Vol. 91. – P. 795–798.
487. Mysore K. S. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration / K. S. Mysore, J. Nam, S. B. Gelvin // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97. – № 2. – P. 948–953.
488. Nafisi M. *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis / M. Nafisi,

S. Goregaoker, C. J. Botanga [et al.] // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – P. 2039–2052.

489. Nagae M. The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana* / M. Nagae, A. Nozawa, N. Koizumi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 43. – P. 42240–42246.

490. Nakamura T. Organ-specific mRNA in transgenic tobacco plants possessing T-DNA of Ri plasmids. / T. Nakamura, T. Handa, Y. Oono [et al.] // *Plant Science*. – 1988. – Vol. 56. – № 3. – P. 213–218.

491. Nakayama S. Evolution of the EF-hand family of proteins / S. Nakayama, R. H. Kretsinger // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 1994. – Vol. 23. – № 3. – P. 473e507.

492. Nakonechnaya O. V. Allozyme variation of the relict plant *Aristolochia manshuriensis* Kom. (*Aristolochiaceae*) / O. V. Nakonechnaya, O. G. Koren', Y. N. Zhuravlev // *Russian Journal of Genetics*. – 2007. – Vol. 43. – P. 156–164.

493. Nakonechnaya O. V. Poor fruit set due to lack of pollinators in *Aristolochia manshuriensis* (*Aristolochiaceae*) / O. V. Nakonechnaya, O. G. Koren, V. S. Sidorenko [et al.] // *Plant Ecology and Evolution*. – 2021. – Vol. 154. – P. 39–48.

494. Nam W. Structure-antioxidative and anti-inflammatory activity relationships of purpurin and related anthraquinones in chemical and cell assays / W. Nam, S. P. Kim, S. H. Nam [et al.] // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – № 2. – P. 265.

495. Narendra S. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development / S. Narendra, S. Venkataramani, G. Shen [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2006. – Vol. 57. – № 12. – P. 3033–3042.

496. Navari-Izzo F. Thylakoid-bound and stromal enzymes in wheat treated with excess copper / F. Navari-Izzo, M. F. Quartacci, C. Pinzino [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 1998. – Vol. 104. – № 4. – P. 630–638.

497. Navathe S. Genome-wide mining of respiratory burst homologs and its expression in response to biotic and abiotic stresses in *Triticum aestivum* / S. Navathe,

S. Singh, V. K. Singh [et al.] // *Genes & Genomics*. – 2019. – Vol. 41. – № 9. – P. 1027–1043.

498. Navazio L. Calcium release from the endoplasmic reticulum of higher plants elicited by the NADP metabolite nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate / L. Navazio, M. A. Bewell, A. Siddiqua [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97. – № 15. – P. 8693–8698.

499. Neinhuis C. Phylogeny of *Aristolochiaceae* based on parsimony, likelihood, and Bayesian analyses of trnL-trnF sequences / C. Neinhuis, S. Wanke, K. Hilu [et al.] // *Plant Systematics and Evolution*. – 2005. – Vol. 250. – P. 7–26.

500. Nemoto K. Autophosphorylation profiling of *Arabidopsis* protein kinases using the cell-free system / K. Nemoto, T. Seto, H. Takahashi [et al.] // *Phytochemistry*. – 2011. – Vol. 72. – № 10. – P. 1136–1144.

501. Nemoto K. Members of the plant CRK superfamily are capable of trans- and autophosphorylation of tyrosine residues / K. Nemoto, N. Takemori, M. Seki [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 290. – № 27. – P. 16665–16677.

502. Nester E. W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer / E. W. Nester // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 5. – P. 730.

503. Ng C. K. Y. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine 1-phosphate / C. K. Y. Ng, K. Carr, M. R. McAins [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 410. – № 6828. – P. 596–599.

504. Nilsson O. Indole-3-acetic acid homeostasis in transgenic tobacco plants expressing the *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene / O. Nilsson, A. Crozier, T. Schmulling [et al.] // *The Plant Journal*. – 1993a. – Vol. 3. – № 5. – P. 681–689.

505. Nilsson O. Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA / O. Nilsson, T. Moritz, N. Imbault [et al.] // *Plant Physiology*. – 1993b. – Vol. 102. – № 2. – P. 363–371.

506. Nilsson O. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots / O. Nilsson, O. Olsson // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – Vol. 100. – № 3. – P. 463–473.

507. Nilsson O. The *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen / O. Nilsson, H. Tuominen, B. Sundberg [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 1997. – Vol. 100. – № 3. – P. 456–462.

508. Nishimura S. Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species / S. Nishimura K. Kohmoto // *Annual Review of Phytopathology*. – 1983. – Vol. 21. – P. 87–116.

509. Nishizawa-Yokoi A. Suppression of Ku70/80 or Lig4 leads to decreased stable transformation and enhanced homologous recombination in rice / A. Nishizawa-Yokoi, S. Nonaka, H. Saika [et al.] // *New Phytologist*. – 2012. – Vol. 196. – № 4. – P. 1048–1059.

510. Nobiling R. Quantitative analysis of calcium gradients and activity in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum* / R. Nobiling, H.-D. Reiss // *Protoplasma*. – 1987. – Vol. 139. – P. 20–24.

511. Noctor G. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control / G. Noctor, C. H. Foyer // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 49. – P. 249–279.

512. Nühse T. S. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses / T. S. Nühse, A. R. Bottrill, A. M. E. Jones [et al.] // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. 51. – № 5. – P. 931–940.

513. Oda H. Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4(Cdt2)-mediated PCNA-dependent degradation during DNA damage / H. Oda, M. R. Hubner, D. B. Beck [et al.] // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 40. – № 3. – P. 364–376.

514. Oda T. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications / T. Oda, H. Hashimoto, N. Kuwabara [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 2. – P. 1435e1445.

515. Ogasawara Y. Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase *AtrbohD* by Ca^{2+} and phosphorylation / Y. Ogasawara, H. Kaya, G. Hiraoka [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 14. – P. 8885–8892.

516. Ogawa K. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignifications / K. Ogawa, S. Kanematsu, K. Asada // *Plant & Cell Physiology*. – 1997. – Vol. 38. – № 10. – P. 1118–1126.

517. Oh M. H. *CDPKs* are dual-specificity protein kinases and tyrosine autophosphorylation attenuates kinase activity / M. H. Oh, X. Wu, H. S. Kim [et al.] // *FEBS Letters*. – 2012. – Vol. 586. – № 23. – P. 4070–4075.

518. Okon E. Advances in chemistry and bioactivity of magnoflorine and magnoflorine-containing extracts / E. Okon, W. Kukula-Koch, A. Jarzab [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 1330.

519. Oldroyd G. E. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes / G. E. Oldroyd, J. A. Downie // *Annual Review of Plant Biology*. – 2008. – Vol. 59. – P. 519–546.

520. Ono N. N. The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities / N. N. Ono, L. Tian // *Plant Science*. – 2011. – Vol. 180. – № 3. – P. 439–446.

521. Oono Y. The TL-DNA gene of Ri plasmids responsible for dwarfness of tobacco plants / Y. Oono, T. Handa, K. Kanaya [et al.] // *The Japanese Journal of Genetics*. – 1987. – Vol. 62. – P. 501–505.

522. Oono Y. Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid / Y. Oono, K. Kanaya, H. Uchimiya // *The Japanese Journal of Genetics*. – 1990. – Vol. 65. – P. 7–16.

523. Oono Y. *Agrobacterium rhizogenes lacZ-rolC* gene expression in *Escherichia coli*: detection of the product in transgenic plants using RolC-specific

antibodies / Y. Oono, T. Satomi, H. Uchimiya // *Gene*. – 1991. – Vol. 104. – № 1. – P. 95–98.

524. Ormancey M. CDPKs and 14-3-3 proteins: emerging duo in signaling / M. Ormancey, P. Thuleau, C. Mazars [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2017. – Vol. 22. – № 3. – P. 263–272.

525. Otten L. *Agrobacterium vitis* nopaline Ti plasmid pTiAB4: relationship to other Ti plasmids and T-DNA structure / L. Otten, P. De Ruffray // *Molecular & General Genetics*. – 1994. – Vol. 245. – № 4. – P. 493–505.

526. Otten L. The *Agrobacterium* phenotypic plasticity (Plast) genes / L. Otten // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2018. – Vol. 418. – P. 375–419.

527. Otterhag L. N-terminal EFhand-like domain is required for phosphoinositide-specific phospholipase C activity in *Arabidopsis thaliana* / L. Otterhag, M. Sommarin, C. Pical // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 497. – P. 165–170.

528. Ozyigit I. I. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops / I. I. Ozyigit, I. Dogan, E. A. Tarhan // *Crop Improvement*. – 2013. – P. 1–48.

529. Palazón J. Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures / J. Palazón, R. M. Cusidó, C. Roig [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 1997. – Vol. 35. – P. 155–162.

530. Palazón J. Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants / J. Palazón, R. M. Cusidó, C. Roig [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 1998a. – Vol. 17. – № 5. – P. 384–390.

531. Palazón J. Relation between the amount the *rolC* gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharantus roseus* transformed root cultures/ J. Palazón, R. M. Cusidó, J. Gonzalo [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 1998b. – Vol. 53. – P. 712–718.

532. Palma J. M. Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves / J. M. Palma, E. López-Huertas, F. J. Corpas [et al.] // *Physiologia Plantarum*. – 1998. – Vol. 104. – № 4. – P. 720–726.

533. Palmer E. Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays / E. Palmer, T. Freeman // *Comparative and Functional Genomics*. – 2004. – Vol. 5. – № 4. – P. 342–353.

534. Panchuk I. I. Heat stress- and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* / I. I. Panchuk, R. A. Volkov, F. Schöffl // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 129. – № 2. – P. 838–853.

535. Pandolfini T. The spliceosomal intron of the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* is a prokaryotic promoter / T. Pandolfini, A. Storlazzi, E. Calabria [et al.] // *Molecular Microbiology*. – 2000. – Vol. 35. – № 6. – P. 1326–1334.

536. Paolis A. Plant cellular and molecular biotechnology: following mariotti's steps / A. Paolis, G. Frugis, D. Giannino [et al.] // *Plants*. – 2019. – Vol. 8. – № 1. – P. 18.

537. Park S. W. Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis / S. W. Park, W. Li, A. Viehhauser [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. – № 23. – P. 9559–9564.

538. Passardi F. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall / F. Passardi, C. Penel, C. Dunand // *Trends in Plant Science*. – 2004. – Vol. 9. – № 11. – P. 534–540.

539. Pattar P. V. *In vitro* regeneration of plantlets from leaf and nodal explants of *Aristolochia indica* L. – an important threatened medicinal plant / P. V. Pattar, M. Jayara // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. – 2012. – Vol. 2. – P. S488–S493.

540. Pauly N. Control of free calcium in plant cell nuclei / N. Pauly, M. R. Knight, P. Thuleau [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 405. – P. 754–755.

541. Pauly N. Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis / N. Pauly, C. Pucciariello, K. Mandon [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2006. – Vol. 57. – № 8. – P. 1769–1776.

542. Pavlova O. A. *Rol*-genes of *Agrobacterium rhizogenes* / O. A. Pavlova, T. V. Matveyeva, L. A. Lutova // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2014. – Vol. 4. – P. 137–145.
543. Peer W. A. Floral scent of *Arabidopsis lyrata* (*Brassicaceae*) / W. A. Peer, A. S. Murphy // Biochemical Systematics and Ecology. – 2003. – Vol. 31. – № 10. – P. 1193–1195.
544. Peer W. A. Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana* / W. A. Peer, A. Bandyopadhyay, J. J. Blakeslee // The Plant Cell. – 2004. – Vol. 16. – P. 1898–1911.
545. Pei Z. M. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells / Z. M. Pei, Y. Murata, G. Benning [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 406. – P. 731–734.
546. Pennington K. The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein–protein interactions / K. Pennington, T. Chan, M. Torres [et al.] // Oncogene. – 2018. – Vol. 37. – P. 5587–5604.
547. Pereira C. G. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives / C. G. Pereira, M. A. A. Meireles // Food and Bioprocess Technology. – 2010. – Vol. 3. – P. 340–372.
548. Pfannschmidt T. Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding / T. Pfannschmidt, K. Bräutigam, R. Wagner [et al.] // Annals of Botany. – 2009. – Vol. 103. – P. 599–607.
549. Pitzschke A. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants / A. Pitzschke, H. Hirt // Plant Physiology. – 2006. – Vol. 141. – P. 351–356.
550. Pogány M. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase *RBOHD* in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem / M. Pogány, U. von Rad, S. Grün [et al.] // Plant Physiology. – 2009. – Vol. 151. – P. 1459–1475.

551. Pogson B. J. Plastid signalling to the nucleus and beyond / B. J. Pogson, N. S. Woo, B. Förster [et al.] // Trends in Plant Science. – 2008. – Vol. 13. – № 11. – P. 602–609.

552. Poovaiah B. W. Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions / B. W. Poovaiah, L. Du, H. Wang [et al.] // Plant Physiology. – 2013. – Vol. 163. – № 2. – P. 531–542.

553. Popescu S. C. Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays / S. C. Popescu, G. V. Popescu, S. Bachan [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2007. – Vol. 104. – № 11. – P. 4730–4735.

554. Popp C. Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis / C. Popp, T. Ott // Current Opinion in Plant Biology. – 2011. – Vol. 14. – № 4. – P. 458–467.

555. Pospíšil P. Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II / Pospíšil P // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1817. – № 1. – P. 218–231.

556. Postiglione A. E. The role of ROS homeostasis in aba-induced guard cell signaling / A. E. Postiglione, G. K. Muday // Frontiers in Plant Science. – 2020. – Vol. 11. – P. 968.

557. Potocký M. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth / M. Potocký, M. A. Jones, R. Bezvoda [et al.] // The New Phytologist. – 2007. – Vol. 174. – P. 742–751.

558. Poulsen C. Roles of chorismate mutase, isochorismate synthase and anthranilate synthase in plants / C. Poulsen, R. Verpoorte // Phytochemistry. – 1991. – Vol. 30. – № 2. – P. 377–386.

559. Prasad T. K. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide / T. K. Prasad, M. D. Anderson, B. A. Martin [et al.] // The Plant Cell. – 1994. – Vol. 6. – № 1. – P. 65–74.

560. Proels R. K. *RBOHF2* of barley is required for normal development of penetration resistance to the parasitic fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei /

R. K. Proels, K. Oberhollenzer, I. P. Pathuri [et al.] // *Molecular Plant Microbe Interactions*. – 2010. – Vol. 23. – № 9. – P. – 1143–1150.

561. Puppo A. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses / A. Puppo, N. Pauly, A. Boscardi [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – Vol. 18. – № 16. – P. 2202–2219.

562. Qu Y. Functional regulation of plant NADPH oxidase and its role in signaling / Y. Qu, M. Yan, Q. Zhang // *Plant Signaling & Behavior*. – 2017. – Vol. 12. – № 8. – P. e1356970.

563. Rangslang R. K. *Agrobacterium* spp. genes and ORFs: mechanisms and applications in plant science / R. K. Rangslang, Z. Liu, H. Lutken [et al.] // *Ciência e Agrotecnologia*. – 2018. – Vol. 42. – № 5. – P. 453–463.

564. Ranty B. Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals / B. Ranty, D. Aldon, J. P. Galaud // *Plant Signaling & Behavior*. – 2006. – Vol. 1. – № 3. – P. 96–104.

565. Rao S. S. Overexpression of *GmCaM4* in soybean enhances resistance to pathogens and tolerance to salt stress / S. S. Rao, M. H. El-Habbak, W. M. Havens [et al.] // *Molecular Plant Pathology*. – 2014. – Vol. 15. – № 2. – P. 145–160.

566. Ravilious G. E. Structural biology of plant sulfur metabolism: From assimilation to biosynthesis / G. E. Ravilious, J. M. Jez // *Natural Product Reports*. – 2012. – Vol. 29. – P. 1138–1152.

567. Razem F. A. Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase / F. A. Razem, M. A. Bernards // *Journal of Experimental Botany*. – 2003. – Vol. 54. – № 384. – P. 935–941.

568. Reddy A. S. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression / A. S. Reddy, G. S. Ali, H. Celesnik [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 6. – P. 2010–2032.

569. Reddy M. S. S. Analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* pTiChry5 *6b* Promoter / M. S. S. Reddy, S. Dasgupta, L. Rymarquis [et al.] // *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. – 2003. – Vol. 12. – P. 87–91.

570. Reddy V. S. Proteomics of calcium-signaling components in plants / V. S. Reddy, A. S. N. Reddy // *Phytochemistry*. – 2004. – Vol. 65. – P. 1745–1776.

571. Remya M. Changes in bioactive components of *Aristolochia tagala*. Cham, a rare species of medicinal importance during its *in vitro* development through direct regeneration / M. Remya, V. Narmatha Bai, S. Murugesan [et al.] // *bioRxiv*. – 2016. – P. 037028.

572. Ren G. Critical roles of RNA-binding proteins in miRNA biogenesis in *Arabidopsis* / G. Ren, B. Yu // *RNA Biology*. – 2012. – Vol. 9. – № 12. – P 1424–1428.

573. Rentel M. C. OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis* / M. C. Rentel, D. Lecourieux, F. Ouaked [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 427. – P. 858–861.

574. Rhoads D. M. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling / D. M. Rhoads, A. L. Umbach, C. C. Subbaiah [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 2. – P. 357–366.

575. Ridgen D. J. A structural model for the RoIA protein and its interaction with DNA / D. J. Ridgen, M. Carneiro // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 1999. – Vol. 37. – № 4. – P. 697–708.

576. Riveras E. The calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis* / E. Riveras, J. M. Alvarez, E. A. Vidal [et al.] // *Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 169. – № 2. – P. 1397–1404.

577. Rizhsky L. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco / L. Rizhsky, H. Liang, R. Mittler // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 130. – № 3. – P. 1143–1151.

578. Robinette D. Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola / D. Robinette, A. G. Matthyse // *Journal of Bacteriology*. – 1990. – Vol. 172. – P. 5742–5749.

579. Rodriguez-Concepcion M. The prenylation status of a novel plant calmodulin directs plasma membrane or nuclear localization of the protein /

M. Rodriguez-Concepcion, S. Yalovsky, M. Zik [et al.] // The EMBO Journal. – 1999. – Vol. 18. – № 7. – P. 1996–2007.

580. Romano P. G. The *Arabidopsis* cyclophilin gene family / P. G. Romano, P. Horton, J. E. Gray // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 134. – № 4. – P. 1268–1282.

581. Romeis T. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response / T. Romeis, A. A. Ludwig, R. Martin [et al.] // The EMBO Journal. – 2001. – Vol. 20. – № 20. – P. 5556–5567.

582. Roxas V. P. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase / V. P. Roxas, S. A. Lodhi, D. K. Garrett [et al.] // Plant & Cell Physiology. – 2000. – Vol. 41. – P. 1229–1234.

583. Rubio M. C. Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules / M. C. Rubio, E. K. James, M. R. Clemente [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2004. – Vol. 17. – № 12. – P. 1294–1305.

584. Rudd J. J. Unravelling response-specificity in Ca²⁺ signalling pathways in plant cells / J. J. Rudd, V. E. Franklin-Tong // New Phytologist. – 2001. – Vol. 151. – № 1. – P. 7–33.

585. Rudrabhatla P. Genome-wide analysis and experimentation of plant serine / threonine / tyrosine-specific protein kinases / P. Rudrabhatla, M. M. Reddy, R. Rajasekharan // Plant Molecular Biology. – 2006. – Vol. 60. – P. 293–319.

586. Rutschmann F. *LeCPK1*, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization / F. Rutschmann, U. Stalder, M. Piotrowski [et al.] // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 129. – P. 156–168.

587. Saga H. Identification and characterization of *ANAC042*, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis* / H. Saga, T. Ogawa, K. Kai [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2012. – Vol. 25. – P. 684–696.

588. Sagi M. Superoxide production by plant homologues of the *gp91(phox)* NADPH oxidase: modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection / M. Sagi, R. Fluhr // Plant Physiology. – 2001. – Vol. 126. – № 3. – P. 1281–1290.

589. Sagi M. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum* / M. Sagi, O. Davydov, S. Orazova [et al.] // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – P. 616–628.
590. Sagi M. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases / M. Sagi, R. Fluhr // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 2. – P. 336–340.
591. Saijo Y. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants / Y. Saijo, S. Hata, J. Kyojuka [et al.] // *The Plant Journal*. – 2000. – Vol. 23. – № 3. – P. 319–327.
592. Salomon F. Genetic identification of functions of TR-DNA transcripts in octopine crown galls / F. Salomon, R. Deblaere, J. Leemans [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1984. – Vol. 3. – № 1. – P. 141–146.
593. Sánchez-Barrena M. J. The structure of the *Arabidopsis thaliana* *SOS3*: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response / M. J. Sánchez-Barrena, M. Martínez-Ripoll, J. K. Zhu // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 345. – № 5. – P. 1253–1264.
594. Sanders D. Calcium at the crossroads of signaling / D. Sanders, J. Pelloux, C. Brownlee [et al.] // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14 (Suppl). – P. S401–S417.
595. Sans N. Ornithine cyclodeaminase from Ti plasmid C58: DNA sequence, enzyme properties and regulation of activity by arginine / N. Sans, U. Schindler, J. Schröder // *European Journal of Biochemistry*. – 1988. – Vol. 173. – № 1. – P. 123–130.
596. Sarma B. *In vitro* regeneration of plantlets from nodal explants of *Aristolochia saccata* and *Aristolochia cathartii* / B. Sarma, B. Tanti // *European Journal of Biological Research*. – 2017. – Vol. 7. – P. 191–201.
597. Sarowar S. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens / S. Sarowar, E. N. Kim, Y. J. Kim [et al.] // *Plant Science*. – 2005. – Vol. 169. – № 1. – P. 55–63.
598. Satuti N. N. H. Phenotype of transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana* SR-1) expressing *1724orf13* gene of *Agrobacterium rhizogenes* strain

MAFF301724 / N. N. H. Satuti, N. Tanaka, K. Yoshida // Indonesian Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 12 – P. 980–987.

599. Scandalios J. G. Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? / Scandalios J. G. // Genome Biology. – 2002. – Vol. 3. – P. reviews1019.

600. Scheiffele P. Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA processing: purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site and strand-specific cleavage of superhelical T-border DNA *in vitro* / P. Scheiffele, W. Pansegrau, E. Lanka // The Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270. – № 3. – P. 1269–1276.

601. Schiefelbein J. W. Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana* / J. W. Schiefelbein, A. Shipley, P. Rowse // Planta. – 1992. – Vol. 187. – № 4. – P. 455–459.

602. Schmülling T. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development / T. Schmülling, J. Schell, A. Spena // The EMBO Journal. – 1988. – Vol. 7. – № 9. – P. 2621–2629.

603. Schmülling T. Promoters of the *rolA*, *rolB* and *rolC* genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differently regulated in transgenic plants / T. Schmfilling, J. Schell, A. Spena // The Plant Cell. – 1989. – Vol. 1. – № 7. – P. 665–670.

604. Schmülling T. Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA / T. Schmülling, M. Fladung, K. Grossmann [et al.] // The Plant Journal. – 1993. – Vol. 3. – № 3. – P. 371–382.

605. Schneeberger R. G. *Agrobacterium* T-DNA integration in *Arabidopsis* is correlated with DNA sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions / R. G. Schneeberger, K. Zhang, T. Tatarinova [et al.] // Functional & Integrative Genomics. – 2005. – Vol. 5. – № 4. – P. 240–253.

606. Schneider K. The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase / K. Schneider, K. Hovel, K. Witzel [et al.] // Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – Vol. 100. – P. 8601–8606.

607. Scholz S. S. Mutation of the *Arabidopsis* calmodulin-like protein CML37 deregulates the jasmonate pathway and enhances susceptibility to herbivory / S. S. Scholz, J. Vadassery, M. Heyer [et al.] // *Molecular Plant*. – 2014. – Vol. 7. – № 12. – P. 1712–1726.

608. Scholz S. S. Calmodulin-like protein CML37 is a positive regulator of ABA during drought stress in *Arabidopsis* / S. S. Scholz, M. Reichelt, J. Vadassery [et al.] // *Plant Signaling & Behavior*. – 2015. – Vol. 10. – P. e1011951.

609. Schopfer P. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth / P. Schopfer, A. Liskay, M. Bechtold [et al.] // *Planta*. – 2002. – Vol. 214. – № 6. – P. 821–828.

610. Schopfer P. Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean / P. Schopfer, E. Heyno, F. Drepper [et al.] // *Plant Physiology*. – 2008. – Vol. 147. – № 2. – P. 864–878.

611. Schuegger R. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis / R. Schuegger, M. Nafisi, M. Mansourova [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 4. – P. 1248–1254.

612. Schumaker K. S. Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots / K. S. Schumaker, H. Sze // *Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – Vol. 262. – № 9. – P. 3944–3946.

613. Schweizer F. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior / F. Schweizer, P. Fernández-Calvo, M. Zander [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – P. 3117–3132.

614. Scrase-Field S. A. M. G. Calcium: just a chemical switch? / S. A. M. G. Scrase-Field, M. R. Knight // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2003. – Vol. 6. – P. 500–506.

615. Segal A. W. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes / A. W. Segal, A. Abo // Trends in Biochemical Sciences. – 1993. – Vol. 18. – № 2. – P. 43–47.
616. Segura M. J. *Arabidopsis thaliana* LUP1 converts oxidosqualene to multiple triterpene alcohols and a triterpene diol / M. J. Segura, M. M. Meyer, S. P. Matsuda // Organic Letters. – 2000. – Vol. 2. – № 15. – P. 2257–2259.
617. Serino G. *Rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* cucumopine strain: sequence, effects and pattern of expression / G. Serino, D. Clerot, J. Brevet [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1994. – Vol. 26. – № 1. – P. 415–422.
618. Shan M. A review of the botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Rubiae radix* et Rhizoma / M. Shan, S. Yu, H. Yan [et al.] // Molecules. – 2016. – Vol. 21. – P. 1747.
619. Sharma P. Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants / P. Sharma, H. Padh, N. Shrivastava // Engineering in Life Sciences. – 2013. – Vol. 13. – P. 62–75.
620. Shaw S. L. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells / S. L. Shaw, S. R. Long // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 131. – № 3. – P. 976–984.
621. Shen C. H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Rubia cordifolia* L. by spectrum-effect relationships / C. H. Shen, C. T. Liu, X. J. Song [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2018. – Vol. 1090. – P. 73–80.
622. Shen L. *CaCDPK15* positively regulates pepper responses to *Ralstonia solanacearum* inoculation and forms a positive-feedback loop with *CaWRKY40* to amplify defense signaling / L. Shen, S. Yang, T. Yang [et al.] // Scientific Report. – 2016. – Vol. 6. – P. 22439.
623. Shi B. *OsDMI3* is a novel component of abscisic acid signaling in the induction of antioxidant defense in leaves of rice / B. Shi, L. Ni, A. Zhang [et al.] // Molecular Plant. – 2012. – Vol. 5. – № 6. – P. 1359–1374.

624. Shi J. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis* / J. Shi, K. N. Kim, O. Ritz [et al.] // *The Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – № 12. – P. 2393–2405.

625. Shi S. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses / S. Shi, S. Li, M. Asim [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 7. – P. 1900.

626. Shigeoka S. Cellular redox regulation, signaling, and stress response in plants / S. Shigeoka, T. Maruta // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2014. – Vol. 78. – P. 1457–1470.

627. Shilpa P. N. Induction of apoptosis by methanolic extract of *Rubia cordifolia* Linn in HEp-2 cell line is mediated by reactive oxygen species / P. N. Shilpa, V. Sivaramakrishnan, S. N. Devaraj [et al.] // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2012. – Vol. 13. – P. 2753–2758.

628. Shin R. 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism / R. Shin, J. M. Jez, A. Basra [et al.] // *FEBS Letters*. – 2011. – Vol. 585. – № 1. – P. 143–147.

629. Shiu S. H. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis* / S. H. Shiu, A. B. Bleecker // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 132. – № 2. P. 530–543.

630. Shkryl Y. N. Individual and combined effects of the *rolA*, *B*, and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli / Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2008. – Vol. 100. – P. 118–125.

631. Shkryl Y. N. Decreased ROS level and activation of antioxidant gene expression in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* / Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov [et al.] // *Planta*. – 2010. – Vol. 232. – № 5. – P. 1023–1032.

632. Shkryl Y. N. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* /

Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2013. – Vol. 168. – № 1. – P. 64–70.

633. Shkryl Y. N. Differential expression of calcium-dependent protein kinase genes (CDPK1–14) in *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes / Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, S. A. Silantieva [et al.] // Plant Gene. – 2020. – Vol. 21. – P. 100215.

634. Shkryl Y. Transcriptional regulation of enzymes involved in ROS metabolism and abiotic stress resistance in *rolC*-transformed cell cultures / Y. Shkryl, G. Veremeichik, T. Avramenko [et al.] // Plant Growth Regulation. – 2022. – Vol. 97. – P. 485–497.

635. Shkryl Y. N. Enhanced production of nitrogenated metabolites with anticancer potential in *Aristolochia manshuriensis* hairy root cultures / Y. N. Shkryl, G. K. Tchernoded, Y. A. Yugay [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – P. 11240.

636. Sieweke H.-J. O-succinylbenzoate: Coenzyme a ligase from anthraquinone producing cell suspension cultures of *Galium mollugo* / H.-J. Sieweke, E. Leistner // Phytochemistry. – 1992. – Vol. 31. – № 7. – P. 2329–2335.

637. Simantiras M. Formation of o-succinylbenzoic acid from iso-chorismic acid in protein extracts from anthraquinone-producing plant cell suspension cultures / M. Simantiras, E. Leistner // Phytochemistry. – 1989. – Vol. 28. – P. 1381–1382.

638. Simantiras M. Cell free synthesis of o-succinylbenzoic acid in protein extracts from anthraquinone andphyloquinone (vitamin K1) producing plant cell suspension cul-tures. Occurrence of intermediates between isochorismic acidand o-succinylbenzoic acid / M. Simantiras, E. Leistner // Zeitschrift für Naturforschung. – 1991. – Vol. 46. – P. 364–370.

639. Siminis C. J. Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts / C. J. Siminis, A. K. Kanellis, K. A. Roubelakis-Angelakis // Plant Physiology. – 1994. – Vol. 105. – P. 1375–1383.

640. Singh J. Fusicoccin activates pathogen-responsive gene expression independently of common resistance signalling pathways, but increases disease

symptoms in *Pseudomonas syringae* infected tomato plants / J. Singh, M. R. Roberts // *Planta*. – 2004. – Vol. 219. – № 2. – P. 261–269.

641. Singh J. Purpurin: a natural anthraquinone with multifaceted pharmacological activities / J. Singh, Y. Hussain, S. Luqman [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2020. – Vol. 35. – № 5. – P. 2418–2428.

642. Singh N. K. A CBL-interacting protein kinase *AdCIPK5* confers salt and osmotic stress tolerance in transgenic tobacco / N. K. Singh, P. Shukla, P. B. Kirti // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – P. 418.

643. Sinkar V. P. *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants / V. P. Sinkar, F. Pythoud, F. F. White [et al.] // *Genes & Development*. – 1988. – Vol. 2. – P. 688–698.

644. Sirichandra C. Phosphorylation of the *Arabidopsis AtrbohF* NADPH oxidase by OST1 protein kinase / C. Sirichandra, D. Gu, H. C. Hu [et al.] // *FEBS letters*. – 2009. – Vol. 583. – № 18. – P. 2982–2986.

645. Slightom J. L. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid / J. L. Slightom, M. Durand-Tardif, L. Jouanin [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1986. – Vol. 261. – P. 108–121.

646. Smith B. Camalexin-induced apoptosis in prostate cancer cells involves alterations of expression and activity of lysosomal protease cathepsin D / B. Smith, D. Randle, R. Mezencev [et al.] // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19. – № 4. – P. 3988–4005.

647. Sohn S. I. Metabolic engineering of isoflavones: an updated overview / S. I. Sohn, S. Pandian, Y. J. Oh [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2021. – Vol 12. – P. 670103.

648. Somssich I. E. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells / I. E. Somssich, E. Schmelzer, J. Bollmann [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1986. – Vol. 83. – № 8. – P. 2427–2430.

649. Sønderby I. E. Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond / I. E. Sønderby, F. Geu-Flores, B. A. Halkier // *Trends Plant Science*. – 2010a. – Vol. 15. – P. 283–290.

650. Sønderby I. E. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis* / I. E. Sønderby, M. Burow, H. C. Rowe [et al.] // *Plant Physiology*. – 2010b. – Vol. 153. – P. 348e363.
651. Song C. J. Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis* / C. J. Song, I. Steinebrunner, X. Wang [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 140. – P. 1222–1232.
652. Song C. P. Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses / C. P. Song, M. Agarwal, M. Ohta [et al.] // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17. – P. 2384–2396.
653. Spanier K. A functional analysis of T-DNA gene *6b*: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development / K. Spanier, J. Schell, P. H. Schreier // *Molecular Genetics and Genomics*. – 1989. – Vol. 219. – P. 209–216.
654. Spano L. Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA / L. Spano, D. Mariotti, M. Cardarelli [et al.] // *Plant Physiology*. – 1988. – Vol. 87. – P. 479–483.
655. Spena A. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants / A. Spena, T. Schmülling, C. Koncz [et al.] // *The EMBO Journal*. – 1987. – Vol. 6. – № 13. – P. 3891–3899.
656. Speth C. RACK1 scaffold proteins influence miRNA abundance in *Arabidopsis* / C. Speth, E. M. Willing, S. Rausch [et al.] // *The Plant Journal*. – 2013. – Vol. 76. – P. 433–445.
657. Srivastava A. K. Salinity and copperinduced oxidative damage and changes in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum* / A. K. Srivastava, P. Bhargava, L. C. Rai // *World Journal Microbial Biotechnology*. – 2005. – Vol. 22. – P. 1291–1298.
658. Stachel S. E. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* / S. E. Stachel, E. W. Nester // *The EMBO Journal*. – 1986. – Vol. 5. – № 7. – P. 1445–1454.
659. Steeghs M. Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of rootsecreted volatile organic compounds in *Arabidopsis* /

M. Steeghs, H. P. Bais, de J. Gouw [et al.] // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 135. – № 1. – P. 47–58.

660. Stepanova A.Y. Collection of hairy roots as a basis for fundamental and applied research / A. Y. Stepanova, M. V. Malunova, E. A. Gladkov [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 22. – P. 8040.

661. Stieger P. A. The *orf13* T-DNA gene of *Agrobacterium rhizogenes* confers meristematic competence to differentiated cells / P. A. Stieger, A. D. Meyer, P. Kathmann [et al.] // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 135. – № 3. – P. 1798–1808.

662. Stracke R. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling / R. Stracke, H. Ishihara, G. Huel [et al.] // *The Plant journal*. – 2007. – Vol. 50. – № 4. – P. 660–677.

663. Su T. Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / T. Su, J. Xu, Y. Li [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 1. – P. 364–380.

664. Subramaniyan V. *In vitro* free radical scavenging and anticancer potential of *Aristolochia indica* L. against MCF-7 cell line / V. Subramaniyan, R. Saravanan, D. Baskaran [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 7. – P. 392–396.

665. Sugaya S. Cell specific expression of the *rolC* gene of the TL-DNA of Ri plasmid in transgenic tobacco plants / S. Sugaya, K. Hayakawa, T. Handa [et al.] // *Plant & Cell Physiology*. – 1989. – Vol. 30. – P. 649–653.

666. Sun X. L. Magnoflorine inhibits human gastric cancer progression by inducing autophagy, apoptosis and cell cycle arrest by JNK activation regulated by ROS / X. L. Sun, X. W. Zhang, H. J. Zhai [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 125. – P. 109118.

667. Sun Y. *In vitro* antiviral activity of *Rubia cordifolia* aerial part extract against Rotavirus / Y. Sun, X. Gong, J.Y. Tan [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 308.

668. Suzuki M. SPXX, a frequent sequence motif in gene regulatory proteins / M. Suzuki // *Journal of Molecular Biology*. – 1989. – Vol. 207. – P. 61–84.
669. Suzuki N. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling / N. Suzuki, G. Miller, J. Morales [et al.] // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2011. – Vol. 14. – P. 691–699.
670. Suzuki N. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress / N. Suzuki, S. Koussevitzky, R. Mittler [et al.] // *Plant, Cell & Environment*. – 2012. – Vol. 35. – P. 259–270.
671. Suzuki T. Activation of glutathione transferase P gene by lead requires glutathione transferase P enhancer I / T. Suzuki, S. Morimura, M. B. Diccianni [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – P. 1626–1632.
672. Swatek K. N. Multisite phosphorylation of 14-3-3 proteins by calcium-dependent protein kinases / K. N. Swatek, R. S. Wilson, N. Ahsan [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2014. – Vol. 459. – P. 15–25.
673. Sweetlove L. J. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria / L. J. Sweetlove, J. L. Heazlewood, V. Herald [et al.] // *The Plant Journal*. – 2002. – Vol. 32. – P. 891–904.
674. Szczegieliński J. A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase / J. Szczegieliński, M. Klimecka, A. Liwosz [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139. – № 4. – P. 1970–1983.
675. Taipale M. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways / M. Taipale, G. Tucker, J. Peng [et al.] // *Cell*. – 2014. Vol. 158. – № 2. – P. 434–448.
676. Takahashi F. Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis* / F. Takahashi, T. Mizoguchi, R. Yoshida [et al.] // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 41. – № 6. – P. 649–660.
677. Takahashi S. Ectopic localization of auxin and cytokinin in tobacco seedlings by the plant-oncogenic *AK-6b* gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 / S. Takahashi, R. Sato, M. Takahashi [et al.] // *Planta*. – 2013. – Vol. 238. – № 4. – P. 753–770.

678. Takahashi Y. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection / Y. Takahashi, M. Nishikawa, H. Shinotsuka [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 165. – № 2. – P. 77–84.
679. Takeda S. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells / S. Takeda, C. Gapper, H. Kaya [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 319. – № 5867. – P. 1241–1244.
680. Tal L. Structural aspects of plant hormone signal perception and regulation by ubiquitin ligases / L. Tal, M. X. A. Gil, A. M. Guercio [et al.] // *Plant Physiology*. – 2020. – Vol. 182. – P. 1537–1544.
681. Talapatra S. K. Two pentacyclic triterpenes from *Rubia cordifolia* / S. K. Talapatra, A. C. Sarkar, B. Talapatra // *Phytochemistry*. – 1981. – Vol. 20. – № 8. – P. 1923–1927.
682. Tao Y. Expression of plant protein phosphatase 2C interferes with nuclear import of the *Agrobacterium* T-complex protein VirD2 / Y. Tao, P. K. Rao, S. Bhattacharjee // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – № 14. – P. 5164–5169.
683. Tavormina P. The plant peptidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions / P. Tavormina, B. De Coninck, N. Nikonorova [et al.] // *The Plant Cell*. – 2015. – Vol. 27. – № 8. – P. 2095–2118.
684. Teixeira F. K. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments / F. K. Teixeira, L. Menezes-Benavente, V. C. Galvão [et al.] // *Planta*. – 2006. – Vol. 224. – № 2. – P. 300–314.
685. Tenea G. N. Overexpression of several *Arabidopsis* histone genes increases *Agrobacterium*-mediated transformation and transgene expression in plants / G. N. Tenea, J. Spantzel, L.-Y. Lee [et al.] // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – № 10. – P. 3350–3367.
686. Tenhaken R. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance / R. Tenhaken, A. Levine, L. F. Brisson [et al.] // *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. – 1995. – Vol. 92. – P. 4158–4163.

687. Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype / D. Tepfer // *Cell*. – 1984. – Vol. 37. – P. 959–967.

688. Tewari R. K. Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng* / R. K. Tewari, E. J. Hahn, K. Y. Paek // *Plant Cell Reports*. – 2008. – Vol. 27. – № 3. – P. 563–573.

689. Thoday-Kennedy E. L. The role of the CBL–CIPK calcium signalling network in regulating ion transport in response to abiotic stress / E. L. Thoday-Kennedy, A. K. Jacobs, S. J. Roy // *Plant Growth Regulation*. – 2015. – Vol. 76. – P. 3–12.

690. Tian W. Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions / W. Tian, C. Wang, Q. Gao[et al.] // *Nature Plants*. – 2020. – Vol. 6. – P. 750–759.

691. Tinland B. *Agrobacterium tumefaciens 6b* genes are strain specific and affect the activity of auxin and cytokinin genes / B. Tinland, B. Huss, F. Pausu [et al.] // *Molecular & General Genetics*. – 1989. – Vol. 219. – P. 217–224.

692. Tör M. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes / M. Tör, M. T. Lotze, N. Holton // *Journal of Experimental Botany*. – 2009. – Vol. 60. – P. 3645–3654.

693. Torres M. A. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (*gp91(phox)*) / M. A. Torres, H. Onouchi, S. Hamada [et al.] // *The Plant Journal*. – 1998. – Vol. 14. – № 3. – P. 365–370.

694. Torres M. A. *Arabidopsis gp91phox* homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response / M. A. Torres, J. L. Dangl, J. D. G. Jones // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 99. – P. 517–522.

695. Torres M. A. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana* / M. A. Torres, J. D. Jones, J. L. Dangl // *Nature Genetics*. – 2005. – Vol. 37 – P. 1130–1134.
696. Torres M. A. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens / M. A. Torres, J. D. G. Jones, J. L. Dangl [et al.] // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 2. – P. 373–378.
697. Townley H. E. Calmodulin as a potential negative regulator of *Arabidopsis* *COR* gene expression / H. E. Townley, M. R. Knight // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 128. – P. 1169–1172.
698. Trovato M. The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase / M. Trovato, B. Maras, F. Linhares [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – P. 13449–13453.
699. Trovato M. From *A. rhizogenes* *RolD* to plant P5CS: exploiting proline to control plant development / M. Trovato, R. Mattioli, P. Costantino // *Plants*. – 2018. – Vol. 7. – P. 108.
700. Trung N. Q. Radical scavenging activity of natural anthraquinones: a theoretical insight / N. Q. Trung, N. M. Thong, D. H. Cuong [et al.] // *ACS Omega*. – 2021. – Vol. 6. – № 20. – P. 13391–13397.
701. Tsai H. L. *HUA ENHANCER1* is involved in posttranscriptional regulation of positive and negative regulators in *Arabidopsis* photomorphogenesis / H. L. Tsai, Y. H. Li, W. P. Hsieh [et al.] // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 7. – P. 2858–2872.
702. Tuteja N. Mechanisms of high salinity tolerance in plants / N. Tuteja // *Methods in Enzymology*. – 2007. – Vol. 428. – P. 419–438.
703. Tuteja N. Calcium signaling network in plants: an overview / N. Tuteja, S. Mahajan // *Plant Signaling & Behavior*. – 2007. – Vol. 2. – № 2 – P. 79–85.
704. Tzfira T. Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium* / T. Tzfira, M. Vaidya, V. Citovsky // *Nature*. – 2004. – Vol. 431. – № 7004. – P. 87–92.

705. Underwood W. The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana* / W. Underwood, S. Zhang, S. Y. He // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. 52. – P. 658–672.

706. Vafa O. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function. A mechanism for oncogene-induced genetic instability / O. Vafa, M. Wade, S. Kern [et al.] // *Molecular Cell*. – 2002. – Vol. 9. – № 5. – P. 1031–1044.

707. van Attikum H. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration / H. van Attikum, P. Bundock, P. Hooykaas // *The EMBO Journal*. – 2001. – Vol. 20. – № 22. – P. 6550–6558.

708. van Attikum H. Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae* / H. van Attikum, P. J. J. Hooykaas // *Nucleic Acids Research*. – 2003. – Vol. 31. – № 3. – P. 826–832.

709. van Breusegem F. Reactive oxygen species in plant cell death / F. van Breusegem, J. F. Dat // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 2. – P. 384–390.

710. van Drogen F. MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity / F. van Drogen, M. Peter // *Current Biology*. – 2002. – Vol. 12. – № 2. – P. 53–55.

711. van Kleeff P. J. M. The *Arabidopsis* GORK K^+ -channel is phosphorylated by calcium-dependent protein kinase 21 (CPK21), which in turn is activated by 14-3-3 proteins / P. J. M. van Kleeff, J. Gao, S. Mol [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2018. – Vol. 125. – P. 219–231.

712. van Kregten M. T-DNA integration in plants results from polymerase- θ -mediated DNA repair / M. van Kregten, S. de Pater, R. Romeijn [et al.] // *Nature Plants*. – 2016. – Vol. 2. – № 11. – P. 16164.

713. van Poecke R. M. P. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis / R. M. P. Van Poecke, M. A. Posthumus, M. Dicke // *Journal of Chemical Ecology*. – 2001. – Vol. 27. – № 10. – P. 1911–1928.

714. van Sluys M. A. Comparative genomic analysis of plant associated bacteria / M. A. Van Sluys, C. B. Monteiro-Vitorello, L. E. Camargo [et al.] // Annual Review of Phytopathology. – 2002. – Vol. 40. – P. 169–189.
715. van Tegelen L. J. P. Isochorismate synthase isoforms from elicited cell cultures of *Rubia tinctorum* / L. J. P. van Tegelen, R. J. M. Bongaerts, A. F. Croes [et al.] // Phytochemistry. – 1999. – Vol. 51. – № 2. – P. 263–269.
716. Venis M. A. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity / M. A. Venis, R. M. Napier, H. Barbier-Brygoo [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – Vol. 89. – № 15. – P. 7208–7212.
717. Veremeichik G. N. Molecular cloning and characterization of seven class III peroxidases induced by overexpression of the agrobacterial *rolB* gene in *Rubia cordifolia* transgenic callus cultures / G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl, V. P. Bulgakov [et al.] // Plant Cell Reports. – 2012. – Vol. 31. – № 6. – P. 1009–1019.
718. Veremeichik G. N. Expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes (CDPK1-14) in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* under temperature- and salt-induced stresses / G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl, S. A. Pinkus [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2014. – Vol. 171. – № 7. – P. 467–474.
719. Veremeichik G. N. Modulation of NADPH-oxidase gene expression in *rolB*-transformed calli of *Arabidopsis thaliana* and *Rubia cordifolia* / G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl // Plant Physiology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 105. – P. 282–289.
720. Veremeichik G. N. Activation of anthraquinone biosynthesis in long-cultured callus culture of *Rubia cordifolia* transformed with the *rolA* plant oncogene / G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl // Journal of Biotechnology. – 2019. – Vol. 306. – P. 38–46.
721. Veremeichik G. N. Overexpression of the A4-*rolB* gene from the pRiA4 of *Rhizobium rhizogenes* modulates hormones homeostasis and leads to an increase of flavonoid accumulation and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants

/ G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl, T. V. Rusapetova [et al.] // *Planta*. – 2022. – Vol. 256. – P. 8.

722. Vilaine F. Modified development in transgenic tobacco plants expressing a *rolA::GUS* translational fusion and subcellular localization of the fusion protein. / F. Vilaine, J. Rembur, D. Chriqui [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 1998. – Vol. 11. – № 9. – P. 855–859.

723. Vincendeau M. Inhibition of canonical NF- κ B signaling by a small molecule targeting NEMO-ubiquitin interaction / M. Vincendeau, K. Hadian, A. C. Messias [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 18934.

724. Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections / O. Voinnet // *Nature Reviews Genetics*. – 2005. – Vol. 6. – № 3. – P. 206–220.

725. Wabiko H. Exogenous phytohormone-independent growth and regeneration of tobacco plants transgenic for the *6b* gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 / H. Wabiko, M. Minemura // *Plant Physiology*. – 1996. – Vol. 112. – № 3. – P. 939–951.

726. Walden R. *Rol* genes alter hormonal requirements for protoplast growth and modify the expression of an auxin responsive promoter / R. Walden, I. Czaja, T. Schmülling [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 1993. – Vol. 12. – № 10. – P. 551–554.

727. Wan B. Expression of rice Ca⁽²⁺⁾-dependent protein kinases (*CDPKs*) genes under different environmental stresses / B. Wan, Y. Lin, T. Mou // *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581. – № 6. – P. 1179–1189.

728. Wang J. Transcriptomic analysis reveals that reactive oxygen species and genes encoding lipid transfer protein are associated with tobacco hairy root growth and branch development / Wang J, Lin H, Liu C [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2014. – Vol. 27. – № 7. – P. 678–687.

729. Wang M. Molecular insights into plant cell proliferation disturbance by *Agrobacterium* protein 6b / M. Wang, T. Soyano, S. Machida [et al.] // *Genes & Development*. – 2011. – Vol. 25. – № 1. – P. 64–76.

730. Wang Q. Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply / Q. Wang, S. Quan, H. Xiao // *Bioresources and Bioprocessing*. – 2019. – Vol. 6. – № 6.
731. Wang S. The structure and function of major plant metabolite modifications / S. Wang, S. Alseekh, A. R. Fernie [et al.] // *Molecular Plant*. – 2019. – Vol. 12. – № 7. – P. 899–919.
732. Wang W. Comprehensive analysis of the *Gossypium hirsutum* L. respiratory burst oxidase homolog (*Ghrboh*) gene family / W. Wang, D. Chen, D. Liu [et al.] // *BMC Genomics*. – 2020. – Vol. 21. – № 91.
733. Wang Y. Characterization of a calmodulin-regulated Ca²⁺-dependent-protein-kinase-related protein kinase, *AtCRK1*, from *Arabidopsis* / Y. Wang, S. Liang, Q. G. Xie [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2004. – Vol. 383. – P. 73–81.
734. Wang Y. J. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress / Y. J. Wang, M. Wisniewski, R. Meilan [et al.] // *Journal of the American Society for Horticultural Science*. – 2005. – Vol. 130. – P. 167–173.
735. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development / C. Wasternack // *Annals of Botany*. – 2007. – Vol. 100. – № 4. – P. 681–697.
736. Wei S. A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK9* positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility / S. Wei, W. Hu, X. Deng [et al.] // *BMC Plant Biology*. – 2014. – Vol. 14. – № 133.
737. Wei T. Magnoflorine improves sensitivity to doxorubicin (DOX) of breast cancer cells via inducing apoptosis and autophagy through AKT/mTOR and p38 signaling pathways / T. Wei, X. Xiaojun, C. Peilong // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 121. – P. 109139.
738. Weill U. Assessment of GFP tag position on protein localization and growth fitness in yeast / U. Weill, G. Krieger, Z. Avihou [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2019. – Vol. 431. – № 3. – P. 636–641.

739. Wernimont A. K. Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium / A. K. Wernimont, J. D. Artz, P. J. Finerty [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17. – № 5. – P. 596–601.
740. White F. F. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants / F. F. White, D. J. Garfinkel, G. A. Huffman [et al.] // *Nature*. – 1983. – Vol. 301. – P. 348–350.
741. White F. F. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* / F. F. White, B. H. Taylor, G. A. Huffman [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1985. – Vol. 164. – № 1. – P. 33–44.
742. Willmitzer L. The use of Ti-plasmids as plant-directed gene vectors / L. Willmitzer, A. Depicker, P. Dhaese [et al.] // *Folia Biologica*. – 1983. – Vol. 29. – № 2. – P. 106–114.
743. Witte C.-P. Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated *in vivo* as part of a kinase cascade that regulates stress response / C.-P. Witte, N. Keinath, U. Dubiella [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 13. – P. 9740–9748.
744. Wittstock U. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era / U. Wittstock, B. A. Halkier // *Trends in Plant Science*. – 2002. – Vol. 7. – № 6. – P. 263–270.
745. Wittstock U. Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores / U. Wittstock, D. J. Kliebenstein, V. Lambrix [et al.] // *Recent Advances in Phytochemistry*. – 2003. – Vol. 37. – P. 101–125.
746. Witzel F. How scaffolds shape MAPK signaling: what we know and opportunities for systems approaches / F. Witzel, L. Maddison, N. Blüthgen // *Frontiers in Physiology*. – 2012. – Vol. 3. – P. 475.
747. Wolterink-van Loo S. Interaction of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VirD2 with histones / S. W. van Loo, A. A. E. Ayala, P. J. J. Hooykaas [et al.] // *Microbiology*. – 2015. – Vol. 161. – P. 401–410.

748. Wong, H.L. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension / H. L. Wong, R. Pinontoan, K. Hayashi [et al.] // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – № 12. – P. 4022–4034.

749. Wu C. C. Dietary pseudopurpurin improves bone geometry architecture and metabolism in red-bone *Guishan goats* / C. C. Wu, X. B. Li, T. S. Han [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – P. e37469.

750. Wu G. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants / G. Wu, B. J. Shortt, E. B. Lawrence [et al.] // *The Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1357–1368.

751. Wu H. C. Heat shock-induced biphasic Ca²⁺ signature and *OsCaM1-1* nuclear localization mediate downstream signalling in acquisition of thermotolerance in rice (*Oryza sativa* L.) / H. C. Wu, D. L. Luo, F. Vignols [et al.] // *Plant, Cell & Environment*. – 2012. – Vol. 35. – № 9. – P. 1543–1557.

752. Wu L.-J. 6-Methoxygeniposidic acid, an iridoid glycoside from *Rubia cordifolia* / L.-J. Wu, S.-X. Wang, H.-M. Hua [et al.] // *Phytochemistry*. – 1991. – Vol. 30. – № 5. – P. 1710–1711.

753. Xiang Y. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement / Y. Xiang, Y. Huang, L. Xiong // *Plant Physiology*. – 2007. – Vol. 144. – P. 1416–1428.

754. Xie Y. J. Evidence of *Arabidopsis* salt acclimation induced by up-regulation of *HY1* and the regulatory role of *RbohD*-derived reactive oxygen species synthesis / Y. J. Xie, S. Xu, B. Han [et al.] // *The Plant Journal*. – 2011. – Vol. 66. – № 2. – P. 280–292.

755. Xin D. Effects of anthraquinones on immune responses and inflammatory diseases / D. Xin, H. Li, S. Zhou [et al.] // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 12. – P. 3831.

756. Xiong, L. M. Cell signaling during cold, drought and salt stress / L. M. Xiong, K. S. Schumaker, J. K. Zhu // *The Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14 (Suppl S). – P. S165–S183.

757. Xu H. Overexpression of a repressor *MdMYB15L* negatively regulates anthocyanin and cold tolerance in red-fleshed callus/ H. Xu, G. Yang, J. Zhang [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 500. – № 2. – P. 405–410.
758. Xu J. *AtCPK6*, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis* / J. Xu, Y. S. Tian, R. H. Peng [et al.] // *Planta*. – 2010. – Vol. 231. – № 6. – P. 1251–1260.
759. Xu T. Magnoflorine: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and toxicity / T. Xu, T. Kuang, H. Du [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2020. – Vol. 152. – P. 104632.
760. Xu W. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes / W. Xu, C. Dubos, L. Lepiniec // *Trends in Plant Science*. – 2015. Vol. 20. – № 3. – P. 176–185.
761. Xu W. Calcium-dependent protein kinases in phytohormone signaling pathways / W. Xu, W. Huang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 6. – P. 2436.
762. Xu X. Q. An *Agrobacterium* catalase is a virulence factor involved in tumorigenesis / X. Q. Xu, S. Q. Pan // *Molecular Microbiology*. – 2000. – Vol. 35. – № 2. – P. 407–414.
763. Yamazaki R. K. Enzymic characterization of leaf peroxisomes / R. K. Yamazaki, N. E. Tolbert // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – Vol. 245. – № 19. – P. 5137–5144.
764. Yamniuk A. P. Structural investigation into the differential target enzyme regulation displayed by plant calmodulin isoforms / A. P. Yamniuk, H. J. Vogel // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – № 8. – P. 3101–3111.
765. Yan C. Injury activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation of JAV1-JAZ8-WRKY51 complex for jasmonate biosynthesis / C. Yan, M. Fan, M. Yang [et al.] // *Molecular Cell*. – 2018. – Vol. 70. – № 1. – P. 136–149.

766. Yang J. Q. v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species / J. Q. Yang, G. R. Buettner, F. E. Domann [et al.] // *Molecular Carcinogenesis*. – 2002. – Vol. 33. – № 4. – P. 206–218.

767. Yang Y. Calcineurin B-like proteins CBL4 and CBL10 mediate two independent salt tolerance pathways in *Arabidopsis* / Y. Yang, C. Zhang, R. J. Tang [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 10. – P. 2421.

768. Yang Z. Cell polarity signaling in *Arabidopsis* / Z. Yang // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2008. – Vol. 24. – P. 551–575.

769. Ye N. H. Natural variation in the promoter of rice calcineurin B-like protein10 (*OsCBL10*) affects flooding tolerance during seed germination among rice subspecies / N. H. Ye, F. Z. Wang, L. Shi [et al.] // *The Plant Journal*. – 2018. – Vol. 94. – № 4. – P. 612–625.

770. Yi H. Expression of the *Arabidopsis* histone H2A-1 gene correlates with susceptibility to *Agrobacterium* transformation / H. Yi, K. S. Mysore, S. B. Gelvin // *The Plant Journal*. – 2002. – Vol. 32. – № 3. – P. 285–298.

771. Yi H. Constitutive expression exposes functional redundancy between the *Arabidopsis* histone H2A gene HTA1 and other H2A gene family members / H. Yi, N. Sardesai, T. Fujinuma [et al.] // *The Plant Cell*. – 2006. – V. 18. – № 7. – P. 1575–1589.

772. Yokoyama R. The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants / R. Yokoyama, T. Hirose, N. Fujii [et al.] // *Molecular Genetics and Genomics*. – 1994. – Vol. 244. – № 1. – P. 15–22.

773. Yoshie, Y. Function of the rice gp91phox homologs OsrbohA and OsrbohE genes in ROS-dependent plant immune responses / Y. Yoshie, K. Goto, R. Takai [et al.] // *Plant Biotechnology Journal*. – 2005. – Vol. 22. – №2. – P. 127–135.

774. Yoshioka H. Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: Looking back at the early pioneering works and towards the future development / H. Yoshioka, F. Bouteau, T. Kawano // *Plant Signaling & Behavior*. – 2008. – Vol. 3. – P. 153–155.

775. Yu B. Overexpression of *CsCaM3* improves high temperature tolerance in cucumber / B. Yu, S. Yan, H. Zhou [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 797.

776. Yu F. Ubiquitin-proteasome system in ABA signaling: from perception to action / F. Yu, Y. Wu, Q. Xie // *Molecular Plant*. – 2016. – Vol. 9. – № 1. – P. 21–33.

777. Yu S. Systematic study of the stress-responsive *Rboh* gene family in *Nicotiana tabacum*: genome-wide identification, evolution and role in disease resistance / S. Yu, K. U. Kakar, Z. Yang [et al.] // *Genomics*. – 2020. – Vol. 112. – P. 1404–1418.

778. Yuan P. Signatures and signaling events orchestrate plant-microbe interactions / P. Yuan, E. Jauregui, L. Du [et al.] // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2017. – Vol. 38. – P. 173–183.

779. Zeng H. Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses / H. Zeng, L. Xu, A. Singh [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 600.

780. Zhang C. Regulation of ARGONAUTE10 expression enables temporal and spatial precision in axillary meristem initiation in *Arabidopsis* / C. Zhang, L. Fan, B. H. Le [et al.] // *Developmental Cell*. – 2020. – Vol. 55. – № 5. – P. 603–616.

781. Zhang H. *Arabidopsis* VILLIN5, an actin filament bundling and severing protein, is necessary for normal pollen tube growth / H. Zhang, X. L. Qu, C. C. Bao [et al.] // *The Plant Cell*. – 2010. – Vol. 22. – № 8. – P. 2749–2767.

782. Zhang W. Molecular and genetic evidence for the key role of *AtCaM3* in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis* / W. Zhang, R. G. Zhou, Y. J. Gao [et al.] // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 149. – № 4. – P. 1773–1784.

783. Zhang X. S. Molecular evolution of calmodulin-like domain protein kinases (*CDPKs*) in plants and protists / X. S. Zhang, J. H. Choi // *Journal of Molecular Evolution*. – 2001. – Vol. 53. – № 3. – P. 214–224.

784. Zhang Y. Alkaloids from *Aristolochia manshuriensis* (*Aristolochiaceae*) / Y. Zhang, J. Jiang // *Helvetica Chimica Acta*. – 2006. – Vol. 89. – P. 2665–2670.

785. Zhang Y. Phospholipase *dalp*1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal

closure in *Arabidopsis* / Y. Zhang, H. Zhu, Q. Zhang [et al.] // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – № 8. – P. 2357–2377.

786. Zhang Y. The cyclophilin CYP20-2 modulates the conformation of BRASSINAZOLE-RESISTANT1, which binds the promoter of FLOWERING LOCUS D to regulate flowering in *Arabidopsis* / Y. Zhang, B. Li, Y. Xu [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 7. – P. 2504–2521.

787. Zhao L. N. Ca²⁺-dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K⁺ channels in *Arabidopsis* pollen tubes / L. N. Zhao, L. K. Shen, W. Z. Zhang [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 2. – P. 649–661.

788. Zhao R. The *Arabidopsis* Ca⁽²⁺⁾-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth / R. Zhao, H. L. Sun, C. Mei [et al.] // *New Phytologist*. – 2011. – Vol. 192. – № 1. – P. 61–73.

789. Zhao R. The *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent protein kinase CPK27 is required for plant response to salt-stress / R. Zhao, H. Sun, N. Zhao [et al.] // *Gene*. – 2015. – Vol. 563. – № 2. – P. 203–214.

790. Zhong H. H. The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases / H. H. Zhong, C. R. McClung // *Molecular & General Genetics*. – 1996. – Vol. 251. – № 2. – P. 196–203.

791. Zhou J. Hydrogen peroxide is involved in the cold acclimation-induced chilling tolerance of tomato plants / J. Zhou, J. Wang, K. Shi [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 60. – P. 141–149.

792. Zhou J. Differential phosphorylation of the transcription factor WRKY33 by the Protein kinases CPK5/CPK6 and MPK3/MPK6 cooperatively regulates camalexin biosynthesis in *Arabidopsis* / J. Zhou, X. Wang, Y. He [et al.] // *The Plant Cell*. – 2020. – Vol. 32. – № 8. – P. 2621–2638.

793. Zhou N. *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase / N. Zhou, T. L. Tootle, J. Glazebrook // *The Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – № 12. – P. 2419–2428.

794. Zhu J. Y. Brassinosteroid signaling / J. Y. Zhu, J. Sae-Seaw, Z. Y. Wang // Development. – 2013. – Vol. 140. – P. 1615–1620.
795. Zhu S.Y. Two calcium-dependent protein kinases, *CPK4* and *CPK11*, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* / S. Y. Zhu, X. C. Yu, X. J. Wang [et al.] // The Plant Cell. – 2007. – Vol. 19. – P. 3019–3036.
796. Zhu X. CML8, an *Arabidopsis* calmodulin-like protein, plays a role in *Pseudomonas syringae* plant immunity / X. Zhu, E. Robe, L. Jomat [et al.] // Plant & Cell Physiology. – 2017. – Vol. 58. – P. 307–319.
797. Zhu Y. Identification of *Arabidopsis* rat mutants / Y. Zhu, J. Nam, J. M. Humara [et al.] // Plant Physiology. – 2003a. – Vol. 132. – № 2. – P. 494–505.
798. Zhu Y. *Agrobacterium*-mediated root transformation is inhibited by mutation of an *Arabidopsis* cellulose synthase-like gene / Y. Zhu, J. Nam, N. C. Carpita [et al.] // Plant Physiology. – 2003b. – Vol. 133. – № 3. – P. 1000–1010.
799. Zia M. Expression of *rol* genes in transgenic soybean (*Glycine max* L.) leads to changes in plant phenotype, leaf morphology, and flowering time / M. Zia, B. Mirza, S. A. Malik [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2010. – Vol. 103. – P. 227–236.
800. Zipfel C. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation / C. Zipfel, G. Kunze, D. Chinchilla [et al.] // Cell. – 2006. – Vol. 125. – № 4. – P. 749–760.
801. Zook M. Biosynthesis of camalexin from tryptophan pathway intermediates in cell-suspension cultures of *Arabidopsis*/ M. Zook // Plant Physiology. – 1998. – Vol. 118. – № 4. – P. 1389–1393.
802. Zou J. J. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase *CPK10* functions in abscisic acid- and Ca^{2+} -mediated stomatal regulation in response to drought stress / J. J. Zou, F. J. Wei, C. Wang [et al.] // Plant Physiology. – 2010. – Vol. 154. – № 3. – P. 1232–1243.