

На правах рукописи

Кирилл

КИСЕЛЕВ
КОНСТАНТИН ВАДИМОВИЧ

**РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА И ЗНАЧЕНИЕ
СТИЛЬБЕНОВ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ**

1.5.6. Биотехнология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

ВЛАДИВОСТОК 2024

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН

Официальные оппоненты: **Кулуев Булат Разяпович**,
доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Кусайкин Михаил Игоревич,
доктор биологических наук, доцент, ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, заместитель директора по научной работе
Дюйзен Инесса Валерьевна,
доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологии

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

Защита состоится «28» января 2025 г. в «10.00» часов на заседании диссертационного совета 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159. Факс: (423)2310-193, E-mail: info@biosoil.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте ФГБУН «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета

Автореферат разослан «__» ноября 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Тюнин А.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Известно, что большинство ценных биологически активных веществ (БАВ), используемых в медицине, являются вторичными метаболитами растительного происхождения. Более того, вторичные метаболиты защищают растения от ряда биотических и абиотических стрессов. Вторичный метаболизм (также называемый специализированным метаболизмом) – это термин, обозначающий пути биосинтеза и низкомолекулярные продукты метаболизма, которые не являются абсолютно необходимыми для выживания организма, но выполняют ряд важных функций в защите и взаимодействии растений с окружающей средой. Примерами таких продуктов являются антибиотики и пигменты. Вторичные метаболиты вырабатываются многими микробами, растениями, грибами и животными. В растениях известно несколько десятков тысяч вторичных метаболитов, которые сильно отличаются по строению и функциям. Обычно у растений принято выделять несколько групп вторичных метаболитов, такие как алкалоиды, терпеноиды или изопреноиды, природные фенольные соединения и несколько тысяч других соединений (например, некоторые небелковые аминокислоты, амины, беталаины, аллицины, цианолипиды и т.д.).

Стильбены, включая наиболее изученный *транс*-резвератрол (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен, *m*-резвератрол), представляют собой семейство фенольных метаболитов растений, которые являются предметом интенсивных исследований из-за их ценных биологически активных свойств и вклада в устойчивость растений к абиотическим и биотическим стрессам. Понимание естественных механизмов регуляции биосинтеза стильбенов в растениях может быть полезно как для получения богатых источников стильбенов, так и для разработки новых стратегий защиты растений.

Известно, что резвератрол обладает превентивными свойствами против некоторых видов рака, положительно влияет на сердечно-сосудистую систему, а также обладает высоким фармакологическим потенциалом в лечении нейродегенеративных заболеваний (Aggarwal et al. 2004; Shankar et al. 2007; Ko et al. 2017). Резвератрол выделяется среди полифенолов растений своей мощной антиоксидантной активностью (de la Lastra and Villegas, 2007). Кроме того, существуют данные о положительном эффекте резвертрола на продолжительность жизни различных живых организмов (Wood et al. 2004; Pallauf et al. 2016). Резвератрол обладает высоким потенциалом для применения в фитотерапии и фармакологии (Shankar et al. 2007; Khatrar et al. 2022). Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких как ель, полигонум, сосна или арахис и др., но виноград, в том числе и дикий виноград *Vitis amurensis* Rupr., относят к основным источникам резвератрола, который является частью естественного рациона питания человека (Liu, Li, 2013).

Необходимость получения ценных стильбенов в значительных количествах открывает вопрос о существующих природных продуцентах этих веществ и о создании альтернативных быстро воспроизводимых источников стильбенов. В настоящее время источниками стильбенов являются культуральные и дикорастущие растения, культуры клеток растений и химический синтез веществ. Однако в известных растениях-продуцентах содержание стильбенов невелико и необходимо длительное время для их выращивания, поэтому получать резвератрол таким способом невыгодно. Химический синтез возможен не для всех ценных вторичных метаболитов растений и, кроме того, для синтетических аналогов БАВ актуальна проблема токсичных примесей.

Опыт получения и длительного культивирования клеточных культур растений показывает, что содержание в них целевых веществ чаще всего ниже (Donnez et al. 2009),

чем необходимо для эффективного применения в биотехнологии, поэтому исследование природных продуцентов стильбенов и разработка методов альтернативного получения этих веществ является актуальной задачей. В современной литературе недостаточно исследованы молекулярно-генетические механизмы регуляции биосинтеза стильбенов и практически отсутствуют исследования, посвященные прямому применению стильбенов для защиты растений от природных стрессов. В настоящее время многое остается неизвестным о сигнальных путях и транскрипционных факторах, регулирующих активность биосинтеза стильбенов растений. Кроме того, исследование ранее неизученных растений-продуцентов стильбенов (в первую очередь представителей флоры Дальнего Востока России, как более доступные и богатые вторичными метаболитами источники) и разработка методик получения альтернативных источников этих ценных биологически активных веществ также остается высоко актуальной задачей.

Таким образом, из сказанного выше следует, что в литературе слабо освещены важные аспекты биосинтеза, получения и применения ценных стильбенов растений. Поэтому, с одной стороны, работа направлена на получение новых фундаментальных знаний о молекулярно-генетических механизмах и сигнальных путях, регулирующих биосинтез стильбенов. Например, получение новых данных о вовлеченности некоторых транскрипционных факторов, кальциевой сигнальной системы в целом и кальций-сенсорных белков в регуляцию биосинтеза стильбенов винограда, а также данных о специализации генов стильбен синтаз. С другой стороны, работа направлена на разработку методов получения культур клеток растений, обладающих активным ростом и высоким уровнем содержания резвератрола с помощью современных биотехнологических подходов. Кроме того, исследования направлены на изучение возможности использования стильбенов как безопасных для человеческого здоровья биологических агентов в сельском хозяйстве для улучшения ростовых характеристик растений.

Степень разработанности темы

Впервые резвератрол был описан более 70 лет назад, после чего вышли тысячи статей, описывающих различные аспекты биосинтеза и биологических эффектов резвератрола и других стильбенов. Однако в опубликованных работах не освещены вопросы регуляции биосинтеза и значение стильбенов для клеток растений, что детально рассмотрено в данной работе.

Цель и задачи исследования

Цель работы – выявить закономерности взаимодействия молекулярных и генетических механизмов, участвующих в регуляции биосинтеза стильбенов и реализации их антистрессового действия в клетках растений. Поиск новых естественных источников стильбенов и изучение потенциала стильбенов как защитных агентов растений против стрессов. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить содержание и разнообразие стильбенов в доступных растительных источниках, произрастающих на Дальнем Востоке РФ (виноград *V. amurensis*, ель *Picea jezoensis*, сосна *Pinus koraiensis*).
2. Изучить влияние различных индукторов и ингибиторов вторичного метаболизма и кальциевой сигнальной системы, а также деметилирующих агентов, на биосинтез стильбенов в культурах клеток и растениях винограда *V. amurensis* и ели *P. jezoensis*.
3. Получить трансгенные культуры клеток винограда *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие гены кальциевых сенсоров, транскрипционных факторов и гены *rol* агробактерий, а также гены стильбен синтаз (*STS*). Оценить влияние сверхэкспрессии этих генов на накопление стильбенов в полученных клетках.

4. Получить трансгенные растения арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующие гены *STS* из различных источников (виноград, ель). Проверить содержание стильбенов в полученных растениях *A. thaliana* и определить их устойчивость к абиотическим стрессам.

5. Изучить влияние внешней обработки растений *A. thaliana*, *V. amurensis* и *P. jezoensis* водными растворами стильбенов и их предшественников на рост, развитие и устойчивость к абиотическим стрессам этих растений.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Впервые изучено влияние трансформации растительных клеток генами кальциевых сенсоров (*CDPK*, *CML*), *Myb*-транскрипционных факторов и генами *rol* на биосинтез стильбенов. В культуре клеток *V. amurensis*, активно экспрессирующей ген *VaCPK20*, продукция т-резвератрола клетками достигала 4.2 мг/г сухого веса клеток. В то же время в клеточной линии *V. amurensis*, активно экспрессирующей ген *rolB* из агробактерий, продукция т-резвератрола клетками составила 111.5 мг/л среды или 32 мг/г сухого веса клеток (3.2% от сухого веса клеток), что значительно превышает ранее сообщаемые данные для резвератрол-продуцирующих культур клеток растений. Найден наиболее богатый источник стильбенов среди доступных растительных источников – кора ели аянской, где общее содержание стильбенов достигало 251 мг/г сухого веса коры.

Впервые показано, что внешняя обработка растений водными растворами стильбенов и трансформация генами *STS* растений оказывает значительное защитное действие против губительного ультрафиолетового облучения.

Таким образом, с помощью сверхэкспрессии отдельных генов в культурах клеток растений исследовано участие в биосинтезе стильбенов 12 регуляторных генов из семейств киназ, транскрипционных факторов и генов *rol* агробактерий. Установлены гены из семейств киназ, транскрипционных факторов и генов *rol* агробактерий (*VaCPK20*, *VaCML65*, *rolB*), которые обладают высоким потенциалом для использования в биотехнологии растений с целью получения растений и культур клеток растений с высоким содержанием ценных вторичных метаболитов.

Методология диссертационного исследования

Диссертационная работа выполнена с использованием широкого спектра современных молекулярно-биологических и биотехнологических методов: для выполнения различных задач применялись методы культивирования растительных клеток *in vitro*, агробактериальная трансформация, полимеразная цепная реакция, секвенирование ДНК по Сэнгеру, высокоэффективная жидкостная хроматография и другие подходы, подробно описанные в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Показано, что кора хвойных деревьев (ель, сосна) является наиболее богатым доступным источником стильбенов.

2. Кальциевая сигнальная система и стрессовые фитогормоны растений вовлечены в регуляцию биосинтеза стильбенов. Применение ионофора кальция A23187, салициловой кислоты и метилжасмоната приводило к достоверному увеличению содержания стильбенов в клетках винограда *V. amurensis*.

3. Трансформация культур клеток *V. amurensis* регуляторными генами, включая гены кальциевых сенсоров (кальций-зависимой протеинкиназы *VaCDPK20* и кальмодулин-подобного белка *VaCML65*), генами транскрипционных факторов (*VaMyb40* и *VaMyb60*) из *V. amurensis* и генами *rolB* и *rolC* из *Agrobacterium rhizogenes* приводит к достоверной

активации биосинтеза т-резвератрола и повышенному содержанию этого стильбена в полученных трансгенных клеточных линиях.

4. Трансформация культур клеток *V. amurensis* структурными генами *STS* из винограда и ели приводит к активации биосинтеза т-резвератрола, но общий уровень накопления стильбенов меньше, чем при трансформации регуляторными генами.

5. Трансформация растений *A. thaliana* генами *STS* приводит к появлению т-резвератрола и т-пицеида, а также значительно повышает устойчивость этих растений к ультрафиолетовому облучению.

6. Внешняя обработка растений *A. thaliana*, листьев винограда *V. amurensis* и черенков *P. jezoensis* стильбенами и предшественниками фенольных соединений приводит к достоверной устойчивости обработанных растений к ультрафиолетовому облучению и тепловому стрессу.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности полученных результатов в ходе выполнения диссертационной работы подтверждается планированием и строгим соблюдением принципов выполнения научных экспериментов. Так, все данные о содержании и регуляции биосинтеза стильбенов основаны на экспериментах с использованием не менее трёх независимо полученных трансгенных линий клеток или растений, и все эксперименты были повторены не менее трех раз. В каждом эксперименте использовали контрольную трансгенную культуру клеток или контрольную линию растений, которые трансформировались только селективным маркерным геном. В работе использовали современные широко известные методы анализа содержания вторичных метаболитов и экспрессии генов. Все полученные значения подвергали статистической обработке, где при небольших выборках и экспериментах использовали спаренный критерий Стьюдента (t-тест), а при широкомасштабных экспериментах – многофакторный дисперсный анализ (ANOVA).

Апробация работы

Материалы данной работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях: 11th International Conference on «Grapevine Breeding and Genetics» (Пекин, Китай, 2014), Международная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений PlantGen 2015» (Новосибирск, Россия, 2015), Конференция с международным участием «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений», (Москва, Россия, 2015), Научная конференции с международным участием «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», 21-24 июня, (Санкт-Петербург, Россия, 2016), V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2016), VII международная научная конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» (Ялта, Россия, 2016), Всероссийская научной конференции с международным участием «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, Россия, 2018), Всероссийская научная конференция с международным участием "Физиология растений – основа создания растений будущего" (Казань, Россия, 2019), VII Международная научная конференция «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений» (Казань, Россия, 2013).

Личный вклад автора

Основные результаты получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Первые химические анализы стильбенов были выполнены совместно с

сотрудниками лаборатории химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН к.х.н. Веселовой М.В., д.х.н. Федореевым С.А. и сотрудником лаборатории лекарственных растений ФГБУН ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН к.б.н. Маняхиным А.Ю. Дальнейшие анализы содержания стильбенов в опытных образцах, как и прочие методы и подходы, были выполнены в лаборатории биотехнологии ФГБУН ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН под непосредственным руководством Киселева К.В.

Публикации

По материалам диссертации опубликована 71 работа, в том числе 57 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, 2 патента РФ и 12 материалов всероссийских и международных конференций.

Структура диссертации

Диссертационная работа содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 354 источника. Диссертация изложена на 206 страницах и содержит 33 рисунка и 20 таблиц.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве основных модельных объектов были использованы растения винограда амурского *V. amurensis* и резуховидки Таля *A. thaliana*, экотип Columbia. Растения *V. amurensis* брали из диких условий произрастания на территории Приморского края. Семена растений дикого типа и трансгенные линии *A. thaliana* хранятся в лаборатории биотехнологии. Так же в работе стильбены анализировали в дальневосточных растениях, произрастающих в диких условиях: ель *P. jezoensis*, сосна *P. koraiensis*. Трансгенные культуры клеток и растения получали с помощью агробактериальной трансформации. Относительный уровень экспрессии анализируемых генов проводили с помощью прибора ДТ-Прайм 4М1 амплификатор с функцией ПЦР РВ (ДНК-технология, Россия) с программным обеспечением RealTime_PCR v.7.3. Далее экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Секвенирование генов было проведено на секвенаторе ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Состав вторичных метаболитов определен с помощью высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20AD XR (Shimadzu, Япония) как описано ранее (Kiselev et al. 2016).

Результаты были обработаны при помощи программы Statistica, версия 10.0. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка измерений (SE). Значимость полученных данных в большинстве случаев оценивалась по спаренному критерию Стьюдента. В сложных экспериментах использовали односторонний дисперсионный анализа (ANOVA) с попарными сравнениями Тьюки. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Накопление стильбенов в тканях дальневосточных растений

Анализ содержания стильбенов был проведен в растениях ели аянской *P. jezoensis*, включая кору, хвою и древесину. Кроме того, провели оптимизацию условий экстракции стильбенов для выделения максимального количества стильбенов из исследуемых образцов. Используя ВЭЖХ с масс-спектрометрией высокого разрешения, мы обнаружили 11 стильбеноидных соединений в коре и иглах ели *P. jezoensis* (Рисунок 1): т-астрингин (1), цис-астрингин (2), т-пицеид (3), т-изорапонтин (4), т-пицеатаннол (5), цис-пицеид (6), цис-изорапонтин (7), т-резвератрол (8), т-изорапонтигенин (9), цис-резвератрол (10), цис-

изорапонтигенин (11). При проведении эксперимента по выбору растворителей для экстракции стильбенов из коры ели было обнаружено, что чистый метанол и, в меньшей степени, этанол, являются наилучшими растворителями для экстракции стильбенов. Использование данных растворителей привело к выделению наибольшего количества стильбенов, а именно 229 и 171 мг/г сухой биомассы, соответственно. В то же время, применение других растворителей, включая воду, этилацетат, ацетон и гексан, привело к значительно меньшему выходу стильбенов, не превышающему 8–87 мг/г сухой биомассы (Suprun et al. 2021).

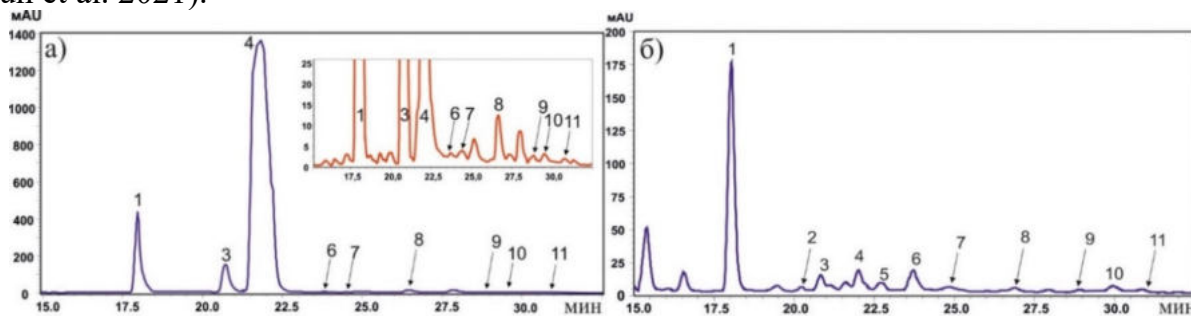


Рисунок 1. Сравнительный анализ хроматографических профилей ВЭЖХ для экстрактов еловой *Picea jezoensis* коры (а) и хвои (б) (310 нм). В результате анализа были выявлены следующие соединения: т-астрингин (1, время удерживания 18.0 мин), цис-астрингин (2, 20.2 мин), т-пицеид (3, 20.8 мин), т-изорапонтин (4, 21.9 мин), т-пицеатаннол (5, 22.6 мин), цис-пицеид (6, 23.9 мин), цис-изорапонтин (7, 24.5 мин), т-резвератрол (8, 26.5 мин), т-изорапонтигенин (9, 28.8 мин), цис-резвератрол (10, 29.7 мин), цис-изорапонтигенин (11, 30.2 мин).

Далее были изучены влияние температуры, времени экстракции и времени года на выход стильбенов (Таблица 1, 2). Экспериментальным путем было установлено, что экстракция стильбенов в течении 2 часов при температуре 60°C является наиболее оптимальным способом выделения стильбенов. Кроме того, было выявлено, что наибольшее содержание стильбенов наблюдалось в коре ели *P. jezoensis*, собранной зимой и весной, в то время как летом и осенью содержание стильбенов уменьшалось в 1.1–1.3 раза. Был проведен ряд экспериментов по изучению влияния предшественников фенольных соединений и УФ-С на биосинтез стильбенов в годовалой хвое ели *P. jezoensis*. Для этого ветви ели разрезали на черенки длиной около 10 см, которые затем помещали в стаканы с питательной средой W_0 (Рисунок 2а). Черенки содержали молодые светло-зеленые иглы. После обработки УФ-С через 24 часа наблюдалось изменение окраски молодых игл, которые приобретали желтоватый оттенок и затем погибали. Количество желтых игл после обработки УФ-С достоверно увеличилось до 95% (Рисунок 2б). Ранее было показано, что 0.5 мМ *para*-кумаровой кислоты (СА) и кофейной кислоты (СаА) оказывали наибольшее стимулирующее влияние на содержание *m*-резвератрола в культурах клеток винограда *V. amurensis* (Tyunin et al. 2018). Поэтому в данном исследовании было решено использовать растворы СА и СаА в тех же концентрациях для изучения защитных свойств от воздействия УФ-С. Исследование показало, что предварительная обработка СА способна предотвратить разрушительное воздействие УФ-С. После облучения УФ-С количество желтых игл значительно сокращалось в 3 раза, до 32% (УФ-С+СА). Добавление СаА также привело к снижению количества желтых игл до 85% (УФ-С+СаА, Рисунок 2в), однако это значение не имело существенных различий с уровнем желтых игл после облучения УФ-С (Рисунок 2в).

Культивирование черенков ели в течение 24 ч в стаканах с питательной средой W_0 (образцы C0 и C24) не оказало существенного влияния на содержание стильбенов (Таблица 3). Обработка УФ-С привела к незначительному увеличению общего содержания стильбенов на 1.1 раза, в то время как добавление СА и СаА привело к увеличению содержания стильбенов на 1.2-1.3 раза по сравнению с необработанным материалом, однако статистически значимое увеличение наблюдалось только в образцах, обработанных СА (Таблица 3). Наибольшее содержание стильбенов (9.2 мг/г сухой массы) было обнаружено после обработки УФ-С черенка, который находился в стакане с раствором СА. УФ обработка и насыщение черенков СаА увеличили содержание стильбенов в 1.1 раза, но это увеличение статистически не отличалось от контрольных образцов (Таблица 3). Было показано, что повышение содержания стильбенов после обработки СА было связано с увеличением содержания *m*-астрингина (в 1.3–1.4 раза), *m*-пицеида (в 1.4–1.5 раза), *m*-изорапонтина (в 1.4–1.5 раза), *m*-пицеатаннола (в 1.4–1.6 раза) и *цис*-пицеида (в 2 раза). Таким образом, содержание всех основных стильбенов после обработки СА было повышено примерно в одинаковой степени (Таблица 3).

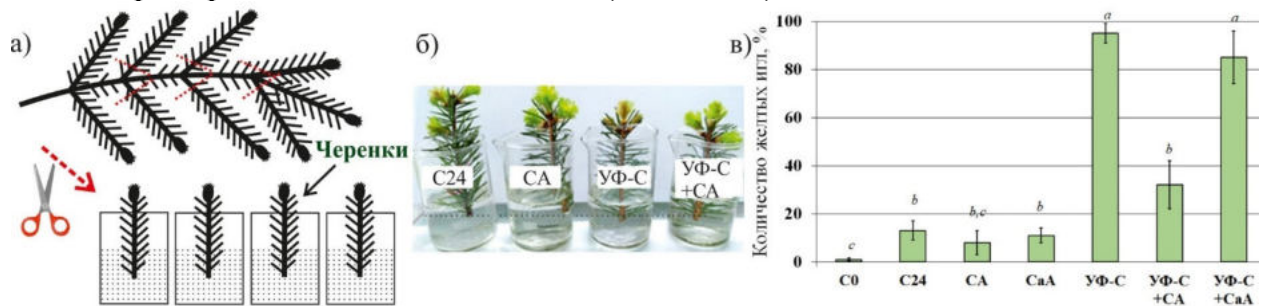


Рисунок 2. Обработка черенков ели *Picea jezoensis* УФ-С, пара-кумаровой кислотой (СА) и кофейной кислотой (СаА). Схема эксперимента (а). Жизнеспособность черенков *P. jezoensis* через 24 часа после обработки СА, СаА и УФ-С (б, в). C0 – количество желтых игл до эксперимента; C-24 – количество желтых игл у черенков 24 часа после обработки, культивируемых в стакане с 50 мл жидкой среды W_0 . СА – 0.5 мМ СА; СаА – 0.5 мМ СаА; УФ-С – черенки сразу обрабатывали УФ-С в течение 10 мин как описано (Kiselev et al. 2017); УФ-С+СА – добавляли 0.5 мМ СА и обрабатывали УФ-С; УФ-С+СаА – добавляли 0.5 мМ СаА и обрабатывали УФ-С. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

С помощью ВЭЖХ был проанализирован состав и количество стильбенов в коре сосны корейской *Pinus koraiensis* (Suprun et al. 2023). Было показано, что кора сосны *P. koraiensis* является богатым источником стильбенов, общее содержание стильбенов доходило до 54 мг/г сухой массы (Таблица 4). Используя ВЭЖХ, мы обнаружили 7 стильбеноидных соединений в тканях сосны *P. koraiensis* (Рисунок 3, Таблица 4): *т*-астрингин (1), *т*-пицеид (2), *цис*-пицеид (3), *т*-изорапонтин (4), *т*-пиностильбенозил (5), *т*-резвератрол (6), *т*-пиностильбен (7). Преобладающими по количеству среди стильбенов были *т*-пицеид и *т*-пиностильбенозил. Эти три соединения в совокупности составляли более 90% всех выявленных стильбенов в образцах. Таким образом, стильбены сосны и ели имеют схожие соединения (пицеид, астрингин, изорапонтин), но отличаются тем, что в сосне довольно много пиностильбена (дигидроксилированный стильбен с метоксигруппой) и его гликозилированного производного (пиностильбенозил), а в ели *т*-изорапонтин (тетрагидроксилированный стильбен с метоксигруппой), *т*-астрингин (тетрагидрокси-транс-стильбен) (Таблица 1, 4).

Таблица 1. Содержание стильбенов в коре ели *Picea jezoensis*, собранной зимой после экстракции метанолом (100%) при различной температуре и времени экстракции (мг/г от сухого веса). Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Условия экстракции	2 ч, 20 °С	2 ч, 40 °С	2 ч, 60 °С	4ч, 20 °С	4 ч, 40 °С	4 ч, 60 °С	6 ч, 20 °С	6 ч, 40 °С	6 ч, 60 °С
<i>m</i> -астрингин	22.92 ± 1.20 ^b	24.79 ± 0.69 ^{ab}	27.46 ± 0.57 ^a	25.54 ± 1.51 ^{ab}	25.93 ± 0.59 ^{ab}	28.76 ± 2.07 ^a	24.94 ± 2.43 ^{ab}	25.21 ± 0.96 ^{ab}	25.54 ± 3.04 ^{ab}
<i>цис</i> -астрингин	0.61 ± 0.03 ^a	0.60 ± 0.03 ^a	0.71 ± 0.05 ^a	0.64 ± 0.06 ^a	0.65 ± 0.03 ^a	0.69 ± 0.04 ^a	0.68 ± 0.05 ^a	0.67 ± 0.06 ^a	0.73 ± 0.08 ^a
<i>m</i> -пицеид	5.87 ± 0.31 ^b	6.09 ± 0.11 ^{ab}	6.73 ± 0.32 ^{ab}	6.48 ± 0.34 ^{ab}	6.49 ± 0.07 ^{ab}	7.14 ± 0.26 ^a	6.13 ± 0.35 ^{ab}	6.30 ± 0.18 ^{ab}	6.59 ± 0.63 ^{ab}
<i>m</i> -изорапонтин	175.8 ± 2.64 ^c	183.31 ± 3.72 ^d	204.16 ± 1.27 ^{bc}	196.53 ± 4.95 ^c	199.35 ± 2.38 ^c	204.14 ± 2.97 ^{bc}	207.6 ± 3.92 ^{ab}	217.06 ± 3.57 ^a	214.78 ± 2.75 ^{ab}
<i>m</i> -пицеатаннол	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
<i>цис</i> -пицеид	0.04 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.01 ^{ab}	0.09 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.02 ^{ab}	0.08 ± 0.01 ^{ab}	0.09 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.01 ^{ab}	0.08 ± 0.01 ^{ab}	0.09 ± 0.01 ^a
<i>цис</i> -изорапонтин	0.82 ± 0.07 ^b	1.06 ± 0.14 ^b	1.58 ± 0.11 ^{ab}	0.91 ± 0.35 ^b	1.33 ± 0.58 ^{ab}	1.56 ± 0.12 ^{ab}	0.91 ± 0.10 ^b	1.4 ± 0.07 ^{ab}	1.79 ± 0.25 ^a
<i>m</i> -резвератрол	0.08 ± 0.02 ^b	0.09 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.04 ^b	0.12 ± 0.01 ^{ab}	0.15 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
<i>m</i> -изорапонтигенин	0.10 ± 0.03 ^{ab}	0.08 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.02 ^{ab}	0.12 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.02 ^{ab}	0.09 ± 0.02 ^{ab}	0.11 ± 0.02 ^{ab}
<i>цис</i> -резвератрол	0.03 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a
<i>цис</i> -изорапонтигенин	0 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
Сумма стильбенов	206.23 ± 4.14 ^d	216.15 ± 3.99 ^c	241.09 ± 3.22 ^{ab}	230.38 ± 6.33 ^{bc}	234.09 ± 3.94 ^b	242.71 ± 5.29 ^{ab}	240.54 ± 6.63 ^{ab}	250.99 ± 3.41 ^a	249.87 ± 4.85 ^{ab}

Таблица 2. Содержание стильбенов в коре ели *Picea jezoensis*, собранной в разные сезоны года, при экстракции этанолом в течение 2 ч при 60°C (мг/г от сухого веса). Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Стильбены	Весна	Лето	Осень	Зима
<i>m</i> -астрингин	16.12 ± 1.74 ^b	12.65 ± 1.19 ^c	20.58 ± 1.12 ^a	23.8 ± 0.69 ^a
<i>цис</i> -астрингин	0.54 ± 0.17 ^a	0.16 ± 0.07 ^b	0.32 ± 0.09 ^{ab}	0 ^c
<i>m</i> -пицеид	2.73 ± 0.74 ^b	3.67 ± 0.36 ^b	4.28 ± 0.19 ^{ab}	4.87 ± 0.12 ^a
<i>m</i> -изорапонтин	130.9 ± 18.37 ^{ab}	104.35 ± 11.7 ^b	112.98 ± 5.13 ^b	134.26 ± 5.54 ^a
<i>m</i> -пицеатаннол	0.19 ± 0.08 ^a	0.02 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0 ^c
<i>цис</i> -пицеид	0.04 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.02 ^a	0 ^c
<i>цис</i> -изорапонтин	0.19 ± 0.08 ^b	6.8 ± 3.3 ^a	0 ^c	0 ^c
<i>m</i> -резвератрол	0.18 ± 0.05 ^{cd}	0.32 ± 0.09 ^{bc}	0.56 ± 0.05 ^a	0.07 ± 0.04 ^d
<i>m</i> -изорапонтигенин	0.04 ± 0.03 ^{ab}	0.22 ± 0.08 ^a	0 ^b	0 ^b
<i>цис</i> -резвератрол	0 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
<i>цис</i> -изорапонтигенин	0.01 ± 0.01 ^{ab}	0.03 ± 0.01 ^a	0 ^b	0 ^b
Сумма стильбенов	150.95 ± 19.93 ^{ab}	126.54 ± 15.06 ^b	138.97 ± 6.42 ^b	163.02 ± 6.36 ^a

Таблица 3. Содержание стильбенов в хвое ели *Picea jezoensis* без обработки и после обработки УФ-С, СА и СаА. С0, С24 – иглы ели без обработки; УФ-С – иглы после обработки УФ-С; СА – иглы после обработки *пара*-кумаровой кислотой; СаА – иглы после обработки кофейной кислотой; УФ-С+СА – иглы после обработки УФ-С и СА; УФ-С+СаА – иглы после обработки УФ-С и СаА. Стильбены из использованных образцов были экстрагированы через 24 ч после обработки, кроме С0 (до обработки). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Стильбены	С0	С24	СА	СаА	УФ-С	УФ-С + СА	УФ-С + СаА
<i>m</i> -астрингин	5.26 ± 0.45 ^d	5.26 ± 0.32 ^d	6.87 ± 0.13 ^{b,c}	6.17 ± 0.23 ^{cd}	5.74 ± 0.30 ^d	7.58 ± 0.24 ^a	5.93 ± 0.16 ^d
<i>цис</i> -астрингин	0.83 ± 0.06 ^b	0.87 ± 0.07 ^b	0.83 ± 0.03 ^b	1.11 ± 0.11 ^a	0.83 ± 0.05 ^b	0.83 ± 0.09 ^b	0.88 ± 0.10 ^{a,b}
<i>m</i> -пицеид	0.17 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.07 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.03 ^a	0.25 ± 0.07 ^a	0.20 ± 0.06 ^a
<i>m</i> -изорапонтин	0.25 ± 0.03 ^b	0.26 ± 0.03 ^b	0.35 ± 0.05 ^{a,b}	0.28 ± 0.03 ^b	0.26 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.06 ^a	0.34 ± 0.08 ^{a,b}
<i>m</i> -пицеатаннол	0.09 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.04 ^a	0.11 ± 0.03 ^a
<i>цис</i> -пицеид	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
<i>цис</i> -изорапонтин	0 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a
<i>m</i> -резвератрол	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ^a
<i>m</i> -изорапонтигенин	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>цис</i> -резвератрол	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
<i>цис</i> -изорапонтигенин	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Сумма стильбенов	6.61 ± 0.56 ^d	6.65 ± 0.42 ^d	8.45 ± 0.29 ^{b,c}	7.89 ± 0.28 ^{c,d}	7.18 ± 0.35 ^{c,d}	9.19 ± 0.26 ^a	7.49 ± 0.19 ^{c,d}

Известно, что плоды сосны корейской *P. koraiensis* или сосны кедровой съедобны (кедровые орешки), довольно популярны и широко продаются в мире, поэтому одной из важных задач стало проанализировать состав стильбенов в шишках и плодах сосны

P. koraiensis (Таблица 4). Нами было показано, что в шишках сосны, по сравнению с корой, содержание стильбенов было намного ниже и состав их был меньше. Мы нашли 5 стильбенов (т-астрингин, т-пицеид, т-пиностильбенозил, т-резвератрол и т-пиностильбен) в чешуйках и всего 3 стильбена в скорлупе (т-астрингин, т-пицеид, т-пиностильбенозил). Их общее содержание было низким и варьировало от 0.05 до 0.13 мг/г сухой массы. Важно отметить, что в ядре соснового ореха, употребляемого в пищу, мы не нашли каких-либо стильбенов (Таблица 4). Значит человек не получает стильбены через употребление сосновых орехов в пищу.

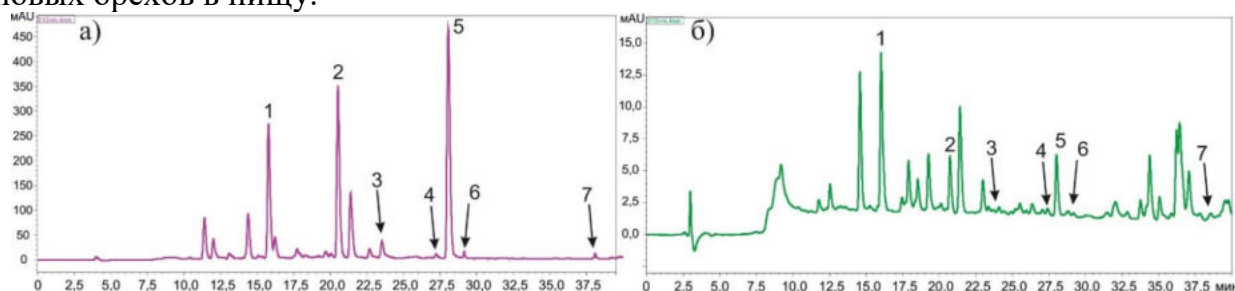


Рисунок 3. Сравнительный анализ хроматографических профилей ВЭЖХ для экстрактов сосновой *Pinus koraiensis* коры (а) и хвои (б), зарегистрированных при 310 нм (Suprun et al. 2023). Образцы сосновой коры и хвои были собраны зимой. В результате анализа были выявлены следующие соединения: т-астрингин (пик № 1), т-пицеид (2), цис-пицеид (3), т-изорапонтин (4), т-пиностильбенозил (5), т-резвератрол (6), т-пиностильбен (7).

Таблица 4. Состав и содержание стильбенов (мг/г от сухой массы) в коре и в различных частях шишки (семенные чешуйки, оболочки семян и семенах) сосны *Pinus koraiensis* (мг/г от сухого веса). При использовании однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с попарными сравнениями по методу Тьюки значения с одной и той же буквой в каждой строке существенно не отличались. Статистически значимым считалось значение $p < 0.05$.

Части сосны / стильбены	зимняя кора	весенняя кора	летняя кора	осенняя кора	семенные чешуйки	оболочки семян	семена
т-астрингин	0.143 ±0.023 ^a	0.102 ±0.039 ^a	0.084 ±0.019 ^a	0.039 ±0.006 ^b	0.017 ±0.003 ^c	0.007 ±0.001 ^d	0 ^e
т-пицеид	22.417 ±3.251 ^a	16.2 ±1.587 ^{ab}	18.68 ±2.969 ^{ab}	14.333 ±0.813 ^b	0.036 ±0.009 ^c	0.035 ±0.014 ^c	0 ^d
цис-пицеид	0.391 ±0.027 ^a	0.277 ±0.051 ^b	0.029 ±0.005 ^d	0.097 ±0.029 ^c	0 ^e	0 ^e	0 ^e
т-изорапонтин	0.854 ±0.132 ^a	0.497 ±0.138 ^a	0.607 ±0.085 ^a	0.868 ±0.258 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^b
т-пиностильбенозил	28.359 ±4.272 ^a	18.39 ±3.071 ^{ab}	23.58 ±4.036 ^{ab}	17.95 ±1.658 ^b	0.051 ±0.014 ^c	0.008 ±0.005 ^d	0 ^d
т-резвератрол	0.868 ±0.094 ^a	0.765 ±0.108 ^b	0.881 ±0.196 ^{ab}	1.487 ±0.327 ^a	0.004 ±0.002 ^c	0 ^c	0 ^c
т-пиностильбен	0.744 ±0.095 ^a	0.645 ±0.122 ^a	0.667 ±0.135 ^a	1.014 ±0.155 ^a	0.005 ±0.001 ^b	0 ^b	0 ^b
Сумма стильбенов	53.78 ±7.657 ^a	36.89 ±4.946 ^{ab}	44.53 ±7.341 ^{ab}	35.79 ±2.681 ^b	0.127 ±0.031 ^c	0.050 ±0.013 ^d	0 ^e

Анализ содержания стильбенов в растениях *V. amurensis* проводили, используя листья, стебли, семена, ягоды и корни винограда амурского *V. amurensis*. Наибольшее общее содержание стильбенов в тканях винограда *V. amurensis* было определено в корнях винограда, собранных осенью – 8.9 мг/г сухой массы корней (Рисунок 4, Таблица 5), в то время как в начале лета содержание стильбенов в корнях было ниже в 2.6 раза и составило 3.4 мг/г (Таблица 5). Относительно высокое содержание стильбенов также было выявлено

в стеблях винограда *V. amurensis* летом и осенью и составило 3.0–4.2 мг/г сухой массы стеблей. Стебли, собранные осенью, содержали в 1.4 раза больше стильбенов, чем летние образцы, но эти отличия были статистически недостоверными (Таблица 5).

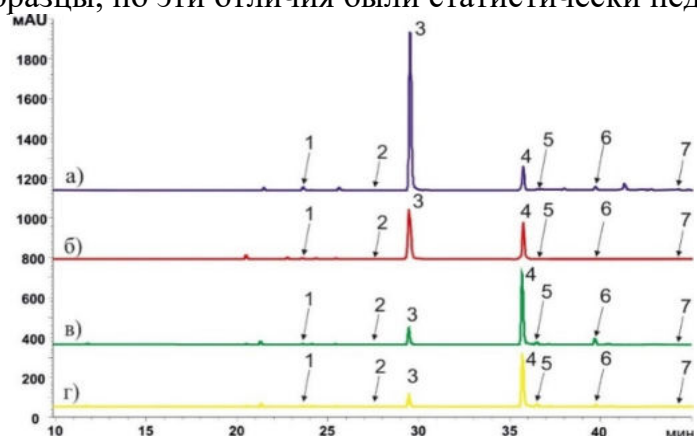


Рисунок 4. Сравнение профилей ВЭЖХ при 310 нм для экстрактов корней (а,б) и стеблей (в,г) винограда *Vitis amurensis*, собранных в июне (б,г) и октябре (а,в) 2018 г. т-пицеид (1, время удерживания 23.5 мин), цис-пицеид (2, 27.5 мин), т-резвератрол (3, 29.9 мин), цис-ε-виниферин (4, 35.4 мин), т-ε-виниферин (5, 36.1 мин), т-δ-виниферин (6, 39.6 мин), т-пицеатаннол (7, 44.2 мин).

Во всех других исследуемых органах и тканях винограда *V. amurensis* содержание стильбенов было значительно меньше, чем в корнях и стеблях (Таблица 5). Так, в листьях содержалось 0.06-0.39 мг/г стильбенов, а в черешках листьев – 0.03-0.05 мг/г стильбенов от сухой массы. Наименьшее содержание стильбенов было отмечено для семян, собранных из зрелых ягод, и составило 0.01 мг/г стильбенов от сухой массы исследуемой ткани (Таблица 5). В корнях винограда в осенний период *V. amurensis* основным стильбеном был т-резвератрол, содержание которого достигало 6.8 мг/г, что составляло 76.4% от общего содержания стильбенов. Так же т-резвератрол преобладал в весенний период в корнях винограда, черешках листьев, собранных весной и осенью, а также в семенах зрелых ягод (Таблица 5). В стеблях винограда *V. amurensis* преобладал цис-ε-виниферин (2.4-3.4 мг/г), а в листьях преобладающими стильбенами были гликозиды резвератрола: цис- и т-пицеид (Таблица 5). Возможно, это вызвано тем, что в стеблях и корнях идет накопление стильбенов, сопровождающееся их окислением, что и приводит к увеличению доли олигомеров резвератрола (Pezet, 1998). В то же время листья – это основное место синтеза стильбенов, поэтому в этих органах доля резвератрола и его гликозидов больше, так как гликозилированные формы стильбенов лучше растворяются в воде и транспортируются по растению.

Таким образом, нами показано, что ель *P. jezoensis* отличается постоянным высоким содержанием стильбенов и высокой экспрессией генов *STS*. В то же время виноград *V. amurensis*, произрастающий в схожих климатических условиях, обладает индуцибельным биосинтезом стильбенов и экспрессией генов *STS*. Например, под воздействием индуцирующих биосинтез стильбенов условий (например, ультрафиолет, предшественники фенольных соединений) содержание стильбенов и экспрессия генов *STS* достоверно возрастает более чем в 2–3 раза. Поэтому следующим шагом в данной работе было определить как обработка УФ-С и предшественниками стильбенов влияет на биосинтез стильбенов в *V. amurensis*. Молодые побеги *V. amurensis* были разделены на черенки длиной 7-8 см, где каждый черенок содержал один здоровый лист и обработаны УФ-С. Черенки с нормальными по фенотипу листьями считались «жизнеспособными», а с желто-зелеными увядшими листьями – «нежизнеспособными» (Рисунок 5а).

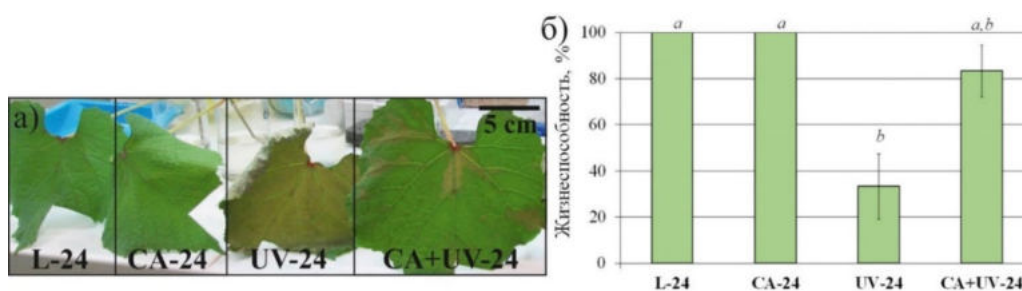


Рисунок 5. Фенотип (а) и жизнеспособность черенков *Vitis amurensis* (б) через 24 часа после обработки *para*-кумаровой кислотой (СА) и/или УФ-С (UV-C). L-24 – 24 часа в жидкой питательной среде W0; СА-24 – 24 часа с 0.5 мМ СА; UV-24 – 20 мин с УФ-С; UV+СА-24 – 0.5 мМ СА и УФ-С в течение 20 мин. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Воздействие УФ-С более 20 мин приводило к гибели листьев *V. amurensis* через 24 часа после обработки. В предварительном эксперименте было протестировано более короткое время облучения УФ-С, однако использование более короткого периода облучения не оказывало явного влияния на жизнеспособность (все листья были живыми). Поэтому листья винограда облучали УФ-С в течение 20 мин. Проведенный анализ показал, что только 33.3% листьев *V. amurensis* оставались жизнеспособными через 24 часа после облучения УФ-С в течение 20 мин, тогда как все листья были жизнеспособными в контрольных условиях без обработки УФ-С или в присутствии СА (Рисунок 5б). Примечательно, что количество жизнеспособных листьев увеличилось почти вдвое, до 83.3%, после обработки УФ-С при добавлении СА (Рисунок 5б).

В ранее опубликованных работах (Xi et al. 2015) сообщалось, что наибольшее влияние на содержание стильбенов наблюдалось через 24 часа после обработки УФ-С, поэтому содержание и состав стильбенов были проанализированы в настоящей работе через 24 часа после обработки. Обработка СА достоверно увеличивала общее содержание стильбенов в 2.4 раза (Таблица 6) за счет достоверного увеличения содержания т-пицеида (в 4.1 раза), т-ε-виниферина (в 2.6 раза), цис-пицеида (в 2.2 раза), т-резвератрола (в 1.6 раза) и т-δ-виниферина (в 1.4 раза). После воздействия УФ-С общее содержание стильбенов достоверно возрастало в 2.9 раза. Это увеличение произошло в основном за счет повышения уровня т-пицеида (в 8.7 раза), цис-ε-виниферина (в 7.7 раза), т-резвератрола (в 2.5 раза), т-ε-виниферина (в 2 раза), цис-пицеида (в 1.6 раза) и т-δ-виниферина (в 1.6 раза). Облучение УФ-С в присутствии СА оказало наиболее сильное влияние на содержание стильбенов, приведя к достоверному увеличению общего содержания стильбенов в 3.4 раза (Таблица 6). Это увеличение было обусловлено возрастанием содержания т-пицеида (в 11.1 раза), цис- и т-ε-виниферина (в 1.6 и 8.7 раза), т-резвератрола (в 3.4 раза), цис-пицеида (в 2 раза), т-δ-виниферина (в 1.5 раза). Установлено, что обработка как УФ-С, так и СА не влияла на спектр образующихся стильбенов.

Таблица 5. Содержание стильбенов в листьях, стеблях, семенах, ягодах и корнях винограда амурского *Vitis amurensis* после экстракции этанолом в течение 2 ч при 60°C (мг/г от сухого веса). Средние значения, содержащиеся одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Тип ткани	Стебель		Корни		Черешок		Листья		Листья после обработки УФ-С	Семена	Кожура ягод
	Июнь	Октябрь	Июнь	Октябрь	Июнь	Октябрь	Июнь	Октябрь			
Месяц сбора ткани	Июнь	Октябрь	Июнь	Октябрь	Июнь	Октябрь	Июнь	Октябрь	Октябрь	Октябрь	Октябрь
<i>m</i> -пицеид	0.037 ±0.006 ^{bc}	0.053 ±0.007 ^b	0.052 ±0.045 ^{bc}	0.235 ±0.050 ^a	0.007 ±0.004 ^c	0 ^d	0.024 ±0.014 ^c	0.031 ±0.006 ^{bc}	0.041 ±0.013 ^{bc}	0 ^d	0.055 ±0.012 ^b
<i>цис</i> -пицеид	0.016 ±0.011 ^d	0.022 ±0.016 ^d	0.170 ±0.021 ^{bc}	0.255 ±0.067 ^a	0 ^e	0 ^e	0.033 ±0.026 ^d	0.197 ±0.018 ^{ab}	0.257 ±0.089 ^a	0 ^e	0.127 ±0.041 ^c
<i>m</i> -резвератрол	0.319 ±0.042 ^c	0.453 ±0.066 ^c	1.553 ±1.321 ^{bc}	6.767 ±1.125 ^a	0.019 ±0.006 ^{ef}	0.024 ±0.004 ^e	0.004 ±0.003 ^g	0.018 ±0.003 ^{ef}	0.121 ±0.028 ^d	0.008 ±0.004 ^f	0.014 ±0.002 ^f
<i>цис</i> -ε-виниферин	2.402 ±1.034 ^{ab}	3.411 ±1.644 ^a	1.496 ±0.102 ^b	1.087 ±0.229 ^b	0 ^e	0.003 ±0.002 ^d	0 ^e	0.031 ±0.003 ^c	0.029 ±0.010 ^c	0 ^e	0.007 ±0.005 ^d
<i>m</i> -ε-виниферин	0.088 ±0.024 ^{ab}	0.125 ±0.055 ^a	0.052 ±0.019 ^{bc}	0.130 ±0.041 ^a	0 ^e	0.018 ±0.002 ^c	0.003 ±0.002 ^d	0.099 ±0.039 ^{ab}	0.122 ±0.025 ^a	0 ^e	0.046 ±0.005 ^b
<i>m</i> -δ-виниферин	0.094 ±0.033 ^{bc}	0.120 ±0.101 ^{ab}	0.077 ±0.076 ^{bcd}	0.380 ±0.103 ^a	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0.014 ±0.002 ^d	0.019 ±0.006 ^d	0 ^e	0 ^e
<i>m</i> -пицеатаннол	0 ^c	0 ^c	0.011 ±0.003 ^a	0.003 ±0.002 ^b	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^c
Сума стильбенов	2.956 ±1.15 ^c	4.184 ±1.791 ^{bc}	3.411 ±1.385 ^c	8.857 ±1.616 ^a	0.026 ±0.011 ^{fg}	0.045 ±0.008 ^f	0.064 ±0.041 ^f	0.390 ±0.056 ^{de}	0.589 ±0.115 ^d	0.008 ±0.004 ^g	0.249 ±0.051 ^e

Таблица 6. Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в листьях черенков винограда амурского *Vitis amurensis* после 24 ч, культивируемых в контрольных условиях (L-24), в присутствии *para*-кумаровой кислоты (CA-24) и/или ультрафиолетового облучения (УФ-С + CA-24). Средние значения, содержащиеся одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Стильбены	L-24	CA-24	УФ-24	УФ + CA-24
<i>m</i> -пицеид	0.027 ± 0.011 ^c	0.110 ± 0.049 ^b	0.234 ± 0.100 ^{a,b}	0.299 ± 0.096 ^a
<i>цис</i> -пицеид	0.061 ± 0.018 ^c	0.132 ± 0.006 ^a	0.100 ± 0.005 ^b	0.120 ± 0.009 ^a
<i>m</i> -резвератрол	0.040 ± 0.007 ^d	0.062 ± 0.005 ^c	0.101 ± 0.015 ^b	0.137 ± 0.014 ^a
<i>цис</i> -ε-виниферин	0.003 ± 0.002 ^b	0.013 ± 0.011 ^{ab}	0.023 ± 0.012 ^a	0.026 ± 0.015 ^a
<i>m</i> -ε-виниферин	0.049 ± 0.009 ^c	0.127 ± 0.004 ^a	0.096 ± 0.010 ^{ab}	0.078 ± 0.009 ^b
<i>m</i> -δ-виниферин	0.021 ± 0.002 ^b	0.030 ± 0.002 ^a	0.033 ± 0.005 ^a	0.031 ± 0.003 ^a
<i>m</i> -пицеатаннол	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Сумма стильбенов	0.201 ± 0.046 ^b	0.474 ± 0.077 ^a	0.587 ± 0.146 ^a	0.691 ± 0.146 ^a

Анализ экспрессии генов *STS* винограда *V. amurensis* показал, что обработка CA и/или УФ-С увеличивала уровень экспрессии генов *STS* как через 1 час, так и через 24 часа после начала эксперимента. Насыщение CA в сочетании с воздействием УФ-С приводило к наиболее значительной активации экспрессии генов *STS* (Kiselev et al. 2019). Таким образом, как и в случае с елью *P. jezoensis*, увеличение содержания стильбенов в листьях винограда *V. amurensis* происходило за счет активации генов биосинтеза этих веществ после обработки предшественниками фенольных соединений и воздействия УФ-С (Kiselev et al. 2019).

Накопление стильбенов в каллусах *V. amurensis*

Культуры клеток винограда являются удобными модельными системами для исследования вторичного метаболизма, поскольку экспериментальный процесс продолжается весь год и процесс получения трансгенных культур клеток проходит значительно быстрее, чем получение трансгенных растений. Поэтому основную часть экспериментальных данных по влиянию различных воздействий на содержание стильбенов было решено сделать на каллусных культурах клеток винограда *V. amurensis*. Для этих целей из молодых стеблей дикорастущих растений *V. amurensis* были получены несколько линий каллусных культур и изучены их ростовые характеристики, а также содержание стильбенов. В дальнейших исследованиях была использована каллусная культура клеток V2 как наиболее активно растущая и синтезирующая *t*-резвератрол (Kiselev et al. 2007). После 10-15 лет непрерывного культивирования ростовые характеристики V2 ухудшились, поэтому в 2017 году из стеблей *V. amurensis* была получена новая каллусная культура V7, которая оказалась по своим характеристикам схожей с ранее полученной культурой V2.

Методом ВЭЖХ показано, что в каллусной культуре клеток V2 и V7 присутствовали такие стильбены как дигликозид *t*-резвератрола, *t*-пицеид, *t*-резвератрол, *t*-ε-виниферин, *t*-δ-виниферин (Рисунок 7). Таким образом, количество индивидуальных стильбенов, детектированных в каллусах винограда *V. amurensis*, было меньше, чем в листьях дикорастущего *V. amurensis*. В каллусах не были обнаружены *цис*-пицеид, *цис*-ε-виниферин и *t*-пицеатаннол, однако в то же время присутствовал дигликозид *t*-резвератрола, который был характерен только для каллусов винограда. Важно отметить, что содержание стильбенов в культурах клеток V2 и V7 анализировали постоянно, начиная с 2007 года. Общее содержание стильбенов в культурах клеток V2 и V7 варьировало от 0.2 до 0.3 мг/г сухой биомассы, а содержание резвератрола – от 0.02 до 0.07 мг/г сухой биомассы. Для сравнения данных, полученных при добавлении различных индукторов биосинтеза стильбенов и других эффекторов, было проанализировано среднее значение

содержания стильбенов в культурах клеток V2 и V7 в разных экспериментах на протяжении 20 лет исследований. Общее содержание стильбенов составило 0.3 ± 0.1 мг/г сухой биомассы и среднее содержание т-резвератрола составило 0.04 ± 0.2 мг/г сухой биомассы (Таблица 7).

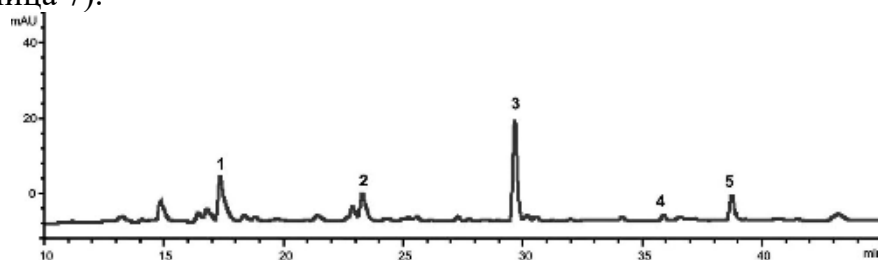


Рисунок 6. Хроматографический профиль ВЭЖХ для экстрактов каллусной культуры клеток винограда *Vitis amurensis* V7, зарегистрированный при 310 нм. Клетки высушивали на 35-й день культивирования. Дигликозид т-резвератрола (1), т-пицеид (2), т-резвератрол (3), т-ε-виниферин (4), т-δ-виниферин (5).

Используя каллусную культуру клеток V2, а в поздних работах культуру клеток V7 (с 2017 года), были проведены многочисленные эксперименты с привлечением веществ различной природы. В питательные среды добавляли различные фитогормоны, ингибиторы и активаторы кальциевых каналов, предшественники фенольных соединений, деметилирующие агенты и др. Кроме того, каллусы обрабатывали УФ-С, который является известным сильным индуктором биосинтеза вторичных метаболитов растений, в том числе стильбенов (Dubrovina and Kiselev, 2017). Эти эксперименты помогли разобраться в базовых особенностях биосинтеза стильбенов в винограде. Все полученные результаты суммированы в виде Таблиц 7 и 8. Салициловую кислоту (SA) причисляют к стрессовым фитогормонам растений. Это хорошо известный индуктор продукции многих защитных вторичных метаболитов в растении (Zhao et al. 2005). Известно, что при воздействии SA на клетки растений активируется синтез PR (Pathogen-Related) белков различных классов, в том числе синтез фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), важного фермента в синтезе большинства растительных фенольных соединений. При добавлении SA в питательные среды общая продукция т-резвератрола культурой V7 достоверно возросла в 2.6–3 раза (Таблица 7). Также значительно возрастало общее содержание стильбенов в 4.3–4.7 раза, до 1.4 мг/г сухой биомассы (Таблица 7).

Жасмоновую кислоту (JA) и ее более активное производное, метилжасмонат (MeJA), также причисляют к стрессовым фитогормонам (Yu et al. 2018). Эти вещества действуют как регуляторы защитного ответа растений, участвуя в функционировании липоксигеназной системы. MeJA достоверно повысил содержание т-резвератрола в клетках V7 в 2.2 раза, а общее содержание стильбенов увеличивалось в 4.3–8 раз (Таблица 7). Добавление деметилирующего агента (5A) в питательные среды вызвало небольшое дозозависимое увеличение содержания т-резвератрола (Таблица 7), что сопровождалось увеличением экспрессии некоторых генов *STS*, например, *VaSTS10* (Tyunin et al. 2012). Более того, увеличение содержания стильбенов под действием стимуляторов биосинтеза вторичных метаболитов, сопровождалось уменьшением метилирования генов *STS* (Tyunin, Kiselev, 2016). Это говорит о том, что в норме биосинтез стильбенов жестко сдерживается метилированием ДНК и его прямое снятие с помощью деметилирующих агентов или через использование активаторов биосинтеза вторичных метаболитов в итоге приводит к увеличению биосинтеза стильбенов.

Наиболее близким предшественником т-резвератрола является пара-кумаровая кислота (СА), поэтому мы добавляли это вещество в питательные среды, чтобы оценить стимулирующее действие этого предшественника на содержание стильбенов. Добавление СА достоверно увеличивало содержание т-резвератрола в 3–4 раза, при этом общее содержание стильбенов возрастало в 4–4.3 раза (Таблица 7). Известно, что обработка УФ-С является наиболее сильным внешним воздействием, активирующим биосинтез стильбенов в растении. В нашем случае УФ-С достоверно увеличивал содержание т-резвератрола: в 2.8–3 раза, по сравнению с необработанными контрольными клетками. Более того, с помощью УФ-С было получено одно из самых высоких значений содержания стильбенов в нетрансгенных каллусных клетках винограда, которое доходило до 2.6 мг/г сухой биомассы (Таблица 7).

Интересные данные были получены при использовании ионофора кальция А23187 и ингибитора кальций-зависимых протеинкиназ растений N-(6-аминогексил)-5-хлоро-1-нафталинсульфонамид (W7). W7 активировал содержание т-резвератрола в 2.5 раза до 0.1 мг/г сухой биомассы, но большее увеличение содержания т-резвератрола было достигнуто при использовании А23187. В результате применения ионофора содержание т-резвератрола достигало 0.28–0.39 мг/г сухой биомассы, что было одним из самых высоких значений для нетрансгенных каллусных культур винограда амурского (Таблица 7). Данные, представленные в Таблице 7 позволили перейти к анализу участия кальциевых сенсоров в регуляции биосинтеза стильбенов, что подробно будет детально рассмотрено в последующих главах.

Таблица 7. Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после добавления в питательные среды различных веществ. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$). А23187 – ионофор кальция; СА – пара-кумаровая кислота; MeJa – метилжасмонат; SA – салициловая кислота; W7 – N-(6-аминогексил)-5-хлоро-1-нафталинсульфонамид; УФ-С – ультрафиолет С; 5А – деметилирующий агент 5-азацитидин; LaCl₃ – общий ингибитор Ca²⁺-каналов хлорид лантана; Ver – верапамил, ингибитор Ca²⁺-каналов плазматической мембраны L-типа; NA – нифлумовая кислота, ингибитор внутренних Ca²⁺-каналов; Рао – фениларсиноксид, ингибитор Тур-фосфата; Van – ортованадат натрия, ингибитор фосфатаз; н.и. – не измерялось; эксп. – экспрессия гена.

Воздействие	Сумма стильбенов	Содержание т-резвератрола	Ссылки
Культура клеток V2, V7	0.3 ± 0.1 ^c	0.04 ± 0.02 ^e	Kiselev et al. 2013; Kiselev et al. 2021
Культура клеток КА-0	н.и.	0.04 ± 0.02 ^e	Kiselev et al. 2021
Культура клеток VV	н.и.	0.03 ± 0.02 ^e	Aleynova et al. 2016
V2 + W7, 0.1 mM	н.и.	0.10 ± 0.02 ^{cd}	Kiselev et al. 2013
V2 + A23187, 1 μM	н.и.	0.39 ± 0.05 ^a	Kiselev et al. 2012
V2 + A23187, 10 μM	н.и.	0.28 ± 0.04 ^{ab}	Kiselev et al. 2012
V7 + СА, 0.1 mM	1.2 ± 0.38 ^b	0.12 ± 0.06 ^{cd}	Kiselev et al. 2021
V7 + СА, 0.5 mM	1.3 ± 0.12 ^b	0.16 ± 0.04 ^{bc}	Kiselev et al. 2021
V7 + MeJa, 50 μM	1.3 ± 0.13 ^b	0.11 ± 0.04 ^{cd}	Kiselev et al. 2021
V7 + MeJa, 200 μM	2.4 ± 0.78 ^{ab}	0.11 ± 0.04 ^{cd}	Kiselev et al. 2021
V7 + SA, 50 μM	1.3 ± 0.18 ^{cd}	0.13 ± 0.03 ^{cd}	Kiselev et al. 2021
V7 + SA, 200 μM	1.4 ± 0.11 ^b	0.15 ± 0.03 ^{bc}	Kiselev et al. 2021
V7 + 1 ч после УФ-С	1.1 ± 0.48 ^{bc}	0.11 ± 0.04 ^{cd}	Kiselev et al. 2021
V7 + 24 ч после УФ-С	2.6 ± 0.55 ^a	0.12 ± 0.06 ^{cd}	Kiselev et al. 2021

V2 + CA (0.1 мМ) + W7	н.и.	0.01 ±0.01 ^d	Kiselev et al. 2013
V2 + SA (0.1 мМ) + W7	н.и.	0.03 ±0.01 ^d	Kiselev et al. 2013
V2 + 5A, 0.05 мМ	н.и.	0.06 ±0.02 ^{cd}	Tyunin et al. 2012
V2 + 5A, 0.1 мМ	н.и.	0.09 ±0.02 ^{cd}	Tyunin et al. 2012
VB1, слабая эксп. гена <i>rolB</i>	н.и.	0.06 ±0.02 ^e	Kiselev et al. 2007
VB2, сильная эксп. гена <i>rolB</i>	н.и.	31.48 ±3.01 ^a	Kiselev et al. 2007
Клетки VB2 с добавлением LaCl ₃ , 1 мМ		5.23 ±2.11 ^{bc}	Dubrovina et al. 2009
Клетки VB2 с добавлением Ver, 0.5 мМ	н.и.	5.31 ±1.87 ^{bc}	Dubrovina et al. 2009
Клетки VB2 с добавлением Ver, 1 мМ	н.и.	1.12 ±0.33 ^d	Dubrovina et al. 2009
Клетки VB2 с добавлением NA, 50 μМ	н.и.	4.76 ±1.15 ^c	Dubrovina et al. 2009
Клетки VB2 с добавлением Рао, 5 μМ	н.и.	3.34 ±0.95 ^{cd}	Kiselev et al. 2007
Клетки VB2 с добавлением Van, 0.1 мМ	н.и.	10.17 ±2.03 ^b	Kiselev et al. 2007
VC1, слабая эксп. гена <i>rolC</i>	н.и.	0.99 ±0.01 ^d	Dubrovina et al. 2010
VCE, сильная эксп. гена <i>rolC</i>	н.и.	1.44 ±0.08 ^d	Dubrovina et al. 2010

Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих гены *rol* из агробактерий

Методика получения трансгенных культур клеток и растений с помощью агробактерий широко используется в молекулярной биологии и биотехнологии для изучения функций генов и получения альтернативных источников биологически активных веществ. Этот подход нацелен на увеличение количества транскриптов изучаемого гена или внесение новых транскриптов в клетки растений. В англоязычной литературе для данного подхода используется термин «overexpression» или сверхэкспрессия изучаемого гена.

Недостатками метода изучения свойств генов с помощью сверхэкспрессия изучаемого гена является то, что процедура агробактериальной трансформации может приводить к некоторым изменениям в биосинтезе вторичных метаболитов, поэтому важно соблюдать несколько правил. Во-первых, на каждый ген необходимо независимо получить минимум 3 трансгенные линии клеток, чтобы избежать влияния инсерционного мутагенеза на вторичный метаболизм растений (Tzfira et al. 2004). Во-вторых, необходимо получить трансгенную линию, трансформированную «пустым» вектором, в котором будет сверхэкспрессироваться только ген селективного маркера без исследуемого гена, чтобы исключить тем самым влияние инкубации с агробактериями и селекции клеток растения на селективном антибиотике на биосинтез вторичных метаболитов. Поэтому в 2003 году была получена контрольная векторная культура клеток VV, а в 2018 новая контрольная клеточная линия КА-0. Культуры клеток VV и КА-0 были трансформированы «пустым» агробактериальным вектором. Ростовые и биосинтетические показатели клеточных линий VV и КА-0 были схожими с показателями нетрансгенных культур клеток V2 и V7, поэтому культуры клеток VV и КА-0 далее были использованы в качестве контрольных.

Для исследования регуляции биосинтеза стильбенов в работе были использованы гены *rolB* и *rolC* из агробактерий *A. rhizogenes*. Гены *rolB* и *rolC* из агробактерий были выбраны, так как ранее было показано, что трансформация клеток растений этими генами приводит к существенному увеличению содержания вторичных метаболитов широкого спектра в различных видах растений (Павлова и др. 2013).

Данные ВЭЖХ показали, что содержание т-резвератрола в культуре клеток VB2, активно экспрессирующей ген *rolB*, значительно увеличилось более чем в 700 раз (Таблица 7). Важно отметить, что содержание т-резвератрола в клетках VB2 достигало 31.5 мг/г сухой биомассы, что является одним из самых высоких значений т-резвератрола, полученных для культур клеток растений и известных растительных источников. Увеличивалось содержание т-резвератрола и при трансформации клеток винограда геном *rolC*, в 25-36 раз (Таблица 7).

Культуру клеток VB2 использовали в качестве модельного объекта для исследования полученного феномена сверхпродукции т-резвератрола. Для этого сначала было решено изучить роль кальциевой сигнальной системы в активации биосинтеза стильбенов в культуре клеток VB2. В питательные среды добавляли ингибиторы Ca^{2+} -каналов, включая общий ингибитор Ca^{2+} -каналов хлорид лантана (LaCl_3) (Knight et al. 1992), ингибитор Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны L-типа верапамил (Ver) (Pineros, Tester, 1997), а также ингибитор внутренних Ca^{2+} -каналов нифлумовую кислоту (NA) (Cessna, Low, 2001). Ингибиторы Ca^{2+} -каналов показали, что феномен сверхпродукции т-резвератрола в клетках VB2 зависит от активности кальциевых каналов всех основных типов, поскольку содержание т-резвератрола в клетках VB2 значительно уменьшалось при добавлении LaCl_3 , Ver и NA в питательные среды (Таблица 7).

Известно, что фосфорилирование и дефосфорилирование белков является важным регулятором различных биологических процессов в сигнальных системах живых организмов (Zhao et al. 2005), поэтому далее изучали влияние ингибиторов фосфатаз и киназ на сверхпродукцию т-резвератрола в клетках VB2. Исследовали влияние ингибитора Тур-фосфатаз фениларсиноксида (Pao) (Reyes et al. 2006) и общего ингибитора фосфатаз ортованадата натрия (Van) (Giacometti et al. 2004) на аккумуляцию т-резвератрола в культуре клеток *V. amurensis* VB2. Стимулирующий эффект трансформации геном *rolB* на продукцию резвератрола достоверно снижался в присутствии ингибиторов фосфатаз в 3.1–9.4 раза (Таблица 7).

Установлено, что эффект сверхпродукции т-резвератрола в клетках VB2 продержался в течение трех лет, после чего содержание т-резвератрола постепенно снижалось до уровня контрольной клеточной линии VV (Dubrovina and Kiselev, 2012). Поэтому мы использовали культуру клеток V2, выращенную на среде с добавлением индукторов биосинтеза резвератрола, которые ранее показывали достоверное увеличение (SA, CA). При одновременном добавлении индукторов биосинтеза стильбенов и ингибитора киназ W7 не наблюдалось характерного увеличения содержания т-резвератрола (Таблица 7).

Экспрессия генов кальциевых сенсоров растений в винограде *V. amurensis* после увеличения содержания стильбенов

Для растений характерно наличие кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK или CPK), кальмодулинов (CaM), кальмодулин-подобных белков (CML), кальций и кальмодулин-зависимых протеинкиназы (CCaMK), кальцийнейрин-B-подобных белков (CBL) и взаимодействующих с ними киназ (CIPK) (Hashimoto, Kudla, 2011), которые участвуют в регуляции многих физиологических процессов, в том числе и биосинтезе вторичных метаболитов (Harmon et al. 2001). Поэтому дальнейшим этапом работы стал детальный анализ экспрессии генов *CPK*, *CaM*, *CML*, *CCaMK*, *CBL* и *CIPK* в клеточных линиях винограда *V. amurensis* с высоким содержанием стильбенов.

Среди кальциевых сенсоров первоначально мы изучили экспрессию генов *CDPK* в культурах клеток VB1 и VB2, отличающихся высоким содержанием т-резвератрола. Важно отметить, что на 2006-2007 год было известно 14 генов *CDPK* винограда, поэтому в культурах клеток VB1 и VB2 мы исследовали транскрипцию 14 из 20 известных генов *CDPK* винограда (Zhang et al. 2015). С помощью ПЦР РВ было показано, что трансформация геном *rolB* и дальнейшая активация содержания стильбенов сопровождалась достоверным сильным увеличением транскрипции гена *VaCDPK20* (Рисунок 7). Также достоверно возрастала транскрипция генов *VaCPK1*, *VaCPK9* и *VaCPK26*, но в меньшей степени, чем увеличение транскрипция гена *VaCDPK20*. Важно

отметить, что при этом экспрессия гена *VaCPK3a* достоверно снижалась в культуре клеток VB1 и VB2 (Рисунок 7).

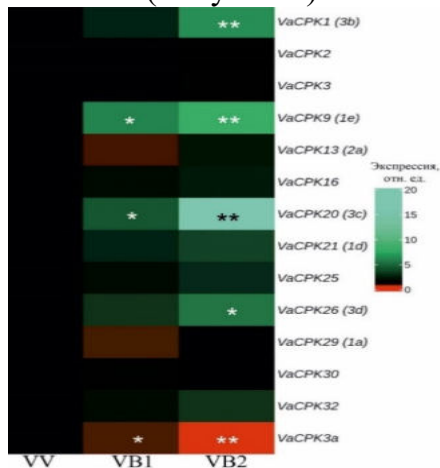


Рисунок 7. Тепловая карта уровней экспрессии генов *VaCPK* в клеточных культурах винограда *Vitis amurensis* с низким содержанием стильбенов (культура клеток VV) и с высоким содержанием стильбенов (культуры клеток VB1 и VB2). Уровни транскриптов *VaCPK* определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР. Цветовая шкала отражает увеличение (зеленый) и уменьшение (красный) значений экспрессии по сравнению со значением в контрольной культуре клеток VV с низким содержанием стильбенов.

*, ** – достоверно отличаются от значений экспрессии *VaCPK* в клетках *V. amurensis* в культурах VB1 и VB2, по сравнению с культурой клеток VV при $p \leq 0.05$ и 0.01 по t-критерию Стьюдента.

В геноме винограда описано 3 гена *CaM*: *VaCaM8*, 9 и 10 (Dubrovina et al. 2019). Полученные данные показали, что уровни транскрипта *VaCaM8* в листьях и клеточных культурах снижались после обработки SA, MeJA и CA (Рисунок 8а). Экспрессия *VaCaM8* значительно повышалась только после обработки SA (200 мкМ) в культивируемых клетках и через 1 ч после УФ-облучения листьев, и никакого эффекта не наблюдалось при других обработках, концентрациях или временных интервалах (Рисунок 8а). Используемые условия не оказали влияния на экспрессию гена *VaCaM9*. Только обработка листьев SA (50 мкМ) и УФ-С-облучение (24 часа) повышали экспрессию гена *VaCaM9*, но это повышение не было подтверждено при других концентрациях или временных точках. В целом, экспрессия *VaCaM10* незначительно реагировала на обработку SA, MeJA или CA. Только УФ-излучение значительно повышало экспрессию *VaCaM10* в клеточных культурах и листьях (в 1.6–2.5 раза; Рисунок 8с).

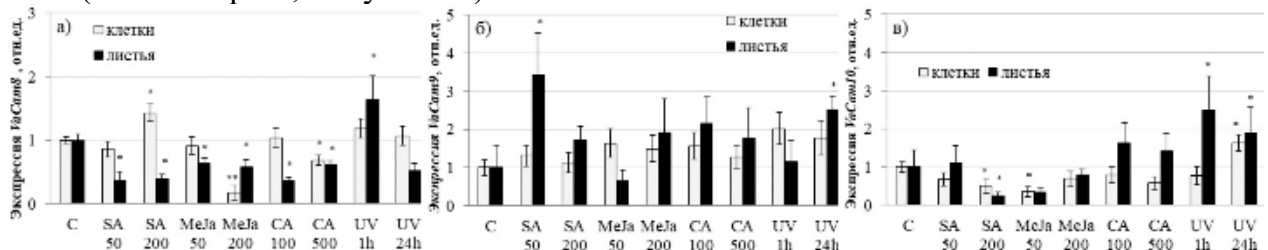


Рисунок 8. Экспрессия генов *VaCaM8* (а), *VaCaM9* (б) и *VaCaM10* (с). С – контрольные условия (для листьев – 24 часа в фильтрованной воде при температуре 25°C; для клеточных культур – 35 дней роста в среде WB/A); SA 50 – с 50 мкМ салициловой кислоты; SA 200 – с 200 мкМ салициловой кислоты; MeJA 50 – с 50 мкМ метилжасмоновой кислоты; MeJA 200 – с 200 мкМ метилжасмоновой кислоты; CA 100 – с 100 мкМ р-кумаровой кислоты; CA 500 – с 500 мкМ р-кумаровой кислоты; UV 1 h – 1 ч ультрафиолетового облучения С; UV 24 h – 24 ч ультрафиолетового облучения С. *, ** – достоверно отличаются от значений экспрессии *VaCaM* в листьях и клетках *V. amurensis* по сравнению с контрольными условиями, $p \leq 0.05$ и 0.01 по t-критерию Стьюдента.

Затем мы проанализировали уровни транскрипции 54 генов *VaCML* в ответ на SA, MeJA, CA и UV-С (Рисунок 9). В этом анализе мы сосредоточились в первую очередь на

генах, экспрессия которых повышалась как во временные моменты (для UV-C), так и в концентрациях (для SA, MeJA, SA). Кроме того, особое внимание было уделено генам, экспрессия которых повышалась как в клеточных культурах винограда, так и в листьях лиан винограда. Используя полную кластеризацию связей с использованием метода измерения расстояния по Манхэттену, мы показали, что все гены *VaCML* разделены на две группы: 19 генов (*VaCML9a, 9b, 21, 41a, 44, 51, 52, 53, 54, 55, 57, 62, 65, 76, 79, 82, 83, 93, 95*) и 31 ген (*VaCML1, 22, 41b, 48, 60, 61, 66, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78, 80, 81, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90/91, 92, 94, 105, 106, 107, 108, 109, 110*). Следует отметить, что в первой группе больше генов, поскольку уровни экспрессии *VaCML95, 96, 100, 103* и *104* были проанализированы вместе с использованием одной пары праймеров из-за высокой идентичности соответствующих нуклеотидных последовательностей.

Экспрессия 19 генов *VaCML* из первой группы увеличилась в большинстве изученных образцов (Рисунок 9). Следовательно, эти гены представляют наибольший интерес для дальнейших генетических исследований. Экспрессия остальных 31 генов *VaCML* снизилась в большинстве образцов (Рисунок 9). Кроме того, кластерный анализ показал, что все обработки были разделены на две группы: (1) данные, полученные из культуры клеток V7, и (2) данные, полученные из листьев *V. amurensis*. В этих группах данные по экспрессии, полученные после УФ-обработки, в наибольшей степени отличались от данных по экспрессии для контрольных V7 и листьев, поскольку количество генов, экспрессия которых сильно изменилась, было самым высоким.

Ультрафиолетовое облучение было наиболее мощным индуктором экспрессии *VaCML*, что привело к заметному повышению уровня транскриптов *VaCML* в 1.2-30.1 раза по сравнению с необработанными контрольными образцами. УФ-C повышал экспрессию *VaCML9a, 51, 52, 55, 76, 82, 90/91, 93* и *95* в культуре клеток V7 (Рисунок 9) и экспрессию *VaCML48, 55, 65, 83* в виноградных черенках во всех пробах. Интересно, что *VaCML22, 48* и *107* экспрессировались на значительно более низких уровнях после УФ-облучения в культивируемых клетках в оба момента времени (Рисунок 9). Мы обнаружили, что обработка УФ-C оказала наибольшее положительное влияние на экспрессию *VaCML* по сравнению с обработкой MeJA, SA и SA, возможно потому, что стильбены участвуют в защите растений от УФ-излучения (Dubrovina, Kiselev, 2017).

Культивирование винограда с MeJA сильно активировало (в 1.2-6.2 раза увеличивало) экспрессию *VaCML9a, 9b, 51, 54, 57, 76, 93, 95* в культуре клеток V7 и экспрессия *VaCML44, 51, 65, 94* только в листьях винограда при всех используемых концентрациях. Экспрессия *VaCML41b, 84* и *VaCML41b, 73, 106* значительно снизилась после обработки MeJA в культуре клеток винограда V7 и листьях (Рисунок 10). Затем мы проанализировали экспрессию *VaCML* в ответ на SA, который был более слабым индуктором экспрессии гена *VaCML* по сравнению с воздействием UV-C или MeJA. Мы обнаружили, что экспрессия генов *VaCML9a, 51, 52, 54, 55* и *82* повышалась при всех тестируемых концентрациях SA в культуре клеток V7, а генов *VaCML21, 54, 65* и *66* – в листьях (Рисунок 9). Кроме того, экспрессия *VaCML92* и *VaCML48* значительно снизилась после обработки SA в культуре клеток винограда V7 и листьях соответственно (Рисунок 9).

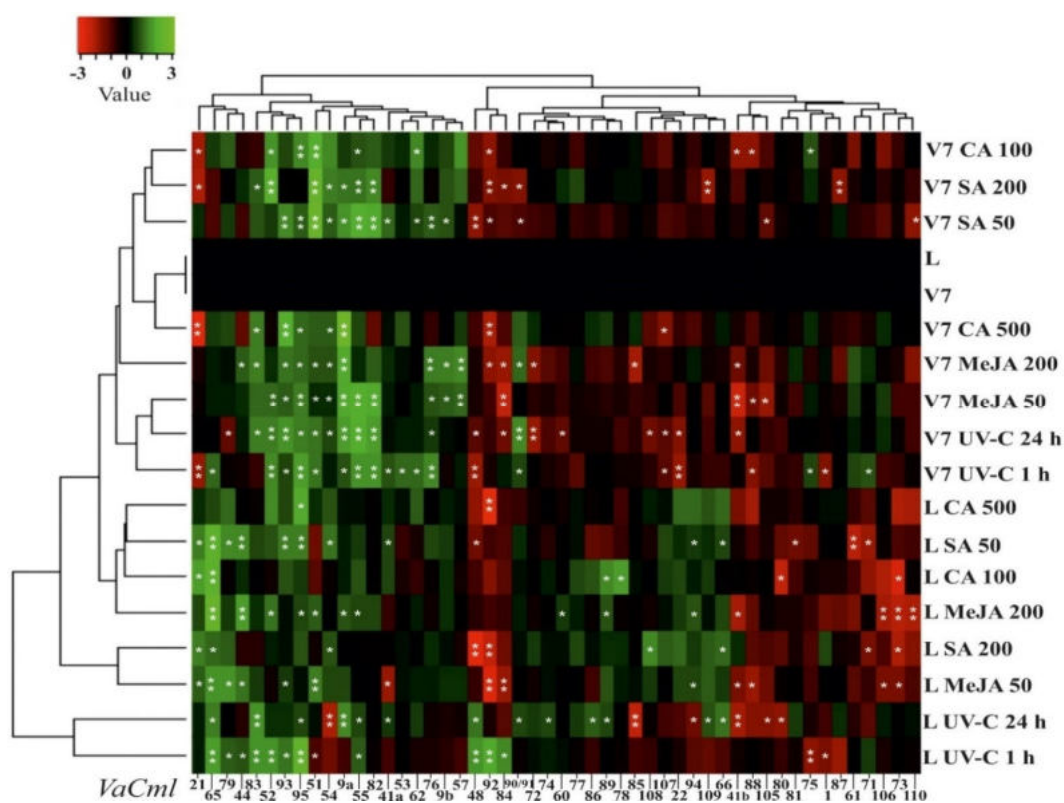


Рисунок 9. Тепловая карта уровней экспрессии *VaCml* после ультрафиолетового облучения (UV-C) в культуре клеток *Vitis amurensis* V7 и черенках, которая построена на основе данных количественной ОТ-ПЦР. Цветовая шкала отражает увеличение (зеленый) и уменьшение (красный) значений экспрессии по сравнению с контролем (V7, L). V7 и L – клетки и листья *V. amurensis* в контрольных условиях без облучения; UV-C 1 ч - клетки и листья *V. amurensis* после 1 ч УФ-облучения; UV-C 24 ч - клетки и листья *V. amurensis* после 24 ч УФ-облучения; SA 50 – с 50 мкМ салициловой кислоты; SA 200 – с 200 мкМ салициловой кислоты; MeJA 50 – с 50 мкМ метилжасмоновой кислоты; MeJA 200 – с 200 мкМ метилжасмоновой кислоты; CA 100 – со 100 мкМ р-кумаровой кислоты; CA 0.5 – с 500 мкМ пара-кумаровой кислоты. *, ** – достоверно отличаются от значений экспрессии *VaCml* в клетках и листьях *V. amurensis* в контрольных условиях по сравнению с экспрессией в клетках и листьях *V. amurensis* через 1 ч или 24 ч облучения при $p \leq 0.05$ и 0.01 согласно t-критерию Стьюдента.

Ранее были описаны восемь генов *CBL* на основе хорошо известного генома культивируемой виноградной лозы *V. vinifera* (Xi et al. 2017). Однако в генном банке NCBI два транскрипта связаны с геном *CBL4 V. vinifera*, четыре транскрипта – с геном *CBL10a* и два транскрипта - с геном *CBL13*. Эти транскрипты отличались по 3'-концу кодирующей области CBL и включали модификации последнего экзона (Kiselev et al. 2023), которые напоминали вариации, связанные со сплайсингом. Специфические праймеры были разработаны для всех транскриптов *CBL*, найденных в базе данных NCBI (Kiselev et al. 2023). Таким образом, мы проанализировали уровни экспрессии 13 вариантов транскриптов *VaCBL* генов (Рисунок 10). ПЦР РВ анализ показал, что уровень транскрипта *VaCBL4-1* значительно повышался во все периоды времени после обработки УФ-С как в культуре клеток V7, так и в листьях виноградной лозы (Рисунок 10а,б). Уровни транскриптов *VaCBL5*, *10a-3* и *13-1* также значительно повышались при обеих дозах SA (*VaCBL10a-3*) и MeJA (*VaCBL5*, *10a-3*, *13-1*), но это повышение было обнаружено только в клеточных культурах. Уровни других вариантов транскрипта *VaCBL* существенно не

изменились после обработки культур клеток виноградной лианы *V. amurensis* SA, MeJA, CA и UV-C (Рисунок 10). В отличие от клеточных культур, обработка черенков виноградной лианы *V. amurensis* привела к значительному снижению уровней большинства транскриптов *VaCBL* (Рисунок 10б). Кроме того, экспрессия транскриптов *VaCBL10a-1*, *10b* и *13-3* увеличилась в некоторых отдельных пробах (Рисунок 10).

Возможно, что *VaCBL4-1* участвует в биосинтезе стилибенов в виноградной лозе в качестве положительного регулятора реакции на ультрафиолетовое облучение. Транскрипты *VaCBL10a-1*, *10b*, *13-3*, *5*, *10a-3* и *13-1* также могут оказывать небольшое положительное влияние на биосинтез стилибенов, поскольку их экспрессия увеличивалась только при одной дозе используемых индукторов (Рисунок 10).

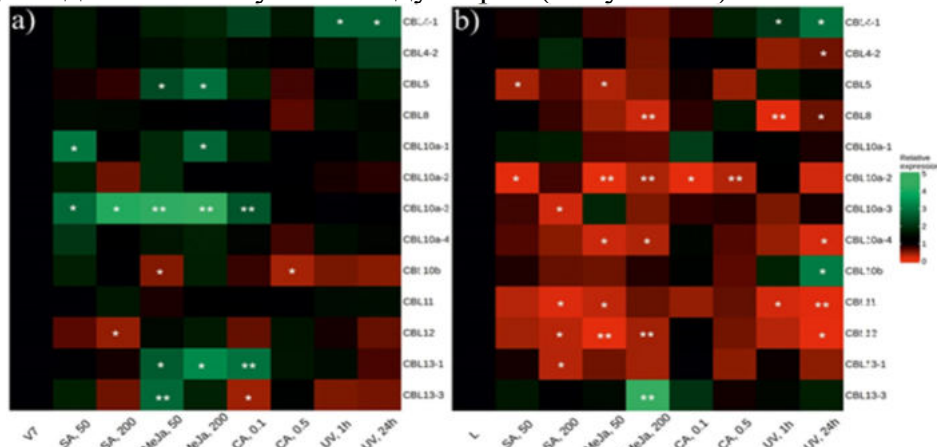


Рисунок 10. Тепловая карта уровней экспрессии *VaCBL* у винограда *Vitis amurensis* после обработки салициловой кислотой (SA), метилжасмонатом (MeJA), пара-кумаровой кислотой (CA) и ультрафиолетовым облучением (UV-C). (а) культура калусных клеток *V. amurensis* V7; (б) листья лиан *V. amurensis*. Уровни транскриптов *VaCBL* определяли с помощью количественной ПЦР РВ. Цветовая шкала отражает увеличение (зеленый) и уменьшение (красный) значений экспрессии при обработке SA, MeJA, CA и UV-C по сравнению с контролем. V7 и L – контрольные необработанные условия (для культур клеток V7 35 дней роста в среде WB/A; для листьев – 24 часа в фильтрованной воде при 25°C); SA 50 и SA 200 – с добавлением 50 и 200 мкм SA; MeJA 50 и MeJA 200 – с добавлением 50 и 200 мкм SA. 200 мкм MeJA; CA 0.1 и 0.5 – с добавлением 100 и 500 мкм SA; УФ–1 ч и 24 ч - через 1 ч или 24 ч после УФ-С-облучения. *, ** – достоверно отличаются от значений экспрессии *VaCBL* в клетках *V. amurensis* в контрольных условиях (V7 или L) при $p \leq 0.05$ и 0.01 по t-критерию Стьюдента.

Затем мы проанализировали уровни транскрипции генов *VaCIPK* в ответ на SA, MeJA, CA и UV-C (Рисунок 11). Ранее для винограда было описано 20 генов *CIPK* на основе хорошо известного генома культивируемой виноградной лозы *V. vinifera* (Xi et al. 2017). Однако в генбанке NCBI два транскрипта связаны с геном *CIPK9* у *V. vinifera*, два транскрипта – с геном *CIPK21* и шесть транскриптов – с геном *CIPK41*. Эти транскрипты отличаются 3'-концом кодирующей области CBL и включают модификации последнего экзона (Kiselev et al. 2023). Специфические праймеры были разработаны для всех транскриптов *CBL*, найденных в базе данных NCBI. Таким образом, мы проанализировали уровни 27 разных транскриптов генов *VaCIPK* (Рисунок 11).

Аналогично *VaCBL*, уровни транскриптов большинства *VaCIPK* значительно снизились после применения SA, MeJA, CA и UV-C (Рисунок 11), что было ожидаемо из-за известного взаимодействия CBL-CIPK. Следовательно, список генов-сенсоров кальция,

негативно регулирующих накопление стилибена, также включает *VaCIPK3*, 9-1, 9-2, 12, 21-1, 21-2, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41-3 и 41-4. Однако было обнаружено несколько *VaCIPK* со значительно повышенными уровнями транскриптов в ответ на применение SA, MeJA, CA и UV-C, включая *VaCIPK31*, 41-1 и 41-2 (Рисунок 11а). Следовательно, *VaCIPK31* (повышенный после обработки MeJA), *VaCIPK41-1* (повышенный после MeJA) и *VaCIPK41-2* (повышенный после CA) могут играть роль в активации накопления стилибенов в ответ на MeJA и CA. Кроме того, мы обнаружили активацию уровней транскриптов *VaCIPK29*, 32, 38, 41-5 и 41-6 после применения только одной дозы препаратов CA, SA, UV-C и MeJA в культурах клеток и листьях винограда (Рисунок 11).

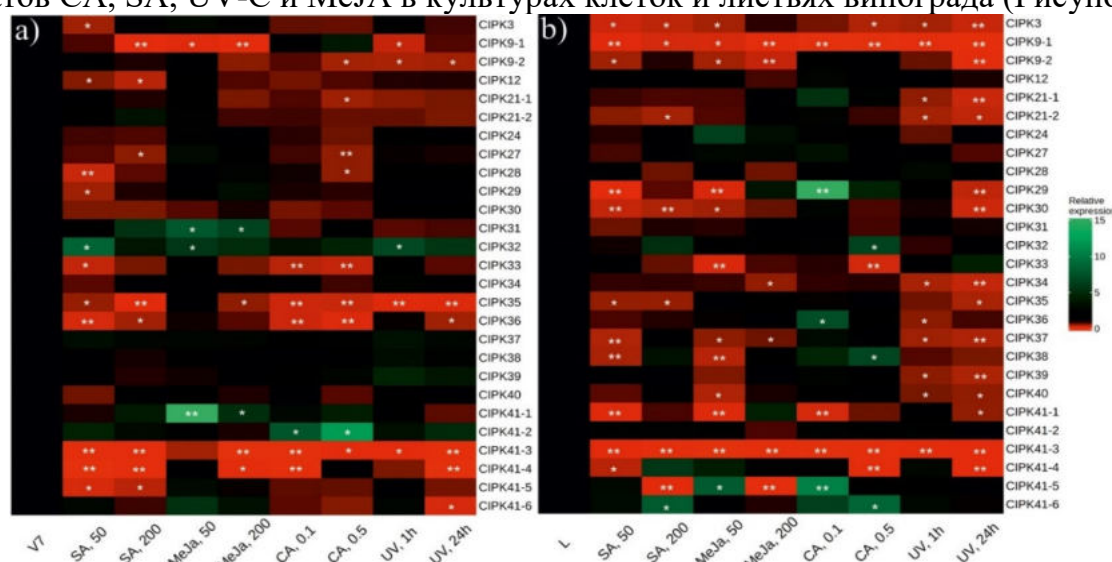


Рисунок 11. Тепловая карта уровней экспрессии *VaCIPK* у винограда *Vitis amurensis* после добавления салициловой кислоты (SA), метилжасмоната (MeJA), пара-кумаровой кислоты (CA) и обработки ультрафиолетовым облучением (UV-C). (а) культура каллусных клеток *V. amurensis* V7; (б) листья *V. amurensis*. Уровни транскрипта *VaCIPK* определяли с помощью количественной ПЦР РВ. Цветовая шкала отражает увеличение (зеленый) и уменьшение (красный) значений экспрессии при обработке SA, MeJA, CA и UV-C по сравнению с контролем. V7 и L – контрольные необработанные условия (для культур клеток V7 35 дней роста в среде WB/A; для листьев – 24 часа в фильтрованной воде при 25°C); SA 50 и SA 200 – с добавлением 50 и 200 мкм SA; MeJA 50 и MeJA 200 – с добавлением 50 и 200 мкм SA. 200 мкм MeJA; CA 0.1 и 0.5 – с добавлением 100 и 500 мкм CA; УФ–1 ч и 24 ч - через 1 ч или 24 ч после УФ-С-облучения. *, ** – достоверно отличаются от значений экспрессии *VaCIPK* в клетках *V. amurensis* в контрольных условиях (V7 или L) при $p \leq 0.05$ и 0.01 по t-критерию Стьюдента.

Далее мы посмотрели экспрессию последнего из известных семейств кальциевых сенсоров: кальций и кальмодулин-зависимых протеинкиназ (*CCaMK*). В винограде это семейство представлено всего одним геном *VvCCaMK* (VIT_213s0047g00260.1). Далее на основе известной последовательности *VvCCaMK* мы подобрали праймеры на начало и конец белок кодирующей последовательности, получили последовательность гена *VaCCaMK* из винограда амурского *V. amurensis* и подобрали специфические праймеры для изучения транскрипции этого гена с помощью ПЦР РВ в культурах клеток винограда *V. amurensis* при добавлении в питательные среды индукторов биосинтеза стилибенов. Было показано, что экспрессия гена *VaCCaMK* существенно не изменялась в культурах клеток винограда при добавлении в питательные среды SA, MeJA, CA и после обработки

UV-C. Поэтому первичные данные по экспрессии гена *VaCCaMK* говорят о том, что он не вовлечен в активную регуляцию биосинтеза стильбенов.

Таким образом, нами проанализирована экспрессия всех известных семейств генов кальциевых сенсоров растений. Было показано, что экспрессия некоторых генов значительно возрастала при увеличении содержания стильбенов, поэтому дальнейшим стало доказательство участия этих генов в биосинтезе стильбенов с помощью их сверхэкспрессии в клетках винограда с низким содержанием стильбенов.

Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах винограда амурского *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих гены кальциевых сенсоров растений и транскрипционных факторов

Эксперименты по влиянию ингибиторов/активаторов кальциевых каналов, экспрессии кальциевых сенсоров, а также ингибиторов фосфотаз и киназ, на продукцию т-резвератрола показали, что работа кальциевой сигнальной системы и процессы фосфорилирования/дефосфорилирования белков являются важными регуляторами биосинтеза стильбенов. Более того, ранее было показано, что экспрессия генов некоторых СРК винограда многократно возрастала в культурах клеток с высоким содержанием стильбенов (Dubrovina et al. 2009). Поэтому далее решено было проверить влияние сверхэкспрессии генов СРК на накопление стильбенов в клетках винограда (Таблица 9).

Установлено, что сверхэкспрессия нескольких разных генов *CDPK* (*VaCPK1*, 16, 20, 26, 29 и 32) увеличивала биосинтез т-резвератрола и других стильбенов, но самым ярким положительным влиянием на содержание т-резвератрола обладала сверхэкспрессия гена *VaCPK20* до 0.6–4.2 мг/г сухой биомассы, что в десятки раз больше, чем содержание в контрольных клетках (Таблица 8). Сравнение выведенной аминокислотной последовательности *VaCPK20* с СРК *A. thaliana* выявило наибольшую гомологию с *AtCPK1* (81% положительных результатов, Изоформа АК1, регистрационный номер ГенБанк NM_120569, L14771), *AtCPK2* (83% идентичности, ГенБанк NM_111902) и *AtCPK20* (84% идентичности, ГенБанк NM_129449). Фермент PAL был идентифицирован как один из возможных субстратов для фосфорилирования *AtCPK1* (Cheng et al. 2001). PAL является первым ферментом в фенилпропаноидном пути биосинтеза вторичных метаболитов растений. Фермент катализирует неокислительное дезаминирование из фенилаланина с получением коричной кислоты. PAL является важным ферментом, который связывает первичный метаболизм со вторичным метаболизмом (Wang et al. 2013). Таким образом, информация о фосфорилировании PAL белком СРК обеспечивает связь между СРК и вторичным метаболизмом в растениях (Cheng et al. 2001). *VaCPK20* является близким гомологом *AtCPK1*, и поэтому функции *VaCPK20* могут быть связаны в том числе с фосфорилированием ферментов участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов.

Достоверно увеличивала содержание т-резвератрола и сверхэкспрессия генов *VaCPK1*, 16, 26, 29 и 32, но всего до 0.57 мг/г сухой биомассы (Таблица 8), что намного меньше, чем сверхэкспрессия генов *rol* или *VaCPK20*. Сверхэкспрессия *VaCPK3a*, 9, 13, 21, 25 и 30 либо достоверно увеличивала содержание т-резвератрола, но не во всех независимо полученных линиях, либо это увеличение было статистически недостоверно (Таблица 8).

Таблица 8. Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после трансформации генами кальций-зависимых протеинкиназ из винограда *V. amurensis*. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$); эксп. – экспрессия гена.

Воздействие	сумма стильбенов	<i>m</i> - резвератрол	Ссылки
Контрольная культура клеток VV/КА-0	0.4 ±0.2 ^c	0.04 ±0.02 ^f	Kiselev et al. 2013; Kiselev et al. 2021
Сверхэкспрессия <i>VaCPK3a</i>	н.и.	0.05 ±0.02 ^f	Kiselev et al. 2013
КА19-II, слабая эксп. <i>VaCPK1</i>	0.5 ±0.2 ^c	0.29 ±0.10 ^{de}	Aleynova et al. 2015
КА19-I, сильная эксп. <i>VaCPK1</i>	0.5 ±0.2 ^c	0.30 ±0.11 ^{de}	Aleynova et al. 2015
КА08-IV, слабая эксп. <i>VaCPK9</i>	н.и.	0.09 ±0.01 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
КА08-I, сильная эксп. <i>VaCPK9</i>	н.и.	0.29 ±0.16 ^{de}	Aleynova et al. 2015
КА15-IV, слабая эксп. <i>VaCPK13</i>	н.и.	0.12 ±0.03 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
КА15-II, сильная эксп. <i>VaCPK13</i>	н.и.	0.10 ±0.02 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
КА23-II, слабая эксп. <i>VaCPK16</i>	1.2 ±0.1 ^a	0.37 ±0.12 ^{cd}	Дубровина и др. 2018
КА23-I, сильная эксп. <i>VaCPK16</i>	1.1 ±0.2 ^{ab}	0.31 ±0.11 ^{de}	Дубровина и др. 2018
КА-09-II, слабая эксп. <i>VaCPK20</i>	н.и.	0.61 ±0.21 ^b	Aleynova-Shumakova et al. 2014
КА-09-I, сильная эксп. <i>VaCPK20</i>	н.и.	4.21 ±0.86 ^a	Aleynova-Shumakova et al. 2014
КА07-I, слабая эксп. <i>VaCPK21</i>	н.и.	0.08 ±0.02 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
КА07-III, сильная эксп. <i>VaCPK21</i>	н.и.	0.07 ±0.02 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
КА22-I, слабая эксп. <i>VaCPK25</i>	1.0 ±0.4 ^{ab}	0.13 ±0.04 ^{ef}	Дубровина и др. 2018
КА22-IV, сильная эксп. <i>VaCPK25</i>	1.2 ±0.3 ^a	0.41 ±0.11 ^{cd}	Дубровина и др. 2018
КА18-I, слабая эксп. <i>VaCPK26</i>	0.5 ±0.2 ^c	0.24 ±0.11 ^{de}	Aleynova et al. 2015
КА18-II, сильная эксп. <i>VaCPK26</i>	1.0 ±0.2 ^{ab}	0.57 ±0.17 ^{bc}	Aleynova et al. 2015
КА10-II, слабая эксп. <i>VaCPK29</i>	н.и.	0.19 ±0.04 ^{de}	Aleynova et al. 2015
КА10-III, сильная эксп. <i>VaCPK29</i>	н.и.	0.17 ±0.03 ^{de}	Aleynova et al. 2015
КА21-I, слабая эксп. <i>VaCPK30</i>	0.5 ±0.1 ^c	0.11 ±0.02 ^{ef}	Дубровина и др. 2018
КА21-IV, сильная эксп. <i>VaCPK30</i>	0.7 ±0.1 ^{bc}	0.14 ±0.05 ^{ef}	Дубровина и др. 2018
КА20-I, слабая эксп. <i>VaCPK32</i>	0.7 ±0.2 ^{bc}	0.23 ±0.07 ^{de}	Дубровина и др. 2018
КА20-III, сильная эксп. <i>VaCPK32</i>	1.2 ±0.3 ^a	0.21 ±0.08 ^{de}	Дубровина и др. 2018

Известно, что к белкам кальциевым сенсорам растений также относят кальмодулин-подобные белки или *CML* (Hashimoto and Kudla, 2011). У растений *CML* также представлены мультигенными семействами, например у винограда описано 54 гена *CML* (Dubrovina et al. 2019). Ранее проведенный анализ выявил, что высокая экспрессия нескольких генов (например, *VaCML9a*, 52, 65, 93, 95, 96, 100, 103, 104) была характерна для тканей винограда *V. amurensis* с высоким содержанием стильбенов (Kiselev et al. 2021), поэтому ряд этих генов было решено использовать в экспериментах по сверхэкспрессии генов *CML*. Более того, было показано, что ряд генов практически никак не реагировал на увеличение содержание стильбенов в тканях, например, *VaCML86*, поэтому этот ген был выбран в качестве дополнительного негативного контроля.

Самым сильным положительным влиянием на содержание стильбенов обладала сверхэкспрессия гена *VaCML65*, что приводило к достоверному увеличению содержания т-резвератрола в нескольких независимо полученных трансгенных линиях, в линии 65-1 с высокой сверхэкспрессией гена *VaCML65* содержание т-резвератрола доходило до 18.1 мг/г сухой биомассы (Таблица 9). Трансформация другими генами *VaCML52*, 86, 93 и 95 увеличивала содержание стильбенов, но это увеличение было достоверно не для всех полученных трансгенных линий и значения не доходили до таких высоких значений. Например, трансформация геном *VaCML93* достоверно увеличила содержание т-резвератрола до 2.3 мг/г сухой биомассы, но это значимое увеличение было характерно только для одной полученной линии из трех (Таблица 9).

Таблица 9. Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после трансформации генами кальмодулин-подобных белков. Средние значения,

содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Воздействие	Общее содержание стильбенов, мг/г сухой биомассы	Содержание <i>m</i> -резвератрола, мг/г сухой биомассы
Контрольная культура клеток КА0	0.6 ± 0.3 ^{fg}	0.42 ± 0.11 ^{fg}
52-3, слабая экспрессия <i>VaCML52</i>	1.2 ± 0.3 ^{ef}	0.58 ± 0.21 ^{ef}
52-1, сильная экспрессия <i>VaCML52</i>	2.4 ± 0.4 ^{de}	1.06 ± 0.35 ^{de}
65-2, слабая экспрессия <i>VaCML65</i>	8.2 ± 2.7 ^{bc}	7.79 ± 3.31 ^{ab}
65-3, средняя экспрессия <i>VaCML65</i>	4.6 ± 2.1 ^{cd}	2.31 ± 0.47 ^{cd}
65-1, сильная экспрессия <i>VaCML65</i>	19.2 ± 4.8 ^a	18.06 ± 7.09 ^a
86-1, слабая экспрессия <i>VaCML86</i>	0.6 ± 0.2 ^{fg}	0.33 ± 0.12 ^{gh}
86-3, сильная экспрессия <i>VaCML86</i>	0.5 ± 0.2 ^{fg}	0.29 ± 0.10 ^{gh}
93-3, слабая экспрессия <i>VaCML93</i>	2.1 ± 1.1 ^{de}	0.63 ± 0.24 ^{ef}
93-1, сильная экспрессия <i>VaCML93</i>	3.5 ± 0.9 ^{cd}	2.32 ± 1.03 ^{cd}
95-1, слабая экспрессия <i>VaCML95</i>	0.3 ± 0.1 ^g	0.15 ± 0.06 ^h
95-2, сильная экспрессия <i>VaCML95</i>	1.9 ± 0.5 ^{ef}	1.01 ± 0.37 ^{de}
ST1-I, сильная экспрессия <i>VaSTS1</i>	0.24 ± 0.11 ^g	0.08 ± 0.03 ^h
ST1-IV, слабая экспрессия <i>VaSTS1</i>	0.36 ± 0.12 ^{fg}	0.15 ± 0.04 ^h
ST2-I, сильная экспрессия <i>VaSTS2</i>	0.60 ± 0.16 ^{fg}	0.21 ± 0.05 ^h
ST2-II, слабая экспрессия <i>VaSTS2</i>	0.25 ± 0.08 ^g	0.07 ± 0.02 ^h
ST7-I, сильная экспрессия <i>VaSTS7</i>	0.48 ± 0.18 ^{fg}	0.22 ± 0.09 ^h
ST7-II, слабая экспрессия <i>VaSTS7</i>	0.42 ± 0.17 ^{fg}	0.21 ± 0.09 ^h
zST1-1, слабая экспрессия <i>PjSTS1a</i>	1.14 ± 0.71 ^{df}	0.79 ± 0.56 ^{ef}
zST1-3, сильная экспрессия <i>PjSTS1a</i>	0.68 ± 0.19 ^{fg}	0.12 ± 0.04 ^h
zST2-1, слабая экспрессия <i>PjSTS2</i>	0.50 ± 0.11 ^{fg}	0.06 ± 0.01 ^h
zST2-3, сильная экспрессия <i>PjSTS2</i>	0.55 ± 0.21 ^{fg}	0.10 ± 0.03 ^h
zST3-1, слабая экспрессия <i>PjSTS3</i>	1.01 ± 0.40 ^{df}	0.53 ± 0.15 ^{ef}
zST3-2, сильная экспрессия <i>PjSTS3</i>	3.06 ± 2.01 ^{cd}	2.44 ± 1.35 ^{cd}

Ключевым звеном в передаче сигналов в клетке являются транскрипционные факторы. У винограда лучше всего изучена регуляция биосинтеза флавоноидов, потому что это одна из наиболее представленных групп вторичных метаболитов у винограда. Аналогичные соединения встречаются во многих других растениях, включая ряд модельных объектов молекулярной биологии, таких как *A. thaliana* (Martens et al. 2010).

Известно, что регуляция биосинтеза флавоноидов осуществляется многочисленной группой транскрипционных факторов, относящихся к подсемейству Myb R2R3 (Myb), насчитывающих 108 генов у *V. vinifera* (Matus et al. 2010; Czemplak et al. 2012). Представители данного семейства транскрипционных факторов регулируют многие важнейшие процессы жизнедеятельности растительного организма: дифференциацию клеток эпидермиса (Ramsay and Glover, 2005), холодостойкость (Agarwal et al. 2006), устойчивость к засухе и устойчивость к заражению патогенами (Vaillancourt et al. 2002).

Первые попытки найти транскрипционные факторы, участвующие в регуляции биосинтеза стильбенов (Fang et al. 2014) указали на положительное участие генов *Myb14* и *Myb15* в регуляции биосинтеза резвератрола. Мы предположили, что участие только двух генов в регуляции экспрессии 32-х полноразмерных и функциональных генов *STS* (Parage et al. 2012) у винограда маловероятно. Биосинтез стильбенов связан с регуляцией экспрессии ряда других генов, участвующих в преобразовании резвератрола и формированию имеющегося многообразия стильбенов у винограда. В указанных статьях (Fang et al. 2014) для индукции биосинтеза стильбенов использовали только ультрафиолет (УФ-С), хотя есть и множество других факторов, увеличивающих биосинтез стильбенов (Kiselev et al. 2011). Поэтому дальнейшим этапом в работе стал анализ экспрессии генов

представителей всех известных подгрупп подсемейства транскрипционных факторов *Myb* в культурах клеток и частях растений винограда *V. amurensis* с разным содержанием т-резвератрола (Киселев и др. 2017).

Нами была проанализирована экспрессия 22 известных генов *Myb* винограда *V. amurensis* в культурах клеток и частях растения винограда *V. amurensis* с разным содержанием резвератрола. Мы показали, что гены *VaMyb9*, *14*, *15a*, *15d*, *40*, *60* и *107* возможно являются позитивными регуляторами биосинтеза резвератрола, потому что их экспрессия достоверно увеличивалась в пробах с высоким содержанием т-резвератрола (Киселев и др. 2017). Важно отметить, что функции близких гомологов этих генов у арабидопсиса *A. thaliana* не известны (Matus et al. 2008). Далее в работе исследовали влияние сверхэкспрессии генов *VaMyb40* и *VaMyb60*, потенциальных позитивных регуляторов биосинтеза стильбенов, на содержание т-резвератрола и его производных в культуре клеток винограда. Было показано, что сильная сверхэкспрессия гена *VaMyb60* достоверно увеличивала содержание т-резвератрола до 16.8 мг/г сухой биомассы и общее содержание стильбенов до 18.4 мг/г сухой биомассы (Ananev et al. 2022). Достоверно увеличивала содержание т-резвератрола и сверхэкспрессия гена *VaMyb40*, но в меньшей степени (до 2.5–3.9 мг/г сухой биомассы) (Ananev et al. 2022).

Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах винограда амурского *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих гены стильбен синтаз

Известно, что *STS* являются ключевыми ферментами в биосинтезе т-резвератрола, а значит и большинства известных стильбенов. Поэтому дальнейшей важной работой стало изучение сверхэкспрессии нескольких разных генов *STS* из винограда *V. amurensis* и ели *P. jezoensis* в культурах клеток винограда *V. amurensis*. Для агробактериальной трансформации клеток винограда в первую очередь были выбраны гены *VaSTS1*, *2* и *7* из винограда *V. amurensis*. Выбор этих генов был обусловлен тем, что ранее было показано, что экспрессия генов *VaSTS2* и *7* резко возрастала при увеличении содержания т-резвератрола в клетках винограда, сверхэкспрессирующих ген *VaCPK20* (Aleynova-Shumakova et al. 2014). Особенностью гена *VaSTS1* было то, что в контрольных культурах клеток с низким содержанием т-резвератрола VV или KA0 количество мРНК *VaSTS1* было достаточно высоким относительно других форм генов *VaSTS* (Kiselev et al. 2009), а увеличение содержание т-резвератрола с помощью различных воздействий либо увеличивало его экспрессию (не столь значительно как гена *VaSTS2* и *7*), либо наблюдалась достоверное уменьшение его экспрессии (Aleynova-Shumakova et al. 2014). Ген *VaSTS1* было решено использовать в работе, как пример гена *STS* с высоким уровнем транскрипции в клетках винограда в норме.

Сверхэкспрессия генов *STS* винограда в культурах клеток винограда *V. amurensis* увеличивала содержание т-резвератрола и общее содержание всех стильбенов, но только в случае сверхэкспрессии гена *VaSTS7* наблюдаемое увеличение было статистически достоверным во всех полученных линиях (Таблица 9). Содержание т-резвератрола в этих линиях доходило до 0.21–0.22 мг/г сухой биомассы, что в 7–7.3 раза было больше, чем в контрольной культуре клеток KA0 (Таблица 9). В ели аянской *P. jezoensis* нами было описано 4 гена *STS*: *PjSTS1a*, *PjSTS1b*, *PjSTS2* и *PjSTS3*. Гены *PjSTS1a* и *PjSTS1b* отличались всего на 5 из 1191 нуклеотидов, что приводило к замене всего 3 аминокислот (Киселев и др. 2016). Ввиду слабого отличия данных генов, в работе было решено использовать только одни из этих двух генов – ген *PjSTS1a*. Так же в работу взяли и оставшиеся гены *PjSTS2* и *PjSTS3*.

Интересные результаты были получены при сверхэкспрессии генов *STS* из ели *P. jezoensis*. Так содержание т-резвератрола в культурах клеток винограда, сверхэкспрессирующих ген *PjSTS3*, достоверно увеличивалось до 0.53-2.44 мг/г сухой биомассы, что в 17.7-81.3 раза было больше, чем в контрольной культуре клеток КА0 (Таблица 9). Содержание стильбенов в трансгенных клетках винограда по генам *PjSTS1a* и *PjSTS1a* было соизмеримо с содержанием в *VaSTS1*-, *VaSTS2*- и *VaSTS7*-трансгенных клеточных линиях винограда. Важно отметить, что общий уровень увеличения содержания т-резвератрола при трансформации отдельными генами *STS* был ниже, чем при сверхэкспрессии используемых ранее регуляторных генов, таких как *CPK*, *CML* или транскрипционных факторов *Myb*. Это говорит о том, что трансформация регуляторными генами является более эффективной стратегией, чем сверхэкспрессия отдельных рабочих генов, поскольку трансформация одним регуляторным геном может привести к активации экспрессии сразу нескольких десятков/сотен других генов, в том числе и эндогенных *STS*.

Накопление стильбенов в трансгенных растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены стильбен синтазы и устойчивость трансгенных растений арабидопсиса к абиотическим стрессам

Поскольку предшественники стильбенов (пара-кумарил-коэнзим А и малонил-коэнзим А) характерны для всех растений, то дальнейшим этапом стало получение трансгенных растений арабидопсиса *A. thaliana*. Используя метод цветочного погружения с дальнейшей селекцией прорастания семян на питательных средах с селективным антибиотиком Км, нами были получены по 3 гомозиготные линии *VaSTS1*- и *VaSTS7*-трансгенных растений и еще по 2 линии гомозиготных линий *VaSTS11c*- и *VaSTS11d*-трансгенных растений *A. thaliana*. Особенность применения *VaSTS11c* и *VaSTS11d* заключается в том, что эти два трансгена отличались тем, что в последовательности *VaSTS11d* остался небольшой интрон (Рисунок 12а, интрон 135 нуклеотидов).

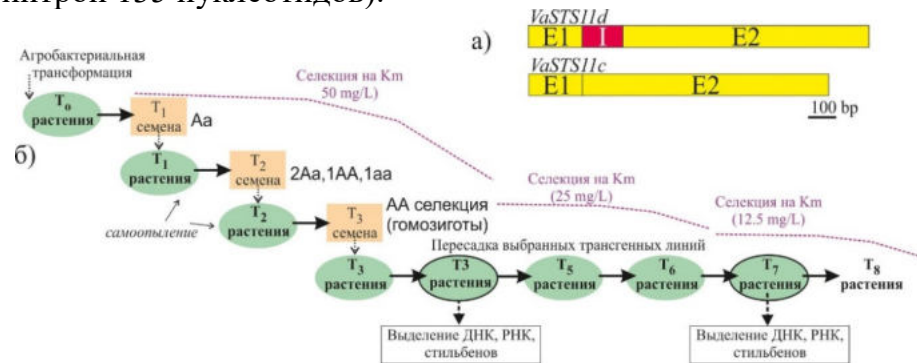


Рисунок 12. а) Схематическое изображение трансгенов *VaSTS11c* (ОQ645979) *VaSTS11d* (ОQ645980); E1 – первый экзон, I – интрон, E2 – второй экзон. б) Схематическое изображение процедуры отбора трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*; T0 – трансформированные растения *A. thaliana*; T1-T8 – различные поколения трансгенных растений *A. thaliana*; Км – канамицин.

Важно отметить, что для анализа экспрессии трансгенов *VaSTS1*, *VaSTS7* и *VaSTS11c*, *VaSTS11d* использовали одну и ту же пару праймеров, подобранную на одинаковые участки генов, что позволило представить данные ПЦР РВ в виде одной гистограммы для генов *VaSTS1*, *VaSTS7*, *VaSTS11c*, *VaSTS11d* (Рисунок 13). Было показано, что уровень транскрипции мРНК во всех пробах, выделенных из трансгенных растений, был значительно выше, чем в контрольных растениях КА0, что говорит о том, что все полученные растения были трансгенными. Уровень экспрессии гена *VaSTS1* в линиях ST1 был 6.3–13.3 раза выше, чем уровень экспрессии гена *VaSTS7* (Рисунок 13а). Данная

разница объясняется тем, что метилирование последовательности белок-кодирующей последовательности трангена *VaSTS1* во всех 3-х полученных линиях была в 1.9-2.4 раза ниже, чем метилирование последовательности трангена *VaSTS7* (Рисунок 14а).

Также экспрессия *VaSTS11* трансгенов была достоверно выше, чем в контроле КА0 или диком типе Wt (Рисунок 13б). Наибольшая экспрессия *VaSTS11* была в линиях STS11d-1 и STS11d-2 (сверхэкспрессирующих *VaSTS11d*) в четвертом поколении, в 4.9-7.3 выше, чем в линиях STS11c-1 и STS11c-2 (сверхэкспрессирующих *VaSTS11c*). Интересно отметить, что эта разница в экспрессии уменьшалась при выращивании следующих поколений (Рисунок 12б, 13б).

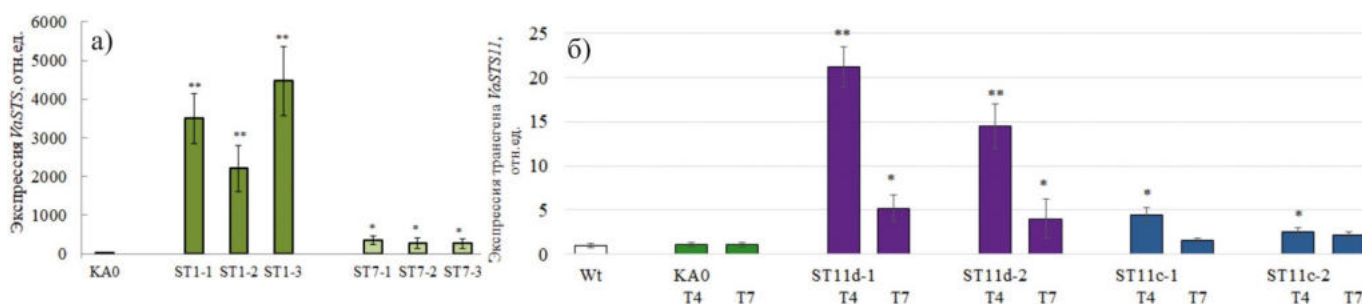


Рисунок 13. Экспрессия *VaSTS1* (а, линии ST1-1, 2, 3), *VaSTS7* (а, ST7-1, 2, 3), *VaSTS11d* (б, линии ST11d-1, 2) и *VaSTS11c* (б, ST11c-1, 2) трансгенов в полученных гомозиготных линиях растений *Arabidopsis thaliana*. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка (SE). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями количества мРНК *VaSTS* у растений КА0, сверхэкспрессирующих только селективный маркерный ген *nptII* (парный t-критерий Стьюдента); Т4 и Т7 – экспрессия *VaSTS11d* и *VaSTS11c* у трансгенных *A. thaliana* поколений Т4 и Т7.

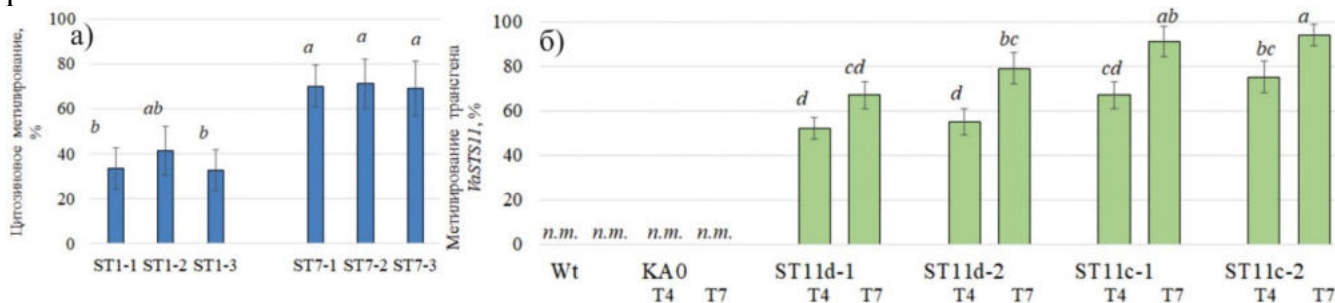


Рисунок 14. Количественная оценка метилирования генов *VaSTS1*, *VaSTS7* и *VaSTS11* (б) в трансгенных растениях арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*. ST1-1, ST1-2, ST1-3 – линии растений *A. thaliana*, со сверхэкспрессией гена *VaSTS1*; ST7-1, ST7-2, ST7-3 – линии растений арабидопсиса, со сверхэкспрессией гена *VaSTS7*. Wt – растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа; КА0 - растения *A. thaliana*, трансформированные только селективным маркером *nptII*; ST11d-1, ST11d-2 – растения *A. thaliana*, трансформированные геном *VaSTS11d*; ST11c-1, ST11c-2 – геном *VaSTS11c*. Т4 и Т7 – экспрессия *VaSTS11d* и *VaSTS11c* у трансгенных *A. thaliana* поколений Т4 и Т7; n.m. – не измерялась. Данные представлены как средние значения \pm SE. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались при использовании одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), за которым следовал тест множественного сравнения Тьюки ($p < 0.05$).

Детальный анализ метилирования нуклеотидной последовательности гена *VaSTS11d* и *VaSTS11c* показал, что уровень метилирования гена *VaSTS11c* был в 1.2-1.4 раза выше, чем метилирование гена *VaSTS11d* в 4-м поколении (Рисунок 14б). В 7-м поколении

трансгенных растений *A. thaliana* уровень метилирования вырос во всех исследуемых трансгенных линиях, более того, метилирование в линиях ST11c-1 и ST11c-2 было наибольшим и в 1.4-1.5 раз выше, чем метилирование трансгена *VaSTS10d* в 7-м поколении (Рисунок 14б). При помощи метода ВЭЖХ, нами было показано, что контрольная линия растений *A. thaliana* KA0, не содержит стильбенов, в то время как *VaSTS1*-трансгенные растения *A. thaliana*, продуцировали два стильбена: т-пицеид и т-резвератрол (Рисунок 15б, Таблица 10).

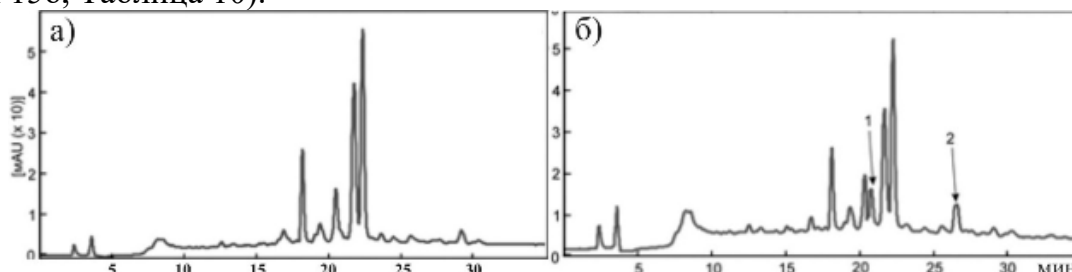


Рисунок 15. Хроматограмма ВЭЖХ – УФ (310 нм) для экстрактов трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*. (а) KA0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; (б) ST1-3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; т-пицеид (1) и т-резвератрол (2).

Растения, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7*, продуцировали в основном только т-резвератрол (Таблица 10). Наибольшее содержание т-пицеида и т-резвератрола было обнаружено в растениях *A. thaliana*, которые сверхэкспрессировали ген *VaSTS1*: 8.3–22.7 мкг/г свежей массы. Количество стильбенов в *VaSTS*-трансгенных линиях растений положительно коррелировало с уровнем экспрессии трансгена *VaSTS1* (коэффициент корреляции $r = 0.96$). Общее содержание стильбенов в растениях линий ST7 было в 103–1133 раз ниже, чем содержание стильбенов в линиях ST1. Важно отметить, что из всех стильбенов для трансгенных линий растений ST7 был обнаружен только т-резвератрол: 0.02–0.08 мкг/г свежей массы (Таблица 10) и этот результат также коррелировал ($r = 0.98$) с низким уровнем экспрессии трансгена *VaSTS7* (Ogneva et al. 2021).

В свою очередь растения, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS11d* или *VaSTS11c*, продуцировали только т-пицеид (Таблица 10) и только одна линия растений, сверхэкспрессирующая трансген *VaSTS11d*, по содержанию стильбенов (линия ST11d-1, 17.9 мкг/г всех стильбенов свежей массы) приближалась к максимальным значениям, полученным при сверхэкспрессии *VaSTS1* (линия STS1-3, 22.7 мкг/г свежей массы, Таблица 10). Важно отметить, что по продукции стильбенов в трансгенных растениях арабидопсиса *A. thaliana*, сверхэкспрессия трансгена *VaSTS11* показывала средние значения: продукция была меньше, чем при сверхэкспрессии трансгена *VaSTS11*, но значительно больше, чем при сверхэкспрессии трансгена *VaSTS7*. Более того, сверхэкспрессия трансгена *VaSTS11d*, содержащим 135 bp интрон, приводила к более сильной экспрессии трансгена и накоплению стильбенов до 17.9 мкг/г от свежей массы, по сравнению с тем же геном *VaSTS11c*, но содержащим только белок-кодирующую последовательность (до 7.8 мкг/г от свежей массы). Дальнейшее исследование полученных *STS11*-трансгенных растений арабидопсиса в последующих поколениях показало, что к 7-му поколению содержание стильбенов в растениях сильно снижалось: в *VaSTS10d* трансгенных линиях в 1.5-2.8 раз, а в *VaSTS10c* линиях в 6.1-8.3 раза (Таблица 10). Интересно отметить, что это коррелировало с увеличением метилирования белок кодирующей последовательности трансгенов *VaSTS11* (Рисунок 14). Метилирование

последовательности трансгена *VaSTS11c* была достоверно выше, чем у трансгена *VaSTS11d* (Рисунок 146).

Таблица 10. Содержание *m*-пицеида и *m*-резвератрола (мкг/г сырой массы) в линиях растений *Arabidopsis thaliana* КА0, ST1-1, 2, 3, ST7-1, 2, 3, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS1*, *VaSTS7*. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (парный *t*-критерий Стьюдента) по сравнению со значениями содержания *t*-пицеида или *t*-резвератрола в 8-недельных растениях *A. thaliana*, трансформированных пустым вектором КА0.

Линия растений (ген)	<i>m</i> -пицеид	<i>m</i> -резвератрол	Сумма стильбенов
КА0 (<i>nptII</i>)	0	0	0
ST1-1 (<i>VaSTS1</i>) 4-е поколение	12.42 \pm 4.11*	0.32 \pm 0.23	12.73 \pm 4.34*
ST1-2 (<i>VaSTS1</i>) 4-е поколение	8.01 \pm 2.02**	0.28 \pm 0.19	8.28 \pm 2.19*
ST1-3 (<i>VaSTS1</i>) 4-е поколение	21.43 \pm 4.98**	1.24 \pm 0.55*	22.66 \pm 5.56**
ST7-1 (<i>VaSTS7</i>) 4-е поколение	0	0.08 \pm 0.03*	0.08 \pm 0.03*
ST7-2 (<i>VaSTS7</i>) 4-е поколение	0	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02
ST7-3 (<i>VaSTS7</i>) 4-е поколение	0	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02
ST11d-1 (<i>VaSTS11d</i>) 4-е поколение	17.92 \pm 1.99**	0	17.92 \pm 1.99**
ST11d-2 (<i>VaSTS11d</i>) 4-е поколение	4.91 \pm 2.01*	0	4.91 \pm 2.01*
ST11c-1 (<i>VaSTS11c</i>) 4-е поколение	7.76 \pm 0.91**	0	7.76 \pm 0.91**
ST11c-2 (<i>VaSTS11c</i>) 4-е поколение	1.51 \pm 0.71*	0	1.51 \pm 0.71*
ST11d-1 (<i>VaSTS11d</i>) 7-е поколение	12.40 \pm 1.15*	0	12.40 \pm 1.15*
ST11d-2 (<i>VaSTS11d</i>) 7-е поколение	1.75 \pm 1.03*	0	1.75 \pm 1.03*
ST11c-1 (<i>VaSTS11c</i>) 7-е поколение	0.94 \pm 0.35*	0	0.94 \pm 0.35*
ST11c-2 (<i>VaSTS11c</i>) 7-е поколение	0.25 \pm 0.09	0	0.25 \pm 0.09

Ранее было показано, что *STS*-трансгенные растения более устойчивы к разным растительным патогенам (Delaunois et al. 2009; He et al. 2018), но ничего не известно про устойчивость трансгенных растений к абиотическим стрессам. Для определения степени участия генов винограда *VaSTS1* и *VaSTS7* в ответ на различные абиотические стрессы были использованы *VaSTS1*- и *VaSTS7*-трансгенные линии растений *A. thaliana*. Всего было проведено 5 серий экспериментов по индукции солевого, высоко-, низкотемпературного и УФ стресса (УФ-В, 312 нм и УФ-С, 254 нм), а также засухи. Результаты показали, что сверхэкспрессия генов *VaSTS1* и *VaSTS7* не увеличивала устойчивость к засолению, засухе и низким температурам (Рисунок 16а,в,г). Устойчивость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих *VaSTS1* и *VaSTS7*, после тепловой обработки была на 1–14% выше по сравнению с растениями КА0, но это увеличение не было статистически значимым (Рисунок 166).

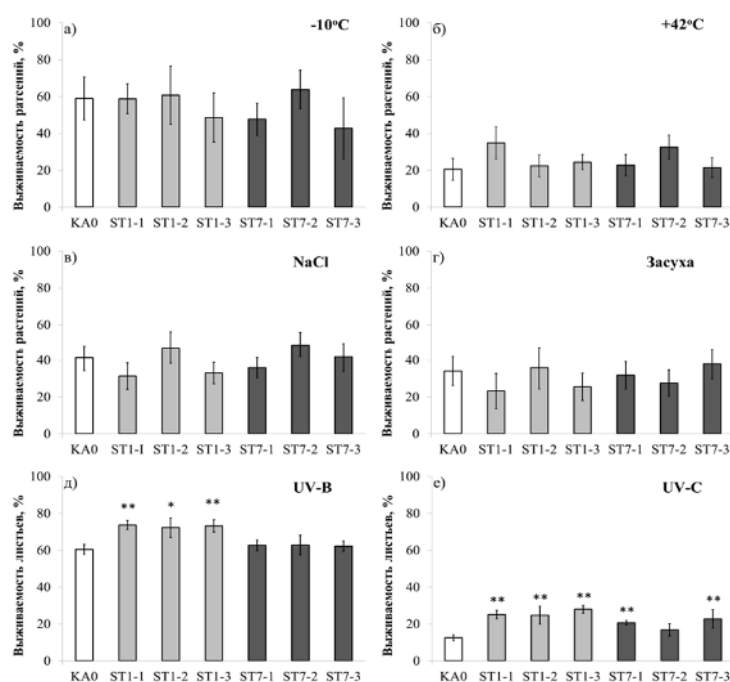


Рисунок 16. Выживаемость растений (а, г) и листьев (д, е) после стрессов: холода (а), тепла (б), засоления (в), засухи (г), ультрафиолетового облучения В (УФ-В, д), и ультрафиолетового облучения С (УФ-С, е). КА0 - трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1, 2 и 3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; ST7-1, 2 и 3 – ген *VaSTS7*.

Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями выживаемости растений или листьев у растений КА0 (парный t-критерий Стьюдента).

Наиболее интересный результат был обнаружен при обработке растений УФ: сверхэкспрессия гена *VaSTS1* увеличивала выживаемость зеленых листьев после обработки УФ-В в 1.3 раза (Рисунок 16д). Это увеличение было статистически значимым для всех *VaSTS1*-трансгенных растений. Сверхэкспрессия гена *VaSTS7* также увеличивала жизнеспособность листьев, облученных УФ-В, но эта устойчивость не была статистически значимой (Рисунок 16д). Аналогичные результаты были получены при применении УФ-С, однако отрицательное влияние на выживаемость листьев было намного сильнее (Рисунок 16е), несмотря на то что интенсивность УФ-С излучения была почти в 2 раза меньше (1800 мкВт/см² УФ-В против 930 мкВт/см² УФ-С). Это подтверждает ранее сделанные выводы о том, что воздействие УФ-С более опасно для растений, чем воздействие УФ-В (Nawkar et al. 2013).

В более жестких условиях облучения УФ-С защитный эффект сверхэкспрессии гена *VaSTS* проявлялся сильнее. Так, сверхэкспрессия гена *VaSTS1* достоверно увеличивала количество зеленых листьев после обработки УФ-С в 2.3 раза по сравнению с растениями КА0 *A. thaliana* (Рисунок 16е). Сверхэкспрессия гена *VaSTS7* также увеличивала жизнеспособность листьев, облученных УФ-С в 1.3–1.8 раза, но это повышение было статистически значимым только для двух из трех линий растений *A. thaliana* ST7, которые использовались в экспериментах (для ST7-1 и ST7-3, Рисунок 16е).

Влияние обработки семян растений *A. thaliana* предшественниками фенольных соединений и стильбенами на дальнейшее развитие растений

Экзогенная обработка семян *A. thaliana* стильбенами (R, Pi, BE) во время прорастания привела к значительному уменьшению длины корня и стебля у 1-недельных проростков *A. thaliana* и диаметра розетки у 1-месячных растений – в 1.3-4.5 раза и 1.2-1.8 раза соответственно (Рисунок 17а,б). Наибольшее угнетение параметров роста растений в возрасте 1 недели и 1 месяца наблюдалось при 0.5 мм СА – в 24.3–79.1 и 1.9 раза соответственно (Рисунок 17а,б). Однако размер розетки обработанных растений в возрасте 2 месяцев существенно не отличался от размера розетки контрольных растений,

обработанных водой (Рисунок 17с), т.е. ингибирующее действие стильбенов через 2 месяцев после обработки исчезало. Важно отметить, что обработка уже взрослых растений (1–2 месяца) существенно не влияло на размер розеток.

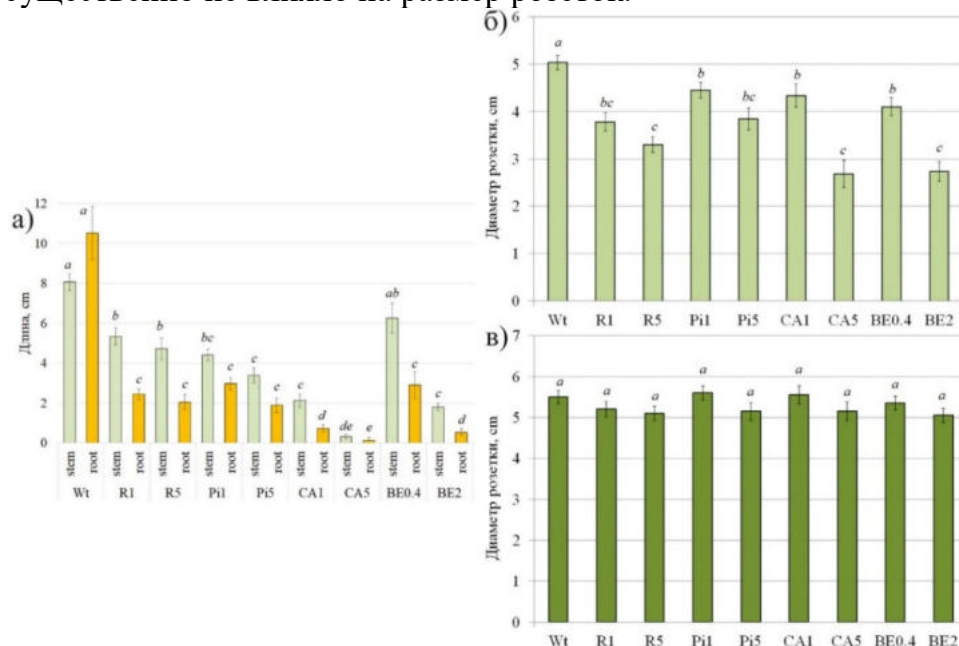


Рисунок 17. Длина стебля (stem) и корня (root) 7-дневных проростков *Arabidopsis thaliana* (а), выращенного на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением стильбеновых соединений (т-резвератрол, т-пицеид), пара-кумаровой кислоты или этанолового экстракта коры ели *Picea jezoensis*. Затем проростки *A. thaliana* пересадили в отдельные горшки и через 1 (б) и 2 месяца (в) подсчитали диаметр розетки. Wt – растения *A. thaliana* дикого типа; R1 и R5 – проростки или растения *A. thaliana*, выращиваемые на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением 1- и 5-мМ т-резвератрола; Pi1 и Pi5 – 1- и 5-мМ т-пицеида; CA1 и CA5 – 1- и 5-мМ пара-кумаровой кислоты; BE1 и BE5 – экстракта еловой коры 0.4 и 2 г/л. Данные представлены в виде среднего значения \pm SE. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались при использовании одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), за которым следовал тест множественного сравнения Тьюки ($p < 0.05$).

Устойчивость растений *A. thaliana* при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами

В предыдущих работах нами было показано, что появление стильбенов в растениях *A. thaliana* увеличивало устойчивость этих растений к УФ излучению, поэтому нами было решено проверить, является ли это прямым следствием воздействия именно стильбенов или сверхэкспрессия генов *STS* могла приводить к другим последствиям, что и вызывало наблюдаемую устойчивость. Поэтому мы провели ряд экспериментов по обработке растений *A. thaliana* растворами стильбенов. Для сравнения мы так же обрабатывали растения предшественниками фенольных соединений растений: пара-кумаровой кислотой (CA) (Рисунок 18в) и транс-коричной кислотой (CiA) (Рисунок 18г). В качестве положительного контроля растения обрабатывали октокриленом – веществом, которое используется в качестве ингредиента в разнообразных солнцезащитных продуктах, потому что поглощает ультрафиолетовые лучи.

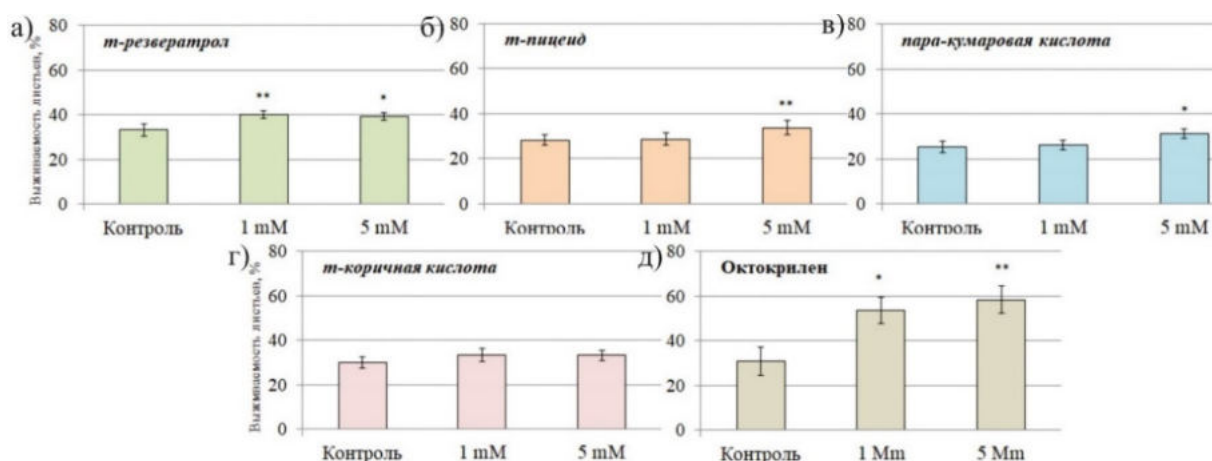


Рисунок 18. Выживаемость листьев растений *Arabidopsis thaliana* после ультрафиолетового облучения С (УФ-С), обработанных *t*-резвератролом (а), *t*-пицеидом (б), пара-кумаровой кислотой (в), транс-коричной кислотой (г) и октокриленом (д) в концентрации 1 mM и 5 mM, в качестве контроля растения были обработаны водой. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка ($n = 160$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями выживаемости растений или листьев у растений КА0 (парный *t*-критерий Стьюдента).

Стильбены, в первую очередь *t*-резвератрол, оказывали достоверное защитное действие от УФ-С облучения во всех используемых дозах (1 и 5 mM; Рисунок 18а). Количество живых зеленых листьев было на 5.4–6.3% больше при обработке *t*-резвератролом, чем в листьях, обработанных просто водой. Но в тоже время защитное действие *t*-резвератрола было в 2–3 раза меньше, чем у октокрилена – вещества, которое поглощает ультрафиолетовое излучение (Рисунок 18д). Предшественники фенольных соединений (СА и СiА) и другие стильбены (*t*-пицеид) намного слабее защищают от УФ облучения: СА и *t*-пицеид оказывают небольшое достоверное положительное действие только при высоких концентрациях (5 mM) (Рисунок 18в,г). Таким образом, впервые с помощью прямого нанесения стильбенов (*t*-резвератрола) на листья растений показано их защитное действие против УФ.

Далее мы исследовали влияния основных типов абиотических стрессов, распространенных в природе, которые часто приводят к потерям в сельском хозяйстве. Пониженные и повышенные температуры, засоление почв и засуха – это стрессы, которые представляют серьезную проблему в сельском хозяйстве, поскольку они могут привести к снижению урожайности сельскохозяйственных культур и экономическим потерям. Поэтому изучение роли в устойчивости растений к абиотическим стрессам является интересной прикладной задачей.

После обработки растений растворами стильбенов и СА, мы наблюдали снижение выживаемости растений после воздействия холода (Рисунок 19а). Практически все используемые растворы приводили к снижению выживаемости растений, в большинстве случаев это снижение не было статистически значимым. Однако при обработке 5 mM раствором *t*-пицеида выживаемость растений снизилась в 2.5 раза или на 60.6% (Рисунок 19а). Результаты показали, что, хотя большинство обработок существенно не снижали выживаемость растений, нанесение 5 mM раствора *t*-пицеида оказало существенное негативное влияние. Это исследование дает ценную информацию о реакции растений на абиотические стрессы и может способствовать разработке стратегий по смягчению их пагубных последствий в сельском хозяйстве. При воздействии повышенных температур

обработка растений стилъбенами и СА привела к заметному повышению устойчивости растений и показателей приживаемости, причем растения показали в 1.5–2.3 раза более высокие показатели приживаемости по сравнению с необработанными растениями (Рисунок 19б). Это увеличение было статистически значимым, особенно при использовании высоких доз (5 мМ) этих веществ. Аналогичным образом, в случае засоления почвы обработка растений *A. thaliana* высокими концентрациями (5 мМ) т-резвератрола и экстракта ели оказала положительное влияние на выживаемость растений (Рисунок 19в). Выживаемость растений, обработанных этими веществами, увеличилась в 1.7–2.1 раза по сравнению с растениями, обработанными только водой. Однако в условиях засухи только один образец с высокой концентрацией СА (5 мМ) показал значительное увеличение выживаемости растений в 1.7 раза по сравнению с контрольной группой, обработанной водой (Рисунок 19г). Эти результаты подчеркивают потенциал обработки веществами для улучшения выживаемости растений при различных стрессовых воздействиях, в частности при высокой температуре и засолении почвы. Необходимы дальнейшие исследования для изучения эффективности этих обработок в различных условиях и выявления механизмов, лежащих в основе их положительного воздействия на выживаемость растений.

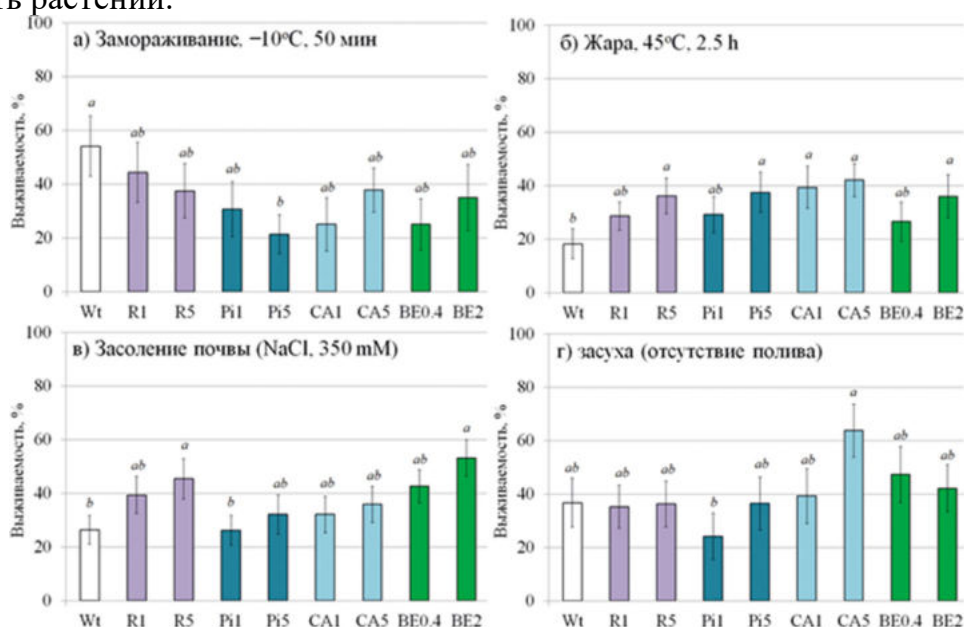


Рисунок 19. Реакция растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа на замораживание (а), жару (б), засоление почвы (в) и засуху (г), обработанных водой (Wt), водными растворами, содержащими 1 и 5 мМ т-резвератрола (R1 и R5), 1 и 5 мМ т-пицеида (Pi1 и Pi5), 1 и 5 мМ пара-кумаровой кислоты (CA1 и CA5), 0.4 и 2 г/л экстракта коры ели (BE0.4 и BE2). Данные представлены в виде среднего значения \pm SE. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались при использовании одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), за которым следовал тест множественного сравнения Тьюки ($p < 0.05$).

Экспрессия генов метаболизма фитогормонов и защитных генов арабидопсиса при обработке предшественниками фенольных соединений и стилъбенами

Сначала мы изучили влияние различных растворов стилъбена на растения *A. thaliana*, проанализировав экспрессию генов, участвующих в метаболизме фитогормонов. В частности, мы сосредоточились на генах, связанных с ауксинами, цитокининами, гиббереллинами, абсцизовой кислотой и этиленом. Таким образом, мы проанализировали 3

гена метаболизма ауксинов (*AtNIT1*, *AtTAA1* и *AtYUCCA1*) (Sato et al. 2022), 4 гена метаболизма цитокининов (*AtCYP735A2*, *AtUGT76C2*, *AtCKX4* и *AtCKX5*) (Wang et al. 2011), 2 гена метаболизма гиббереллинов (*AtGA3ox2* и *AtGA2ox2*) (Plackett et al. 2012), 4 гена метаболизма абсцизовой кислоты (*AtNCED3*, *AtABA1*, *AtABA2* и *AtABA3*) (Behnam et al. 2013) и 2 гена метаболизма этилена (*AtEIN2* и *AtEIN3*) (Binder 2020). Мы показали, что стильбены и СА значительно увеличивают экспрессию ряда генов метаболизма фитогормонов, таких как гены биосинтеза ауксинов (активированы все 3 гена из 3-х исследуемых), гены биосинтеза гиббереллинов (1 из 2 проанализированных генов) и гены биосинтеза абсцизовой кислоты (2 из 3 проанализированных генов) (Рисунок 20). Однако экспрессия генов, связанных с метаболизмом цитокининов и этилена, не претерпела существенных изменений (Рисунок 20).

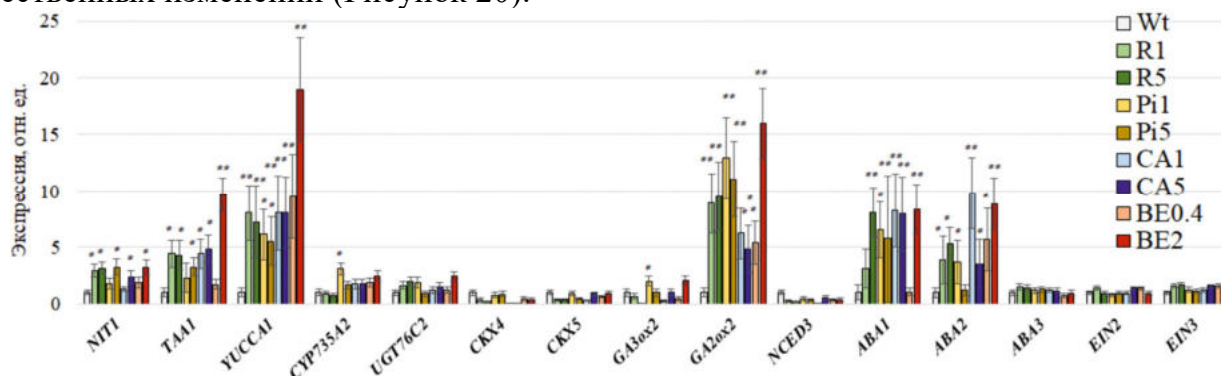


Рисунок 20. Уровень количества транскриптов генов метаболизма фитогормонов *AtNIT1*, *AtTAA1*, *AtYUCCA1*, *AtCYP735A2*, *AtUGT76C2*, *AtCKX4*, 5, *AtGA3ox2*, *AtGA2ox2*, *AtNCED3*, *AtABA1*, 2, 3, *AtEIN2*, 3 у проростков *Arabidopsis thaliana*, обработанных стильбенами или пара-кумаровой кислотой. Wt – проростки *A. thaliana* дикого типа; R1 и R5 – проростки *A. thaliana*, выращенные на питательной среде ½ MS с добавлением т-резвератрола 1 и 5 мМ; Pi1 и Pi5 – т-пицеида 1 и 5 мМ; CA1 и CA5 – из пара-кумаровой кислоты 1 и 5 мМ; BE1 и BE5 – экстракта еловой коры 0.4 и 2 г/л. Данные представлены в виде среднего значения ± SE (два независимых эксперимента с двадцатью техническими повторениями). ** – $p < 0.01$; * – $p < 0.05$ по сравнению со значениями контрольных растений, обработанных водой, согласно t-критерию Стьюдента.

Интересно, что влияние обработки стильбенами и СА на экспрессию этих генов было сходным. Это говорит о том, что если обработка оказывала положительное влияние на экспрессию генов, то большинство соединений, использованных в эксперименте, также оказывали положительное влияние. Это можно объяснить присутствием фенольных колец в структуре всех используемых обработок, что может способствовать их благотворному воздействию на биосинтез фитогормонов.

Затем у растений *A. thaliana*, подвергшихся воздействию стильбенов и СА, мы оценили экспрессию генов, реагирующих на стресс (Рисунок 21), кодирующих факторы транскрипции (*AtABI3*, 4, 5, *AtCBF1*, *AtDREB1A*, 2A, *RD26*) (Fujita et al. 2004), протеинфосфатазы (*AtABII*, 2) (Brocard-Gifford et al. 2004), абсцисс-связывающий фактор (*AtABF*) (Wang et al. 2016), дегидрины (*AtCOR15*, 17, *AtRab18*, *AtLEA*) (Puhakainen et al. 2004), осмолит-синтазы (*AtP5CS2*) (Fabro et al. 2004), гены антиоксидантов (*AtCAT*, *AtCSD1,2*) (Yang et al. 2014; Zhou et al. 2022), протеинкиназы (*AtKINI*) (Kurkela, Borg-Franck, 1992), липидные белки-переносчики (*AtLtp*) (Zhang et al. 2022), гены-переносчики ионов (*AtNHX1*, *AtSOS1*) (Yue et al. 2012). Кроме того, несколько генов не имеют информации о физиологических ролях, но было показано, что их экспрессия значительно

повышается при стрессовых воздействиях (*AtRD22*, *29a*, *29b*, Harshavardhan et al. 2014). Более того, мы также исследовали экспрессию гена большой субъединицы рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы РуБисКо, гена *AtRbcL* (Nivison, Stocking, 1983). Этот фермент играет решающую роль в светонезависимой фазе фотосинтеза, в частности в фиксации углерода. Он помогает преобразовывать атмосферный углекислый газ в богатые энергией молекулы, такие как глюкоза.

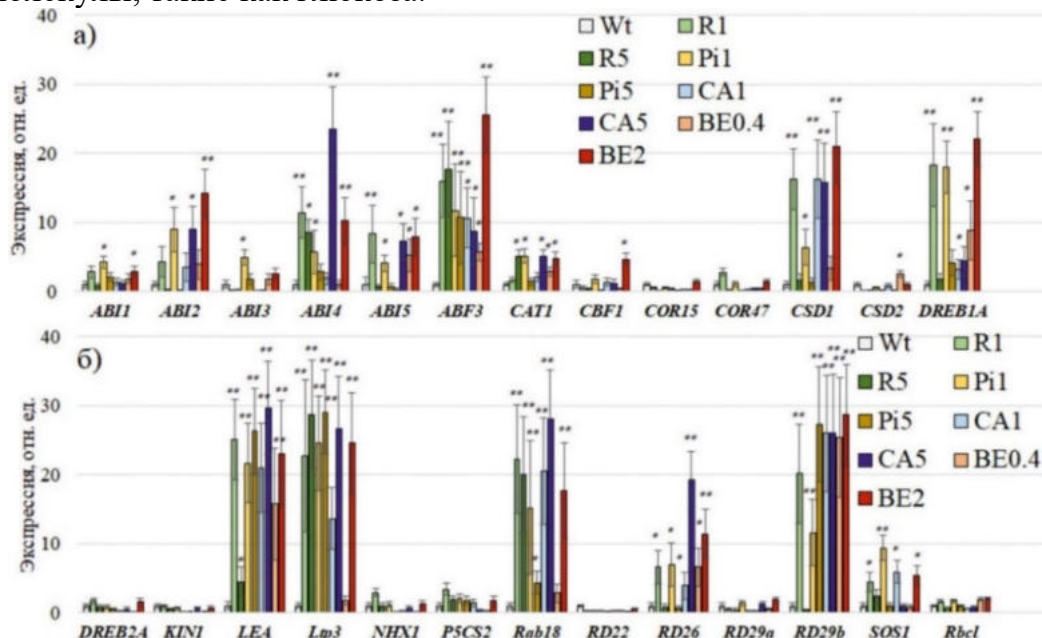


Рисунок 21. Уровень количества транскриптов стресс-чувствительных генов *AtABI1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *AtABF3*, *AtCAT1*, *AtCBF1*, *AtCOR15*, *47*, *AtCSD1*, *2*, *AtDREB1A*, *2A*, *AtKIN1*, *AtLEA*, *AtLtp3*, *AtNHX1*, *AtP5CS2*, *AtRab18*, *AtRD22*, *26*, *29a*, *29b*, *AtSOS1* и *AtRbcL* в проростках *Arabidopsis thaliana*, обработанных стильбенами или пара-кумаровой кислотой. Wt – проростки *A. thaliana* дикого типа; R1 и R5 – проростки *A. thaliana*, выращенные на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением т-резвератрола 1 и 5 мМ; Pi1 и Pi5 – т-пицеида 1 и 5 мМ; CA1 и CA5 – пара-кумаровой кислоты 1 и 5 мМ; BE1 и BE5 – экстракта еловой коры 0.4 и 2 г/л. Данные представлены в виде среднего значения \pm SE (два независимых эксперимента с двадцатью техническими повторениями). ** – $p < 0.01$; * – $p < 0.05$ по сравнению со значениями контрольных растений, обработанных водой, согласно t-критерию Стьюдента.

Наше исследование показало, что использование стильбенов и СА значительно увеличивало экспрессию примерно половины генов, реагирующих на стресс, которые мы проанализировали. Это указывает на то, что эти обработки оказывают сильное влияние на систему защиты растений (Рисунок 21). В частности, экспрессия генов, связанных с метаболизмом АВА (*AtABI2*, *4*, *5* и *AtABF3*), антиоксидантными генами (*AtCAT1*, *AtCSD1*), факторами транскрипции (*AtDREB1A*, *AtRD26*), генами дегидрина (*AtLEA*, *AtRab18*), геном белка переноса липидов (*AtLtp3*), гены без известных физиологических ролей (*AtRD29b*) и гены-переносчики ионов (*AtSOS1*) были значительно увеличены после обработки стильбенами и СА (Рисунок 21). Интересно, что воздействие используемых веществ на гены, чувствительные к стрессу, было аналогично их воздействию на гены биосинтеза фитогормонов. Если обработка веществами оказывала положительное воздействие на экспрессию анализируемых генов, то большинство используемых соединений также оказывали положительный эффект. Это можно объяснить наличием фенольных колец в структуре всех используемых нами веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что стильбены участвуют как в конститутивных, так и в активных защитных реакциях растений, обеспечивая устойчивость от различных биотических и абиотических стрессовых воздействий (Dubrovina and Kiselev, 2017). Этот факт вызывает большой интерес к данной группе веществ. Известно, что коммерчески доступные чистые препараты резвератрола и его производных имеют высокую стоимость, что осложняет применение этих веществ в полевых условиях. Поэтому встает актуальный вопрос об альтернативных источниках этих веществ, который мы детально рассмотрели в пределах данной работы.

Содержание стильбенов было подробно исследовано в различных органах дальневосточных растений и в культурах клеток, полученных из них. Детальный анализ литературных данных и наших результатов показал, что наибольшее содержание стильбенов обнаружено в коре хвойных деревьев (ель, сосна). Так, общее содержание стильбенов в коре ели аянской *P. jezoensis* достигало 230-251 мг/г от сухой массы, что на данный момент является наиболее высоким содержанием стильбенов среди известных естественных источников.

Преобладающими по количеству среди стильбенов в коре хвойных были т-изорапонтин (в ели, тетрагидроксилированный стильбен с метоксигруппой), т-астрингин (в ели, тетрагидрокси-транс-стильбен), т-пиностильбенозид (в сосне, гликозилированный дигидроксилированный стильбен с метоксигруппой) и т-пицеид (в ели и сосне, гликозид резвератрола). Таким образом, в коре хвойных присутствует много гликозидов резвератрола и его производных, что при доступности исходного материала, дает возможность рассматривать данный материал как богатый и недорогой натуральный источник стильбенов.

Содержание стильбенов в клеточных культурах винограда было низким (менее 1 мг/г сухой массы), но применение классических и современных биотехнологических приемов позволило значительно повысить содержание стильбенов (до 32 мг/г сухой массы). Наиболее сильными стимулами для увеличения биосинтеза стильбенов стали ультрафиолетовое облучение и сверхэкспрессия генов *rolB* и некоторых генов *CDPK* (в первую очередь *VaCPK20*). Однако полученный уровень стильбенов был значительно меньше, чем в ранее описанных растительных источниках, и более того, он не отличался стабильностью. Поэтому эксперименты по обработке культур клеток растений регуляторными молекулами, стрессовыми условиями и сверхэкспрессии генов имели в большей степени фундаментальное значение, поскольку помогли разобраться в особенностях регуляции биосинтеза стильбенов в клетках растений на молекулярном уровне.

Детали молекулярно-генетического механизма, стимулирующего биосинтез стильбенов растений, были изучены недостаточно. Поэтому в настоящей работе было дополнено общее представление о регуляции биосинтеза стильбенов и описаны основные участники данного процесса. Анализ современной литературы и наших результатов (Таблица 7, 8) показывает, что с биохимической точки зрения биосинтез стильбенов регулируется сигнальными системами растений, в частности кальциевой сигнальной системой, а также стрессовыми фитогормонами (SA, JA, ET, ABA) и продукцией АФК.

Наши исследования позволили идентифицировать растительные протеинкиназы (СРК) и факторы транскрипции (MYB40, MYB60) в качестве вероятных важнейших регуляторов биосинтеза стильбенов в растительных клетках (Таблица 8,9). Предполагается, что после восприятия сигнала рецепторы клеточной мембраны запускают каскад митоген-

активируемых протеинкиназ или MAPK-сигнальную систему растений (Bigeard and Hirt, 2018) и/или индуцируют приток ионов Ca^{2+} , что затем приводит к активации белков-сенсоров Ca^{2+} , включая СРК. Активированный каскад MAPK, СРК и, предположительно, других сенсоров Ca^{2+} (например, Cml, CBL и др.) могут затем запускать выработку АФК и способствовать передаче сигналов растительных гормонов (Рисунок 22).

СРК ответственны за активацию растительной NADPH-оксидазы, которая известна как основной участник окислительного взрыва в ответ на растительные патогены (Adachi and Yoshioka, 2015). Известно, что выработка АФК, в свою очередь, активирует передачу сигналов фитогормонов, которые затем активируют биосинтез стилибенов. Таким образом, АФК и стрессовые фитогормоны, по-видимому, служат промежуточными звеньями в сигнальном пути для экспрессии генов биосинтеза стилибенов. Было показано, что NO активирует отток Ca^{2+} из внутренних хранилищ и запускает выработку АФК (Vandelle et al. 2006) и, таким образом, может усилить индукцию пути биосинтеза стилибенов.

СРК, каскад MAPK и гормональная сигнализация могут активировать экспрессию *STS* и других генов, ответственных за биосинтез стилибенов, скорее всего посредством активации транскрипционных факторов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, фосфорилируются ли транскрипционные факторы, участвующие в регуляции биосинтеза стилибенов, растительными СРК и MAPK. Ранее были идентифицированы некоторые растительные СРК как киназы, фосфорилирующие фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL), важный элемент в биосинтезе фенилпропаноидов, включая стилибены (Allwood et al. 2002). Следовательно, возможно, что в растительных клетках существуют более короткие пути активации биосинтеза стилибенов по сравнению с путями, включающими индукцию транскрипции стилибен синтаз (*STS*) с помощью специфических транскрипционных факторов (Рисунок 22).

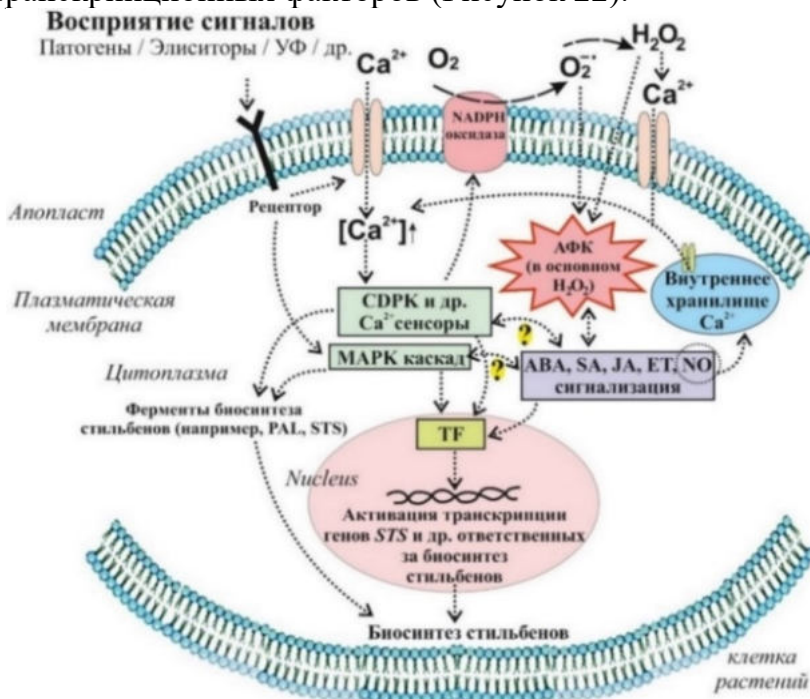


Рисунок 22. Гипотетическая модель передачи сигнала, приводящая к активации биосинтеза стилибенов в клетках растений. Ультрафиолетовое (УФ) излучение, элиситоры, эффекторы патогенов и другие сигналы окружающей среды воспринимаются специфическими рецепторами. Распознавание внешнего сигнала приводит к устойчивому притоку Ca^{2+} ,

повышению уровня цитоплазматического кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), активации каскадов протеинкиназ и выработке активных форм кислорода (АФК). Это способствует передаче сигналов от растительных гормонов и активации ряда транскрипционных факторов (TF) либо генов биосинтеза стилибенов (например, PAL – фенилаланин-аммиак-лиазы). TF активируют транскрипцию генов, ответственных за биосинтез стилибенов. Оксид азота (NO) активирует отток Ca^{2+} из внутренних хранилищ и запускает выработку АФК. СРК –

Ca²⁺-зависимые протеинкиназы; MAPKs – митогенактивированные протеинкиназы; АФК - активные формы кислорода.

Важной прикладной частью данной работы стало исследование применения стильбенов и их прямых предшественников в защите растений от биотических и абиотических стрессов. Впервые было показано, что стильбены (*m*-резвератрол, *m*-пицеид и др.) при прямой обработке растений или при повышенной продукции в клетках растений, через трансформацию генами биосинтеза стильбенов (гены *STS*), оказывают положительное влияние на устойчивость растений к губительному воздействию ультрафиолетового облучения и к повышенным температурам (например, Рисунок 16, 18, 19). Поэтому в настоящей работе предложено использовать экстракты растений богатых источниками (ели или сосны) в качестве стимуляторов защитных реакций растений, что может быть активно востребовано в сельском хозяйстве.

Интересно отметить, что в природе ультрафиолетовое облучение и повышенные температуры чаще всего являются сопутствующими стрессовыми факторами, которые одновременно поражают растения в летний жаркий период. Более того, было показано, что повышение содержания стильбенов в тканях винограда приводило к большей устойчивости растений против бактериальных и грибных патогенов (Hatmi et al. 2014; Dubrovina and Kiselev, 2017).

Полученный достоверный эффект устойчивости растений к описанным стрессовым воздействиям вероятно можно объяснить тем, что стильбены действуют в растении на разном уровне организации живой материи: сначала на поверхности растений и в апопласте, потом уже после проникновения в клетки растений (Рисунок 23). После внешней обработки растения значительная часть стильбенов оказывается на поверхности листьев и здесь напрямую воздействует на патогены. Особенности ингибирования роста и развития патогенов растений стильбенами описаны во многих работах и это не вызывает сомнений (Hatmi et al. 2014; Lygin et al. 2014). Более того, стильбены эффективно защищают растение от ряда абиотических стрессов, например, против губительного ультрафиолетового облучения, где на этом уровне стильбены могут связывать избыточную энергию фотонов света путем перехода в цис-формы при затрате энергии фотонов (Figueiras et al. 2011).

В случае попадания патогенов внутрь клеток растений, микроорганизмы начинают оказывать негативное воздействие на клетки, что автоматически приводит к накоплению активных форм кислорода (АФК). Избыточное накопление АФК приводит в множественным негативным воздействиям, что может привести к гибели клеток и целого растения. После внешней обработки растения стильбены проникают внутрь клеток растений, и, более того, при сверхэкспрессии генов *STS*, стильбены могут синтезироваться в цитоплазме и накапливаться в вакуолях клеток (Chang et al. 2011). Таким образом, и внутри растения стильбены также могут воздействовать напрямую на патогенные микроорганизмы. Известно, что стильбены обладают выраженными антиоксидантными свойствами (de la Lastra and Villegas, 2007), поэтому они могут сдерживать развитие окислительного взрыва путем связывания с АФК (Рисунок 23), что в итоге так же имеет положительное влияние на выживаемость растений.

Полученные в настоящей работе данные (Рисунок 20, 21) показывают, что после внешней обработки растений стильбенами или после индукции биосинтеза фенольных соединений с помощью добавления предшественников фенольных веществ происходит активация экспрессии определенных генов метаболизма фитогормонов и генов, связанных с защитными реакциями растений. Активации подвергаются некоторые гены биосинтеза и

метаболизма ауксинов, гиббереллинов, абсцизовой кислоты, гены антиоксидантов и дегидринов, что в свою очередь запускает целый каскад ответных защитных реакций.

Наблюдаемая активация экспрессии генов метаболизма фитогормонов и генов, связанных с защитными реакциями растений, была выборочная и синхронная (Рисунок 20, 21), т.е. активация происходила не всех исследуемых генов, а если положительно действовал резвератрол, то и остальные стилибены увеличивали экспрессию эти гены. Это говорит о специфичном действии стилибенов, как бывает в случае связывания с определенными специфическими рецепторами и дальнейшей активацией соответствующих транскрипционных факторов, связанных с этими рецепторами.

Сходное действие используемых стилибенов и пара-кумаровой кислоты, предшественника фенольных соединений (активация одних и тех же семейств генов) свидетельствует о том, что общие элементы структуры используемых веществ и приводят к наблюдаемым эффектам.

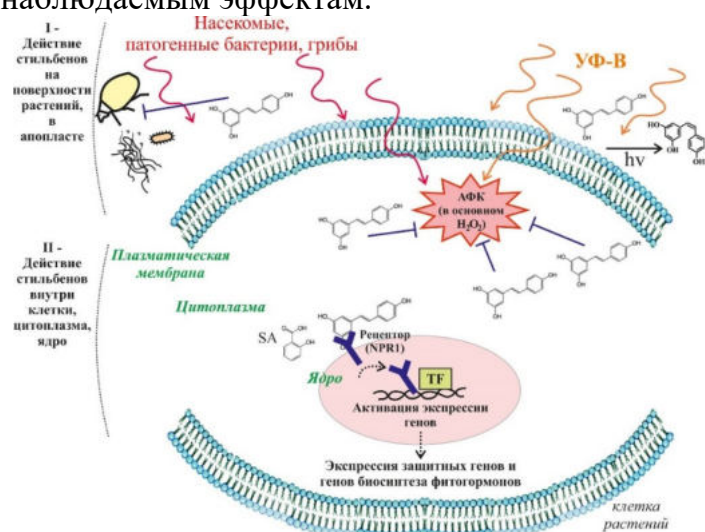


Рисунок 23.

Предположительная модель действия стилибенов в растениях. Стилибены на модели представлены в виде молекул транс- и цис-резвератрола. АФК – активные формы кислорода; SA – салициловая кислота; УФ-В – ультрафиолет В; TF – факторы транскрипции.

Важно отметить, что во всех используемых в работе веществах в химической структуре присутствует фенольное кольцо. Интересно, что салициловая кислота, известный стрессовый фитогормон растений, также в своей структуре содержит фенольное кольцо. Известно, что для салициловой кислоты ключевым белком является NPR1 (Wu et al. 2012). Белок NPR1 взаимодействует с рядом транскрипционных факторов, которые в свою очередь активируют экспрессию PR белков. Возможно, и в нашем случае происходит активация NPR1 белков или похожих белков, что и приводит к наблюдаемым эффектам активации экспрессии ряда генов биосинтеза фитогормонов и защитных генов (Рисунок 20, 21).

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что стилибены (на примере т-резвератрола и т-пицеида) могут стимулировать экспрессию ряда генов (например, гены метаболизма фитогормонов и стресс-чувствительные гены). Это значит, что стилибены сами по себе являются регуляторами защитных свойств растений и их действие в клетках растений выходит за простое предположение об их прямом влиянии на патогены или на АФК.

ВЫВОДЫ

1. Содержание и состав стильбенов в культурах клеток и тканях растений, произрастающих на Дальнем Востоке РФ (виноград амурский *V. amurensis*, ель аянская *P. jezoensis* и сосна корейская *P. koraiensis*), заметно отличаются и зависят от вида растения, тканевого источника, сезона и действия стрессовых факторов. Наиболее перспективным естественным источником стильбенов является кора ели *P. jezoensis*, где содержание стильбенов достигает 251 мг/г от сухой массы.

2. Биосинтез стильбенов в условиях естественного роста клеток растений и при воздействии стрессовых факторов регулируется кальциевой сигнальной системой. Выполнен детальный анализ экспрессии генов всех известных кальциевых сенсоров растений в клетках винограда *V. amurensis* (*Cam*, *CBL*, *CIPK*, *CML*, *CPK*). Содержание и биосинтез стильбенов в клетке обусловлены активностью ряда кальций-зависимых протеинкиназ (*VaCPK1*, 9, 16, 20, 25, 26, 29, 32) и кальмодулин-подобных белков (*VaCML65*).

3. Активаторами биосинтеза стильбенов в культурах клеток винограда *V. amurensis* являются регуляторные гены, включая гены *rol* агробактерий *A. rhizogenes* и гены *CPK*, *CML* и *Myb* винограда *V. amurensis*. Наибольшее стимулирующее влияние на содержание стильбенов оказывает биотехнологическая трансформация культур клеток *V. amurensis* генами *rolB*, *VaCPK20* или *VaMyb60*, увеличивая содержание стильбенов до 32 мг/г от сухой массы клеток.

4. Избирательная сверхэкспрессия структурных генов *STS* в культуре клеток винограда активирует биосинтез стильбенов в значительно меньшей степени, чем при использовании регуляторных генов (*rol*, *CPK*, *CML* или *Myb*).

5. Растительные стильбены (*m*-резвератрол, *m*-пицеид, экстракт ели) имеют защитное значение для листьев винограда и растений *A. thaliana* от воздействия ультрафиолета и теплового стресса, увеличивая выживаемость растений в 1.5-2 раза по сравнению с контролем.

6. Сверхэкспрессия отдельных генов *STS* *V. amurensis* в растениях *A. thaliana* увеличивает устойчивость листьев к обработке ультрафиолетом. Выживаемость листьев *A. thaliana* при трансформации геном *VaSTS1* была значительно выше, чем при трансформации геном *VaSTS7*.

7. Таким образом, впервые показано, что регуляторная роль стильбенов проявляется в дифференциальном влиянии на экспрессию важных регуляторных и защитных генов у растений. Экзогенные стильбены достоверно увеличивали экспрессию генов биосинтеза ауксинов, гиббереллинов и абсцизовой кислоты у растений *A. thaliana* и не влияли на экспрессию генов, связанных с биосинтезом цитокининов и этилена. Кроме того, стильбены селективно увеличивали экспрессию защитных генов *A. thaliana* (некоторых антиоксидантных генов, генов факторов транскрипции, дегидринов, белков переноса липидов и переносчиков ионов).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ, и в приравняемых к ним периодических изданиях, входящих хотя бы в одну из библиографических баз цитирования (Web of Science или Scopus).

1. **Kiselev K.V.**, Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // Journal of Biotechnology. 2007. V. 128. P. 681-692.
2. Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.**, Veselova M.V., Isaeva G.A., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in *CDPK* gene expression // Journal of Plant Physiology. 2009. V. 166. P. 1194-1206.
3. **Kiselev K.V.**, Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. V. 82. P. 647-655.
4. **Kiselev K.V.**, Dubrovina A.S., Isaeva G.A., Zhuravlev Y.N. The effect of salicylic acid on phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *Vitis amurensis* cell culture // Russian Journal of Plant Physiology. 2010. V. 57. P. 415-448.
5. **Kiselev K.V.**, Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene *PgCDPK1a* in roots, leaves, and cell cultures of *Panax ginseng* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2010. V. 103. P. 197-204.
6. Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., **Kiselev K.V.** (2010) Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2010. V. 88. P. 727-736.
7. **Kiselev K.V.**, Tyunin A.P., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N. Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2011. V. 105. P. 65-72.
8. **Kiselev K.V.** Perspectives for production and application of resveratrol // Applied Microbiology and Biotechnology. 2011. V. 90. P. 417-425.
9. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., **Kiselev K.V.** Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with coumaric acid // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2011. V. 165. P. 1427-1436.
10. Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Effect of long-term cultivation on resveratrol accumulation in a high-producing cell culture of *Vitis amurensis* // Acta Physiologiae Plantarum. 2012. V. 34. P. 1101-1106.
11. **Kiselev K.V.**, Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Mazeika A.N. Influence of calcium influx induced by the calcium ionophore, A23187, on resveratrol content and the expression of *CDPK* and *STS* genes in the cell cultures of *Vitis amurensis* // Plant Growth Regulation. 2012. V. 68. P. 371-381.
12. Tyunin A.P., **Kiselev K.V.**, Zhuravlev Y.N. Effects of 5-azacytidine induced DNA demethylation on methyltransferase gene expression and resveratrol production in cell cultures of *Vitis amurensis* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2012. V. 111. P. 91-100.
13. **Kiselev K.V.**, Shumakova O.A., Manyakhin A.Y. Effect of plant stilbene precursors on the biosynthesis of resveratrol in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures // Applied Biochemistry and Microbiology. 2013. V. 49. P. 53-58.
14. **Kiselev K.V.**, Tyunin A.P., Zhuravlev Y.N. Involvement of DNA methylation in the regulation of *STS10* gene expression in *Vitis amurensis* // Planta. 2013. V. 237. P. 933-941.
15. **Kiselev K.V.**, Dubrovina A.S., Shumakova O.A., Karetin Y.A., Manyakhin A.Y. Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, *CDPK3a*, in leaves, stems, grapes, and cell cultures of wild-growing grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // Plant Cell Reports. 2013. V. 32. P. 431-442.
16. **Kiselev K.V.**, Tyunin A.P., Karetin Y.A. Influence of 5-azacytidine and salicylic acid on demethylase gene expression in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. // Acta Physiologiae Plantarum. 2013. V. 35. P. 1843-1851.

17. Tyunin A.P., **Kiselev K.V.**, Karetin Y.A. Differences in the methylation patterns of the *VaSTS1* and *VaSTS10* genes of *Vitis amurensis* Rupr. // *Biotechnology Letters*. 2013. V. 35. P. 1525-1532.
18. **Kiselev K.V.**, Shumakova O.A., Manyakhin A.Y. Effects of the calmodulin antagonist W7 on resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* Rupr. // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2013. V. 31. P. 1569-1575.
19. Aleynova-Shumakova O.A., Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., **Kiselev K.V.** *VaCPK20* gene overexpression significantly increased resveratrol content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. V. 98. P. 5541-5549.
20. **Kiselev K.V.**, Tyunin A.P., Karetin Y.A. Salicylic acid induces alterations in the methylation pattern of the *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS10* genes in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures // *Plant Cell Reports*. 2015. V. 34. P. 311-320.
21. Aleynova O.A., Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., **Kiselev K.V.** Regulation of resveratrol production in *Vitis amurensis* cell cultures by calcium-dependent protein kinases // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015. V. 175. P. 1460-1476.
22. **Kiselev K.V.**, Aleynova O.A. Influence of overexpression of stilbene synthase *VaSTS7* gene on resveratrol production in transgenic cell cultures of grape *Vitis amurensis* Rupr. // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2016. V. 52. P. 56-60.
23. Tyunin A.P., **Kiselev K.V.** Alternations in *VaSTS* gene cytosine methylation and t-resveratrol production in response to UV-C irradiation in *Vitis amurensis* Rupr. cells // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016. V. 124. P. 33-45.
24. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., **Kiselev K.V.** Influence of overexpression of the true and false alternative transcripts of calcium-dependent protein kinase *CPK9* and *CPK3a* genes on the growth, stress tolerance, and resveratrol content in *Vitis amurensis* cell cultures // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2016. V. 38. P. 78.
25. Aleynova O.A., Grigorchuk V.P., Dubrovina A.S., Rybin V.G., **Kiselev K.V.** Stilbene accumulation in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. overexpressing *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS7* genes // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016. V. 125. P. 329-339.
26. **Kiselev K.V.**, Ogneva Z.V., Suprun A.R., Zhuravlev Y.N. Expression of the stilbene synthase genes in the needles of spruce *Picea jezoensis* // *Russian Journal of Genetics*. 2016. V. 52. P. 1157-1163
27. **Kiselev K.V.**, Grigorchuk V.P., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Dubrovina A.S. Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis* // *Phytochemistry*. 2016. V. 131. P. 57-67.
28. Tyunin A.P., **Kiselev K.V.** Influence of increased expression of *VaMyb1* transcription factor on biosynthesis of resveratrol in the cells of Amur grape (*Vitis amurensis*) // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017. V. 64. P. 41-47.
29. **Kiselev K.V.**, Aleynova O.A., Grigorchuk V.P., Dubrovina A.S. Stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // *Planta*. 2017. V. 245. P. 151-159.
30. **Kiselev K.V.**, Aleynova O.A., Tyunin A.P. Expression of the R2R3 MYB transcription factors in *Vitis amurensis* Rupr. plants and cell cultures with different resveratrol content // *Russian Journal of Genetics*. 2017. V. 53. P. 465-471.
31. Aleynova O.A., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Activation of stilbene synthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* by calcium-dependent protein kinases *VaCPK1* and *VaCPK26* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2017. V. 130. P. 141-152.
32. Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Regulation of stilbene biosynthesis in plants // *Planta*. 2017. V. 346. P. 597-623.
33. Tyunin A.P., Nityagovsky N.N., Grigorchuk V.P., **Kiselev K.V.** Stilbene content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with cinnamic and caffeic acids // *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2018. V. 65. P. 150-155.
34. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Manyakhin A.Y., **Kiselev K.V.** The role of calcium-dependent protein kinase genes *CPK16*, *CPK25*, *CPK30*, and *CPK32* in stilbene biosynthesis and the stress

resistance of grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. V. 54. P. 410-417.

35. Tyunin A.P., Suprun A.R., Nityagovsky N.N., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** The effect of explant origin and collection season on stilbene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2019. V. 136. P. 189-196.

36. **Kiselev K.V.**, Ogneva Z.V., Suprun A.R., Grigorochuk V.P., Dubrovina A.S. Action of ultraviolet-C radiation and p-coumaric acid on stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis-related genes in the grapevine *Vitis amurensis* Rupr // Acta Physiologiae Plantarum. 2019. V. 41. P. 28.

37. **Kiselev K.V.**, Grigorochuk V.P., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Dubrovina A.S. The effect of ultraviolet-C and precursor feeding on stilbene biosynthesis in spruce *Picea jezoensis* // Journal of Plant Physiology. 2019. V. 234-235. P. 133-137.

38. Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** The role of calcium-dependent protein kinase genes *VaCPK1* and *VaCPK26* in the response of *Vitis amurensis* (*in vitro*) and *Arabidopsis thaliana* (*in vivo*) to abiotic stresses // Russian Journal of Genetics. 2019. V. 55. P. 319-329.

39. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Ananov A.A., **Kiselev K.V.** The effect of abiotic stress conditions on expression of calmodulin (*CaM*) and calmodulin-like (*CML*) genes in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* // Plants. 2019. V. 8. Article ID 602.

40. Suprun A.R., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Effect of spruce *PjST1a*, *PjST2*, or *PjST3* gene overexpression on stilbene biosynthesis in callus cultures of *Vitis amurensis* Rupr. // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2020. V. 67. P. 234-239.

41. Tyunin A.P., Nityagovsky N.N., Karetin Y.A., **Kiselev K.V.** The comparative analysis of stilbene production in cell cultures of two East Asian grape species *Vitis amurensis* Rupr. and *Vitis coignetiae* Pulliat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2020. V. 142. P. 121-129.

42. Aleynova O.A., **Kiselev K.V.**, Ogneva Z.V., Dubrovina A.S. The grapevine calmodulin-like protein gene *CML21* is regulated by alternative splicing and involved in abiotic stress response // International Journal of Molecular Sciences. 2020. V. 21. Article ID 7939.

43. **Kiselev K.V.**, Dubrovina A.S. Overexpression of stilbene synthase genes to modulate the properties of plants and plant cell cultures // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2021. V. 68. P. 13-19.

44. Ogneva Z.V., Aleynova O.A., Suprun A.R., Karetin Y.A., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing grapevine *VaST1* or *VaST7* genes to cold, heat, drought, salinity, and ultraviolet irradiation // Biologia Plantarum. 2021. V. 65. P. 111-117.

45. **Kiselev K.V.**, Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Ananov A.A., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S. The effect of stress hormones, UV-C, and stilbene precursors on calmodulin (*CaM*) and calmodulin-like gene (*CML*) expression in *Vitis amurensis* Rupr. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2021. V. 146. P. 59-68.

46. Suprun A.R., Dubrovina A.S., Tyunin A.P., **Kiselev K.V.** Profile of stilbenes and other phenolics in Fanagoria white and red Russian wines // Metabolites. 2021. V. 11. Article ID 213.

47. Aleynova O.A., Suprun A.R., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** The influence of the grapevine bacterial and fungal endophytes on biomass accumulation and stilbene production by the *in vitro* cultivated cells of *Vitis amurensis* Rupr. // Plants. 2021. V. 10. Article ID 1276.

48. Ogneva Z.V., Volkonskaia V.V., Dubrovina A.S., Suprun A.R., Aleynova O.A., **Kiselev K.V.** Exogenous stilbenes improved tolerance of *Arabidopsis thaliana* to a shock of ultraviolet B radiation // Plants. 2021. V. 10. Article ID 1282.

49. Suprun A.R., Dubrovina A.S., Aleynova O.A., **Kiselev K.V.** The bark of the spruce *Picea jezoensis* is a rich source of stilbenes // Metabolites. 2021. V. 11. Article ID 714.

50. Aleynova O.A., Suprun A.R., Ananov A.A., Nityagovsky N.N., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Effect of calmodulin-like gene (*CML*) overexpression on stilbene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. // Plants. 2022. V. 11. Article ID 171.

51. Aleynova O.A., Nityagovsky N.N., Suprun A.R., **Kiselev K.V.** Enhancement of stilbene biosynthesis in grape-cell cultures by natural products based on endophytes of the wild grape species *Vitis amurensis* Rupr. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2022. V. 58. P. 45-56.

52. Ananov A.A., Suprun A.R., Aleynova O.A., Nityagovsky N.N., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** Effect of *VaMyb40* and *VaMyb60* overexpression on stilbene biosynthesis in cell cultures of grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // Plants. 2022. V. 11. Article ID 1916.

53. **Kiselev K.V.**, Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Ananov A.A., Nityagovsky N.N., Dneprovskaya A.A., Beresh A.A., Dubrovina A.S. The effect of stress hormones, ultraviolet C, and stilbene precursors on expression of calcineurin b-like protein (CBL) and CBL-interacting protein kinase (CIPK) genes in cell cultures and leaves of *Vitis amurensis* Rupr. // Plants. 2023. V. 12. Article ID 1562.

54. **Kiselev K.V.**, Ogneva Z.V., Aleynova O.A., Suprun A.R., Ananov A.A., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S. Influence of the 135 bp Intron on stilbene synthase *VaSTS11* transgene expression in cell cultures of grapevine and different plant generations of *Arabidopsis thaliana* // Horticulturae. 2023. V. 9. Article ID 513.

55. Suprun A.R., Dubrovina A.S., Grigorchuk V.P., **Kiselev K.V.** Stilbene content and expression of stilbene synthase genes in korean pine *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. // Forests. 2023. V. 14. Article ID 1239.

56. Aleynova O.A., **Kiselev K.V.**, Suprun A.R., Ananov A.A., Dubrovina A.S. Involvement of the calmodulin-like protein gene *VaCML92* in grapevine abiotic stress response and stilbene production // International Journal of Molecular Sciences. 2023. V. 24. Article ID 15827.

57. Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Ananov A.A., Nityagovsky N.N., Beresh A.A., Dubrovina A.S., **Kiselev K.V.** The effect of external treatment of *Arabidopsis thaliana* with plant-derived stilbene compounds on plant resistance to abiotic stresses // Plants. 2024. V.13. Article ID 184.

Патенты:

58. Федореев С.А., **Киселев К.В.**, Дубровина А.С., Веселова М.В., Кулеш Н.И., Булгаков В.П., Журавлев Ю.Н. Патент Российской Федерации. Способ получения резвератрола. С12N 5/04, С12N 15/05, А01Н 1/04. Заявка 2006135294. Решение о выдаче патента от 19.10.2007 г.

59. Супрун А.Р., Огнева З.В., Алейнова О.А., Дубровина А.С., **Киселев К.В.** Патент Российской Федерации «Способ увеличения устойчивости растений к воздействию ультрафиолета» № 2733119. Приоритет от 06 апреля 2020 г.

Работы, опубликованные в материалах всероссийских и международных научных конференциях:

60. **Kiselev K.V.**, Shumakova O.A., Dubrovina A.S. Resveratrol production by grape cell cultures overexpressing *CDPK* genes // 11th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Beijing, China, 2014, V. 1., P. 103-104.

61. Tyunin A.P., **Kiselev K.V.** Stilbene synthase genes transcriptional regulation in cultured cells of *Vitis amurensis* Rupr. // 3-я международная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений PlantGen 2015», Новосибирск, Россия, 2015 г., с. 60.

62. Алейнова О.А., **Киселев К.В.** Анализ вторичных метаболитов растений *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS1*, *VaSTS2* и *VaSTS3* винограда амурского *Vitis amurensis* // Конференция «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений», Москва, Россия, 2015 г., с. 752-754.

63. **Киселев К.В.**, Дубровина А.С., Алейнова О.А. Регуляция биосинтеза резвератрола в культурах клеток винограда *Vitis amurensis* Rupr. с помощью генов кальций-зависимых протеинкиназ // Научная конференция «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», Санкт-Петербург, Россия, 2016 г., с. 118-119.

64. Супрун А.Р., Огнева З.В., **Киселев К.В.** Структура и экспрессия генов стилибен синтаз у ели аянской *Picea jezoensis* (Sieb. et Zucc.) // Научная конференция «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», Санкт-Петербург, Россия, 2016 г., с. 252-253.

65. **Киселев К.В.** Регуляция биосинтеза стильбенов в клетках виноград // V молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 2016 г., с. 3.

66. **Киселев К.В.** Содержание стильбенов в растениях семейства виноградные // VII международная научная конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», Ялта, Россия, 2016 г., с. 227.

67. Супрун А.Р., Огнева З.В., Дубровина А.С., **Киселев К.В.** Действие *p*-кумаровой кислоты и кофейной кислоты, а так же ультрафиолета-С на накопление стильбенов и экспрессию генов, участвующих в биосинтезе стильбенов в хвое ели аянской *Picea jezoensis* // Всероссийская научная конференция «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», Иркутск, Россия, 2018 г., с. 742-743.

68. Огнева З.В., Алейнова О.А., Супрун А.Р., Ананьев А.А., Дубровина А.С., **Киселев К.В.** Экспрессия сплайсированных вариантов мРНК генов кальций-зависимых протеинкиназ *CPK21* и *CPK26* в винограде амурском *Vitis amurensis* Rupr. под воздействием абиотических стрессов // Всероссийская научная конференция "Физиология растений - основа создания растений будущего", Казань, Россия, 2019 г., с. 320.

69. Супрун А.Р., Огнева З.В., Алейнова О.А., Ананьев А.А., **Киселев К.В.**, Дубровина А.С. 2019. Экспрессия генов кальмодулинов и кальмодулин-подобных белков под воздействием абиотических стрессов в винограде амурском *Vitis amurensis* Rupr. // Всероссийская научная конференция "Физиология растений - основа создания растений будущего", Казань, Россия, 2019 г., с. 416.

70. **Kiselev K.V.**, Aleynova O.A., Dubrovina A.S., Suprun A.R., Ogneva Z.V. The effect of external treatment of *Arabidopsis thaliana* with plant-derived stilbene compounds on plant resistance to abiotic stresses // VII Международная научная конференция «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений», Казань, Россия, 2023 г., с. 189.

71. Ogneva Z.V., **Kiselev K.V.**, Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Suprun A.R., Ananьев A.A., Nityagovsky N.N. Influence of the 135 bp intron on stilbene synthase *VaSTS11* transgene expression in cell cultures of grapevine and different plant generations of *Arabidopsis thaliana* // VII Международная научная конференция «Генетика, Геномика, Биоинформатика и Биотехнология растений», Казань, Россия, 2023 г., с. 287.

КИСЕЛЕВ
КОНСТАНТИН ВАДИМОВИЧ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

**РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА И ЗНАЧЕНИЕ
СТИЛЬБЕНОВ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ**