

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

На правах рукописи

КИСЕЛЕВ Константин Вадимович

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

1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

ВЛАДИВОСТОК
2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1.1. Стельбены: распространение и значение для растений.	16
1.2. Биологически активные свойства <i>m</i> -резвератрола и других стельбенов.	19
1.4. Биосинтез резвератрола и других стельбенов.	43
1.5. Регуляция биосинтеза резвератрола и других стельбенов.	46
1.5.1. Биотические и абиотические стрессы как регуляторы биосинтеза стельбенов.	46
1.5.2. Регуляция биосинтеза стельбенов с помощью кальциевой сигнальной системы.	52
1.5.3. Регуляция биосинтеза стельбенов с помощью активных форм кислорода (АФК).	56
1.5.4. Регуляция биосинтеза стельбенов с помощью фитогормонов.	57
1.5.5. Регуляция биосинтеза стельбенов с помощью транскрипционных факторов.	60
1.5.6. Участие метилирования ДНК в регуляции биосинтеза стельбенов. .	63
1.5.7. Значение предшественников вторичных метаболитов и доступности питательных веществ для биосинтеза стельбенов.	65
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	68
2.1. Растительный материал и клеточные культуры	68
2.2. Генетическая агробактериальная трансформация культур клеток винограда и растений арабидопсиса.	69

2.3. Обработка культур клеток винограда индукторами биосинтеза стильбенов и другими эффекторами	75
2.4. Обработка листьев растений винограда, хвои ели и арабидопсиса	77
2.5. Выделение нуклеиновых кислот и синтез кДНК	79
2.6. Количественный и полуколичественный анализ экспрессии генов <i>rol</i> , <i>PAL</i> , <i>STS</i> , <i>CPK</i> , <i>CML</i> , <i>CCaMK</i> и <i>Myb</i> с помощью ПЦР	79
2.7. Секвенирование ДНК	84
2.8. Бисульфитное секвенирование	85
2.9. Определение содержания стильбенов в тканях винограда, ели и сосны	86
2.10. Статистический анализ полученных результатов	86
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	88
3.1. Накопление стильбенов в тканях дальневосточных растений.	88
3.1.1. Накопление стильбенов в растениях ели аянской <i>P. jezoensis</i> и сосне корейской <i>P. koraiensis</i>	88
3.1.2. Накопление стильбенов в растениях винограда амурского <i>V. amurensis</i>	100
3.1.3. Накопление стильбенов в нетрансгенных каллусах <i>V. amurensis</i> после обработки УФ-С и при добавлении в питательные среды активаторов и ингибиторов биосинтеза вторичных метаболитов растений	107
3.1.4. Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах <i>V. amurensis</i> , сверхэкспрессирующих гены <i>rol</i> из агробактерий	112
3.1.5. Экспрессия генов кальциевых сенсоров растений в винограде амурском <i>V. amurensis</i> после увеличения содержания стильбенов	115

3.1.6. Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах винограда амурского <i>V. amurensis</i> , сверхэкспрессирующих гены кальциевых сенсоров растений	125
3.1.7. Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах винограда амурского <i>V. amurensis</i> , сверхэкспрессирующих гены транскрипционных факторов	129
3.1.8. Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах винограда амурского <i>V. amurensis</i> , сверхэкспрессирующих гены стильбен синтаз	131
3.1.9. Накопление стильбенов в трансгенных растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены стильбен синтаз.....	134
3.1.10. Устойчивость к абиотическим стрессам <i>VaSTS1</i> - и <i>VaSTS7</i> -трансгенных растений <i>A. thaliana</i>	142
3.1.11. Влияние обработки семян растений <i>A. thaliana</i> предшественниками фенольных соединений и стильбенами на дальнейшее развитие растений	145
3.1.12. Устойчивость растений <i>A. thaliana</i> при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами.....	147
3.1.13. Экспрессия генов метаболизма фитогормонов и защитных генов арабидопсиса при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами.....	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	155
ВЫВОДЫ.....	163
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	165

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФК – активные формы кислорода
- БАВ – биологически активные вещества,
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография,
- ПЦР – полимеразная цепная реакция,
- ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в реальном времени,
- ОТ-ПЦР – обратнo-транскрипционная полимеразная цепная реакция,
- С.О. – стандартная ошибка измерений,
- ЦПМ – цитоплазматическая мембрана,
- УФ-С – ультрафиолет средневолнового диапазона С,
- ЭР – эндоплазматический ретикулум,
- 4CL – кумарат-КоА-4-лигаза,
- АВА – абсцизовая кислота,
- ЕТ – этилен,
- СА – *para*-кумаровая кислота,
- С4Н – циннамат-4-гидроксилаза,
- $[Ca^{2+}]_{цит}$ – концентрация кальция в цитоплазме,
- СаМ – кальмодулин,
- СДРК – Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы,
- СДС – циклодекстрины,
- СНС – халкон синтаза,
- СОР – коронатина,
- ЖА – жасмоновая кислота,
- МАРК – митоген-активируемые киназы,
- МеЖА – метилжасмонат,
- НА – нифлумовая кислота,
- ОРДА – 12-оксо-фитодиеновой кислоты,
- РАЛ – фенилаланин-аммиак-лиаза,
- РАО – фениларсиноксид,

PG – эндополигалактуроназа,

PMT – пиносильвин-*O*-метилтрансфераза,

PFP –*p*-фтор-*DL*-фенилаланин,

Phe – фенилаланин,

PR-белки – белки, связанные с патогенезом,

SA – салициловая кислота,

SNP – нитропруссид натрия,

SOV – ортованадат натрия,

STS – стильбен синтаза,

Ser – серин,

Thr – треонин,

Tyr – тирозин.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследований

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; Khattar 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 *m*-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 *m*-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 А23187, 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 *m*-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 *m*-резвератрола, но общий уровень накопления стильбенов меньше, чем при трансформации регуляторными генами.

5. Трансформация растений *A. thaliana* генами *STS* приводит к появлению *m*-резвератрола и *m*-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).

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.

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. Федоревым 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.

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.

Благодарности. Автор выражает благодарность всем соавторам и коллегам, принимавшим участие в исследованиях, а также весь коллектив лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, в первую

очередь Дубровину А.С., Алейнову О.А. и Супруна А.Р. Основная часть исследований финансировались в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012200181-4) и грантов РФФИ (12-04-33069-мол_вед, 19-04-00063) и РНФ (№ 14-14-00366, 22-16-00078).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стильбены: распространение и значение для растений.

Стильбены представляют собой класс растительных фенольных вторичных метаболитов, характеризующихся наличием 1,2-дифенилэтиленового ядра со структурной формулой $C_6H_5-CH=CH-C_6H_5$ (Jeandet et al. 2012; 2010). Стильбены вызывают значительный интерес благодаря своим целебным свойствам, а также важной роли в защите растений от вредителей, патогенов и ряда абиотических стрессов. Большинство стильбенов представлено двумя стереоизомерами (*транс*- и *цис*-изомер или E- и Z-изомер), но в природе чаще встречаются и лучше изучены *транс*-изомеры.

Транс-резвератрол (*m*-резвератрол) и его производные (Рисунок 1), такие как птеростильбен, оксирезвератрол или виниферины, являются наиболее известными и широко изученными стильбенами из-за их разнообразных биологических активностей и лекарственных свойств, которые более подробно описаны в главе 1.2 (Kalantari and Das, 2010; Pangen et al. 2014; Estrela et al. 2013; Xu et al. 2014; Wang and Yao, 2015).

Необходимо отметить, что резвератрол в русскоязычной литературе часто встречается как ресвератрол, но в данной работе используется резвератрол в дань этимологии данного термина: впервые выделено Такаока в 1940 году и определено, как производное резорцинола (1,3-дигидроксибензол) из черемицы *Veratrum grandiflorum* (Такаока 1940).

Stilbene	R3	R5	R2'	R3'	R4'
<i>t</i> -resveratrol	OH	OH	H	H	OH
<i>t</i> -pterostilbene	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH
<i>t</i> -oxyresveratrol	OH	OH	OH	H	OH
<i>t</i> -piceatannol	OH	OH	H	OH	OH
<i>t</i> -pinosylvin	OH	OH	H	H	H
<i>t</i> -pinosylvin monomethyl ether	OCH ₃	OH	H	H	OH
<i>t</i> -isorhapontigenin	OH	OH	H	OCH ₃	OH
<i>t</i> -isorhapontin	OGlu	OH	H	OCH ₃	OH
<i>t</i> -astringin	OGlu	OH	H	OH	OH
<i>t</i> -polydatin (<i>t</i> -piceid)	OH	OGlu	H	H	OH
mulberroside A	OGlu	OH	OH	H	OGlu

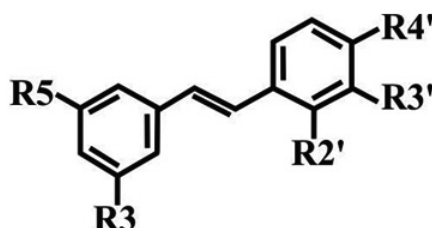


Рисунок 1 – Химические структуры типичных растительных стильбенов. OGlu – *O*-β-D- глюкопиранозид.

Было показано, что *m*-резвератрол обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим, противовоспалительным и антиангиогенным действием и широким спектром преимуществ для здоровья человека, таких как химиопрофилактика рака или кардиопротекция (Kalantari and Das 2010; Pangen et al. 2014; Weiskirchen and Weiskirchen, 2016). Ряд других стильбеноидов (Рисунок 1), например пицеатаннол, пиносильвин, комбретастины, полидатин (пицеид) или различные олигостильбены, также известны как обладающие ценной биологической активностью (Piotrowska et al. 2012; Du et al. 2013; Wang et al. 2014a; Greene et al. 2015; Laavola et al. 2015; Wang and Yao, 2015).

Стильбены участвуют в конститутивных и индуцируемых защитных реакциях растений, а также вызывают большой интерес благодаря своим защитным свойствам против патогенных грибов растений, нематод и травоядных (Chong et al. 2009; Jeandet et al. 2010). Также показано, что растения с наибольшим содержанием стильбенов, более устойчивы к

некоторым абиотическим стрессам, таким как ультрафиолету, засолению и осмотическому стрессу (He et al. 2018; Huang et al. 2018; Kiselev and Dubrovina, 2020). Эти данные открывают новые перспективы для использования этих веществ в прикладных исследованиях.

Растительные стильбены синтезируются по фенилпропаноидному пути, где первым основным шагом является синтез *транс*-коричной кислоты из ароматических аминокислот фенилаланина с помощью фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL, EC 4.3.1.5, Yu and Jez, 2008). Далее идёт еще несколько ферментов, где в итоге стильбен синтаза (STS; EC 2.3.1.95) катализирует образование простых мономерных стильбенов (например, резвератрола) из одной молекулы *пара*-кумарил-коэнзима А (*p*-кумарил-КоА) и трех молекул малонил-коэнзима А (малонил-КоА) в одной реакции (Рисунок 2). Затем простые стильбены могут быть гликозилированы, метилированы или пренилированы действием специфических ферментов. Существуют также многочисленные сложные олигомерные структуры стильбенов. В последние годы был предпринят ряд успешных попыток индуцировать биосинтез резвератрола в растениях, которые обычно не продуцируют стильбены (Giovinazzo et al. 2012; Zhang et al. 2015a). В значительной части этих исследований гены *STS* винограда были сверхэкспрессированы в различных видах растений, и трансгенные растения произвели значительное количество резвератрола и/или его гликозилированных форм. Способность продуцировать стильбены в большинстве случаев приводила к повышению устойчивости против различных грибковых патогенов (Giovinazzo et al. 2012).

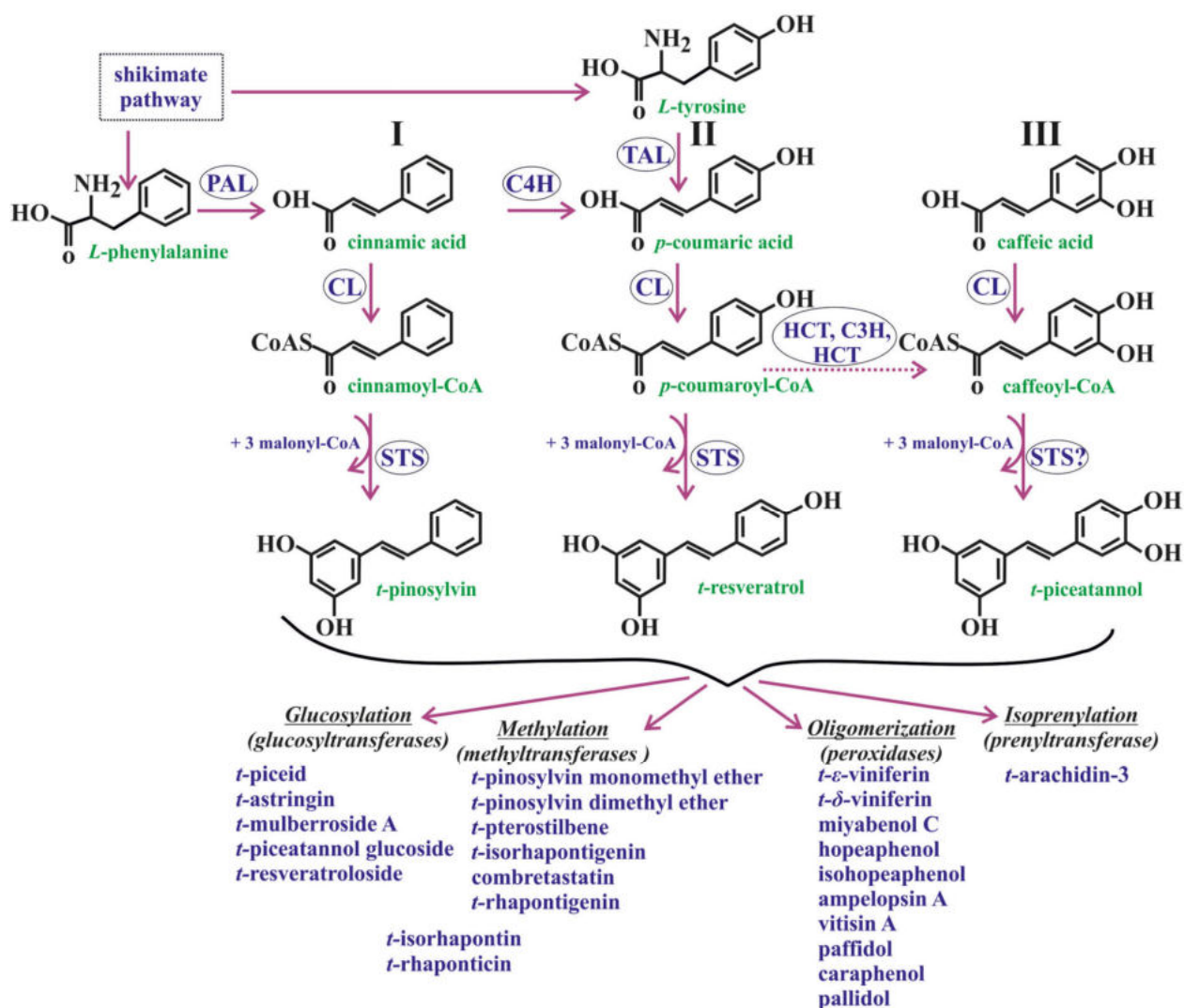


Рисунок 2 – Биосинтетический путь образования стильбенов в растениях (по Dubrovina and Kiselev, 2017). PAL – фенилаланин-аммиак-лиаза; C4H – циннамат 4-гидроксилаза; C3H – кумарат 3-гидроксилаза; CL – 4-кумарат КоА-лигаза; HCT – гидроксицинамоилтрансфераза; STS – стильбенсинтаза.

1.2. Биологически активные свойства *t*-резвератрола и других стильбенов.

Продукты питания, содержащие стильбены попали в поле зрения общественности в начале 1990-х годов, когда научное сообщество заговорило о так называемом “французском парадоксе”. Ученые обратили внимание на интересную статистику, опубликованную в международном медицинском журнале “Lancet” (Renaud and Lorgeril, 1992). Ученых заинтересовал тот факт, что во Франции, где население отдает предпочтение продуктам питания с высоким содержанием жиров, что ведет к болезням сердца и

сосудов, уровень сердечно-сосудистых заболеваний намного ниже, чем в других развитых странах.

Известно, что у французов есть еще одно гастрономическое пристрастие – красное вино. Результаты исследований показали, что “французский парадокс” частично связан с действием этанола, присутствующем в вине. Этанол вызывает увеличение содержания в крови липопротеинов высокой плотности (Rimm et al. 1996). Однако ученые предположили, что не только этанол способен приводить к наблюдаемому парадоксу, но и какие-то другие неизвестные на тот момент вещества в вине (Renaud and Lorgeril, 1992). Позднее многочисленные исследования показали высокую биологическую активность фенольных компонентов вина, большая часть которых имела структуру флавоноидов (Soleas et al. 1997). Важно отметить, что флавоноиды характерны для широкого круга растений, употребляемых в пищу, а отличительным для красного вина является то, что значительная часть фенольной фракции вина содержит стильбены, где большая часть приходится на *m*-резвератрол и его гликозиды (Siemann and Seasy, 1992; Vitrac et al. 2002). В таких количествах стильбены не встречаются больше ни в каких других продуктах питания.

Резвератрол привлек внимание ученых с момента обнаружения его в вине (Siemann and Seasy, 1992). По разным причинам благотворный эффект красного вина на сердечно-сосудистую систему приписывают этому веществу (Hung et al. 2000), поэтому виноделы теперь даже используют новый показатель качества вина – уровень содержания резвератрола. Важно отметить, что о биологических свойствах *цис*-изомера резвератрола известно намного меньше, чем о свойствах *т*-резвератрола (Orallo, 2006).

Показано, что резвератрол, обладая мощными антиоксидантными свойствами, препятствует окислительной модификации липидов (Leighton et al. 1999; Ovesna et al. 2006; Frombaum et al. 2012) и останавливает накопление окисленных липопротеинов низкой плотности в стенках сосудов (Fremont, 2000). Известно, что резвератрол способен влиять на метаболизм липидов в

печени, снижая содержание в крови холестерина и триглицеридов (Goldberg et al. 1995).

Резвератрол снижает риск возникновения нейро-дегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера или Паркинсона (Vingtdeux et al. 2008). Так, например, было показано, что резвератрол предотвращает гибель нервных клеток, индуцированную окисленными липопротеинами *in vitro* (Draczynska-Lusiak et al. 1998).

Антиканцерогенные свойства резвератрола впервые были обнаружены в 1997 году, когда Янг с соавторами продемонстрировали ингибирование резвератролом роста индуцированных опухолей (Jang et al. 1997). С тех пор появилось множество публикаций, свидетельствующих о способности резвератрола влиять на механизмы, регулирующие клеточную пролиферацию и рост (Pervaiz, 2003; Aggarwal et al. 2004). Показано, что резвератрол обладает противоопухолевой активностью на стадии возникновения, роста опухоли и образования метастазов (Aziz et al. 2003a; Shankar et al. 2007). Резвератрол индуцирует остановку клеточного роста и апоптоз посредством регуляции многочисленных сигнальных путей.

Вследствие схожести структуры *m*-резвератрола и синтетического эстрогена диэтилстильбэстрола (4,4'-дигидрокси-*транс*-диэтилстильбен), возник вопрос об эстрогенной активности резвератрола (Aggarwal et al. 2004). В перспективе, после проведения подробных исследований эстрогенной активности резвератрола, возможно использование его для коррекции различных гормональных расстройств, терапии эстроген-зависимых опухолей и некоторых эстроген-зависимых расстройств организма.

Сегодня ученые активно работают над проблемой старения организма. Установлено, что важную роль в регуляции процессов старения играют белки семейства сиртуинов – НАД⁺-зависимые диацетилазы белков (Anderson et al. 2003). В настоящее время ученые заняты поиском вещества, способного непосредственно активировать сиртуины. Установлено, что такой способностью обладают многие полифенолы растений. Показано, что самым

мощным активатором сиртуинов среди всех изученных полифенолов растений является резвератрол (Howitz et al. 2003). Резвератрол значительно увеличивает продолжительность жизни организмов, таких как дрожжи, насекомые (дрозофила), круглые черви (нематоды) и некоторые короткоживущие рыбы (Wood et al. 2004; Kasiotis et al. 2013).

Кроме того, показано, что резвератрол и другие стильбены обладают антибактериальными и противогрибковыми свойствами против патогенов человека и растений, таких как *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* и *Plasmopara viticola* (Daroch et al. 2001; Chalal et al. 2014; Guldass et al. 2019). В последнее время большой интерес представляют данные, которые свидетельствуют о том, что резвератрол обладает противовирусной активностью, например сдерживает развитие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1, Heredia et al. 2000), цитомегаловируса (Evers et al. 2004) и вируса простого герпеса (Docherty et al. 1999).

Особое внимание привлекают данные, которые показывают, что резвератрол обладает противовирусными свойствами в отношении коронавирусной инфекции COVID-19 (Marinella, 2020), возможно из-за этого во Франции одна из самых низких смертностей от данной инфекции в Европе по данным на ноябрь 2021 года (Dong et al. 2020).

Обобщая изложенные данные, необходимо сказать, что резвератрол обладает поразительными по силе и качеству положительными эффектами на функционирование живых организмов и имеет большой потенциал для создания на его основе различных биологически активных добавок к пище, а также лекарственных средств. Активно ведутся доклинические испытания резвератрола на различных модельных системах с целью исследовать его потенциальный противораковый эффект, возможность использования в лечении нейродегенеративных заболеваний и болезней сердечно-сосудистой системы (Shankar et al. 2007). Результаты проведенных доклинических испытаний в большинстве случаев успешны, и авторы рекомендуют проводить клинические испытания (Athar et al. 2007).

1.3. Распределение, содержание и локализация стильбенов в растениях и других организмах.

Современная литература показывает, что стильбены, гидриды стильбенов и производные 2-арилбензофурана продуцируются ограниченной гетерогенной группой видов растений из примерно 50 семейств растений, включая двудольные, однодольные, хвойные, печеночники и папоротники (Shen et al. 2009; Riviere et al. 2012; Dubrovina and Kiselev, 2017). Существуют также исследования, сообщающие об обнаружении и идентификации стильбенов (*m*-резвератрола, резвератродегидов и некоторых других стильбеноидов) в растительных эндофитных грибах (*Alternaria* sp. из *Vitis vinifera*, Shi et al. 2012; *Alternaria* sp. из мангрового растения *Myoporum bontioides*; Wang et al. 2014b), эмтмопатогенные бактерии (*Photorhabdus luminescens*, Eleftherianos et al. 2007; *Bacillus* sp., Kumar et al. 2012), несколько съедобных грибов (Peng et al. 2015), губка (антарктическая губка *Kirkpatrickia variolosa*, Jayatilake et al. 1995) и личинка моли (высушенная личинка шелкопряда *Bombyx mori*, Kikuchi et al. 2004).

Недавний анализ транскриптома предоставил доказательства на генном уровне, что стильбены в эндофитном грибе *Alternaria* могут быть синтезированы специфическими для этого гриба халкон синтазами (Che et al. 2016). Кроме того, недавний структурный анализ показал, что стильбен 2-изопрпил-5-[(E)-2-фенилвинил] бензол-1,3-диол в бактериях *Photorhabdus* синтезируется в результате сотрудничества двух ферментов, необычной β -кетосинтезы StlD и ароматазы StlC (Mori et al. 2016).

Существует множество исследований, в которых изучается структурные особенности стильбенов и их состав в самых разных растениях (Shen et al. 2009; Riviere et al. 2012), но относительно мало работ, где определялся бы общий уровень содержания стильбенов. В Таблице 1 собраны исследования, в которых представлены как содержание отдельных

стильбенов, так и приведен общий уровень стильбенов в различных органах растений представителей разных семейств.

Таблица 1 – Состав и содержание стильбенов в разных видах растений.

Источник стильбенов	Способ индукции биосинтеза стильбенов	Общее содержание стильбенов	Состав стильбенов	Содержание основного мономерного стильбена	Ссылка
Голосеменные растения (Gymnosperms), Pinidae (хвойные деревья), Pinaceae*					
Сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> (саженцы)	механически поврежденные саженцы	11.6 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пиносильвин; монометилловый эфир <i>m</i> -пиносилвинат-	<i>m</i> -пиносильвин, 3.8 мг/г от сухой биомассы	Harju and Venäläinen, 2012
Норвежская ель <i>P. abies</i> (кора корня и ствола)	без индукции	58 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -изорапонтин, <i>m</i> -астрингин, <i>m</i> -пицеид	н.и.	Latva-Mäenpää et al. 2013
Норвежская ель <i>P. abies</i> (корневая кора)	без индукции	45.2 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -изорапонтин, <i>m</i> -астрингин, <i>m</i> -пицеид	н.и.	Mulat et al. 2014
Норвежская ель <i>P. abies</i> (древесина)	без индукции	48 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -изорапонтин, <i>m</i> -астрингин, <i>m</i> -пицеид	н.и.	Jyske et al. 2014
Черная сосна <i>Pinus nigra</i> (древесина)	без индукции	60 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пиносильвин; <i>m</i> -монометилловый эфир пиносильвина; <i>m</i> -диметилловый эфир пиносильвина	<i>m</i> -пиносильвин, 17 мг/г от сухой биомассы	Ioannidis et al. 2017
Ель <i>Picea jezoensis</i> (иглы)	весенние иглы	2-7.8 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -астрингин; <i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> - и <i>цис</i> -изорапонтин; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -изоропантинген	<i>m</i> -пицеатаннол, 0.03-0.04мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> -резвератрол, 0.00004-0.0001 мг/г от сухой биомассы ;	Kiselev et al. 2016
	осенние иглы	2.6-5.4 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -пицеатаннол, 0.06-0.12 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -резвератрол, 0.00001-0.00002 мг/г от сухой биомассы	
Гнетовые (Gnetaceae)					
Гнетум <i>Gnetum parvifolium</i> (стебли, корни)	корни, контроль	3.2 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -пицеатаннол, 2.6 мг/г от сухой биомассы;	Deng et al. 2017

				<i>m</i> -резвератрол, 0.6 мг/г от сухой биомассы	
	корни, 48 ч после повышения температуры	1.4 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -пицетаннол, 1.1 мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> -резвератрол, 0.3 мг/г от сухой биомассы ;	
	корни, 48 ч после УФ воздействия	4.2 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -пицетаннол, 3.5 мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> -резвератрол, 0.7 мг/г от сухой биомассы	
Однодольные растения (Liliopsida или Monocotyledones), Poaceae					
Сахарный тростник <i>Saccharum sp.</i> (стебли)	без индукции	н.и.	измеряли только <i>m</i> -пицетаннол	<i>m</i> -пицетаннол, следы;	Brinker and Seigler, 1993
	инкубация с <i>Colletotrichum falcatum</i>			<i>m</i> -пицетаннол, 0.18 мг/г от сухой биомассы	
Овсяная трава <i>Festuca versuta</i> (семена)	семена (Техас), естественно зараженные грибковыми эндоситами <i>Acremonium</i>	н.и.	измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 2.3 мг/г от сухой биомассы	Powell et al. 1994
Ячмень <i>Hordeum brevisubulatum</i> (семена и корма)	фураж (СССР) неинфицированный			<i>m</i> -резвератрол, 0.003 мг/г от сухой биомассы	
	фураж (СССР), зараженный <i>Acremonium</i>			<i>m</i> -резвератрол, 0.27 мг/г от сухой биомассы	
Сорго <i>Sorghum bicolor</i> (мезокотили)	семена (Египет), зараженные <i>Acremonium</i>			<i>m</i> -резвератрол, 0.004 мг/г от сухой биомассы	
Сорго <i>Sorghum bicolor</i> (мезокотили)	сорт DK18 зараженный <i>Colletotrichum sublineolum</i>	0.01 мг/г от сырой биомассы	измеряли только <i>m</i> -пицеид	н.и.	Yu et al. 2008
	сорт DK77 зараженный <i>C. sublineolum</i>	0.04 мг/г от сырой биомассы			
Сахарный	на 3-й день	0.4 мг/г от	<i>m</i> -резвератрол;	<i>m</i> -пицетаннол,	Boue et

тростник <i>Saccharum</i> spp. (стебли)	после после сбора урожая	сухой биомассы	<i>m</i> -пицеатаннол	0.06-0.03 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -резвератрол, 0.01 мг/г от сухой биомассы	al. 2013
	на 7-й день после после сбора урожая	1.73 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> - пицеатаннол, 0.06-1.66мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> -резвератрол, 0.07 мг/г от сухой биомассы	
Двудольные растения (Dicotyledones или Magnoliopsida), Ericaceae					
Черника <i>Vaccinium</i> <i>corymbosum</i> (ягоды)	сырая высокогорная мичиганская черника	н.и.	измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.00003 мг/г от сырой биомассы	Lyons et al. 2003
Голубика высокорослая <i>V. corymbosum</i> (ягоды)	Корваллис, Орегон, обычное возделование	0.0013 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол	<i>m</i> -резвератрол, 0.0009мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> - пицеатаннол, 0.0004 мг/г от сухой биомассы	Rimando et al. 2005
Черника тычиночная <i>Vaccinium</i> <i>stamineum</i> (ягоды)	сорт SHF3A-2- 108, Дженксонс Спрингс, Северная Калифорния	0.0006 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -птеростильбен	<i>m</i> -резвератрол, 0.0001 мг/г от сухой биомассы	
Fabaceae или Leguminosae или Papilionaceae					
Арахис <i>Arachis</i> <i>hypogaea</i> (листья)	без индукции	н.и.	измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.001-0.003 мг/г от сырой биомассы	Chung et al. 2003
	обработка УФ листьев	н.и.		<i>m</i> -резвератрол, 0.06 мг/г от сырой биомассы	
Арахис <i>A. hypogaea</i> (ядра)	без индукции	н.д.	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -арахидин-1; 2; 3; <i>m</i> -3'-изопен- тадиенил-3,5,4'- тригидроксистерильбен;	н.д.	Sobolev 2008
	инкубирование с <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>	4.3 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 1.2 мг/г от сухой биомассы	
Арахис <i>A. hypogaea</i> (листья)	спелые ядра	н.и.	измеряли только <i>m</i> - резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.009 мг/г от сырой биомассы	Zorzete et al. 2011
Робиния ложноакациевая или ложная акация	молодое дерево, без индукции	0.28 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол	<i>m</i> - пицеатаннол, 0.263мг/г от сухой	Sergent et al. 2014

<i>Robinia pseudoacacia</i> (сердцевина дерева)				биомассы ; <i>m</i> -резвератрол, 0.017 мг/г от сухой биомассы	
	зрелая древесина, без индукции	0.92 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> - пицеатаннол, 0.65мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> -резвератрол, 0.271 мг/г от сухой биомассы	
Арахис <i>A. hypogaea</i> (seed embryos)	Инкубация с <i>Bacillus subtilis</i>	1 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -арахидин-1; 2; 3; <i>m</i> -3'-изопен- тадиенил-3,5,4'- тригидроксистильбен;	<i>m</i> -резвератрол, 0.08 мг/г от сухой биомассы	Sobolev 2013
Moraceae					
Шелковица <i>Morus alba</i> L. (листья и плоды)	листья, без индукции	1.9 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -астрингин; <i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -рапонтицин; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -рапонтигенин; <i>m</i> -птеростильбен	<i>m</i> -резвератрол, 0.13мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> - пицеатаннол, но	Kim et al. 2008
	плоды, без индукции	6.1 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.05мг/г от сухой биомассы ; <i>m</i> - пицеатаннол, 0.09 мг/г от сухой биомассы	
Шелковица <i>Morus albus</i> L. (корка корня)	Чжанцзякоу, регион Хэбэй	0.11 мг/г от сухой биомассы	мульберозид А; <i>цис</i> - мульберозид А; резвератрол-4; 3'-di-O-b-D- глюкопиринозид; оксирезвератрол-2-O- b-D-глюкопиринозид; оксирезвератрол-3'-O- b-D-глюкопиринозид	н.и.	Piao et al. 2011
	Бэньси, регион Ляонин	54 мг/г от сухой биомассы			
Шелковица <i>Morus species</i> (корни, собранные в сентябре)	<i>M. atropurpurea</i>	17.8 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -оксирезвератрол; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.1 мг/г от сухой биомассы	Zhou et al. 2013
	<i>M. alba</i>	5.6 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.06 мг/г от сухой биомассы	
	<i>M. latifolia</i>	9.5 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.05 мг/г от сухой биомассы	

Шелковица <i>Morus notabilis</i> (листья)	контроль	0.001 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -оксирезвератрол;	<i>m</i> -резвератрол, следы	Li et al. 2016
	18 ч после УФ-С-воздействия	0.01 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -резвератрол	0.001 мг/г от сырой биомассы	
Myrtaceae					
Родомирт войлочный <i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (плоды)	без индукции	4 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -астрингин; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -пицеатаннол-галлоил-гексозид; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -пицеатаннол, 2.3 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -резвератрол, 0.71 мг/г от сухой биомассы	Lai et al. 2013
Polygonaceae					
Рейнутрия японская <i>Polygonum cuspidatum</i> (корни)	Разновидность Ху Чжана	12.6 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератролозид;	<i>m</i> -резвератрол, 3.8 мг/г от сухой биомассы	Vastano et al. 2000
	Мексиканский бамбуковый сорт	13.8 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пицеатаннол глюкозид	<i>m</i> -resveratrol, 3 мг/г от сухой биомассы	
Рейнутрия японская <i>Reynoutria japonica</i> (ростки)	молодые весенние ростки	0.8 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератролозид	<i>m</i> -резвератрол, 0.06 мг/г от сухой биомассы	Vrchotová et al. 2007
Рейнутрия японская (полигонум) <i>P. cuspidatum</i> (корни)	<i>var. japonica</i> , без индукции	11.1-19.4 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -астрингин	<i>m</i> -резвератрол, 0.15-1. мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.025-0.07 мг/г от сухой биомассы	Benova et al. 2008
	<i>var. sachalinensis</i> , без индукции	0.3-0.8 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.02-0.1 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.006-0.008 мг/г от сухой биомассы	
	<i>var. bohémica</i> , без индукции	2.7-9.8 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.08-0.95 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.01-0.095 мг/г от сухой биомассы	
Ревень	корни	5.2 мг/г от	<i>m</i> -резвератрол;	<i>m</i> -резвератрол,	Rokaya

<i>Rheum acuminatum</i> , <i>Rheum australe</i> (корни)	культивируемо го <i>R. acuminatum</i>	сухой биомассы	<i>m</i> -пицеатаннол	0.5 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 4.7 мг/г от сухой биомассы	et al. 2012
	корни натурального <i>R. acuminatum</i>	1.7 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.1 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 1.6 мг/г от сухой биомассы	
	корни культивируемо го <i>R. australe</i>	14.1 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.1 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 14 мг/г от сухой биомассы	
	корни натурального <i>R. australe</i>	3.8 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.1 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 3.7 мг/г от сухой биомассы	
Рейнугрия японская <i>Fallopia japonica</i> (корни)	Провинция Цзянси, Китай, собранный в ноябре	24 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеид	<i>m</i> -резвератрол, 12 от сухой биомассы	Chen et al. 2013
Solanaceae					
Плоды томата <i>Lycopersicon esculentum</i> (кожура помидора)	без индукции	0.02 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> - и <i>цис</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.015 мг/г от сухой биомассы	Ragab et al. 2006
Vitacea*					
Виноград <i>Vitis vinifera</i> (ягоды)	без индукции	3 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 1 мг/г от сухой биомассы	Deluc et al. 2011
	водный дефицит	11 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 1.5 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (ягоды)	без индукции	4.6 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 1.5 мг/г от сухой биомассы	
	водный дефицит	4.5 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 2 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (ягоды)	без индукции	0.0007 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> - δ -виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.0005 мг/г от сырой биомассы	Timperio et al. 2012
	заражение <i>Botrytis cinerea</i>	0.0025-0.003 мг/г от		<i>m</i> -резвератрол, 0.0015-0.002	

		сырой биомассы		мг/г от сырой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (саженцы)	контроль	0.0013 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеид; ϵ -виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.0005 мг/г от сухой биомассы	Tavares et al. 2013
	дефицит серы	0.0022 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.0012 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> 16 различных сортов (древесные побеги)	<i>V. vinifera</i> cv. Пино нуар	8.5 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -резвератрол; хопеафенол; <i>m</i> - ϵ -виниферин; <i>m</i> -миябенол С; <i>m</i> - и <i>цис</i> -витизин В	<i>m</i> -резвератрол, 1.5 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 1.7 мг/г от сухой биомассы	Lambert et al. 2013
	среднее значение для 16 сортов	4.7 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.8 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.67 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (ягоды)	сорт Рабозо Пьяве	0.005 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -астрингин; <i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> -пицеатаннол; паффидол; паффидол-3-О-глюкозид; димер 2; <i>m</i> -резвератрол; карафенол В; тетрамер 1; 2; <i>цис</i> - ϵ -виниферин; <i>m</i> - ϵ -виниферин; <i>цис</i> -миябенол С; <i>m</i> -миябенол С; тригидрокси флаванон; <i>d</i> -виниферины; метилловый эфир резвератрола	<i>m</i> -резвератрол, 0.001 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.01-0.00004 мг/г от сырой биомассы	Flamini et al. 2013
	сорт Примитиво	0.011 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.001 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.01-0.0003 мг/г от сырой биомассы	
<i>Vitis vinifera</i> (листья)	без индукции	следы	резвератрол; ϵ -виниферин	<i>m</i> -резвератрол, следы	Hatmi et al. 2014
	72 ч после обработки 400 г/ л ПЭГ 6000	1.3 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.3 мг/г от сухой биомассы	
	72 ч после обработки 600 мМ сахарозы	1.5 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.35 мг/г от сухой биомассы	
	<i>V. cinerea</i>	7.8 мг/г от		<i>m</i> -резвератрол,	

		сухой биомассы		1.3 мг/г от сухой биомассы	
<i>Vitis</i> sp. (ягоды)	без индукции	0.04 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид	<i>m</i> -резвератрол, 0.01 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.005 мг/г от сырой биомассы	Ahn et al. 2015
	облучение голубым светом	0.18 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.08 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.03 мг/г от сырой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (листья)	без индукции	0.01 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.004 мг/г от сырой биомассы	Xi et al. 2015
	24 ч после облучения УФ-С	0.467 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.46 мг/г от сырой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (ствол лианы)	5% виноградников, пораженных ложной мучнистой росой	10.8 мг/г от сухой биомассы	ампелопсин А; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -резвератрол; хопеафенол; изохопеафенол; <i>m</i> -ε-виниферин; <i>m</i> -миябенол С; <i>m</i> - и <i>цис</i> -витизин В	<i>m</i> -резвератрол, 6.5 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.5 мг/г от сухой биомассы	Houillé et al. 2015
	95% виноградников, пораженных ложной мучнистой росой	10.9 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 5.3 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.3 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> × <i>Vitis labrusca</i> (ягоды)	no induction	0.03 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -ε-виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.02 мг/г от сырой биомассы	Wang et al. 2015
	2 ч после обоаботки 0.1 mM MeJA	0.055 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.035 мг/г от сырой биомассы	
	1 h ч после обоаботки	0.07 мг/г от сырой		<i>m</i> -резвератрол, 0.045 мг/г от	

	MeJA и <i>B. cinerea</i>	биомассы		сырой биомассы	
Шесть видов дикого китайского винограда (кожица ягод)	<i>Vitis amurensis</i> Rupr.	0.01-0.09 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.001-0.02 мг/г от сырой биомассы	Zhou et al. 2015
	<i>Vitis quinquangularis</i> Rehd.	<i>m</i> -резвератрол, 0.02-0.08 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.003-0.014 мг/г от сырой биомассы	
	<i>Vitis romanetii</i> Roman.	<i>m</i> -резвератрол, 0.01-0.09 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.001-0.015 мг/г от сырой биомассы	
Европейский дикий виноград <i>V. vinifera</i> ssp. <i>sylvestris</i> (листья)	без индукции	следы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> - и <i>цис</i> -резвератрол; <i>m</i> - ϵ - и <i>m</i> - δ -виниферин; <i>m</i> -птеростильбен; <i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеатаннол	<i>m</i> -резвератрол, следы; <i>m</i> -пицеатаннол, следы	Duan et al. 2015
	24 ч после облучения УФ-С	1.2 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.8 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.01 мг/г от сырой биомассы	
<i>Vitis riparia</i> × <i>V. rupestris</i> генотип, чувствительный к засухе (корни)	без индукции	0.02 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.0008 мг/г от сырой биомассы	Corso et al. 2015
	засуха	0.018 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.0012 мг/г от сырой биомассы	
<i>(V. vinifera</i> × <i>Vitis berlandieri</i>) × <i>V. berlandieri</i> засухоустойчивый генотип (корни)	без индукции	0.012 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.0085 мг/г от сырой биомассы	
	засуха	0.012 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.0019 мг/г от сырой биомассы	
<i>Vitis vinifera</i> (ягоды)	без индукции	0.014 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> - и <i>цис</i> -астрингин; димер резвератрола 1-6; карафенол; паллидол-глюкозид; а-виниферин;	<i>m</i> -резвератрол, 0.002 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.001 мг/г от сырой биомассы	Flamini et al. 2016

	инфизированы <i>Aspergillus carbonarius</i>	0.023 мг/г от сырой биомассы	тример резвератрола 1-4; тетрамер резвератрола 1-2	<i>m</i> -резвератрол, 0.004 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.001 мг/г от сырой биомассы	
Дикий виноград, произрастающий на азиатском континенте <i>Vitis amurensis</i> (листья, собранные в октябре)	без индукции	0.390 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> - ϵ - и <i>цис</i> - ϵ -виниферин; <i>m</i> - δ -виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.018 мг/г от сухой биомассы	Kiselev et al. 2017
	1 ч после облучения УФ-С	0.5 89 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.121 мг/г от сухой биомассы	

^a – содержание *m*-резвератрола, *m*-пиносильвина или *m*-пицеатаннола.

* – Для семейств Pinaceae и Vitaceae, мы представили работы с детальным исследованием стильбенов начиная с 2010 года из-за большого количества работ, н.и. – не измерялось; н.о. – не детектировалось; следы – незначительные количества вещества. MeJA – метилжасмонат; ПЭГ – полиэтиленгликоль; УФ-С – ультрафиолет С. В таблице представлены данные для содержания стильбенов в норме без воздействий так и с наибольшим содержанием для разных органов, тканей или после различных воздействий, увеличивающих содержание стильбенов в каждом индивидуальном исследовании.

Качественный и количественный состав стильбенов наиболее активно изучался для видов растений, принадлежащих к семи семействам растений, таких как Vitaceae (виноград), Pinaceae (сосна, ель), Poaceae (сорго, сахарный тростник, ячмень, овсяница), Ericaceae (голубика, черника), Fabaceae (арахис, ложная акация), Moraceae (шелковица) и Polygonaceae (спорыш или рейнутрия, ревень) (Таблица 1). Есть также работы по содержанию стильбенов в гнетуме (Gnetaceae), в мирте (Myrtaceae) и в томатах (Solanaceae) (Таблица 1). Для Pinaceae и Vitaceae мы собрали только самые последние и подробные исследования, опубликованные после 2010 года из-за большого количества исследований.

Таблица 1 показывает, что стильбены накапливаются в различных органах и тканях растений, в том числе в листьях, корнях, плодах, семенах, стеблях, древесине, коре или хвое. На данный момент описано в растениях

более 40 видов стильбенов. Точный подсчет осложняется тем, что иногда одни и те же вещества называются по-разному, например, широковстречаемый гликозид резвератрола – пицеид иногда называют полидатином. Так же трудности встречаются при описании димеров, тримеров и тетрамеров олигомерных стильбенов, потому что они менее стабильные вещества, чем мономерные стильбены и они встречаются в низких количествах в тканях растений, что затрудняет определение их структуры.

В растениях встречаются три мономерных стильбена, которые являются ключевыми в синтезе других стильбенов – это пиносильвин (больше у Pinidae, Pinaceae), резвератрол (больше у Ericaceae, Vitaceae) и пицеатаннол (больше у Gnetaceae, Poaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Polygonaceae) (Рисунок 1, Таблица 1). Также довольно часто встречаются гликозиды мономерных стильбенов (пицеид, астрингин) и метилированные производные мономерных стильбенов (преростильбен, изорапонтин). Остальные стильбены или встречаются только у определенных видов растений, или в определенных органах растений, или содержатся в таких низких количествах, что в ряде исследований просто не детектируются из-за методических ограничений.

Проанализированные данные (Таблица 1) свидетельствуют о том, что больше всего конститутивно накапливают сумму стильбенов в естественных условиях без каких либо воздействий – это сосна (в коре ствола до 60 мг/г от сухой биомассы), ель (в коре ствола до 58 мг/г от сухой биомассы), рейнутрия (в корнях до 24 мг/г от сухой биомассы) и шелковица (в корнях до 54 мг/г от сухой биомассы). Этот факт предполагает, что стильбены вовлечены в конститутивные защитные реакции у этих видов растений и, вероятно, могут быть вовлечены в устойчивость растений к микробным патогенам и вредителям растений в качестве конститутивно продуцируемых соединений. Необходимо отметить, что в других видах растений в норме, без каких-либо воздействий, общее содержание стильбенов намного меньше

(меньше в 100-1000 раз, Таблица 1), но это количество многократно возрастает при различных воздействиях.

Было показано, что наиболее сильным стимулом для увеличения содержания стильбенов в растениях с изначально низким содержанием стильбенов была обработка ультрафиолетом С (УФ-С). После воздействия УФ-С в арахисе содержание стильбенов увеличивалось в 20 раз (Chung et al. 2003), в винограде почти в 50 (Xi et al. 2015). Так же значительно содержание стильбенов увеличивала обработка голубым светом (в 4.5 раза, Ahn et al. 2015), инокуляция плесневелым грибом *Botrytis cinerea* (в 4.3 раза, Timperio et al. 2012) и обработка метилжасмонатом (MeJA) (в 2 раза, Wang et al. 2015).

Надо отметить, что описанные воздействия (например, УФ-С) действовали и на растения с исходно высоким содержанием стильбенов (например, на ель), но увеличивали их содержание всего в 1.1-1.4 раза (Kiselev et al. 2019). Слабое действие УФ-С на хвою ели можно объяснить тем, что изначально в хвое уже высокое содержание стильбенов. Кроме того, в геноме ели описано присутствие всего от 2 до 4 генов *STS*, тогда как в геноме винограда описано большое семейство генов *STS*, содержащее от 32 до 36 функциональных генов (Parage et al. 2012; Vannozzi et al. 2012). Возможно, это и объясняет то, что стильбены быстро синтезируются в листьях винограда после соответствующих воздействий.

Были также исследования, сообщающие об определении резвератрола и пицеида в различных съедобных фруктах и овощах, таких как клубника, малина, вишня, перец, помидор, огурец, морковь, баклажан, салат, слива, яблоко, груша, персик и виноград, которые являются коммерчески доступными (Huang, Mazza 2011; Peng et al. 2015). Согласно Huang, Mazza (2011), виноград содержал более высокое количество стильбенов, чем другие анализируемые фрукты. Peng с соавторами (2015) пришли к выводу, что большинство фруктов, овощей и трав, проанализированных в исследовании, содержали более высокие уровни *m*-пицеида, чем *m*-резвератрола. Таким образом, возможно, что не только виноград и арахис, но и многие другие

ежедневные съедобные фрукты и овощи могут быть также источником биологически активных стильбенов и должны быть проанализированы для получения стильбенов более подробно. Но эти работы не подтверждаются другими исследованиями, поэтому этот вопрос требует дополнительного исследования.

Таким образом, наибольшее суммарное содержание стильбенов было в коре черной сосны и норвежской ели (58-60 мг/г от сухой биомассы, Таблица 2). В большинстве других видах растений содержание намного ниже и приближается к описываемым значениям только после воздействий сильных стимуляторов биосинтеза стильбенов. Среди продуктов, используемых человеком в пищу, наибольшее содержание было в ягодах винограда и голубики. Информация о содержании в других ягодах и фруктах требует проверки и детализации.

Содержание и спектр стильбенов также определяли в суспензионных и каллусных культурах клеток и в культурах корней разных растений, таких как сосна, ель, арахис, шелковица, горец и виноград (Таблица 2). Содержание в полученных культурах определяли как в стандартных условиях культивирования, так и после обработки растительными гормонами, некоторыми стрессовыми факторами или после трансформации различными генами, способными увеличить содержание вторичных метаболитов (Таблица 2).

Проанализированные данные в Таблице 2 свидетельствуют о том, что, как правило, общее содержание и разнообразие стильбенов, синтезированных *in vitro* в культурах растительных клеток, было ниже, чем у растений (Таблица 1 и 2). Хотя было одно вещество, характерное только для культур клеток – это дигликозид *m*-резвератрола (Aleynova et al. 2016; Suprun et al. 2020). Дигликозид *m*-резвератрола найден только в культурах клеток, возможно из-за того, что, обычно в питательных средах довольно высокие концентрации сахаров (сахароза, глюкоза) избыток которых и приводит к появлению довольно большого количества дигликозидов стильбенов. В

растениях встречается дигликозид стильбенов – мультберрозид А (Рисунок 1), но только в корнях шелковицы *Morus albus* L. (Piao et al. 2011; Zhou et al. 2013).

В общем, в статьях по культурам клеток описано наличие 16 различных стильбенов, среди которых наиболее чаще встречались *m*-резвератрол, *m*-пицеид, *m*-пицеатаннол и некоторые виниферины (Таблица 2). Содержание стильбенов в культурах клеток варьировало от следовых количеств до 38 мг/г от сухой биомассы (Таблица 2).

Было показано, что наиболее сильным стимулом для увеличения содержания стильбенов в культурах клеток растений была обработка циклическими олигосахаридами циклодекстринами в сочетании с MeJA (100 μ M) суспензионной культуры клеток шелковицы *Morus alba*, с 15 до 38 мг/г от сухой биомассы, в 2.5 раза по сравнению с необработанными клетками (Таблица 2, Komaikul et al. 2015). Так же значительное увеличение стильбенов было после добавления 130 μ M салициловой кислоты (SA) в суспензионную культуру клеток горца *Polygonum multiflorum* с 7.3 до 16.4 мг/г от сухой биомассы, в 2.2 раза по сравнению с необработанными клетками (Таблица 2, Shao et al. 2012).

Сильным стимулом для увеличения содержания стильбенов в культуре клеток была обработка УФ-С, добавление предшественников фенольных соединений растений и сверхэкспрессия некоторых генов кальций-зависимых протеинкиназ и стильбен синтаз (Таблица 2).

Таблица 2 – Спектр стильбенов и их содержание в культурах клеток или корней, полученных из разных видов растений

Источник стильбенов	Воздействие	Общее содержание стильбенов	Композиция стильбенов	Содержание основных мономерных стильбенов ^a	Ссылки
Голосеменные (Gymnosperms), хвойные деревья (Pinidae), Pinaceae					
Норвежская ель <i>Picea abies</i> (эмбриогенная культура клеток)	контроль	0.02 мг/г от сырой биомассы		н.и.	Cvikrová et al. 2008
Сосна обыкновенная	контроль	н.и.	измеряли только	пиносилвин, 0.0003 мг/г от сухой	Muilu-Mäkelä et

<i>Pinus sylvestris</i> (суспензионная культура клеток)			пиносилвин	биомассы	al. 2015
	осмотический стресс (5-10% ПЭГ)			пиносилвин, 0.0002 мг/г от сухой биомассы	
Двудольные растения (Dicotyledones или Magnoliopsida): Fabaceae или Leguminosae или Papilionaceae					
Арахис <i>Arachis hypogaea</i> (каллусная культура)	контроль	н.д.		н.д.	Ku et al. 2005
	18 ч после облучения УФ-С	0.017 мг/г от сырой биомассы/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.012 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.005 мг/г от сырой биомассы	
<i>A. hypogaea</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	0.005 мг/г от сырой биомассы/г от сырой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол	<i>m</i> -резвератрол, 0.004 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.0005 мг/г от сырой биомассы	Ku et al. 2005
	4 после облучения УФ-С	0.008 мг/г от сырой биомассы/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.007 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.0005 мг/г от сырой биомассы	
Арахис <i>A. hypogaea</i> (Культура волосатых корней)	контроль	следы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -арахидин-1; 3	<i>m</i> -резвератрол, следы	Yang et al. 2015
	9 г/л циклодекстринов с 100 μМ MeJa	21.5 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 4.6 мг/г от сухой биомассы	
<i>A. hypogaea</i> (каллусная культура)	заражение <i>Botryodiplodia theobromae</i>	0.023 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол	<i>m</i> -резвератрол, 0.016 мг/г от сырой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.007 мг/г от сырой биомассы	Yang et al. 2010
<i>A. hypogaea</i> (культура волосатых корней)	контроль	следы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеатаннол; <i>m</i> -арахидин-1; <i>m</i> -арахилин-3;	<i>m</i> -резвератрол, tr <i>m</i> -пицеатаннол, tr	Yang et al. 2016
	9 г/л циклодекстрины с 100 μМ MeJa и 10 μМ кломазон после 72 ч	21 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 4.6 мг/г от сухой биомассы; <i>m</i> -пицеатаннол, 0.5 мг/г от сухой биомассы	
Malvaceae					
Хлопок <i>Gossypium hirsutum</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	н.и.	измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.007 мг/г от сухой биомассы	Kouakou et al. 2006
Moraceae					
Шелковица <i>Morus alba</i> (клетки иммобилизован)	контроль	15 мг/г от сухой биомассы	измеряли только мультберрозид	н.и.	Inyai et al. 2015
	дрожжевой	35 мг/г от	А	н.и.	

ной культуры)	экстракт с 0.5 μ M MeJa	сухой биомассы			
<i>M. alba</i> (суспензионная культура клеток)	100 μ M SA	38 мг/г от сухой биомассы		н.и.	Komaikul et al. 2015
Polygonaceae					
Горец многоцветковый <i>Polygonum multiflorum</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	7.3 мг/г от сухой биомассы	измеряли только 2,3,5,4'-тетрагидроксистильбен-2-O- β -D-гликозид	н.и.	Shao et al. 2012
	100 μ M MeJa	21.4 мг/г от сухой биомассы		н.и.	
	130 μ M SA	16.4 мг/г от сухой биомассы		н.и.	
Vitacea*					
Кайратия т- <i>Cayratia trifolia</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	0.25 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; пицеид; виниферин; ампелопсин	<i>m</i> -резвератрол, 0.035 мг/г от сухой биомассы	Arora et al. 2010
	200 мг/л экстракта ангиосперма паразита <i>Cuscuta reflexa</i>	2.14 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.042 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (культура клеток)	контроль	н.и.	измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, следы	Belchí-Navarro et al. 2012
	96 ч после 50 мМ β -циклодекстринов в комбинации с 100 μ M MJ			<i>m</i> -резвератрол, 375 мг/г от сухой биомассы	
	50 мМ циклодекстринов с 100 μ M MeJa и 1 мМ этилена			<i>m</i> -резвератрол, 155 мг/г от сухой биомассы	Belchí-Navarro JPP 2013
<i>V. vinifera</i> (культура клеток)	контроль	0.0001 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -пицеид; ϵ -виниферин	<i>m</i> -резвератрол, следы	Tavares et al. 2013
	дефицит серы	0.0008 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.0001 мг/г от сухой биомассы	
Дикий виноград, произрастающий на азиатском континенте <i>Vitis amurensis</i> (калусные культуры)	контроль	н.и.	измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, 0.07-0.08 мг/г от сухой биомассы	Aleynova-Shumakova et al. 2014; Aleynova et al. 2015
	сверхэкспрессия генов <i>CDPK</i>	н.и.		<i>m</i> -резвератрол, 0.1-4.2 мг/г от сухой биомассы	
	контроль	0.17-0.18 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол диглюкозид; <i>m</i> -пицеид;	<i>m</i> -резвератрол, 0.03 мг/г от сухой биомассы	Aleynova et al. 2016
0.1 мМ SA	0.26 мг/г от	<i>m</i> -резвератрол, 0.08			

		сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол;	мг/г от сухой биомассы	
	Сверхэкспрессия <i>VaSTS2</i>	0.6 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -ε-виниферин;	<i>m</i> -резвератрол, 0.21 мг/г от сухой биомассы	
	Сверхэкспрессия <i>VaSTS2</i> с 0.5 мМ СА	1.16 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -δ-виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.42 мг/г от сухой биомассы	
	1 ч после УФ-С	0.8 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -ε-виниферин; <i>m</i> -δ-виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.4 мг/г от сухой биомассы	Tyunin and Kiselev, 2016
<i>V. vinifera</i> (культура клеток)	контроль	н.и.	Измеряли только <i>m</i> -резвератрол	<i>m</i> -резвератрол, следы	Almagro et al. 2015
	50 мМ β-циклодекстринов с 1 мМ коронатина после 168 ч воздействия			<i>m</i> -резвератрол, 35 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	0.5 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; виниферины; <i>m</i> -пицеид	<i>m</i> -резвератрол, 0.38 мг/г от сухой биомассы	Taurino et al. 2015
	100 μМ MeJa	4.5 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 4.1 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	0.5 мг/г от сухой биомассы	<i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -ε-виниферин; <i>m</i> - и <i>цис</i> -пицеид	<i>m</i> -резвератрол, 0.15 мг/г от сухой биомассы	Xu et al. 2015
	4 дня после облучения УФ-С	1.4 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.3 мг/г от сухой биомассы	
	2 дня после облучения УФ-С и 100 μМ MeJa	2.1 мг/г от сухой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.54 мг/г от сухой биомассы	
<i>V. vinifera</i> (культура волосатых корней)	контроль	0.5 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -ε-виниферин; <i>m</i> -δ-виниферин	<i>m</i> -резвератрол, следы	Tisserant et al. 2016
	18 дней культивирования с 100 μМ MeJa	1.2 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.1 мг/г от сырой биомассы	
Дикий североамериканский виноград <i>Vitis rupestris</i> (суспензионная культура клеток)	контроль	0.001 мг/г от сырой биомассы	<i>m</i> -пицеид; <i>m</i> -резвератрол; <i>m</i> -δ-виниферин	<i>m</i> -резвератрол, 0.0001 мг/г от сырой биомассы	Chang et al. 2017
	100 μМ MeJa	0.75 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.003 мг/г от сырой биомассы	
<i>V.</i>	контроль	0.01 мг/г от		<i>m</i> -резвератрол,	

<i>vinifera</i> (суспе нзионная культура клеток)		сырой биомассы		0.0001 мг/г от сырой биомассы
	200 μ M SA	0.1 мг/г от сырой биомассы		<i>m</i> -резвератрол, 0.0003 мг/г от сырой биомассы

^a – содержание of *m*-резвератрола, *m*-пиносильвина или *m*-пицеатаннола. * – Для семейств Pinaceae и Vitaceae, мы представили работы с детальным исследованием стильбенов начиная с 2010 года из-за большого количества работ, н.и. – не измерялось; н.д. – не детектировалось; следы – незначительные количества вещества.; MeJA – метилжасмонат; ПЭГ – полиэтиленгликоль; УФ-С – ультрафиолет С. В таблице представлены данные для содержания стильбенов в норме без воздействий так и с наибольшим содержанием после определенных воздействий в каждом индивидуальном исследовании.

Имеющиеся данные по профилю стильбенов показывают, что растения могут значительно отличаться по спектру производимых стильбенов (Таблица 1, 2). Пиносильвин и производные пиносильвина в основном накапливаются в хвойных породах, например в сосне и в еле (Таблица 1). Производные резвератрола и пицеатаннола были обнаружены в травянистых растениях, полукустарниках, лианах и деревьях (Polygonaceae, Fabaceae, Ericaceae, Vitaceae, Pinaceae, Gnetaceae и др.). *m*-резвератрол и, в меньшей степени, *m*-пицеатаннол и *m*-птеростильбен являются наиболее известными стильбенами за их ценные свойства и поэтому привлекают к себе особое внимание (Kalantari and Das 2010; Piotrowska et al. 2012; Estrela et al. 2013).

Различные виды виноградной лозы были наиболее изучены с точки зрения состава и уровня содержания стильбенов по сравнению с другими видами растений (Таблица 1 и 2). Недавний детальный качественный и количественный анализ производных стильбенов (Flamini et al. 2013, 2016), проведенный с использованием современных подходов, показал, что в общей сложности более 20 стильбенов было описано в ягодах винограда *V. vinifera* (Таблица 1). Поэтому не исключено, что значительная часть стильбеновых соединений не была обнаружена в предыдущих исследованиях по техническим причинам. Возможно, что разработка и применение более точных технологий идентификации метаболитов и качественного анализа

расширит спектр стильбенов в уже проанализированных видах растений и список организмов, продуцирующих стильбены, будет расширен.

Ряд исследований показывает, что синтез и накопление стильбенов сильно зависят от стадии развития ягод винограда и происходят главным образом в кожице виноградных ягод (Teixeira et al. 2013; Wang et al. 2015). В естественных условиях содержание стильбенов в незрелых ягодах низкое, в то время как количество стильбенов резко возрастает при полной зрелости ягод, где стильбены представлены главным образом в виде *m*-пицеида (Wang et al. 2015; Teixeira et al. 2013).

Детальное исследование распределения *m*-резвератрола в молодых растениях виноградной лозы (Wang et al. 2010) показали, что *m*-резвератрол накапливается в стебле (ксилеме и флоэме), пазушных почках, верхушках побегов, черешках, корнях и листьях молодых лиан винограда. В то время как самое высокое содержание *m*-резвератрола наблюдалось в стеблевой флоэме и самое низкое – в листьях, хотя для листьев характерен самый высокий уровень транскриптов мРНК *STS* и белков *STS* (Wang et al. 2010). Поэтому очевидно, что основной синтез резвератрола идет в листьях, а потом избытки резвератрола распространяются по растению и стильбены накапливаются уже в виде разных производных резвератрола.

Согласно Pan et al. (2009) и Wang et al. (2010) белки *STS* были локализованы в основном на клеточной стенке и вторичных клеточных стенках клеток из различных тканей виноградной лозы. *STSs* также были обнаружены в хлоропластах, эндоплазматическом ретикулуме, вакуоли и цитоплазме (Pan et al. 2009; Wang et al. 2010). Pan et al. (2009) отметили, что локализация белков *STS* не претерпела значительных изменений в процессе развития ягод. Недавно, Jyske et al. (2015, 2016) применили комбинацию новых микроаналитических методов для анализа распределения и локализации стильбенов в заморожено-гидратированном состоянии (т.е. *in vivo*) в тканях флоэмы ели обыкновенной *Picea abies* и обнаружили, что стильбены локализованы в клетках аксиальной паренхимы.

1.4. Биосинтез резвератрола и других стильбенов.

Стильбеноиды, в том числе основные стильбены, бибензилы, фенантрены и родственные соединения – это органические фенольные соединения, производные фенилпропаноидного пути, которые структурно отличаются наличием 1,2-дифенилэтиленового ядра (Riviere et al. 2012), т.е. являются производными молекулы этилена с двумя фенильными группами в положении 1 и 2 (Рисунок 1).

Биосинтез стильбенов и других фенилпропаноидов начинается с синтеза *транс*-коричной кислоты или ее производной *пара*-кумаровой кислоты из ароматических аминокислот фенилаланина или тирозина, соответственно (Рисунок 2; Yu and Jez, 2008). Стильбен синтаза (STS EC2.3.1.95) катализирует прямое образование остова мономерных стильбенов из трех молекул малонил-КоА и, либо одной молекулы *n*-кумарил-КоА для получения резвератрола, либо с коричневым-коэнзимом А (коричный-КоА или циннамоил-КоА) с образованием пиносилвина (Рисунок 2; Austin and Noel, 2003). STS принадлежит к суперсемейству ферментов поликетидсинтаз III типа и имеет высокую идентичность аминокислотной последовательности с халконсинтазой (CHS EC 2.3.1.74), которая использует те же субстраты, что и STS, но отвечает за образование соединений флавоноидного типа (Austin and Noel, 2003). Было высказано предположение, что STS может катализировать образование пицеатаннола с использованием кофеил-КоА в качестве субстрата, но специфический фермент, ответственный за биосинтез пицеатаннола, не был идентифицирован (Рисунок 2; Watts et al. 2006; Chong et al. 2009; Hammerbacher et al. 2011).

Большинство растительных стильбенов являются производными мономерных стильбенов резвератрола, пиносильвина или пицеатаннола (Рисунок 2). *Транс*-изомер (*T* или *E*) является наиболее распространенной конфигурацией мономерных стильбенов растительного происхождения (Таблица 1 и 2; Riviere et al. 2012) в отличие от *цис*-изомера или *Z*-изомера.

Олигомерные стильбены образуются окислительной связью между гомогенными или гетерогенными мономерными стильбенами и характеризуются сложными структурными конфигурациями (Shen et al. 2009).

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что гены *STS* у сорго, ели, сосны, арахиса и шелковицы образуют небольшие семейства генов, состоящие из 1-10 генов (Preisig-Müller et al. 1999; Yu et al. 2005; Paterson et al. 2009; Zhu et al. 2014; Warren et al. 2015; Li et al. 2016), в то время как семейство генов *STS* в виноградной лозе состоит из 48 генов *STS*, где, по меньшей мере, 32 гена являются потенциально функциональными, как было выявлено в результате общегеномного анализа виноградной лозы (Vannozzi et al. 2012; Parage et al. 2012). Функциональный анализ девяти генов *STS*, представляющих наибольшее разнообразие семейства генов *STS* в виноградной лозе, проведенный Parage et al. (2012), показал, что гены кодируют белки, обладающие активностью синтезировать *m*-резвератрол. Возможно, что различные гены *STS* кодируют ферменты с неодинаковой активностью или специфичностью. Однако в настоящее время нет четких экспериментальных данных о том, отличаются ли белки *STS* виноградной лозы и других растений в каждом мультигенном семействе по своей ферментативной активности и специфичности для биосинтеза стильбенов.

Экспрессионный анализ членов семейства генов *STS* в виноградной лозе и шелковице показал, что некоторые гены *STS* проявляют различия в транскрипционных реакциях во время развития и в ответ на экологические стрессы (Vannozzi et al. 2012; Shi et al. 2014; Dai et al. 2012). Были также обнаружены различия в тканеспецифической экспрессии некоторых членов семейства генов *STS* виноградной лозы и шелковицы (Vannozzi et al. 2012; Shi et al. 2014; Li et al. 2016). Таким образом, возможно, что отдельные гены *STS* могут быть активированы под различными сигналами развития или окружающей среды, или в различных растительных тканях, что приводит к накоплению стильбенов.

Меньше известно о ферментах, катализирующих различные модификации стильбенов, включая олигомеризацию стильбенов (образование димерных, тримерных, тетрамерных и др. стильбенов), гликозилирование (присоединение остатков сахаров), метоксилирование (присоединение метильных групп), пренилирование (присоединения гидрофобных молекул), геранилирование (присоединение геранилированных групп) и некоторые другие модификации.

Растительные пероксидазы (ЕС 1.11.1.7) ответственны за катализ окислительного соединения резвератрола с образованием его природных олигомеров (Morales et al. 1997; Barceló et al. 2003). Однако эксперименты *in vitro* с *m*-резвератролом и пероксидазой не привели к образованию олигомеров резвератрола с естественной конфигурацией, которую можно найти *in vivo*. На сегодняшний день, насколько нам известно, не было получено никаких окончательных и убедительных данных, которые бы непосредственно доказывали участие специфических пероксидаз (или других растительных ферментов) в образовании олигомеров стильбенов *in vivo*.

Известно, что гликозилирование стильбенов катализируется растительными гликозилтрансферазами. Фермент, катализирующий гликозилирование резвератрола, и соответствующий ему ген *VLRSGt* были идентифицированы и охарактеризованы в винограде *Vitis labrusca* (Hall and De Luca, 2007). Известно, что гликозилирование повышает растворимость *m*-резвератрола (Lepak et al. 2015), а также помогает защитить резвератрол и другие полифенолы от ферментативного окисления (Regev-Shoshani et al. 2003), что, в свою очередь, продлевает период полураспада полифенолов в растительных клетках и сохраняет их биологические свойства и, как предполагается, способствует накоплению и транспортировке стильбенов.

Стильбены также могут подвергаться реакциям метилирования или метоксилирования растительными метилтрансферазами, принадлежащими к *s*-Аденозил-L-метионин-зависимым O-метилтрансферазам (ЕС 2.1.1), приводящим к образованию метоксилированных стильбенов, таких как

пиносильвин в сосне обыкновенной *Pinus sylvestris* или птеростильбен в виноградной лозе (Рисунок 1).

Было показано, что рекомбинантный фермент пиносильвин О-метилтрансфераза (ПМТ) из сосны обыкновенной *P. sylvestris* катализирует метилирование пиносильвина *in vitro* (Chiron et al. 2000). Затем Кацуяма и др. (2007) подтвердили О-метилирующую активность ПМТ по отношению к стильбенам *in vitro*, используя гомологичный ген риса *Oryza sativa* и экспрессируя его в *Escherichia coli*. Было показано, что в винограде и сорго резвератрол О-метилтрансферазы (ОМТ) катализируют образование диметилированного производного резвератрола, птеростильбена, как *in vitro*, так и *in vivo* (Schmidlin et al. 2008; Rimando et al. 2012). Транскрипция генов *ПМТ* и *ОМТ* индуцировалась в иглах сосны обыкновенной и листьях виноградной лозы соответственно в ответ на биотические и абиотические стрессы, такие как грибковая инфекция, ультрафиолетовое облучение, озон, ранение или обработка тяжелыми металлами (Chiron et al. 2000; Schmidlin et al. 2008).

Недавнее исследование впервые выявило стильбеноидспецифическую пренилтрансферазу, участвующую в биосинтезе пренилированных стильбенов с использованием культур волосатых корней арахиса, продуцирующих арахидины (Yang et al. 2016). Гены, кодирующие растительные стильбеноидспецифические пренилтрансферазы, не были клонированы и охарактеризованы, но исследование Yang et al. (2016) предоставили важную информацию для последующей идентификации генов пренилтрансферазы.

1.5. Регуляция биосинтеза резвератрола и других стильбенов.

1.5.1. Биотические и абиотические стрессы как регуляторы биосинтеза стильбенов.

Хорошо известно, что стильбены действуют как фитоалексины, растительные защитные вещества с низкой молекулярной массой. Стильбены

синтезируются *de novo* в ответ на микробные патогены и быстро накапливаются в зонах инфекции (Ahuja et al. 2012). Многочисленные исследования показывают, что производство стильбенов в растениях индуцируется при заражении различными грибковыми инфекциями. Перенос генов *STS* в геномы различных растений часто приводил к появлению или увеличению продукции стильбенов и, как следствие, к повышению устойчивости к различным грибковым патогенам (Chong et al. 2009; Jeandet et al. 2010).

Несмотря на наличие обширной информации о деятельности стильбенов против растительных грибковых патогенов (Chong et al. 2009; Jeandet et al. 2010) и микробных патогенов человека (Pangeni et al. 2014), совсем мало сообщений об активности и накоплении стильбенов в ответ на фитопатогенные бактерии. Maddox et al. (2010) сообщили, что 12 фенольных соединений, включая стильбены, ингибируют рост патогенной бактерии растений *Xylella fastidiosa*, выделенной из винограда и миндаля.

Ряд исследований показал, что стильбены подавляют рост *in vitro* бактерий, ассоциированных с пищевыми продуктами. Например, Plumed-Ferrer et al. (2013) обнаружили, что группа связанных с древесиной стильбенов обладает явной антимикробной активностью в отношении некоторых пищевых патогенов и организмов, вызывающих порчу пищевых продуктов, включая как грамотрицательные (сальмонеллы), так и грамположительные бактерии (листерии, стафилококки). По данным Ferreira et al. (2014), резвератрол проявляет бактерицидную активность в отношении *Arcobacter butzleri* и *Arcobacter cryaerophilus*, полученных из образцов пищевых продуктов. Таким образом, необходимы дополнительные исследования для документирования возможной индукции биосинтеза стильбенов фитопатогенными бактериями и проявления бактерицидной активности стильбенов против этих фитопатогенных бактерий, особенно тех, которые заражают сельскохозяйственные растения.

Известно, что биосинтез стильбенов в растениях может быть вызван различными абиотическими стрессовыми стимулами, включая механическое повреждение, озон, ультрафиолетовое излучение, истощение сульфатов, стресс от тяжелых металлов, засуха и тепловой стресс. Например, Bavaresco с соавторами (Bavaresco et al. 1997) показали, что механическое повреждение кожицы ягод виноградной лозы привело к увеличению содержания стильбенов в неинфицированных ягодах. Chiron и др. (2000) и Chung и др. (2001) показали, что повреждение, вызванное ложной грибковой инокуляцией или прокалыванием листьев, привело к индукции генов биосинтеза стильбенов в сосне обыкновенной и арахисе соответственно. Также было показано, что нарезка очищенных семян арахиса увеличивает выработку *m*-резвератрола (Rudolf and Resurreccion, 2005).

Известно, что механические повреждения растений, вызванные сверлением отверстий в стволе сосны обыкновенной, увеличивали образование пиносильвина и монометилового эфира пиносильвина (Harju et al. 2009).

Согласно ранее опубликованной работе (Rosemann et al. 1991), воздействие озона активировало как образование стильбенов (пиносильвина и эфира пиносильвина), так и ферментативную активность PAL и STS в иглах саженцев сосны обыкновенной. Однако в другой работе (Pearce, 1996) было показано, что уровни стильбеновых глюкозидов астрингина и изоргапонтина, основных конститутивных противогрибковых стильбеновых соединений в коре ели, не изменялись при применении озона в тканях ствола ели Ситка (*Picea sitchensis*). Хотя впоследствии несколько исследований показали, что обработка озоном увеличила уровни транскриптов генов *STS* в сосне обыкновенной (Zinser et al. 1998; Chiron et al. 2000). Шуберт с соавторами (Schubert et al. 1997) показали, что *Vst1*, ген *STS* из виноградной лозы, транскрипционно регулируется применением озона, и более того были идентифицированы промоторные последовательности *Vst1*, необходимые для индуцированной экспрессии озоном.

Далее было показано, что послеуборочная обработка столового винограда озоном способствовала накоплению резвератрола и птеростильбена (Sarig et al. 1996) и *m*-резвератрола, пицеатаннола и виниферинов (González-Barrio et al. 2006) в количествах, аналогичных тем, которые вызываются обработкой ультрафиолетом-С (УФ-С).

Многочисленные исследования показывают, что воздействие ультрафиолетового света индуцирует биосинтез стильбенов у различных видов растений (например, у виноградной лозы, сосны, арахиса и гнетума), и индукция сопровождалась активацией транскрипции, накоплением белка и активацией активности ферментов STS и некоторых других ферментов биосинтеза стильбенов (Adrian et al. 2000; Wang et al. 2010, 2015; Tang et al. 2010; Suzuki et al. 2015; Deng et al. 2017; Kiselev et al. 2017).

Для ягод виноградной лозы было показано, что индукция биосинтеза резвератрола после облучения УФ-С происходила в основном в форме *m*-резвератрола и зависела от стадии развития ягоды (Wang et al. 2015). Также известно, что различные уровни УФ-В влияют на накопление фенолов. Например, Verli и др. (2008) проанализировали содержание *m*-резвератрола в кожуре ягод, собранной с лианы *V. vinifera*, выращенной под солнечным светом с полным УФ-В (+УФ-В) и отфильтрованным УФ-В (-УФ-В) в трех разных местах на высоте 500, 1000 и 1500 м над уровнем моря, и обнаружили, что различные уровни солнечного УФ-В влияют на накопление стильбенов. Самое высокое содержание резвератрола было обнаружено в кожуре ягод из +УФ-В на высоте 1500 м над уровнем моря. При такой обработке разница между +УФ-В и -УФ-В была статистически значимой.

Vannozzi с соавторами (2012) провели общегеномный анализ профилей экспрессии мультигенного семейства *STS* в *V. vinifera* после воздействия УФ-С, механического поранения, увядания ягод после сбора урожая и заражения *P. viticola* с помощью секвенирования транскриптома (мРНК-seq) и количественных методов ОТ-ПЦР. Согласно полученным результатам, все виды обработки привели к значительному усилению

экспрессии по меньшей мере нескольких представителей семейства мультигенных генов *VvSTS*. При этом, облучение УФ-С привело к наибольшему повышению количества мРНК большинства генов *VvSTS* по сравнению с другими стрессовыми воздействиями (Vannozzi et al. 2012).

Adrian и др. (1996) и Aziz и др. (2006) продемонстрировали, что биосинтез стильбенов в тканях *V. vinifera* индуцировался применением тяжелых металлов, таких как алюминий ($AlCl_3$, индукция *m*-резвератрола) или медь ($CuSO_4$, индукция *m*-резвератрола, *m*-*e*-виниферина и *m*-пицеида). Cai и др. (2013) сообщили, что ионы тяжелых металлов (Co^{2+} , Ag^+ , Cd^{2+}) увеличивали выработку пицеида в клеточных суспензионных культурах винограда *V. vinifera*.

В недавних публикациях есть результаты, демонстрирующие, что условия засухи и осмотический стресс оказывают положительное влияние на биосинтез стильбенов в растениях *V. vinifera*. Показано, что дефицит воды вызвал повышение уровня *m*-пицеида в ягодах Каберне Совиньон, но не в Шардоне (Deluc et al. 2011). Хатми с коллегами (Hatmi et al. 2014) обнаружили, что осмотический стресс, вызванный полиэтиленгликолем (ПЭГ) и сахарозой, увеличивает накопление *m*-резвератрола и *e*-виниферина в листьях *V. vinifera* cv. Шардоне. Однако обнаруженное увеличение накопления *m*-резвератрола и *e*-виниферина, вызванное осмотическим стрессом, было заметно менее выраженным, чем у листьев, инфицированных *B. cinerea*. Корсо с соавторами (Corso et al. 2015) проанализировали уровни производства *m*-резвератрола и *m*-пицеида в условиях засухи в корнях виноградной лозы, чувствительной к засухе (*V. riparia* × *V. rupestris*), и засухоустойчивой виноградной лозы [(*V. vinifera* × *V. berlandieri*) × *V. berlandieri* cv. Resseguier n. 1]. Полученные результаты показали, что количество *m*-резвератрола было повышено в условиях засухи, в то время как содержание *m*-пицеида существенно не менялось (увеличение *m*-резвератрола было выше в генотипе, устойчивом к засухе). Кроме того, авторы в этой работе обнаружили, что увеличение накопления *m*-

резвератрола было связано с увеличением экспрессии некоторых генов *VvSTS* и нескольких факторов транскрипции *VvWRKY* (Corso et al. 2015). В отличие от этих исследований, Веззулли с соавторами показали, что засуха оказала незначительное влияние на содержание стильбенов в кожице виноградных ягод *V. vinifera* cv. Barbera (Vezzulli et al. 2007). Кроме того, Муилу-Макела с коллегами обнаружили, что вызванный ПЭГ осмотический стресс не влияет на содержание стильбенов в культурах клеточной суспензии сосны *P. sylvestris* (Muilu-Makela et al. 2015). По-видимому, условия засухи и осмотический стресс оказывают влияние на биосинтез стильбена в зависимости от генотипа растения.

Недавние исследования показывают, что другие абиотические факторы стресса, такие как воздействие высокой освещенности и высокой температуры, также могут индуцировать биосинтез стильбенов. Например, было показано, что накопление стильбенов и экспрессия генов биосинтеза стильбенов в основном индуцировались при освещении красными и синими светодиодными лампами (LED), в сравнении с белым флуоресцентным светом и фиолетовым светом светодиодных ламп (Ahn et al. 2015). Дэгу с коллегами показали, что высокие воздействия освещенности ($2500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{сек}^{-1}$) для виноградных ягод привели к временному повышению уровня стильбенов на предварительной стадии созревания ягод (увеличился пицеид) и в созревших ягодах (увеличились пицеид и виниферины), в то время как высокие температуры (40°C) увеличили содержание виниферинов во всех пробах только на предварительной стадии созревания ягод (Degu et al. 2016). Так же высокие температуры (40°C) индуцируют экспрессию *PAL*-, *САН*-, *4CL*- и *STS*-подобных генов и повышают количество пицеатаннола в листьях *Gnetum parvifolium*, но не влияют на содержание резвератрола (Deng et al. 2016). Однако следующий анализ показал, что условия высокой температуры подавляли накопление как резвератрола, так и пицеатаннола в стеблях и корнях *G. parvifolium*, в то время как экспрессия генов биосинтеза стильбенов была увеличена с некоторой вариабельностью (Deng et al. 2017).

Таким образом, имеются значительные доказательства того, что грибковая инфекция, озон, механическое повреждение и ультрафиолетовое облучение значительно активируют биосинтез стильбенов, в то время как данные о биосинтезе стильбенов в ответ на абиотические стрессовые условия ограничены.

1.5.2. Регуляция биосинтеза стильбенов с помощью кальциевой сигнальной системы.

Кальций (Ca^{2+}) в комплексной сети передачи информации служит универсальным посредником, поскольку ни один вторичный мессенджер не реагирует на столь большое число стимулов, как свободный Ca^{2+} цитозоля (Sanders et al. 1999). У растений Ca^{2+} распределяется между бóльшим числом компартментов клетки, чем у животных (White and Broadley, 2003). Однако подобно другим организмам, у растений концентрация Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) и ядре поддерживается на уровне, который на 3-4 порядка величин ниже, чем в других клеточных структурах и во внеклеточных жидкостях. Именно поэтому увеличение числа ионов Ca^{2+} в конкретном участке клетки всего на несколько ионов является мощным и очень информативным сигналом. Содержание кальция в отдельных структурах клетки регулируется с участием Ca^{2+} -помп и Ca^{2+} -каналов (Sanders et al. 1999; Алехина и др. 2005). Градиент электрохимического потенциала для Ca^{2+} на цитоплазматической мембране (ЦПМ), тонопласте и мембране эндоплазматического ретикулаума (ЭР) таков, что поступление Ca^{2+} в цитозоль происходит по каналам пассивно, а удаление с участием помп – с затратой энергии (Тарчевский, 2002).

Известно, что кальциевая сигнализация играет важную роль в активации защитных реакций растений на абиотические и биотические стрессы (Ludwig et al. 2004; Lecourieux et al. 2006; Reddy et al. 2011).

К основным известным регуляторным белкам кальциевой сигнальной системы, способным связывать Ca^{2+} , у растений относят 5 семейств белков:

(1) Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPK), (2) кальмодулины (CaM), (3) кальмодулин-подобные белки (CML), (4) кальцийнейрин-В-подобные белки (CBL) и взаимодействующие с ними киназы (CIPK), (5) Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CCaMK) (Roberts and Harmon, 1992; Hashimoto, Kudla, 2011). В качестве первичного сенсора Ca^{2+} -сигнала рассматриваются и некоторые фосфатазы (Sanders et al. 1999). Считают, что у растений большая часть ферментативной активности, которая стимулируется Ca^{2+} , связана именно с CDPK, а меньшая с CCaMK и CaM (White and Broadley, 2003).

Показано, что мишенью для некоторых изоформ CDPK, например для AtCPK1 модельного растения *Arabidopsis thaliana*, является PAL (Cheng et al. 2002). Также одной из мишеней CDPK является локализованная в мембране НАДФН-оксидаза, главный источник активных радикалов кислорода (таких как H_2O_2 и O_2^-), которые активируют вторичный метаболизм (Xing et al. 2001; Kobayashi et al. 2007). CDPK принадлежат к одной из групп Ser/Thr-протеинкиназ эукариотических клеток. CDPK имеют три функциональных домена – каталитический, автоингибиторный и С-терминальный CaM-подобный регуляторный домен, имеющий специальные области связывания кальция, называемые EF-мотивами (Cheng et al. 2002).

Полногеномное секвенирование двух таксономически далеких видов растений, риса *O. sativa* (однодольные) и арабидопсиса *A. thaliana* (двудольные), показало наличие в их геномах 27 и 34 изоформ генов CDPK, соответственно, и такое многообразие может свидетельствовать о том, что отдельные изоформы выполняют разные функции и участвуют в различных сигнальных путях (Cheng et al. 2002; Asano et al. 2005). На сегодняшний день все CDPK по аминокислотной последовательности разделяют на четыре семейства (Cheng et al. 2002; Zhang et al. 2015b). Известно, что полная активация фермента при фосфорилировании с участием CDPK возможна, если к регуляторному участку одновременно присоединяется 14-3-3 белок (Cheng et al. 2002). CDPK локализованы во многих органеллах клетки,

включая ядро, ЦПМ и внутриклеточные мембраны, пероксисомы и вакуоли (Harper and Harmon, 2005).

Постоянно пополняемый список белков-мишеней для СДПК включает транспортные белки мембран (H^+ -АТФазу ЦПМ, калиевые и анионные каналы замыкающих клеток устьиц, аквапорины и др.), ферменты (сахарофосфатсинтазу, фосфоенолпируваткарбоксилазу, нитратредуктазу, фосфатидилинозитолкиназу, PAL и др.), факторы транскрипции, белки цитоскелета и другие мишени (Алехина и др., 2005; Harper and Harmon, 2005). Известно, что СДПК играют важную роль в формировании клубеньков при взаимодействии растения и бактерий некоторых родов семейства Rhizobiaceae (Levy et al. 2004; Harper and Harmon, 2005; Tirichine et al. 2006; Gargantini et al. 2006). Таким образом, СДПК включены в передачу Ca^{2+} -сигнала, связанную с поддержанием мембранного потенциала, регуляцией углеводного и азотного обмена, устьичными движениями, ответами на стрессовые воздействия, формированием архитектуры клетки и т.д.

В ряде работ были представлены доказательства того, что передача сигналов кальция участвует в регуляции биосинтеза стильбенов. Согласно данным Ванделле с коллегами, индуцированный элиситором приток ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в клетках винограда приводит к образованию фосфорилированно-зависимого оксида азота (NO) (Vandelle et al. 2006). Это в свою очередь приводит к ряду эффектов, включая высвобождение Ca^{2+} из внутренних хранилищ, увеличение потоков Ca^{2+} через плазматическую мембрану, изменение потенциала плазматической мембраны, выработке активных форм кислорода (АФК), активацию митоген активируемых протеинкиназ (МАРК), усиление экспрессии генов *PAL* и *STS* и увеличение биосинтеза стильбенов (Poinssot et al. 2003; Vandelle et al. 2006). Используя на суспензионных культурах клеток винограда блокаторы Ca^{2+} -каналов и хелатор Ca^{2+} , Фаури с коллегами (Faurie et al. 2009) и Бельчи-Наваррос соавторами (Belchí-Navarro et al. 2013b) подтвердили данные Ванделле с коллегами (Vandelle et al. 2006). Они показали, что индуцированный

метилжасмонатом (MeJA) или циклодекстринами (CDS) в суспензионных культурах клеток винограда приток Ca^{2+} через кальциевые каналы плазматической мембраны и увеличение концентрации цитозольного кальция $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ были необходимы для накопления стильбенов.

Более того, использование ионофора Ca^{2+} (A23187), активатора внутриклеточного кальция, увеличивало накопление резвератрола в каллусных культурах клеток *V. amurensis* с изначально низким содержанием стильбенов (Kiselev et al. 2012), в то время как применение блокаторов каналов Ca^{2+} (LaCl_3 , верапамила и нифлумовой кислоты) значительно снижало накопление стильбенов в культурах клеток винограда с высоким уровнем содержания стильбенов (Dubrovina et al. 2009).

Исследования также показали, что обработка культур клеток винограда *V. amurensis* блокаторами Ca^{2+} каналов и ионофором Ca^{2+} влияла на количество мРНК генов кальций-зависимой протеинкиназы (CDPK) и генов *STS* (Dubrovina et al. 2009; Kiselev et al. 2012). Применение антагониста кальмодулина W7 (N-(6-аминогексил)-5-хлор-1-нафталинсульфонамид), который известен как ингибитор активности CDPK, значительно уменьшило накопление резвератрола и экспрессию генов *STS* в культурах клеток винограда *V. amurensis* (Kiselev et al. 2013a). В недавних исследованиях было показано, что сверхэкспрессия генов *VaCPK20* и *VaCPK29* в культурах клеток винограда значительно увеличивала выработку *m*-резвератрола, в то время как сверхэкспрессия генов *VaCPK3a*, *VaCPK9*, *VaCPK13* и *VaCPK21* не оказывала положительного влияния на выработку стильбенов (Kiselev et al. 2013b; Aleynova-Shumakova et al. 2014; Aleynova et al. 2015; Dubrovina et al. 2016). Эти результаты указывают на то, что некоторые CDPK участвуют в регуляции биосинтеза стильбенов в качестве положительных регуляторов.

1.5.3. Регуляция биосинтеза стильбенов с помощью активных форм кислорода (АФК).

Помимо увеличения потока Ca^{2+} в цитоплазму и изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, ранние сигнальные события в защитной реакции растений включают выработку АФК. Например, выработка анионов супероксида ($\text{O}_2^{\cdot-}$), которые быстро переходят в H_2O_2 . Известно, что АФК играют важную роль в защитных реакциях растений, включая выработку вторичных метаболитов (Zhao et al. 2005). Чунг с коллегами продемонстрировали, что накопление резвератрола и транскриптов *STS* увеличивалось в листьях арахиса после обработки H_2O_2 и паракватом, генератором АФК (Chung et al. 2003).

Фаурье с соавторами (Faurie et al. 2009) и Бельчи-Наварро с коллегами (Belchi-Navarro et al. 2013b) обнаружили, что индуцированная MeJA и CDS продукция стильбенов в суспензиях клеток винограда зависела от производства $\text{O}_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 . Согласно данным Фаурье с соавторами, $\text{O}_2^{\cdot-}$ оказывал большее стимулирующее действие на биосинтез стильбенов, чем H_2O_2 (Faurie et al. 2009). Кроме того, Дэгу с коллегами показали, что менадион, экзогенно применяемый к отделенным ягодам винограда в качестве индуктора окислительного стресса (высвобождает АФК, такие как $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и OH^{\cdot}), увеличивает содержание стильбенов на всех стадиях созревания ягод (Degu et al. 2016).

Оксид азота (NO) известен как газообразный АФК, относящийся к подгруппе активных форм азота, который синтезируется в ответ на атаку патогенов и может способствовать защитной реакции растений (Domingos et al. 2015). Было показано, что зависящая от фосфорилирования продукция NO участвует в активации синтеза мРНК генов *PAL* и *STS* в суспензионных культурах клеток винограда в ответ на обработку эндополигалактуроназой 1 (BCPG1), мощным грибковым элиситором (Vandelle et al. 2006). Бельчи-Наварро с коллегами подтвердил ранее опубликованные данные, где было показано, что выработка *m*-резвератрола в клетках винограда, обработанных CDS и MeJA, зависела также от NO. Таким образом, возможно, что NO также

является сигнальной молекулой в производстве стильбенов в ответ на атаку патогенов.

Вышеописанные результаты указывают на то, что АФК действуют как промежуточное звено в сигнальных путях, регулирующих биосинтез стильбенов в клетках растений. Примечательно, что Танг с соавторами сообщили, что производство резвератрола способствовало устойчивости арахиса к ультрафиолетовому излучению, стимулируя накопление АФК и активацию антиоксидантных ферментов (Tang et al. 2010). Таким образом, также возможно, что резвератрол и другие стильбены могли бы, в свою очередь, стимулировать выработку АФК и, таким образом, способствовать активному производству стильбенов.

1.5.4. Регуляция биосинтеза стильбенов с помощью фитогормонов.

В ряде исследований показано, что выработка стильбенов также регулируется растительными гормонами, такими как жасмоновая кислота (JA), ее метиловый эфир MeJA, SA, этилен (ET) и абсцизовая кислота (ABA).

JA и его производные, включая MeJA, являются гормонами стресса растений, полученными из жирных кислот, которые участвуют в регуляции защитных реакций растений (Dar et al. 2015). Существует множество исследований, показывающих, что биосинтез стильбенов в культуре клеток винограда и в тканях растений винограда увеличился после обработки JA или MeJA (Larronde et al. 2003; Tassoni et al. 2005; Vezzulli et al. 2007; Kiselev et al. 2007; Faurie et al. 2009; Tassoni et al. 2012; Taurino et al. 2015; Xu et al. 2015; Degu et al. 2016).

Влияние 12-оксо-фитодиеновой кислоты, биологически активного предшественника JA, и коронатина, грибкового фитотоксина, имитирующего биологически активную форму JA, на биосинтез стильбенов было исследовано с использованием суспензионных культур клеток *V. vinifera* и сравнено с эффектами JA и MeJA (Taurino et al. 2015; Almagro et al. 2015).

OPDA, COR и JA по сравнению с MeJA оказывали более низкий стимулирующий эффект на содержание *m*-резвератрола, но более высокий на содержание виниферинов.

Известно, что SA опосредует местные и системные реакции растений против микробных патогенов растений и абиотических стрессов (Vlot et al. 2009; Khan et al. 2015). Было показано, что обработка SA увеличивала содержание резвератрола, накапливающегося в клеточных культурах *V. amurensis* и *V. vinifera*, что сопровождалось увеличением количества мРНК генов *PAL* и *STS* (Kiselev et al. 2007, 2010; Xu et al. 2015). Шао с соавторами продемонстрировали, что как SA, так и MeJA могут увеличивать продукцию 2,3,5,4'-тетрагидроксистильбен-2-О-β-D-гликозида в клеточных суспензионных культурах *Polygonum multiflorum* (Shao et al. 2012). Обработка SA избирательно повышала количество мРНК некоторых генов *STS* в каллусах *V. amurensis* и в то же время заметно снижала уровень метилирования цитозина в ДНК этих генов (Kiselev et al. 2015). Таким образом, селективное деметилирование ДНК определенных генов *STS* может быть необходимо для показанной активации биосинтеза стильбенов в ответ на SA. Однако также есть результаты, где при добавлении SA к клеточной суспензии *V. vinifera*, предварительно обработанной CDS в сочетании с ET и/или MeJA, снижало положительный эффект обработки ET или MeJA на продукцию резвератрола (Belchí-Navarro et al. 2013a). Примечательно, что при добавлении всех агентов (CDS, MeJA, ET и SA) уровень резвератрола не снижался и существенно не отличался от уровня, вызванного обработками отдельно MeJA или MeJA вместе с ET.

Этилен (ET) – это газообразный растительный гормон, участвующий в ряде физиологических процессов растений, таких как созревание плодов, опадение листьев, старение или реакция на стресс (Wang et al. 2013). ET не является распространенным индуктором вторичного метаболизма растений (Zhao et al. 2005), но Чунг с коллегами сообщили, что обработка листьев арахиса этефоном, соединением, высвобождающим этилен, индуцировала

накопление мРНК генов *STS* (Chung et al. 2001). Гримминг с коллегами исследовали роль ЕТ в регуляции транскрипции гена *STS* из *V. vinifera* и продемонстрировали, что ЕТ участвует в индуцированной озоном регуляции этого гена (Grimmig et al. 2003). Обработка черенков *V. vinifera* этефоном привела к увеличению содержания стильбенов и количества мРНК генов *PAL* и *STS* (Belhadj et al. 2008). Обработка винограда *V. vinifera* ЕТ привела к повышению концентрации *цис*-пицеида и *m*-резвератрола в вине ЕТ (Becatti et al. 2014). Эти исследования показывают, что ЕТ участвует в сигнальных путях, модулирующих выработку стильбенов в клетках растений.

В дополнение к исследованиям, в которых сообщается о положительном влиянии JA, MeJA, SA и ЕТ на продукцию стильбенов, три недавних исследования показывают, что АВА участвует в сигнальной сети, регулирующей биосинтез стильбенов в клетках растений. Во-первых, Николас с соавторами показали, что сверхэкспрессия гена винограда *VvABF2*, кодирующего транскрипционный фактор, реагирующий на содержание АВА, приводило к сильному увеличению накопления стильбенов (*m*-резвератрол и *m*-пицеид) в трансгенных линиях клеток винограда, особенно после обработки АВА (Nicolas et al. 2014). Примечательно, что это исследование также показало, что обработка АВА само по себе увеличивало продукцию *m*-резвератрола в контрольных (нетрансформированных) клетках винограда (Nicolas et al. 2014). Затем Кагеями с коллегами сообщили, что АВА индуцирует биосинтез бисбибензилов, группу стильбеноидных соединений, в печеночнике *Marchantia polymorpha* (Kageyama et al. 2015). Кроме того, Дэгу с соавторами продемонстрировали, что экзогенная обработка АВА ягод винограда существенно увеличивала содержание резвератрола, пицеида и виниферина (во время созревания ягод) (Degu et al. 2016).

Вышеизложенные данные указывают на то, что фитогормоны растений JA, MeJA, SA, ЕТ и АВА положительно регулируют биосинтез стильбенов, в то время как, насколько нам известно, нет данных о влиянии

гиббереллиновой кислоты (GA) и brassinosterоидов. Точный механизм гормонально-опосредованной регуляции биосинтеза стильбенов остается неясным. В исследовании, посвященном анализу транскрипционного ответа на стимуляторы гормонов в клетках *V. vinifera*, была представлена некоторая информация о регуляторных каскадах, активируемых MeJA отдельно или в сочетании с модифицированными CDS (Almagro et al. 2014). MeJA активирует гены *MYC2*, *MYC3* и факторы транскрипции винограда *JAZ*, которые являются основными факторами, регулирующими функционирование JA (Almagro et al. 2014).

Кроме того, экспрессия генов, кодирующих другие транскрипционные факторы винограда (например, *WRKY*, *NAC*, *ARF2* и *MYB*), некоторые сигнальные белки ET и предполагаемая митогенактивируемая протеинкиназа MAPKKK, была заметно увеличена в присутствии MeJA отдельно или в сочетании с CDS (Almagro et al. 2014). Следовательно, механизмы действия MeJA, приводящие к увеличению биосинтеза стильбенов, могут включать вышеперечисленные белки.

1.5.5. Регуляция биосинтеза стильбенов с помощью транскрипционных факторов.

В целом имеется скудная информация о регуляции биосинтеза стильбенов транскрипционными факторами, но в последние годы появилось несколько исследований, в которых сообщалось о двух транскрипционных факторах – гомологах вирусного онкогена миелобластома, V-myb типа R2R3, регулирующих биосинтез стильбенов в винограде. Холл с коллегами идентифицировали и охарактеризовали два транскрипционных фактора MYB14 и MYB15 *V. vinifera*, которые положительно регулируют путь биосинтеза стильбенов (Höll et al. 2013). Согласно полученным результатам, экспрессия этих транскрипционных факторов положительно коррелировала с определенными генами *STS* в различных органах *V. vinifera* в ответ на ультрафиолетовое облучение, поранение и заражение ложной плесенью.

Более того, экспрессия *MYB14* и *MYB15* коррелировала с накоплением *m*-пицеида в созревающих ягодах *V. vinifera*. Клеточные суспензии *V. vinifera* и листья табака, временно экспрессирующие репортерные конструкции, показали значительную индукцию промоторной активности *STS29* и *STS41* при совместной трансформации с *MYB14* и *MYB15*. Чтобы подтвердить участие этих транскрипционных факторов в регуляции биосинтеза стильбенов *in vivo* Холл с коллегами получили культуру волосатых корней винограда, сверхэкспрессирующие *MYB15* и показали, что повышенное накопление *m*-пицеида связано с повышением количества мРНК *STS29* и *STS41* в культуре волосатых корней (Höll et al. 2013). Таким образом результаты Холл с соавторами показали, что *MYB14* и *MYB15* участвуют в индукции транскрипции *STS29* и *STS41* у *V. vinifera*. В работе Фанг с соавторами было показано, что изменение количества мРНК *MYB14* коррелирует с изменением содержания резвератрола в двух сортах винограда (*Vitis monticola* × *Vitis riparia* с высоким содержанием резвератрола и *V. vinifera* с низким содержанием резвератрола) (Fang et al. 2014). Кроме того, Фанг с соавторами подтвердили данные Холл с коллегами о том, что паттерны экспрессии *MYB14* и *STS* были почти идентичны при обработке УФ-С. Используя дрожжевой одногибридный анализ, они также обнаружили, что *MYB14* напрямую взаимодействует с промотором *STS* (мотив Box-L5) *in vitro* (Höll et al. 2013). Фанг с соавторами подтвердили, что временная сверхэкспрессия *MYB14* может активировать транскрипцию *STS* в листьях растений винограда. Авторы также продемонстрировали, что сверхэкспрессия *MYB14* у трансгенного арабидопсиса может активировать транскрипцию GUS, управляемую промотором *STS* (Fang et al. 2014).

Дуан с коллегами представили доказательства, подтверждающие значимость *MYB14* в регуляции транскрипции *STS* (Duan et al. 2016). Используя сорта *Vitis sylvestris* с высоким уровнем резвератрола, было показано, что активация транскрипции *STS* коррелирует с различиями в количестве мРНК *MYB14* (*MYB15* не выявил значительных изменений) (Duan

et al. 2016). Используя ряд ингибиторов, гормонов стресса и ионофора Ca^{2+} , было установлено, что NADPH-оксидаза, приток Ca^{2+} , каскад MAPK и передача сигналов JA, но не SA, вовлечены в активацию транскрипции *MYB14* (Duan et al. 2016). Системный анализ, проведенный Вонг с коллегами, показал, что гены *V. vinifera VvMYB14* и *VvMYB15* имеют общие совместно экспрессируемые гены *STS* с геном *VvMYB13*, который является ближайшим гомологом *VvMYB15* (Wong et al. 2016).

В недавнем исследовании ген *MYB1 V. amurensis* (99% гомологии с *VvMYB15* на белковом уровне) был клонирован и сверхэкспрессирован в культурах каллусных клеток, продуцирующих *m*-резвератрол *V. amurensis* (Tyunin and Kiselev, 2017). Однако сверхэкспрессия *VaMYB1* не увеличивала содержание резвератрола в двух трансгенных линиях каллусных клеток.

AREB/ABF – это транскрипционные факторы, реагирующие на АВА, которые, как известно, регулируют реакцию растений на абиотический стресс, прорастание семян и процесс созревания ягод. Николас с соавторами обнаружили, что сверхэкспрессия гена *ABF2* в культуре суспензии клеток винограда *V. vinifera* повысила способность клеток продуцировать стильбены (*m*-резвератрол и *m*-пицеид) после обработки АВА (Nicolas et al. 2014). Таким образом, данные свидетельствуют о том, что фактор транскрипции *VvABF2* участвует в регуляции биосинтеза стильбенов, по крайней мере, под влиянием АВА.

Имеются также данные, указывающие на то, что эпигенетические механизмы, в частности метилирование ДНК, участвуют в регуляции биосинтеза стильбенов в растениях. Например, обработка культур клеток винограда *V. amurensis* деметилирующим агентом ДНК 5-азацитозинном и последующий анализ уровней метилирования ДНК и транскрипции генов *STS* показали, что чем выше уровень цитозинового метилирования ДНК в определенных генах *STS*, тем ниже количество *m*-резвератрола (Kiselev et al. 2013c; Tyunin et al. 2013). Впоследствии было показано, что УФ-С и SA-индуцированное накопление стильбенов и транскрипция генов *STS* были

связаны со снижением цитозинового метилирования ДНК этих генов *STS* (Kiselev et al. 2015; Tyunin and Kiselev, 2016). Полученные данные свидетельствуют о том, что эпигенетические механизмы могут прямо или косвенно способствовать активации биосинтеза стильбенов.

Взятые вместе, эти данные указывают на то, что транскрипционные факторы MYB14, MYB15, ABF2 и, предположительно, MYB13 участвуют в регуляции транскрипции, по крайней мере, некоторых генов *STS* в винограде. Опубликованные исследования также предполагают, что другие транскрипционные факторы (например, WRKY5, NAC, ARF2 и MYB), которые совместно экспрессируются с некоторыми генами *STS* или активируются в ответ на фитогормоны, индуцирующие биосинтез стильбенов, возможно, участвуют в регуляции биосинтеза стильбенов (Fang et al. 2014; Almagro et al. 2014). Вопрос о том, регулируют ли эти и другие транскрипционные факторы биосинтез стильбенов и как координируется это регулирование, все еще нуждается в разъяснении.

1.5.6. Участие метилирования ДНК в регуляции биосинтеза стильбенов.

Впервые 5-метилцитозин был обнаружен в составе ДНК пшеницы в 1951 году (Wyatt, 1951). Дальнейшие работы выявили широкое распространение данного модифицированного нуклеотида в геномах других растений, например, папоротника, хлопка, клевера, капусты, ржи, кукурузы, арахиса, подсолнечника и др. (Thomas and Sherrat, 1956). С самого начала была отмечена контекстуальность цитозинового метилирования, обусловленная наличием 5-метилцитозина в полинуклеотидной цепи перед гуаниновым нуклеотидом (контекст CG), при этом дальнейшие исследования показали наличие и широкое распространение в растительных геномах метилирования в контекстах CHG и CHH, где H – адениновый, тиминный или цитозинный нуклеотид (Gruenbaum et al. 1981).

Объяснить причину нахождения 5-метилцитозина именно в составе описанных контекстов метилирования помогло открытие ферментов – цитозиновых метилтрансфераз. Было показано, что ДНК метилтрансферазы растений семейства Met1 способны метилировать ДНК в контексте CG, ДНК метилтрансферазы CMT эффективно метилируют ДНК в контексте CHG, а метилтрансферазы DRM метилируют ДНК в несимметричных контекстах CHH (Goll and Bestor, 2005). На основании функций соответствующих метилтрансфераз удалось выделить два принципа метилирования цитозиновых нуклеотидов: поддерживающее и *de novo*.

Поддерживающее метилирование заключается в копировании паттерна цитозинового метилирования на дочернюю цепь цепи при репликации ДНК метилтрансферазами семейств Met1 и CMT. Цитозиновое метилирование *de novo* осуществляется метилтрансферазами семейства DRM и в некоторых локусах CMT (Finnegan and Kovacs, 2000).

Цитозиновое метилирование ДНК вовлечено в регуляцию процесса онтогенеза у растений в не меньшей мере, чем у животных. Экспериментальные данные, полученные при помощи мутантных растений с мутациями по гену метилтрансферазы *met1*, установили отсутствие апикального роста, нарушения времени цветения, множественные нарушения в развитии листьев (Finnegan et al. 1996; Pennisi, 1996), в фенотипе полученных растений. Эмбрионы растений – двойных гомозигот с мутантными генами метилтрансфераз *met1* и *cmt3*, демонстрировали нарушения в паттернах клеточного деления и полярности, и, в связи с этим, были нежизнеспособны (Xiao et al. 2006).

Важнейшей биологической ролью цитозинового метилирования ДНК у растений является участие в стрессовой адаптации, которая может передаваться через поколения. В ходе многочисленных исследований было показано, что уровень и паттерн цитозинового метилирования у растений может изменяться в ответ на биотические и абиотические стрессовые воздействия. Холодовой стресс значительно снижал содержание

метилцитозинных нуклеотидов в клеточных культурах табака (Burn et al. 1993), проростках *A. thaliana* (Finnegan et al. 1998), и тканях корней кукурузы (Steward et al. 2002). Вирусная инфекция вызывала метилирование гомологичных последовательностей в геноме растений (Wassenegger et al. 1994).

Действие деметилирующего агента 5-азациитидина (5A), способного неспецифически снижать статус цитозинового метилирования, вызывало ранее цветение у *A. thaliana* за счёт деметилирования локуса FWA, экспрессия которого контролирует этот процесс (Finnegan et al. 1998). Другие исследования доказали необходимость системы метилирования ДНК в регуляции генного импринтинга растений, половой детерминации, регенерации корней (Martin et al. 2009; Li et al., 2011; Ikeda, 2012). Существует предположение, что действие любого стрессового фактора, в конечном итоге, ведет к изменению статуса метилирования генома с последующей активацией специфических генов, в том числе и генов вторичного метаболизма в том числе стильбенов (Ванюшин, 2005).

Дальнейшие эксперименты показали, что добавление 5A приводило к увеличению содержанию *m*-резвератрола и его производных в клетках винограда. Более того, добавление 5A сопровождалось специфическим увеличением экспрессии определенных генов *STS*, что говорит о том, что деметилирование ДНК приводит к увеличению биосинтеза стильбенов (Tyunin et al. 2012; Tyunin, Kiselev, 2013).

1.5.7. Значение предшественников вторичных метаболитов и доступности питательных веществ для биосинтеза стильбенов.

Несколько исследований подчеркнули важность уровня питательных веществ и предшественников для активного биосинтеза стильбенов в клетках растений. Добавление в питательные среды фенилаланина, *пара*-кумаровой, кофейной и коричной кислот оказало положительное влияние на биосинтез стильбенов в каллусах винограда (Shumakova et al. 2011; Kiselev et al. 2013d).

Применение фенилаланина индуцировало экспрессию нескольких генов *PAL* и *STS*, в то время как обработка *para*-кумаровой кислотой не приводила к существенным изменениям экспрессии *PAL* и *STS* (Shumakova et al. 2011; Kiselev et al. 2013d). Как коричневая, так и кофейная кислота значительно увеличивали экспрессию нескольких генов *STS*.

В недавнем исследовании Манелла с соавторами добились значительного увеличения содержания ароматических аминокислот в суспензионной культуре клеток винограда путем экспрессии гена, кодирующего бактериальную форму фермента 3-дезоксид-D-арабино-гептулозонат 7-фосфатсинтазы (AROG) (Manela et al. 2015). Это привело к резкому увеличению выработки резвератрола AROG-трансгенными клетками. В то же время увеличение выработки стильбенов не сопровождалось увеличением концентраций антоцианов, которые также являются фенилпропаноидными метаболитами. В трех из четырех трансгенных линий AROG экспрессия генов биосинтеза фенилпропаноидов, включая *PAL* и *STS*, заметно не изменялась. Манелла с коллегами предположили, что доступность субстрата, а не уровни биосинтетических ферментов, является фактором, ограничивающим скорость биосинтеза фенилпропаноидов, включая стильбены (Manela et al. 2015).

Существует несколько исследований, в которых сообщается о влиянии некоторых питательных веществ на биосинтез стильбенов в тканях растений. Например, Ларондэ с соавторами сообщили о незначительном стимулирующем эффекте применения сахарозы на продукцию стильбенов (Larronde et al. 1998), позднее Ферри с коллегами показали обратный эффект, при котором увеличение концентрации сахарозы в питательных средах способствовало значительному увеличению биосинтеза стильбенов в культуре клеток винограда (Ferri et al. 2011).

Таварес с соавторами сообщили, что биосинтез стильбенов в фотосинтетических и нефотосинтетических тканях *V. vinifera* зависит от дефицита серы (Tavares et al. 2013). В условиях дефицита сульфатов в

проростках винограда накапливались *m*-резвератрол и ϵ -виниферин, в то время как в суспензионных клеточных культурах *V. vinifera* при дефиците сульфатов накапливался глюкозид *m*-резвератрола (Tavares et al. 2013). Согласно данным Сae-Ли с коллегами, обогащение азотом (более высокие концентрации нитрата аммония) увеличивало содержание резвератрола в суспензионной клеточной культуре *V. vinifera* (Sae-Lee et al. 2014). Таким образом, подходящая концентрация азота является важным фактором, регулирующим биосинтез стильбенов в клетках растений.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал и клеточные культуры

Для анализа экспрессии генов *STS* и содержания стильбенов в ели использовали хвою ели аянской *Picea jezoensis* (Lindl. et Gord.) Fisch ex Carr., произрастающей в естественных условиях в Ботаническом саду-институте ДВО РАН, возрастом 15-20 лет. Хвоя была разделена на 3 группы: молодая (первый год), средняя (возрастом 2-3 года) и старая (4-5 лет). Хвою собирали весной, летом, осенью и зимой в 2014-2016 годах. Для анализа содержания стильбенов в коре и древесине ели использовали продукты лесоперерабатывающего предприятия (с. Ивановка, Михайловский район Приморского края).

Дикорастущие растения винограда амурского *V. amurensis* Rupr. были собраны в окрестностях г. Владивостока (станция Академическая). Каллусные культуры V2 и V7 были получены в 2002 и в 2017 году, соответственно, из молодых стеблей взрослых лиан винограда *V. amurensis* как описано ранее (Kiselev et al. 2006).

Каллусы культивировали в пробирках размером 200×20 мм с 15 мл агаризованной среды W_{B/A} (Dubrovina et al. 2010) с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (АНУ), в темноте при 24–25 °С. Интервал субкультивирования составлял 30–40 дней. Для экспериментов использовали каллусные агрегаты клеточных культур, начальный вес которых составил около 0.2 г, культивировали в течение 35 дней.

Растения *Arabidopsis thaliana* L. (экотип Колумбия, семена из коллекции лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН) выращивали в горшках, используя коммерчески доступный универсальный почвенный грунт, в климатической камере (Panasonic MLR-352, Япония) при температуре 22 °С, 16 часов день/8 часов ночь, освещенность ~120 мкмоль м²с⁻¹ (около 10.000 люкс).

2.2. Генетическая агробактериальная трансформация культур клеток винограда и растений арабидопсиса

Трансгенные по генам *rol* каллусные культуры винограда (VB1, VB2, VCE, VC1) получены в результате трансформации суспензионной культуры V2 штаммом агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, несущим бинарную конструкцию pPCV002-CaMVB/pMP90RK для гена *rolB* или pPCV002-CaMVC/pMP90RK для гена *rolC* (Spena et al. 1987), согласно ранее описанной методике (Dubrovina et al. 2010) (Рисунок 3 а, б, в). В данных конструкциях гены *rol* находились под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) (Spena et al. 1987). Так же в Т-ДНК был перенесен ген неомицинтрансферазы (*nptII*) для отбора трансгенных клеток.

Контрольная культура VV была получена в результате совместной инкубации суспензионной клеточной культуры винограда V2 и штамма GV3101 *A. tumefaciens*, несущим конструкцию pPCV002/pMP90RK (Рисунок 3 в, г), содержащую только ген *nptII*, согласно описанной методике (Dubrovina et al. 2010). pMP90RK – это *vir*-хелперная плазмида, кодирующая полный состав *vir*-белков (A, B, C, D, E и G), которые осуществляют перенос и встраивание Т-ДНК в геном растения (Рисунок 3 б). Все плазмиды (pPCV002, pPCV002-CaMVB и pMP90RK) были любезно предоставлены доктором Анджело Спена (Институт Макса-Планка, Германия).

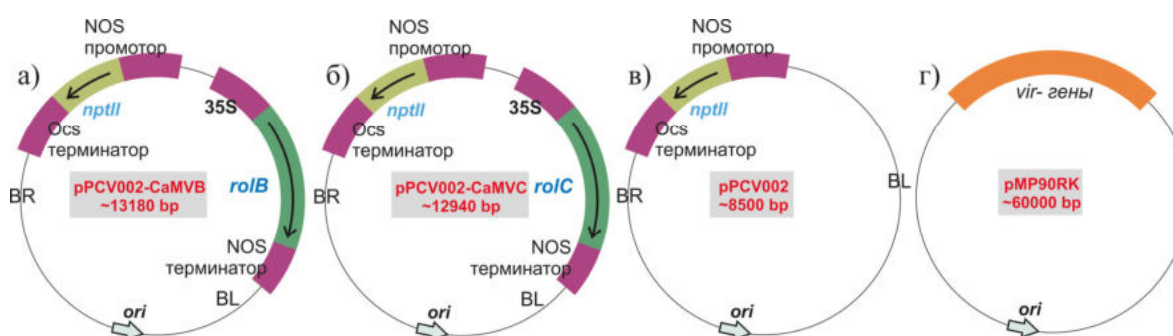


Рисунок 3 – Физические карты плазмид, используемых в работе (Spena et al. 1987): а) плазмида pPCV002-CaMVB, несущая ген неомицинтрансферазы (*nptII*) и ген *rolB*; б) плазмида pPCV002-CaMVC, несущая гены *nptII* и *rolC*; в) плазмида pPCV002, несущая только ген *nptII*; г) *vir*-хелперная плазмида pMP90RK. 35S – промотор вируса мозаики цветной капусты, NOS – нопалин-синтазный промотор и терминатор, Ocs –

октопинсинтазный терминатор, *ori* – место репликации плазмиды, BR и BL – правая и левая граница T-ДНК.

Трансгенные каллусные культуры по генам *STS* (ST1-I, ST1-II, ST1-IV, ST2-I, ST2-II, ST7-I, ST7-II, ST7-III, zST1-1, zST1-2, zST1-3, zST2-1, zST2-2, zST2-3, zST3-1, zST3-2, zST3-3), *CPK* (KA02-I, KA02-II, KA04-I, KA04-II, KA04-III, KA05-I, KA05-IV, KA06-I, KA06-II, KA07-I, KA07-II, KA07-III, KA08-I, KA08-II, KA08-III, KA08-IV, KA-09-I, KA-09-II, KA-09-III, KA-09-IV, KA-09-V, KA10-I, KA10-II, KA10-III, KA10-IV, KA15-I, KA15-II, KA15-III, KA15-IV, KA18-I, KA18-II, KA18-III, KA18-IV, KA18-V, KA19-I, KA19-II, KA19-III, KA19-IV, KA20-I, KA20-II, KA20-III, KA21-I, KA21-II, KA21-III, KA22-I, KA22-II, KA22-III, KA22-IV, KA23-I, KA23-II, KA23-III), *Myb* (40-1, 40-2, 40-3, 60-1, 60-2, 60-3) и *CML* (52-1, 52-2, 52-3, 65-1, 65-2, 65-3, 65-4, 86-1, 86-2, 86-3, 93-1, 93-2, 93-3, 95-1, 95-2, 95-3) были получены на основе бинарного вектора pZP-RCS2-*nptII* (Рисунок 4) и агробактерий штамма GV3101::pMB90 (Tzfira et al. 2005).

Для получения бинарных конструкций для переноса целевых генов в клетки растений были амплифицированы полноразмерные кодирующие последовательности исследуемых генов, а именно: *VaSTS1* (ST1, GQ167204), *VaSTS2* (ST2, EU659863), *VaSTS7* (ST7, EU659868), *PjSTS1a* (zST1, LT158484), *PjSTS2* (zST2, LT158486), *PjSTS3* (zST3, LT158487), *VaCPK1* (KA19, ГенБанк KC488321), *VaCPK3a* (KA04, JQ793892), *VaCPK9* (KA08, KC488319), *VaCPK13* (KA15, KC488320), *VaCPK16* (KA23, KF042356), *VaCPK20* (KA09, KC488322), *VaCPK21* (KA07, KC488318), *VaCPK25* (KA22, KF042357), *VaCPK26* (KA18, KC488323), *VaCPK29* (KA10, KC488317), *VaCPK30* (KA21, KF042358), *VaCPK32* (KA20, XM_002283513), *VaMyb40* (40, XM_019224778), *VaMyb60* (60, XM_034837254), *VaCML52* (52, MN540595), *VaCML65* (65, MN540606), *VaCML86* (86, MN540576), *VaCML93* (93, MN540582), *VaCML95* (95, MN540584). Для получения полноразмерных

кодирующих последовательностей перечисленных генов использовали кДНК винограда, ели и геноспецифичные пары праймеров (Таблица 3).

Таблица 3 – Праймеры для амплификации полноразмерных кодирующих последовательностей генов *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb* винограда *Vitis amurensis* и *PjSTS* ели *Picea jezoensis*

Гены	Прямой и обратный праймеры, 5'-3'	Описание условий ПЦР
<i>VaCPK1</i>	5'ATGGGGAATAACTGTGTGGGA, 5'TCAATAGACTGGTAGCGGCT,	Aleynova et al. 2017
<i>VaCDPK3a</i>	5'ATGAAGAAATCGTCCGCAGGAG, 5'GTTTGTCAAGCGCATATCTGGT,	Kiselev et al. 2013b
<i>VaCPK9</i>	5'ATGGGTATTTGTCTAAGCAA, 5'CTAAAAACCTTCAATCCCTG,	Aleynova et al. 2015
<i>VaCPK13</i>	5'ATGGGGAAGTGTTCAGAT, 5'TTACTCATCCCCAAGTTTAG,	Aleynova et al. 2015
<i>VaCPK16</i>	5'ATGGGGCGTGCCTCTCCG, 5'CTAAATTTCCGAGGATTC,	Дубровина и др. 2018
<i>VaCPK20</i>	5'ATGGGGAACACATGTGTAGGA, 5'TTAGGTTATTTGTATCCCTTCT,	Aleynova-Shumakova et al. 2014
<i>VaCPK21</i>	5'ATGGGTTGTTTTAGCAGTAAG, 5'AAATAGCTTGACTGGCGGT,	Aleynova et al. 2015
<i>VaCPK25</i>	5'ATGGCTGTTGCCAAGAGCAAC, 5'TCAACAGACGAGAGAAGATCT,	Дубровина и др. 2018
<i>VaCPK26</i>	5'ATGGGCAACACATGCCGGGGA, 5'CTAAAAGCTCCTGGTGCATCTC,	Aleynova et al. 2017
<i>VaCPK29</i>	5'ATGGGTTTCTGCTTCTCCAG, 5'TCTCTGCTTCMACTCGGTATC,	Aleynova et al. 2015
<i>VaCPK30</i>	5'ATGGGTAAGTGTATCGCAT, 5'TCAGACAGCAATAGATTGA,	Дубровина и др. 2018
<i>VaCPK32</i>	5'ATGGGTAATTGCTGCGTGA, 5'TCATGGCCTAACTCCAAT,	Дубровина и др. 2018
<i>VaSTS1</i>	5'ATGGCKTCWGTKGAGGAA, 5'ATTTGTAAAYGTAGGAATG,	Aleynova et al. 2016
<i>VaSTS2</i>	5'ATGGCKTCWGTKGAGGAA, 5'ATTTGTAAAYGTAGGAATG,	Aleynova et al. 2016
<i>VaSTS7</i>	5'ATGGCKTCWGTKGAGGAA, 5'ATTTGTAAAYGTAGGAATG,	Aleynova et al. 2016
<i>PjSTS1a, b</i> <i>PjSTS2, 3</i>	5'ATGTCTGCAGRAATGACTGTTG, 5'TGGAAGRAGAACGCTCTTAAGA,	Kiselev et al. 2016
<i>VaMyb1, 15a</i>	5'ATGGTAAGAGCTCCYTGTGTYGAT, 5'TCAAAGCTCCTGTAAGCCGCCAG,	Тюнин и Киселев, 2017
<i>VaMyb40</i>	5'ATGGGAAGACAGCCTTGTTG, 5'TCAATGGCTATTTCCAAGA,	Ananev et al. 2022
<i>VaMyb60</i>	5'ATGGGAAGGCCTCCTTGCTG, 5'TCAGAATATTGGAGAGAGTT	Ananev et al. 2022
<i>VaCML52</i>	5'ATGCCTCTGTGGACTCC 5'CTAACGTAACCTAAATCCCCAT	Aleynova et al. 2022

<i>VaCML65</i>	5'ATGAGTGTGGAAGTGTTG 5'TCAAGCATCCATTTTCATGG	Aleynova et al. 2022
<i>VaCML86</i>	5'ATGACGAGCAATTCTATTTTC 5'TCACTGTTGACGCTGTTTAG	Aleynova et al. 2022
<i>VaCML93</i>	5'ATGGCAAACGATGAGATGA 5'CTATAACATCATGACCTTGAACTC	Aleynova et al. 2022
<i>VaCML95</i>	5'ATGATTAACCTGCAGCATATA 5'TCAAAACATCATGAGCTTGAACTC	Aleynova et al. 2022

Полученные ампликоны генов *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb* были выделены из геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Москва, Россия) и клонированы в вектор pJet согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Вильнюс, Литва). Затем, используя праймеры, содержащие в своей последовательности сайты рестрикции для рестриктаз, мы амплифицировали полные последовательности генов *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb* (Таблица 4). В качестве матриц использовали гены *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb*, которые были клонированы в плазмиду pJet. Полученные ПЦР продукты переносили в вектор pSAT1 (Tzfira et al. 2005). В данной конструкции гены *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb* находились под контролем двойного 35S CaMV (Рисунок 4 а). После этого переносили кассеты, содержащие *STS* и *CPK* гены из вектора pSAT1 в вектор pZP-RCS2-*nptII* (Tzfira et al. 2005), используя рестриктазу PstI (Asc I). Все рестриктазы были приобретены в СибЭнзим (Новосибирск, Россия). После этого генетические конструкции pZP-RCS2-*nptII* с генами *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb* были перенесены в агробактерии *A. tumefaciens* штамма GV3101::pMB90.

Таблица 4 – Праймеры для переноса последовательностей генов *VaSTS*, *VaCPK*, *VaMyb* и *VaCML* *Vitis amurensis* и *PjSTS* или *Picea jezoensis* в вектор pZP-RCS2-*nptII* (Tzfira et al. 2005).

Гены	Прямой и обратный праймеры, 5'-3'
<i>VaCPK1</i>	5'GCTCAGATCTATGGGGAATAACTGTGTGGGA 5'TCGAGGTACCTCAATAGACTGGTAGCGGCT
<i>VaCDPK3a</i>	5'GCTCGAGCTCATGAAGAAATCGTCCGCAGGAG 5'TCGAGGATCCGTTTGTCAAGCGCATATCTGGT
<i>VaCPK9</i>	5'GCTCGAGCTCATGGGTATTTGTCTAAGCAA 5'TCGAGGATCCCTAAAAAACCTTCAATCCCTG
<i>VaCPK13</i>	5'GCTCGAGCTCATGGGGAAGTGTGTCAGAT 5'TCGAGGTACCTTACTCATTCCCAAGTTTAG
<i>VaCPK16</i>	5'ACTCCTCGAGATGGGGGCGTGCCTCTCCG

	5'TCGAGGATCCCTAAATTTTCCGAGGATTC
<i>VaCPK20</i>	5'GCTCCTCGAGATGGGGAACACATGTGTAGGA 5'TCGAGGATCCTTAGGTTATTTTGTATCCCTTCTT
<i>VaCPK21</i>	5'GCTCCTCGAGATGGGTTGTTTTAGCAGTAA 5'TCGAGGATCCAAATAGCTTGACTGGCGGT
<i>VaCPK25</i>	5'ACTCGAGCTCATGGCTGTTGCCAAGAGCA 5'TCGAGGTACCTCAACAGACGAGAGAAGAT
<i>VaCPK26</i>	5'GCTCGAGCTCATGGGCAACACATGCCGGGGA 5'TCGAGGTACCTAAAAAGCTCCTGGTGCATCTC
<i>VaCPK29</i>	5'ACTCGAGCTCATGGGTTTCTGCTTCTCCAG 5'TCGAGGATCCTTATCTCTGCTTCACTCGGTATC
<i>VaCPK30</i>	5'ACTCAGATCTATGGGTAACGTATCGCAT 5'TCGAGGTACCTCAGACAGCAATAGATTGA
<i>VaCPK32</i>	5'ACTCGGTACCATGGGTAATTGCTGCGTGA 5'TCGAGGATCCTCATGGCCTAACTTCCAAT
<i>VaSTS1</i>	5'GCTCGAGCTCATGGCKTCWGTKGAGGAA 5'TCG AGG ATC CAT TTG TAA YTG TAG GAA TGA
<i>VaSTS2</i>	5'GCTCGAGCTCATGGCKTCWGTKGAGGAA 5'TCG AGG ATC CAT TTG TAA YTG TAG GAA TGA
<i>VaSTS7</i>	5'GCTCGAGCTCATGGCKTCWGTKGAGGAA 5'TCGAGGATCCATTTGTAA YTG TAGGAATGA
<i>PjSTS1, PjSTS2, 3</i>	5'GCTCAGATCTATGTCTGCAGGAATGACTGT 5'TCGAAAGCTTTTATGGAAGAAGAACGCTCT
<i>VaMyb40</i>	5'GCTCAGATCTATGGGAAGACAGCCTTGTTG 5'TCGAGTCGACTCAATGGCTATTTTCCAAGA
<i>VaMyb60</i>	5'GCTCAGATCTATGGGAAGGCCTCCTTGCTG 5'TCGAGTCGACTCAGAATATTGGAGAGAGTT
<i>VaCML52</i>	ACTCAGATCTATGCCTCTGTGGACTCCGA TCGAGGATCCTCACTAACGTAACCTAAA
<i>VaCML65</i>	ACTCGAGCTCATGAGTGTGGAAGTGTTGG TCGAGGATCCTCATCAAGCATCCATTTTC
<i>VaCML86</i>	GCTCAAGCTTATGACGAGCAATTCTATTTTC TCGAGGATCCTTACTGTTGACGCTGTTTAGA
<i>VaCML93</i>	ACTCGAGCTCATGGCAAACGATGAGATG TCGAGGATCCTCACTATAACATCATGACC
<i>VaCML95</i>	ACTCGAGCTCATGATTAACGTCAGCATAT TCGAGGATCCTCATCAAAACATCATGAGC

Клетки винограда трансформировали по подробно описанной ранее методике (Kiselev et al. 2007). После трансформации каллусные агрегаты культур клеток винограда культивировали на агаризованной среде $W_{B/A}$ в течении трех месяцев в присутствии 250 мг/л цефотаксима для ингибирования роста агробактерий. Отбор трансгенных клеток проводили при помощи селекции на канамицине (Км, 10-20 мг/л) в течении 5 месяцев.

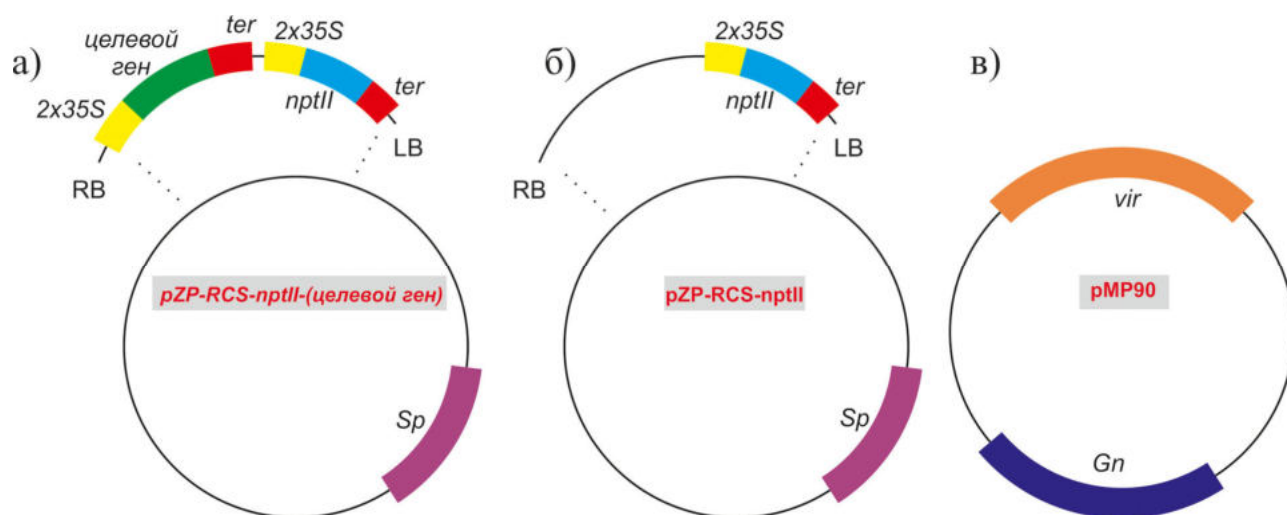


Рисунок 4 – Бинарные векторные конструкции, используемые для агробактериальной трансформации (Tzfira et al. 2005). а) бинарный вектор для получения штаммов агробактерий для сверхэкспрессии генов *CML*, *CPK*, *STS* и *Myb*. В состав вектора входит плаزمида pZP-RCS-*nptII*-(целевой ген), содержащая RB – и LB – правый и левый бордер, 2x35S – двойной конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты, целевые гены, *nptII* – ген неомцилфосфотрансферазы, *ter* – терминатор, *Sp* – ген устойчивости к спектиномицину; б) бинарный вектор для получения котрольного штамма агробактерий КА0. В состав вектора входит плазмида pZP-RCS-*nptII*; в) плазмида pMP90 – содержащая *vir*-гены и ген устойчивости к гентамицину (*Gn*).

Для получения трансгенных растений *A. thaliana*, экспрессирующих гены *STS*, использовали метод погружения соцветий в суспензию агробактерий (Zhang et al. 2006). Для обработки *A. thaliana* «дикого типа» использовали штаммы *A. tumefaciens* GV3101::pMP90, содержащие бинарные векторные конструкции pZP-RCS2-*nptII* (“пустой” вектор) или pZP-RCS2-*STS-nptII* (Tzfira et al. 2005). Полученные штаммы агробактерий инокулировали в жидкий лизогенный бульон (LB) и выращивали сутки при 28°C при постоянном помешивании 120 об/мин. Далее получали видимый осадок агробактерий путем центрифугирования в течение 5 мин при 4 °C и 4 600 об/мин, после чего переводили полученный осадок в 5% раствор сахарозы и 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich, Берлингтон, США).

Трансформацию проводили путем погружения нераскрывшихся бутонов *A. thaliana* в полученный раствор агробактерий как описано в работе Занга и коллег (Zhang et al. 2006). Для дальнейшей работы отбирали

гомозиготные по инсерции T-ДНК линии *A. thaliana* с помощью исследования сегрегации растений поколения T₂ и поколения T₃ (отсутствие расщепления по признаку устойчивости в потомстве растений T₂) на среде с Км 50 мг/л. Для проведения дальнейших экспериментов использовали гомозиготное T₃ поколение растений *A. thaliana* с одной вставкой используемой генетической конструкции.

Доказательство трансгенности и определение количества вставок проводили с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ), используя праймеры, один из которых был подобран к концу белок-кодирующей последовательности, а второй был подобран к терминатору в плазмиде pSAT1 (pSAT1-real-a) в соответствии с опубликованной методикой (Aleynova et al. 2016).

Для трансформации *A. thaliana* использовали штамм *A. tumefaciens* GV3101::pMP90, содержащий вектор pZP-RCS2-*nptII* (Рисунок 4 в), в результате чего была получена контрольная трансгенная линия растений *A. thaliana* КА-0 и трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие гены *STS*.

2.3. Обработка культур клеток винограда индукторами биосинтеза стильбенов и другими эффекторами

Все используемые в работе индукторы биосинтеза стильбенов и другие эффекторы можно разделить на несколько групп: фитогормоны или стресс-гормоны растений, предшественники фенольных соединений, токсические аналоги предшественников фенольных соединений, а также ингибиторы и активаторы сигнальных систем растений.

Растворы фитогормонов метилжасмоната (MeJA, рабочие концентрации 50 мкМ и 300 мкМ) и салициловой кислоты (SA, 50 мкМ и 300 мкМ) добавляли в питательные среды до автоклавирования и измерения pH среды как было описано ранее (Kiselev et al. 2007). Нитропруссид натрия (SNP, 0.1 и 1 мМ) растворяли в стерильной дистиллированной воде и

добавляли в питательные среды после автоклавирования в асептических условиях.

Фенилаланин, предшественник фенольных соединений (Phe, 0.1 мМ, 0.33 мМ и 1 мМ), растворяли в стерильной дистиллированной воде и добавляли в культуральные среды после автоклавирования в асептических условиях. Этанольные растворы *para*-кумаровой (CA, 0.5 мМ) и кофейной кислот (CaA, 0.5 мМ) добавляли в питательные среды после автоклавирования в асептических условиях.

Токсический аналог фенилаланина *p*-фтор-*DL*-фенилаланин (PFP) растворяли в концентрации 10 мг/мл в горячей воде (50-60 °С). PFP добавляли в питательные среды после автоклавирования в стерильных условиях. Клетки культуры V2 пересаживали на агаризованную среду W_{B/A}, содержащую 30 и 100 мг/л PFP. Клетки выдерживали в течение месяца и потом наиболее хорошо выросшие агрегаты клеток пересаживали на свежие среды, содержащие также 30 и 100 мг/л PFP. Селекцию на PFP проводили в течении трех пассажей. Арегаты клеток, прошедшие селекцию на PFP, наращивали в течении двух пассажей и определяли содержание стильбенов.

Ингибиторы кальциевых каналов хлористый лантан (LaCl₃, 1 мМ) и верапамил (VER, 0.5 и 1 мМ) растворяли в стерильной дистиллированной воде и добавляли в культуральные среды до автоклавирования и до измерения pH среды. Концентрация исходного раствора LaCl₃ и VER – 100 мг/мл. Рабочие концентрации LaCl₃ – 1 мМ и VER – 0.5 и 1 мМ. Другой ингибитор кальциевых каналов нифлумовую кислоту (NA, 50 мкМ) растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) и добавляли в культуральные среды после автоклавирования в асептических условиях. Эквивалентные количества DMSO были добавлены в питательные среды для контрольной культуры клеток V2.

Ионофор кальция A23187 (CI, 1 мМ и 10 мМ), который значительно повышает внутриклеточный уровень кальция, растворяли в этаноле и добавляли в питательные среды после автоклавирования в асептических

условиях. Эквивалентные количества этанола были добавлены в питательные среды для контрольной культуры клеток V2.

Ингибитор фосфатаз фениларсиноксид (PAO, 5 μM и 50 μM), растворяли в DMSO и добавляли в культуральные среды после автоклавирования в асептических условиях. Ортованадат натрия или Na_3VO_4 (SOV, 0.1 мМ), растворяли в стерильной дистиллированной воде и добавляли в культуральные среды до автоклавирования и до измерения pH среды.

Специфический ингибитор CaM-подобных протеинкиназ W7 растворяли в DMSO и добавляли в питательные среды после автоклавирования до конечной концентрации 100 μM (исходный раствор 10 мг/мл).

Фирма производитель реактивов SNP, PAO, NA, DMSO, SOV и LaCl_3 – ICN Pharmaceuticals (Коста-Меса, США). Фирма производитель CA, CaA, CI, SA, MeJA, Phe, VER, W7 и PFP – Sigma (Сант Луис, США).

2.4. Обработка листьев растений винограда, хвои ели и арабидопсиса

В работе по исследованию экспрессии генов *STS* ветви ели *P. jezoensis* с молодой однолетней хвоей были разделены на черенки длиной 6–8 см, которые далее были помещены в индивидуальные стаканы с 50 мл жидкой среды W_0 (Dubrovina et al. 2009) без фитогормонов в течение 24 ч. Черенки ели инкубировали в климатической камере (Panasonic MLR-352, Япония) при 11-часовом фотопериоде, интенсивности света ~ 100 мкмоль $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и температуре 12 °С в светлый период суток и 9 °С в темный.

Черенки с одиночными листьями *V. amurensis* были помещены в индивидуальные стаканы с 50 мл жидкой среды W_0 без фитогормонов для инкубации в течение 24 ч в климатической камере (Panasonic MLR-352, Япония) при 11-часовом фотопериоде, интенсивности света ~ 70 мкмоль $\text{м}^{-2}\text{с}^{-1}$ и температуре 11 °С в светлый период суток и 8 °С в темный.

В жидкую среду W_0 были добавлены предшественники фенольных соединений, как описано выше в главе 2.3. После проводили обработку черенков ультрафиолетом С (УФ-С) один раз в течение 20 мин при длине волны 254 нм в темноте как описано ранее (Kiselev et al. 2017). Через сутки проводили подсчет желтой хвои в черенках ели и число зеленых листьев винограда не потерявших тургор и не высохших.

Четырехнедельные растения арабидопсиса *A. thaliana* облучали ультрафиолетом в течение 10 мин на расстоянии 15 см над горшками с помощью УФ-лампы VL-215.МС компании Vilber Lourmat (Марн-ла-Валле, Франция), где пиковая интенсивность облучения для 312 или 254 нм составляла согласно руководству производителя 1800 мкВт/см² (УФ-В) и 930 мкВт/см² (УФ-С). Показатели выживаемости листьев определялись как количество зеленых листьев через сутки после облучения.

Первоначально мы исследовали влияние стильбенов на рост и развитие растений *A. thaliana*. Мы посадили семена *A. thaliana* в чашки Петри, содержащие различные концентрации стильбенов, включая *m*-резвератрол (R, 1 и 5 мМ), *m*-пицеид (Pi, 1 и 5 мМ), *para*-кумариновую кислоту (CA, 1 и 5 мМ) и экстракт коры ели *P. jezoensis* (BE, 0.4 и 2 г/л экстракта еловой коры). Первоначально растворы стильбена растворяли до 1 М в ДМСО (Panreac, Барселона, Испания), а затем в стерильной воде до рабочей концентрации. Через 7 дней в климакамере камере мы измерили длину стеблей и корней проростков арабидопсиса *A. thaliana*. Впоследствии проростки пересадили в отдельные горшки и измерили диаметр розетки через 1 и 2 месяца роста.

В другой серии экспериментов мы использовали 4-недельные растения *A. thaliana* для изучения эффектов стрессовой обработки. Растения обрабатывали водными растворами стильбенов и после ночного периода они подвергались различным стрессам (Dubrovina et al. 2015). Мы использовали распылитель объемом 2 мл, чтобы нанести растворы на растения. В каждом горшке было по 4–5 растений, и в общей сложности 4 горшка были

обработаны раствором объемом 2 мл. Эти эксперименты были направлены на то, чтобы понять влияние стильбенов на рост, развитие и стрессовую реакцию растений *A. thaliana*.

2.5. Выделение нуклеиновых кислот и синтез кДНК

Образцы растительной ДНК выделяли из культур клеток растений в соответствии с опубликованной методикой с использованием цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) (Kiselev et al. 2015). Тотальную РНК экстрагировали из клеточных культур на 35 день культивирования с использованием LiCl при помощи метода, оптимизированного для работы с тканями растений, богатыми вторичными метаболитами (Bekesiova et al. 1999; Kiselev et al. 2013a). Комплементарную ДНК (кДНК) получали, используя 1.5 мкг тотальной РНК, с помощью набора для обратной транскрипции в соответствии с рекомендациями производителя (Евроген, Москва, Россия). Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1х-кратный ОТ буфер, по 0.25 mM каждого dNTP, 0.2 мкМ олиго-(dT)₁₅ праймера, 200 единиц активности M-MLV-ревертазы. Реакцию проводили при 37 °C в течении 1 часа.

2.6. Количественный и полуколичественный анализ экспрессии генов *rol*, *PAL*, *STS*, *CPK*, *CML*, *CCaMK* и *Myb* с помощью ПЦР

На первых стадиях работы с генами *PAL*, *STS*, *CPK*, *CML* и *Myb* геном винограда не был расшифрован и аннотирован, поэтому мы использовали ОТ-ПЦР с вырожденными праймерами и секвенирование полученных клонов согласно описанной методике (Kiselev and Dubrovina, 2010). Вырожденные праймеры были подобраны на основе ранее известных генов *PAL*, *STS*, *CPK*, *CML* и *Myb* других видов растений. Преимущество подхода с использованием вырожденных праймеров с последующим клонированием и секвенированием ПЦР продуктов заключается в том, что эта методика позволяет изучить экспрессию сразу нескольких генов мультигенного

семейства. Кроме того, можно определить долю экспрессии каждого гена в суммарной экспрессии генов семейства. ПЦР РВ использовали для подтверждения полученных результатов и более детального анализа экспрессии каждого гена.

Для амплификации генов семейства *PAL* *V. amurensis* были разработаны вырожденные праймеры 5'GARGCYGCGCYATYATGGA и 5'GGRGTGCCYTGRAARTT (Kiselev et al. 2009) на основе аминокислотных последовательностей генов *PAL* видов *A. thaliana*, *Lactuca sativa*, *Rubus idaeus*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Glycine max*, *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris* (номера в ГенБанк: NM_129260, NM_115186, AF411134, AF299330, AF237955, X52953, Q01861, Q04593, Q9SMK9, P19143 соответственно). Праймеры были использованы для амплификации части “core domain” *PAL* (Ritter and Schulz, 2004).

Для амплификации генов семейства *STS* *V. amurensis* были разработаны вырожденные праймеры 5'GARATYATYACHGCHGA и 5'TTDGGRATRAADGTYTG (Kiselev et al. 2009) на основе аминокислотных последовательностей *STS* видов *V. vinifera*, *V. sp. cv. Optima*, *V. sp.*, *V. sp. cv. 'Norton'*, *V. riparia*, *V. labrusca*, *Cissus rhombifolia*, *Parthenocissus henryana*, *Parthenocissus quinquefolia* (номера в ГенБанк: AB046375, P51070, P51071, X76892, S53314, S16206, AAB32488, S63221, AF418566, AF418567, AY059639, AF274281, DQ366301, DQ366302, AB046373, AF128861, AB046374, AY094616, AY094615, AY094617). Эти праймеры использовали для амплификации центральной части *STS*, содержащей каталитические аминокислотные остатки, *цис*-пептидный поворот, аминокислотные остатки активного сайта (Jez et al. 2000).

Амплификацию участков генов *CPK* *V. amurensis* проводили с вырожденными праймерами 5'GGWGGWGARYTYTTYGA и 5'TCDGCCCCARAADGGDGG (Kiselev et al. 2009), разработанными на основе сравнения аминокислотных последовательностей генов *CPK* разных подсемейств из разных видов растений (номера в ГенБанк: AF363784,

AF072908, AB236787, D87707, AF418563, AF090835, AY312268, X96723, NM_106132, NM_101746, AY138479, AC097277, AY394009, U20626, AJ344154, AB042550, D84408, AY704444, AB051809, AB051808, AY247754, AY072802, U90262, U08140).

Аmplification полноразмерных белок-кодирующих участков генов *CML* и *Myb V. amurensis* проводили на основе праймеров представленных в Таблице 3, которые уже были подобраны на основе известных нуклеотидных последовательностей гомологичных генов у близкого вида винограда *V. vinifera*, поскольку его геном был секвенирован и аннотирован в 2007 году (Jaillon et al. 2007; Velasco et al. 2007).

После этого анализировали экспрессию генов с помощью количественного ПЦР РВ. Специфические праймеры были подобраны на основе секвенированных последовательностей генов *PAL*, *STS*, *CPK*, *CML* и *Myb* из *V. amurensis* и представлены в Таблице 5. кДНК амплифицировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1×Taq буфер с 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 0.25 мкМ каждого из праймеров, 1×SybrGreen I, 1 единицу активности Taq ДНК полимеразы, 1 мкл кДНК. ПЦР РВ проводили с использованием реактивов из Евроген (Москва, Россия). Синтез геноспецифических праймеров заказывали в Синтол или Евроген (Москва, Россия). Амплификацию проводили при следующих условиях: 2 мин при 95 °С, затем 50 циклов 95 °С 10 с и 62 °С 25 с. Использовали ДТ-Прайм 4М1 амплификатор с функцией ПЦР РВ (ДНК-технология, Протвино, Россия) с программным обеспечением RealTime_PCR v.7.3.

Полученные значения транскрипции исследуемых генов нормализовали с использованием гена актина *AtActin* (ГенБанк: NM_112764) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *AtGAPDH* (NM_111283) для анализа экспрессии в *A. thaliana*; *VvGAPDH* (GU585870) и *VaActin* (DQ517935) для винограда *V. amurensis*; *PjActin* (LT158488) и *PjGAPDH* (LT158489) в еле аянской *P. jezoensis* (Таблица 5). Эти гены были выбраны в

предыдущих исследованиях как наиболее подходящие эндогенные эталонные гены в качестве внутреннего контроля (референс-гены) (Reid et al. 2006).

Экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), где значение 1 в расчете относительного количества мРНК в каждой реакции ПЦР-РВ присваивалось для контрольных проб (КА0 клетки или растения без обработки).

Таблица 5 – Праймеры для анализа экспрессии генов *STS*, *PAL*, *CPK*, *CML*, *CCaMK* и *Myb* с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени, а также последовательности праймеров для референсных генов *Actin* и *GAPDH*

Гены (номер в ГенБанке)	Название праймера	Прямой и обратный праймеры, 5'-3'
<i>VaCPK1</i> (KC488321)	VaCPK1-real-s VaCPK1-real-a VaCPK1-real-endo	5'CAATGATGGCCGCATAGATTAT, 5'TCAATAGACTGGTAGCGGCT, 5'GCTCTTGGCTGAGTGA CTAT,
<i>VaCDPK3a</i> (JQ793892)	VaCPK3a-real-s VaCPK3a-real-a VaCPK3a-real-endo	5'TGAGGCCCATCTTGATGACA, 5'TCCATTGCCCTTCCTCATCA, 5'AAAGATTTCTTACGGTTAACA,
<i>VaCPK9</i> (KC488319)	VaCPK9-real-s VaCPK9-real-a VaCPK9-real-endo	5'ATGCGCTTTTGAAGGCAACA, 5'CTACATAGTAAGCACTCCCAA, 5'CTG TGC CGA GTG CAA CAG AAA,
<i>VaCPK13</i> (KC488320)	VaCPK13-real-s VaCPK13-real-a VaCPK13-real-endo	5'TATTCTTCAAGCCAGGTGAGA, 5'CCATAATTCCGCTTGAGGAC, 5'CTTGTGTGGATGAACAAAAGA
<i>VaCPK16</i> (KF042356)	VaCPK16-real-s VaCPK16-real-a VaCPK16-real-endo	5'ACTGCTAGAGGAAGCTGATAT, 5'AACCAGATGAGCTAGGTA CTT, 5'CTTTCTTCTCTCCCAACCTTA,
<i>VaCPK20</i> (KC488322)	VaCPK20-real-s VaCPK20-real-a VaCPK20-real-endo	5'TCGAGAAGGAGGATCATTTGT, 5'TTAGGTTATTTTGTATCCCTTCTT, 5'TTGTGGCATTTCGAGGATCAAG,
<i>VaCPK21</i> (KC488318)	VaCPK21-real-s VaCPK21-real-a VaCPK21-real-endo	5'TCAGGGGCATTA CTCTGAGA, 5'TGCTTCATCCTTGCTGGACAA, 5'ACATTCAGCAACCATCACTGA,
<i>VaCPK25</i> (KF042357)	VaCPK25-real-s VaCPK25-real-a VaCPK25-real-endo	5'AGGAACAGAACAATTGGCCT, 5'TCAACAGACGAGAGAAGATC, 5'TCATCGGCTGGTCCATGCT,
<i>VaCPK26</i> (KC488323)	VaCPK26-real-s VaCPK26-real-a VaCPK26-real-endo	5'TATGATGCAAAAGGGCAATGC, 5'CTCCTGGTGCATCTCTCAA, 5'CGATTCTCCTTTCTAGCTCA,
<i>VaCPK29</i> (KC488317)	VaCPK29-real-s VaCPK29-real-a VaCPK29-real-endo	5'CGGCGAAAGGTAGTTATTC, 5'TTCTCAGGCTTCAAGTCCCT, 5'TTAAACTTATCTCTG CTTCAC,
<i>VaCPK30</i> (KF042358)	VaCPK30-real-s VaCPK30-real-a VaCPK30-real-endo	5'ACTCAAGGGAGAGGTTCAAA, 5'TCAGACAGCAATAGATTGACC, 5'CAGATCATCAAACCCTTTAGC,
<i>VaCPK32</i> (Hx2000060675)	VaCPK32-real-s VaCPK32-real-a VaCPK32-real-endo	5'GGAAAGCATCAAGGCAGTATT, 5'TCATGGCCTAACTTCCAATG, 5'TCTCCAGAGGTTCTCATG,
<i>VaPAL1</i>	VaPAL1-real-s	5'CAGGACTTCACCTCAATGG,

(EU659859)	VaPAL1-real-a	5'GGGTTATCATTAAACGGAGTTGA,
<i>VaPAL2</i> (EU659860)	VaPAL2-real-s VaPAL2-real-a	5'AAGGACTTCCCCTCAATGG, 5'GGGTTATCGTTCACTGAGTTTA,
<i>VaPAL3</i> (EU659861)	VaPAL3-real-s VaPAL3-real-a	5'TCCGAACATCTCCCCAGT, 5'ATCAAGGGATTGTTCGTTTACC,
<i>VaPAL4</i> (GQ443744)	VaPAL4-real-s VaPAL4-real-a	5'AGCAAGATCGGTATGCTCT, 5'TCTATGGACTTCGTTGATGT,
<i>VaPAL5</i> (GQ443745)	VaPAL5-real-s VaPAL5-real-a	5'GTTGATGAAGCCTAAACAAG, 5'CCATGCGAATGACCTCAAT,
<i>VaSTS1</i> (EU659862)	VaSTS1-real-s VaSTS1-real-a	5'CCAACCAAAGTCCAAGATCA, 5'CCTTCTAACCGATGTTTCAAGA,
<i>VaSTS2</i> (EU659863)	VaSTS2-real-s VaSTS2-real-a	5'CGGTGCGGATTACAACTC, 5'CACCCTTGATGGTACAACAT,
<i>VaSTS3</i> (EU659864)	VaSTS3-real-s VaSTS3-real-a	5'GTCAGCCTAAATCGAAGATCAC, 5'TCTTCTAACAGATGGTTCGAGG,
<i>VaSTS4</i> (EU659865)	VaSTS4-real-s VaSTS4-real-a	5'ACAACCTCTGGTGTAGAAAT, 5'CTGACCGATGTTTCAAGGC,
<i>VaSTS5</i> (EU659866)	VaSTS5-real-s VaSTS5-real-a	5'CCTCGAACCATCTGTTAGAAGA, 5'TCTCCGCAAGATCCTTAGC,
<i>VaSTS6</i> (EU659867)	VaSTS6-real-s VaSTS6-real-a	5'CCTCAGGTGTAGAAATGCC, 5'CATCACTCTTCTAACAGATGG,
<i>VaSTS7</i> (EU659868)	VaSTS7-real-s VaSTS7-real-a	5'GCAGCACTGAAGGCACTTAA, 5'ATTTCTACACCTGACGTTGT,
<i>VaSTS8</i> (GQ443746)	VaSTS8-real-s VaSTS8-real-a	5'GCCTCGAACCATCTGTCA, 5'AAGATCCTTAGCTGTTCTGA,
<i>VaSTS9</i> (GU266256)	VaSTS9-real-s VaSTS9-real-a	5'GGCAGCCTAAGTCCAAGATTA, 5'AGTCTGCACCGGGCATTTC,
<i>VaSTS10</i> (JQ780328)	VaSTS10-real-s VaSTS10-real-a	5'GCAGGAGCACGGGTTCT, 5'AGTCCAAAGCAATTTTCAGAA,
<i>VaMyb1, 15a</i> (KM196537)	VaMyb1-real-s VaMyb1-real-a VaMyb1-real-endo	5'AGGAGTACTCAACGGAATCATT, 5'TCAAAGCTCCTGTAAGCCGCCAG, 5'TTTCTCGGACTTTTCTGTGGA,
<i>VaMyb40</i> (XM_019224778)	VaMyb40-real-s VaMyb40-real-a VaMyb40-real-endo	5'ATCCTCATCTCTCCAAGATGAC, 5'TCAATGGCTATTTTCCAAGAAGAAAAG, 5'CACAGAAGGGGAGACAGTATG,
<i>VaMyb60</i> (XM_034837254)	VaMyb60-real-s VaMyb60-real-a VaMyb60-real-endo	5'CTCTTGATGAATCAGCAGC, 5'TCAGAATATTGGAGAGAGTTGATC, 5'CTTCTTTTTATCATTTTATATCTCAAGCA,
<i>PjSTS1a</i> (LT158484)	PjSTS1a-real-s PjSTS1a-real-a	5'CGGAGCCGACTGTGAGC, 5'GATTTCACTGCAGACGACCAA,
<i>PjSTS1b</i> (LT158485)	PjSTS1b-real-s PjSTS1b-real-a	5'CGGAGCCGACTGTGAGG, 5'GATTTCACTGCAGACGACCAG,
<i>PjSTS2</i> (LT158486)	PjSTS2-real-s PjSTS2-real-a	5'TACTGAAGGAGAATCCCAATC, 5'TCCCAGCCGGGGCACTG,
<i>PjSTS3</i> (LT158487)	PjSTS3-real-s PjSTS3-real-a	5'GTACCATCCCTGGACGC, 5'GTAATCTTAGACTTCGGCTGT,
<i>pSAT terminator</i> (AY818364)	pSAT-term-a	5'GAGAGACTGGTGATTTTTGCG,
<i>VirB2</i> (MK439385)	VirB2-s VirB2-a	5'ATGCGATGCTTTGAAAGATACCG, 5'TTAGCCACCTCCAGTCAGCG,
<i>VaActin1</i> (DQ517935)	Va-actin-s Va-actin-a	5'GTATTGTGCTGGATTCTGGTGAT, 5'AGCAAGGTCAAGACGAAGGATAG,
<i>VaGapdh</i> (XM_002263109)	Va-Gapdh-s Va-Gapdh-a	5'CACTGAAGATGATGTTGTTTCC, 5'GCTATTCCAGCCTTGGCAT,
<i>AtActin</i> (NM_001338359)	At-actin-s At-actin-a	5'GATTCAGATGCCCAGAAGTC, 5'TACCGTACAGATCCTTCCTG,

<i>AtGapdh</i> (NM 101214)	At-Gapdh-s At-Gapdh-a	5'TTGGTGACAACAGGTCAAGCA, 5'AAACTTGTCTCGCTCAATGCAAT,
<i>PjActin</i> (LT158488)	Pj-actin-s Pj-actin-a	5'CTGGTATTGTGCTAGATTCTG, 5'TCCTGTTCATAGTCCAGTGC,
<i>PjGapdh</i> (LT158489)	Pj-Gapdh-s Pj-Gapdh-a	5'CTGATGAAGATGTCGTCTCG, 5'AGTCCACCACTCGGTTGCTG
<i>VaCML52</i> (MN540595)	VaCML52-real-s VaCML52-real-a VaCML52-real-endo	5'GGAGACCATTTTCATTAGCGA 5'CTAACGTAACCTTAAATCCCCAT 5'AAAAGCCTAAAACCTTTCTTGTAAGA
<i>VaCML65</i> (MN540606)	VaCML65-real-s VaCML65-real-a VaCML65-real-endo	5'GCTTCCTGAAGAAAGCTGTT 5'TCAAGCATCCATTTTCATGG 5'ATACCTCAACAAAGTCAACAAACA
<i>VaCML86</i> (MN540576)	VaCML86-real-s VaCML86-real-a VaCML86-real-endo	5'GGATCTTTTGACTCCGACG 5'TCACTGTTGACGCTGTTTAG 5'AAGAATCCATGCGCCTCAGCAG
<i>VaCML93</i> (MN540582)	VaCML93-real-s VaCML93-real-a VaCML93-real-endo	5'GTTGCATCACCCCAAAGAGCTTG 5'ATCGATGCTCCGGGATTCACCA 5'GGAAAGCAAGGCATGATGATC
<i>VaCML95</i> (MN540584)	VaCML95-real-s VaCML95-real-a VaCML95-real-endo	5'GGTGATGGGAAACTCTCTC 5'CGCCTCCTCCATCAGCAG 5'CAAGTTCTTGCGGTAAGCAGC
<i>VaCCaMK</i> (MN540584)	VaCCaMK-real-s VaCCaMK-real-a VaCCaMK-real-endo	5'CCAACAGCGATGGAAAAGTC 5'CTATAGTGGGCGGAGAGA 5'AGGCAAACAGGGGAAGTGGGAA

2.7. Секвенирование ДНК

ПЦР продукты были клонированы с использованием набора CloneJET (Thermo Fisher, Массачусетс, США). Клонированные ПЦР продукты генов *PAL*, *STS*, *CPK*, *CML* и *Myb* были секвенированы с использованием BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, Уолтем, США), следуя протоколу и рекомендациям изготовителя с pJet праймерами. После очистки этанолом пробы были секвенированы на ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Уолтем, США).

Полученные нуклеотидные последовательности генов *PAL*, *STS* и *CDPK* *V. amurensis* и *STS* или *P. jezoensis* сравнивали с известными последовательностями этих генов в программе NCBI BLAST. Выравнивание участков *VaPAL*, *VaSTS* и *VaCDPK* проводили в программе BioEdit 7.8.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Номера секвенированных фрагментов генов *Actin1*, *PAL*, *STS* и *CDPK*, депонированных в ГенБанк: *VaActin1* (DQ517935) *VaPAL1* (EU659859), *VaPAL2* (EU659860), *VaPAL3* (EU659861), *VaPAL4* (GQ443744), *VaPAL5*

(GQ443745), *VaSTS1* (EU659862), *VaSTS2* (EU659863), *VaSTS3* (EU659864), *VaSTS4* (EU659865), *VaSTS5* (EU659866), *VaSTS6* (EU659867), *VaSTS7* (EU659868), *VaSTS8* (GQ443746), *VaSTS9* (GU266256), *VaSTS10* (JQ780328), *VaCPK1* (KC488321), *VaCDPK3a* (JQ793892), *VaCPK9* (KC488319), *VaCPK13* (KC488320), *VaCPK16* (KF042356), *VaCPK20* (KC488322), *VaCPK21* (KC488318), *VaCPK25* (KF042357), *VaCPK26* (KC488323), *VaCPK29* (KC488317), *VaCPK30* (KF042358), *VaCPK32* (Hx2000060675), *PjSTS1a* (LT158484), *PjSTS1b* (LT158485), *PjSTS2* (LT158486), *PjSTS3* (LT158487), *VaCML52* (MN540595), *VaCML65* (MN540606), *VaCML86* (MN540576), *VaCML93* (MN540582), *VaCML95* (MN540584).

2.8. Бисульфитное секвенирование

Тотальную ДНК выделяли из 20 мг сухой ткани у восьминедельных растений *A. thaliana* (были смешаны все типы тканей надземных частей растений) с использованием набора Zymo Research EZ DNA Methylation-Gold Kit (Irvine, США) как описано в работе Kiselev et al. 2015. Уровень цитозинового метилирования участков генов *VaSTS1* и *VaSTS7* был проанализирован с использованием бисульфитного секвенирования, как описано у Kiselev et al. 2013b и Tyunin et al. 2013.

После бисульфитной обработки ДНК фрагменты белок-кодирующих последовательностей генов *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали с использованием праймеров для бисульфитного секвенирования (Tyunin et al. 2013). Праймеры были разработаны в соответствии с рекомендациями для набора DNA Methylation-Gold Kit (ZymoResearch, Ирвин, США). ПЦР и клонирование ПЦР-продуктов проводили, как описано ранее (Kiselev et al. 2013b). Было секвенировано 16 клонов для каждой области ДНК из 2 биологических повторов (8 клонов на каждое отдельное растение). Множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием программы ClustalX (Altschul et al. 1990).

2.9. Определение содержания стильбенов в тканях винограда, ели и сосны

Кора, хвоя и древесина ели *P. jezoensis* были собраны весной, летом, осенью и зимой 2019 года. В лаборатории сырье промывали, а затем сушили при 60°C в течение 1 суток. Далее материал измельчали и просеивали для отбора частиц размером от 0.2 до 1 мм. Ткани винограда и 35-дневную культуру клеток винограда сушили при 37°C в течение 3 суток до полного испарения влаги.

Далее высушенные и измельченные ткани ели и винограда (100 мг) экстрагировали в 3 мл этанола в течении 2 часов при 60 °С. После экстракты центрифугировали в течении 10 мин при 15 000 об/мин (5415R, Eppendorf, Гамбург, Германия). Далее экстракты были очищены с помощью 0.45 мкм мембран (Millipore, Бедфорд, Массачусетс, США) и C18 твердофазных колонок (Supelco, Беллефонт, Пенсильвания, США). Очищенные пробы далее использовали для анализа стильбенов с помощью высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе LC-20AD XR (Shimadzu, Япония) как описано ранее (Kiselev et al. 2016).

Аналитические стандарты *m*-резвератрол, *m*-пицеид, *m*-изорапонтигенин и птеростильбен были получены из Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США); *e*-виниферин из Panreac AppliChem (Дармштадт, Германия); *m*-пицеатаннол из Enzo Life Sciences (Нью Йорк, США); *m*-астрингин и *m*-изарапонтин из Polyphenols (Санднес, Норвегия).

2.10. Статистический анализ полученных результатов

Результаты были обработаны при помощи программы Statistica, версия 10.0. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка измерений (С.О.). 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.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Накопление стильбенов в тканях дальневосточных растений.

3.1.1. Накопление стильбенов в растениях ели аянской *P. jezoensis* и сосне корейской *P. koraiensis*.

Анализ содержания стильбенов был проведен в растениях ели аянской *P. jezoensis*, включая кору, хвою и древесину, собранную в зимний период. 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 5): *m*-астрингин (1), *цис*-астрингин (2), *m*-пицеид (3), *m*-изорапонтин (4), *m*-пицеатаннол (5), *цис*-пицеид (6), *цис*-изорапонтин (7), *m*-резвератрол (8), *m*-изорапонтигенин (9), *цис*-резвератрол (10), *цис*-изорапонтигенин (11). Возможно, что в анализируемых тканях присутствовали и другие стильбены в следовых количествах (менее 0.001 мг/г от массы высушенной ткани).

Наибольшее содержание стильбенов было обнаружено в коре *P. jezoensis* и составило 152–229 мг/г сухой биомассы. В хвое ели содержание стильбенов составило 8.2 мг/г сухой биомассы, что в 19-28 раз меньше содержания стильбенов в коре. Наименьшее содержание стильбенов было обнаружено в древесине ели *P. jezoensis* и составило менее 0.1 мг/г сухой биомассы (Таблица 6). Преобладающими по количеству среди стильбенов были *m*-изорапонтин (пик 4), *m*-астрингин (пик 1) и *m*-пицеид (пик 3) (Рисунок 5). Эти три соединения в совокупности составляли от 65% до 99.9% всех выявленных стильбенов в образцах (Таблица 6). Особенно выделялся *m*-изорапонтин, содержание которого в экстракте коры достигало 193 мг/г от сухой биомассы, что составляло 19.3% от используемой сухой массы коры ели или 84.3% от всех экстрагированных стильбенов.

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 (Таблица 6).

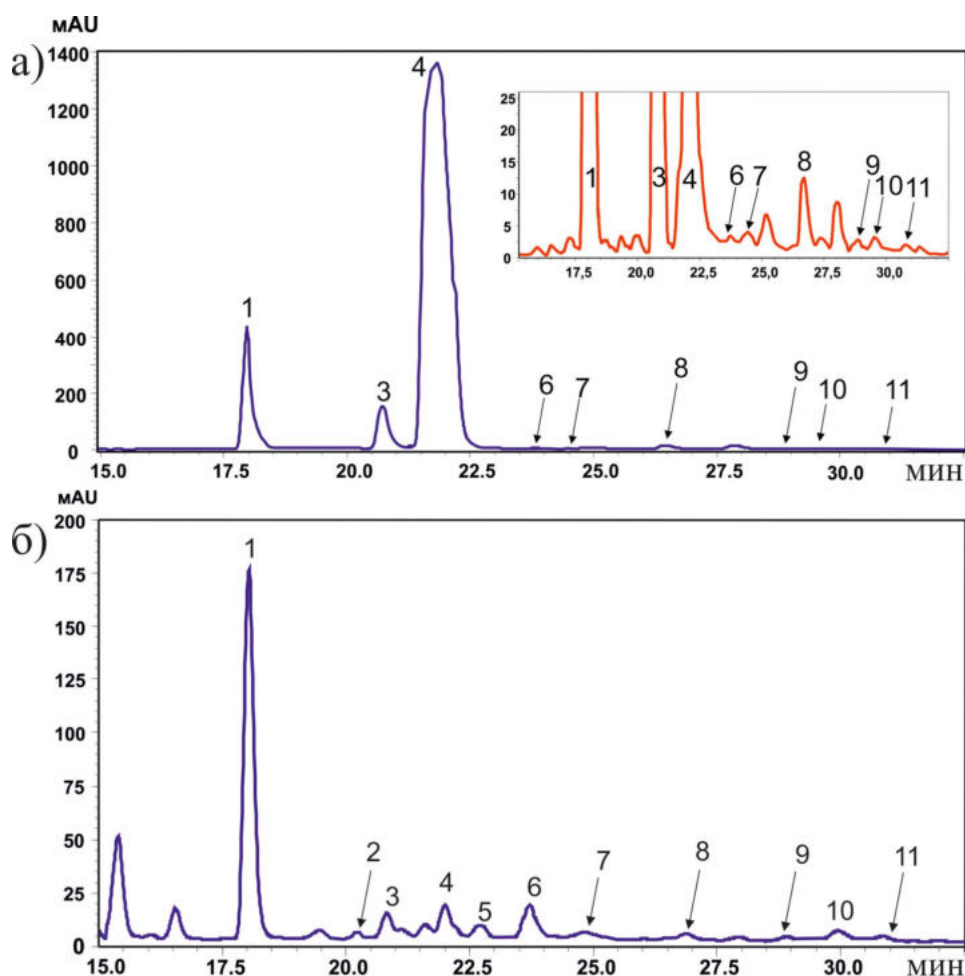


Рисунок 5 – Сравнительный анализ хроматографических профилей ВЭЖХ для этанольных экстрактов еловой *Picea jezoensis* коры (а) и хвои (б), зарегистрированных при 310 нм. Образцы еловой коры и хвои были собраны зимой. В результате анализа были выявлены следующие соединения: *m*-астрингин (1, время удерживания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

Таблица 6 – Содержание стильбенов в коре ели *Picea jezoensis*, собранной зимой после экстракции различными растворителями в течение 2 ч при 60 °С (мг/г от сухого веса). Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Тип ткани	Кора								Хвоя	Древесина
	EtOH (96%)	EtOH (70%)	MeOH (100%)	MeOH (70%)	H ₂ O	Этилацетат	Ацетон	Гексан	EtOH (96%)	EtOH (96%)
<i>m</i> -астрингин	16.72 ± 0.94 ^{bc}	16.17 ± 1.43 ^{bc}	26.46 ± 2.75 ^a	20.78 ± 1.88 ^{ab}	7.11 ± 0.56 ^c	5.91 ± 0.55 ^e	10.09 ± 0.74 ^d	0.87 ± 0.22 ^f	6.49 ± 1.01 ^e	0.02 ± 0.01 ^g
<i>цис</i> -астрингин	0.14 ± 0.06 ^c	0.17 ± 0.08 ^c	0.71 ± 0.22 ^a	0.59 ± 0.18 ^{ab}	0.38 ± 0.10 ^b	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0.02 ± 0.01 ^d	0.01 ± 0.01 ^d
<i>m</i> -пицеид	4.91 ± 0.67 ^{bc}	4.08 ± 0.59 ^{bc}	6.73 ± 0.78 ^a	5.95 ± 0.79 ^{ab}	2.14 ± 0.33 ^{cd}	1.47 ± 0.12 ^d	2.40 ± 0.32 ^{cd}	0.21 ± 0.06 ^e	1.36 ± 0.62 ^d	0.01 ± 0.01 ^f
<i>m</i> -изорапонтин	148.5 ± 1.77 ^c	130.79 ± 5.04 ^d	193.16 ± 2.21 ^a	174.46 ± 1.98 ^b	64.71 ± 2.89 ^f	46.80 ± 1.32 ^g	74.52 ± 1.16 ^e	6.62 ± 1.16 ^h	0 ⁱ	0 ⁱ
<i>m</i> -пицеатаннол	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0 ^c	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0.27 ± 0.05 ^a	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0 ^c	0 ^c	0.04 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b
<i>цис</i> -пицеид	0.02 ± 0.01 ^{cd}	0.06 ± 0.02 ^{bc}	0.09 ± 0.04 ^{bc}	0.12 ± 0.05 ^{ab}	0.26 ± 0.08 ^a	0.01 ± 0.01 ^d	0 ^d	0 ^d	0.02 ± 0.01 ^{cd}	0 ^d
<i>цис</i> -изорапонтин	0.41 ± 0.09 ^c	0.59 ± 0.09 ^c	1.58 ± 0.11 ^a	1.59 ± 0.21 ^a	1.04 ± 0.10 ^b	0.13 ± 0.07 ^d	0.27 ± 0.08 ^{cd}	0 ^e	0 ^e	0 ^e
<i>m</i> -резвератрол	0.16 ± 0.05 ^b	0.20 ± 0.06 ^{ab}	0.16 ± 0.04 ^b	0.16 ± 0.03 ^b	0.42 ± 0.12 ^a	0.02 ± 0.01 ^c	0.03 ± 0.02 ^c	0.01 ± 0.01 ^c	0.24 ± 0.07 ^{ab}	0.01 ± 0.01 ^c
<i>m</i> -изорапонтигенин	0.02 ± 0.01 ^{bc}	0.03 ± 0.02 ^b	0.13 ± 0.03 ^a	0 ^b	0.03 ± 0.02 ^b	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0 ^c
<i>цис</i> -резвератрол	0.04 ± 0.02 ^{ab}	0.02 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.01 ^{ab}	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0 ^c	0.01 ± 0.01 ^{bc}	0 ^c
<i>цис</i> -изорапонтигенин	0.01 ± 0.01 ^a	0 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Общее	170.94 ± 6.68 ^c	152.12 ± 7.54 ^c	229.08 ± 6.57 ^a	203.72 ± 4.12 ^b	76.38 ± 3.70 ^e	54.36 ± 2.44 ^f	87.32 ± 2.87 ^d	7.71 ± 0.92 ^g	8.19 ± 1.71 ^g	0.07 ± 0.02 ^h

Таблица 7 – 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	175.78 ± 2.64 ^e	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
Общее	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}

Дальнейшие эксперименты были проведены с целью определения оптимальных параметров для выделения стильбенов из коры ели. В ходе исследования были изучены влияние температуры, времени экстракции и времени года на выход стильбенов (Таблица 7, 8). Экспериментальным путем было установлено, что экстракция стильбенов в течении 2 часов при температуре 60°C является наиболее оптимальным способом выделения стильбенов. Снижение температуры приводило к существенному уменьшению содержания стильбенов в экстракте, в то время как увеличение времени экстракции до 6 часов не приводило к значимому увеличению выхода стильбенов (Таблица 7). 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 (Таблица 8).

Таблица 8 – Содержание стильбенов в коре ели *Picea jezoensis*, собранной в разные сезоны года, при экстракции этанолом в течение 2 ч при температуре 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
Общее	150.95 ± 19.93 ^{ab}	126.54 ± 15.06 ^b	138.97 ± 6.42 ^b	163.02 ± 6.36 ^a

В дальнейшем 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 химические стаканы с питательной средой W_0 (Рисунок 6 а). Черенки содержали молодые светло-зеленые иглы (Рисунок 6 б). 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 6 б). Ранее было показано (Tyunin et al. 2018), 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*. Исходя из этого, в данном исследовании было решено использовать растворы СА и СаА в тех же концентрациях для изучения защитных свойств этих веществ от воздействия УФ-С (Tyunin et al. 2018).

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, Рисунок 6 в). Добавление СаА также привело к снижению количества желтых игл до 85% (УФ-С+СаА, Рисунок 6 в), однако это значение не имело существенных различий с уровнем желтых игл после облучения УФ-С (Рисунок 6 в).

Кроме того, проведен анализ содержания и состава стильбенов в данном эксперименте. Полученные данные показали, что культивирование черенков ели в течение 24 ч в стаканах с питательной средой W_0 (образцы С0 и С24) не оказало существенного влияния на содержание стильбенов (Таблица 9). 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 9). Наибольшее содержание стильбенов (9.2 ± 0.3 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 9).

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 9).

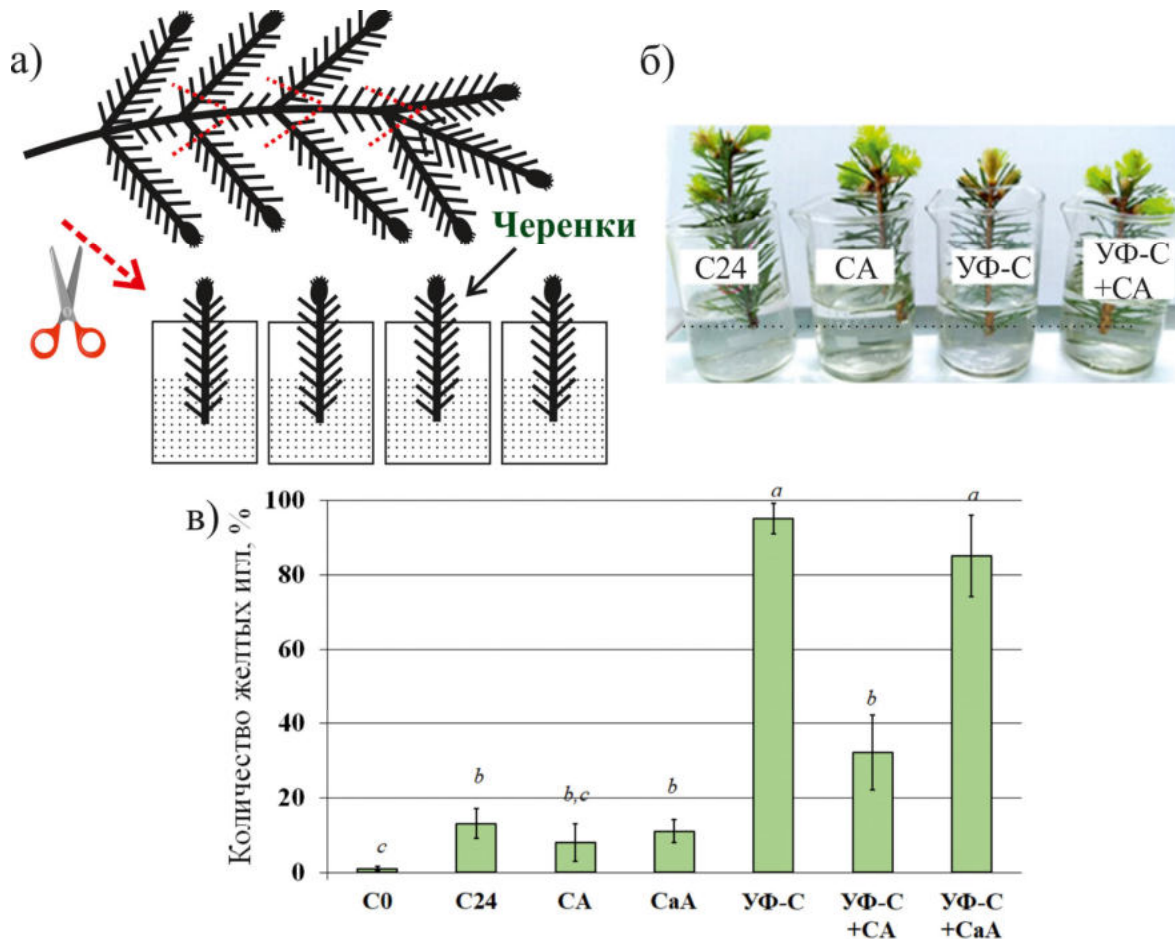


Рисунок 6 – Обработка черенков ели *Picea jezoensis* УФ-С, паракумаровой кислотой (СА) и кофейной кислотой (СаА). Схема эксперимента (а). Жизнеспособность черенков *P. jezoensis* через 24 часа после обработки СА, СаА и УФ-С (б, в). С0 – количество желтых игл до эксперимента; С-24 – количество желтых 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 ($p < 0.05$).

Таблица 9 – 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 (SEM). 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
Общее содержание 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}

С помощью ПЦР РВ были проанализированы уровни транскрипции четырех генов *STS P. jezoensis*, включая *PjSTS1a*, *PjSTS1b*, *PjSTS2* и *PjSTS3*. Наибольшая экспрессия *PjSTS1a* была обнаружена в иглах ели *P. jezoensis* через 1 ч после обработки СА, СаА и/или обработки УФ-С (Рисунок 7 а, д), однако через 24 ч после обработки уровень экспрессии *PjSTS1a* во всех образцах вернулся к контрольному значению, за исключением экспрессии *PjSTS1a* в образцах СА+УФ. Уровень экспрессии гена *PjSTS3* через 24 ч после обработки СаА и СаА+УФ достоверно возрастал в 2.3-2.5 раза (Рисунок 7 г). Экспрессия *PjSTS1b* достоверно возрастала через 24 ч в 2.1

раза после обработки СА+УФ (Рисунок 7 е). Обработка СА, СаА и УФ-С не оказывала влияния на уровень транскрипции *PjSTS2* (Рисунок 7 в, ж). Таким образом, увеличение содержания стильбенов в хвое ели *P. jezoensis* после добавления предшественников и обработки УФ-С происходило за счет увеличения уровня транскрипции генов биосинтеза стильбенов.

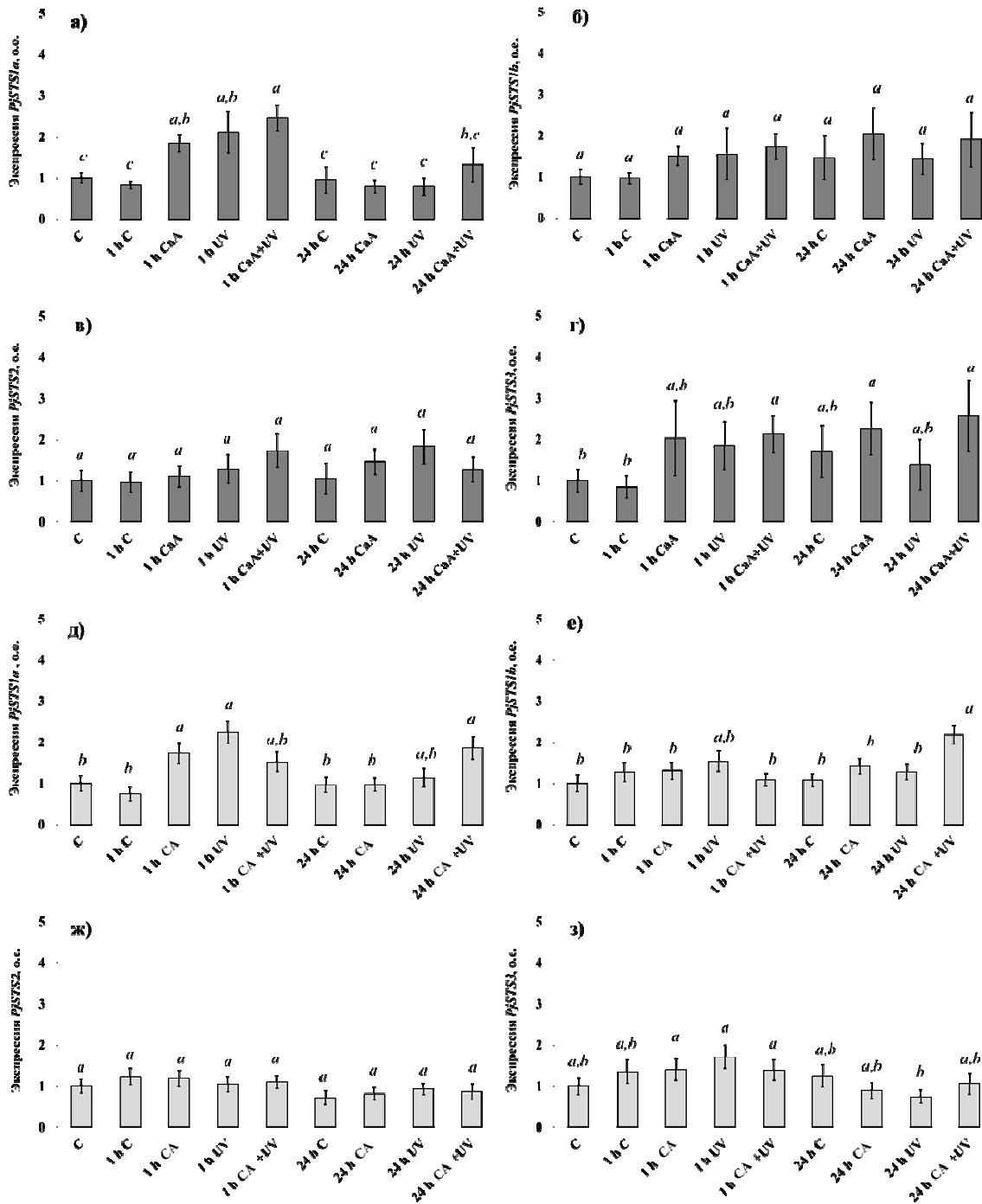


Рисунок 7 – Уровень транскрипции *PjSTS* в годовалой хвое ели *P. jezoensis* после обработки кофейной кислотой СаА: *PjSTS1a* (а); *PjSTS1b* (б); *PjSTS2* (в); *PjSTS3* (г) и пара-кумаровой кислотой СА: *PjSTS1a* (д); *PjSTS1b* (е); *PjSTS2* (ж); *PjSTS3* (з) с/без облучения ультрафиолетом-С (УФ-С). Данные

представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$); о.е. – относительные единицы.

С помощью ВЭЖХ был проанализирован состав и количество стильбенов в коре другого представителя хвойных деревьев – в коре сосны корейской *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. Так же было показано, что кора сосны *P. koraiensis* является богатым источником стильбенов, общее содержание стильбенов доходило до 54 мг/г сухой массы (Таблица 10).

Используя ВЭЖХ с масс-спектрометрией высокого разрешения, мы обнаружили 7 стильбеноидных соединений в тканях сосны *P. koraiensis* (Suprun et al. 2023, Рисунок 8, Таблица 10): *m*-астрингин (1), *m*-пицеид (2), *цис*-пицеид (3), *m*-изорапонтин (4), *m*-пиностильбенозил (5), *m*-резвератрол (6), *m*-пиностильбен (7) (Рисунок 8). Возможно, что в анализируемых тканях присутствовали и другие стильбены в следовых количествах (менее 0.001 мг/г от массы высушенной ткани) которые мы не можем детектировать и подтвердить используемыми методами.

Преобладающими по количеству среди стильбенов были *m*-пицеид и *m*-пиностильбенозил (Таблица 10). Эти три соединения в совокупности составляли более 90% всех выявленных стильбенов в образцах (Таблица 10). 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 6, 10).

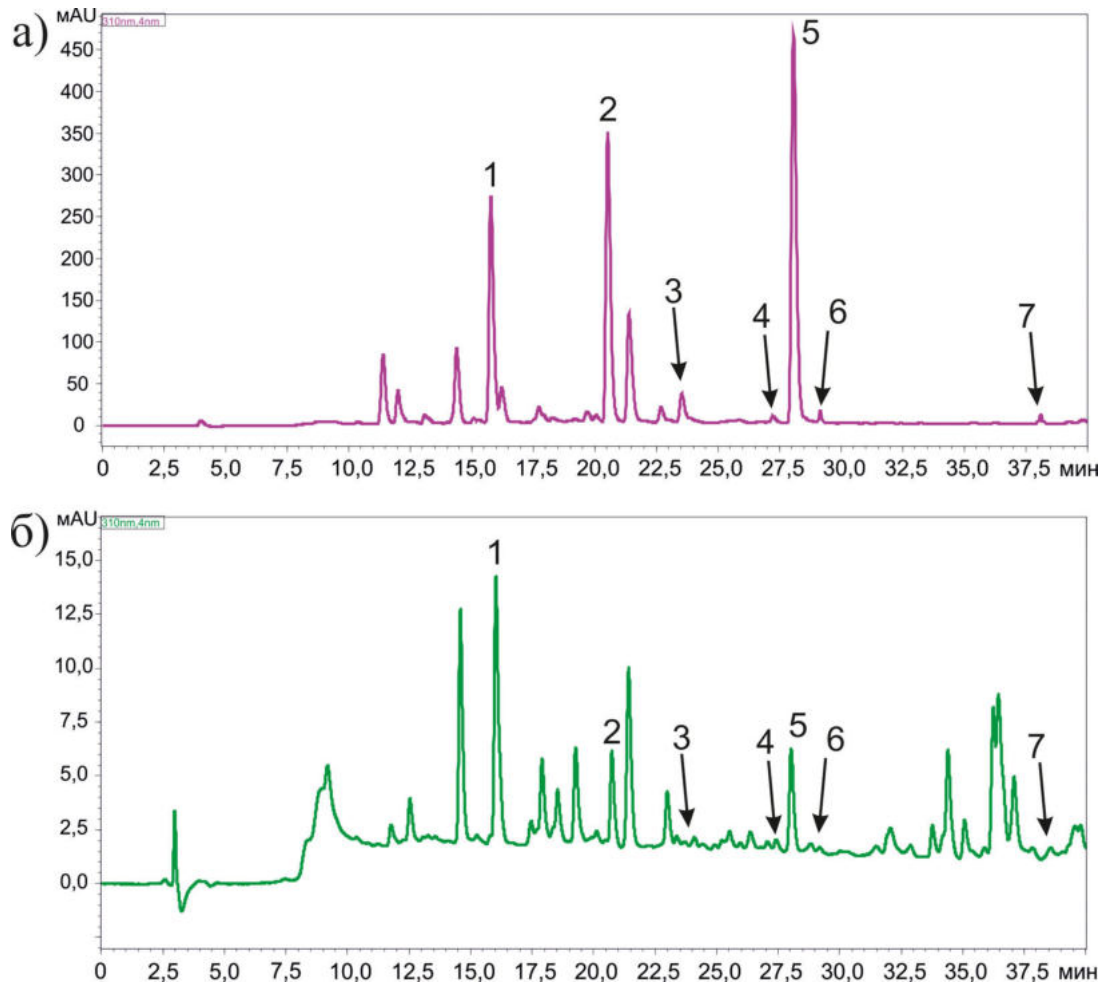


Рисунок 8 – Сравнительный анализ хроматографических профилей ВЭЖХ для этанольных экстрактов сосновой *Pinus koraiensis* коры (а) и хвои (б), зарегистрированных при 310 нм (Suprun et al. 2023). Образцы сосновой коры и хвои были собраны зимой. В результате анализа были выявлены следующие соединения: *m*-астрингин (пик № 1), *m*-пицеид (2), *cis*-пицеид (3), *m*-изоропонтин (4), *m*-пиностилбенозил (5), *m*-резвератрол (6), *m*-пиностилбен (7).

Таблица 10 – Содержание стильбенов в коре сосны *Pinus koraiensis* (мг/г от сухого веса), собранной зимой, весной, летом и осенью. Стильбены из использованных образцов были экстрагированы и проанализированы через 24 ч после сбора. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Сезон сбора коры / стильбены	Кора, собранная зимой	Кора, собранная весной	Кора, собранная летом	Кора, собранная осенью
<i>m</i> -астрингин	0.143 \pm 0.023 ^a	0.102 \pm 0.039 ^a	0.084 \pm 0.019 ^a	0.039 \pm 0.006 ^b
<i>m</i> -пицеид	22.417 \pm 3.251 ^a	16.2 \pm 1.587 ^{a,b}	18.68 \pm 2.969 ^{a,b}	14.333 \pm 0.813 ^b
<i>cis</i> -пицеид	0.391 \pm 0.027 ^a	0.277 \pm 0.051 ^b	0.029 \pm 0.005 ^d	0.097 \pm 0.029 ^c
<i>m</i> -изоропонтин	0.854 \pm 0.132 ^a	0.497 \pm 0.138 ^a	0.607 \pm 0.085 ^a	0.868 \pm 0.258 ^a
<i>m</i> -пиностилбенозил	28.359 \pm 4.272 ^a	18.39 \pm 3.071 ^{a,b}	23.58 \pm 4.036 ^{a,b}	17.95 \pm 1.658 ^b

<i>m</i> -резвератрол	0.868 ± 0.094^{ab}	0.765 ± 0.108^b	0.881 ± 0.196^{ab}	1.487 ± 0.327^a
<i>m</i> -пиностилбен	0.744 ± 0.095^a	0.645 ± 0.122^a	0.667 ± 0.135^a	1.014 ± 0.155^a
Общее	53.777 ± 7.657^a	$36.89 \pm 4.946^{a,b}$	$44.53 \pm 7.341^{a,b}$	35.79 ± 2.681^b

Известно, что плоды сосны корейской *P. koraiensis* или сосны кедровой съедобны (так называемые «кедровые орешки»), довольно популярны и широко продаются в мире, поэтому одной из важных задач стало проанализировать состав стилбенов в шишках и плодах сосны *P. koraiensis* (Таблица 11). Нами было показано, что в шишках сосны, по сравнению с корой, содержание стилбенов было намного ниже и состав их был меньше (Таблица 11). Мы нашли 5 стилбенов (*m*-астрингин, *m*-пицеид, *m*-пиностилбенозил, *m*-резвератрол и *m*-пиностилбен) в чешуйках и всего 3 стилбена в скорлупе (*m*-астрингин, *m*-пицеид, *m*-пиностилбенозил). 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 стилбенов (Таблица 11). Значит человек не получает стилбены через употребление сосновых орехов в пищу.

Таблица 11 – Содержание стилбенов и их состав в различных частях шишки (семенные чешуйки, оболочки семян и семенах) сосны *Pinus koraiensis* (мг/г от сухого веса), собранных осенью. 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 шишки / стилбены	Семенные чешуйки, мг/г от сухой массы	оболочки семян, мг/г от сухой массы	семена, мг/г от сухой массы
<i>m</i> -астрингин	0.017 ± 0.003^a	0.007 ± 0.001^b	0
<i>m</i> -пицеид	0.036 ± 0.009^a	0.035 ± 0.014^a	0
<i>цис</i> -пицеид	0	0	0
<i>m</i> -изорапонтин	0	0	0
<i>m</i> -пиностилбенозид	0.051 ± 0.014^a	0.008 ± 0.005^b	0
<i>m</i> -резвератрол	0.004 ± 0.002	0	0
<i>m</i> -пиностилбен	0.005 ± 0.001	0	0
Общее содержание стилбенов	0.127 ± 0.031^a	0.050 ± 0.013^b	0

3.1.2. Накопление стильбенов в растениях винограда амурского *V. amurensis*.

Анализ содержания стильбенов в растениях *V. amurensis* проводили, используя листья, стебли, семена, ягоды и корни винограда амурского *V. amurensis*, собранные в разное время года (Рисунок 9, Таблица 12).

Наибольшее общее содержание стильбенов в тканях винограда *V. amurensis* было определено в корнях винограда, собранных осенью – 8.9 мг/г сухой массы корней (Tyunin et al. 2019; Рисунок 9, Таблица 12), в то время как в начале лета содержание стильбенов в корнях было ниже в 2.6 раза и составило 3.4 мг/г (Таблица 12). 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 12).

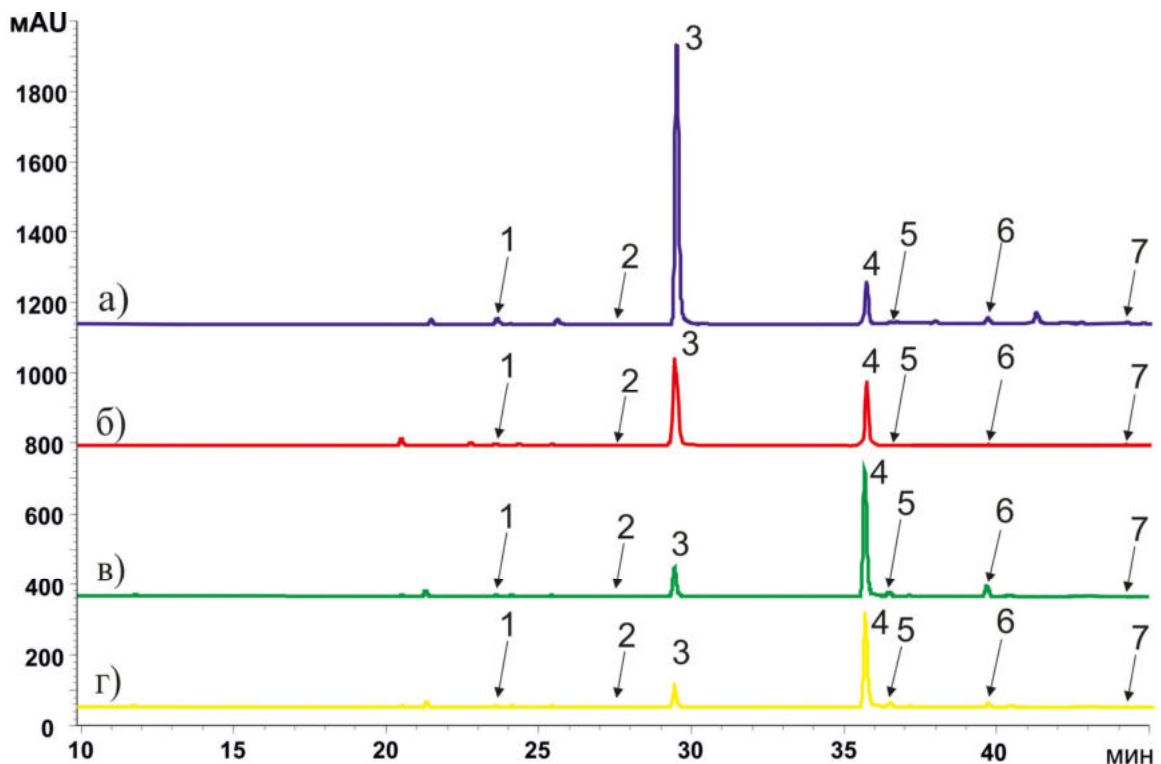


Рисунок 9 – Сравнение хроматографических профилей ВЭЖХ для этанольных экстрактов корней (а,б) и стеблей (в,г) винограда *Vitis amurensis*, собранных в июне (б,г) и октябре (а,в) 2018 г., зарегистрированных при 310 нм; *m*-пицеид (1, время удерживания 23.5 мин), *цис*-пицеид (2, 27.5 мин), *m*-резвератрол (3, 29.9 мин), *цис*- ϵ -виниферин (4, 35.4 мин), *m*- ϵ -виниферин (5, 36.1 мин), *m*- δ -виниферин (6, 39.6 мин), *m*-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 12). 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 12).

В корнях винограда в осенний период *V. amurensis* основным стильбеном был *m*-резвератрол, содержание которого достигало 6.8 мг/г, что составляло 76.4% от общего содержания стильбенов. Так же *m*-резвератрол преобладал в весенний период в корнях винограда, черешках листьев, собранных весной и осенью, а также в семенах зрелых ягод (Таблица 12).

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 *m*-пицеид (Таблица 12). 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.

Таблица 12 – 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, содержащие 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 ^c	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 ^e	0 ^e	0.011 ±0.003 ^a	0.003 ±0.002 ^b	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0 ^e	0 ^e
Общее	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 ^c

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* резко 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. Полученные черенки использовали для обработки УФ-С. Жизнеспособность черенков определяли через 24 ч после обработки УФ-С. Черенки с нормальными по фенотипу листьями считались «жизнеспособными», а с желто-зелеными увядшими листьями – «нежизнеспособными» (Рисунок 10 а).

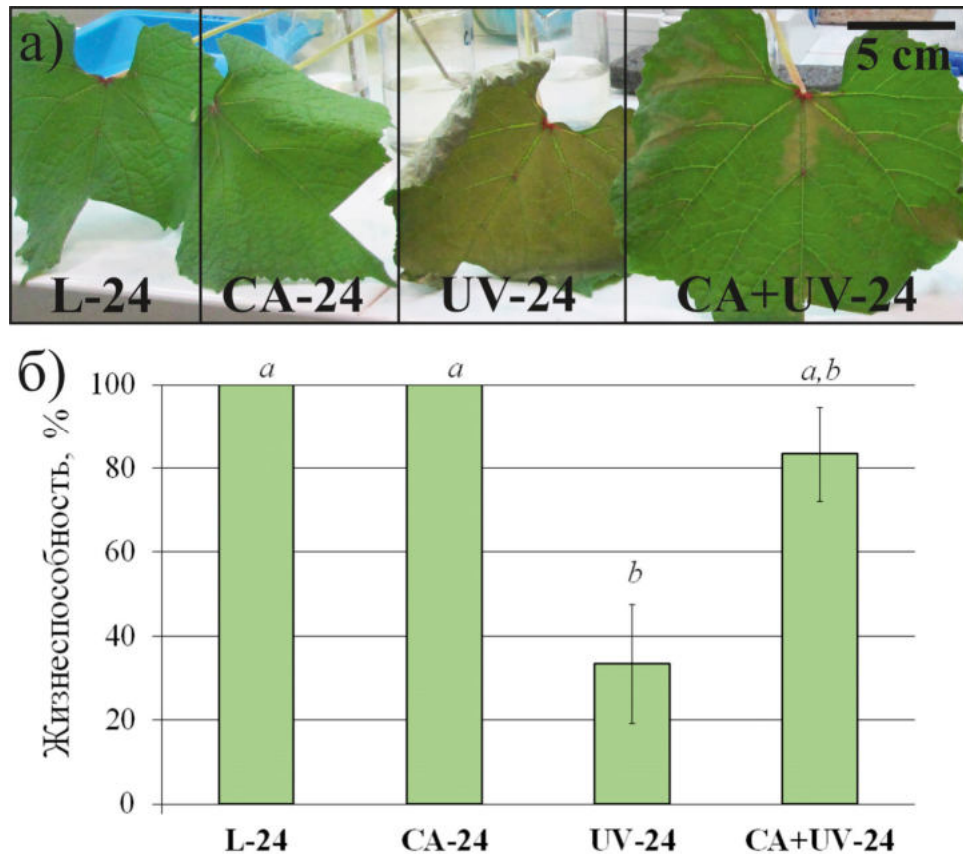


Рисунок 10 – Фенотип (а) и жизнеспособность черенков *Vitis amurensis* (б) через 24 часа после обработки *para*-кумаровой кислотой (СА) и/или УФ-С (UV-С). L-24 – 24 часа в жидкой питательной среде W_0 ; СА-24 – 24 часа с 0.5 мМ СА; UV-24 – 20 мин с УФ-С; UV+СА-24 – 0.5 мМ СА и УФ-С в течение 20 мин. 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 10 б).

Примечательно, что количество жизнеспособных листьев увеличилось почти вдвое, до 83.3%, после обработки УФ-С при добавлении СА (Рисунок 10 б).

В ранее опубликованных работах (Duan et al. 2015; 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 13) за счет достоверного увеличения содержания *m*-пицеида (в 4.1 раза), *m*- ϵ -виниферина (в 2.6 раза), *цис*-пицеида (в 2.2 раза), *m*-резвератрола (в 1.6 раза) и *m*- 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 *m*-пицеида (в 8.7 раза), *цис*- ϵ -виниферина (в 7.7 раза), *m*-резвератрола (в 2.5 раза), *m*- ϵ -виниферина (в 2 раза), *цис*-пицеида (в 1.6 раза) и *m*- δ -виниферина (в 1.6 раза).

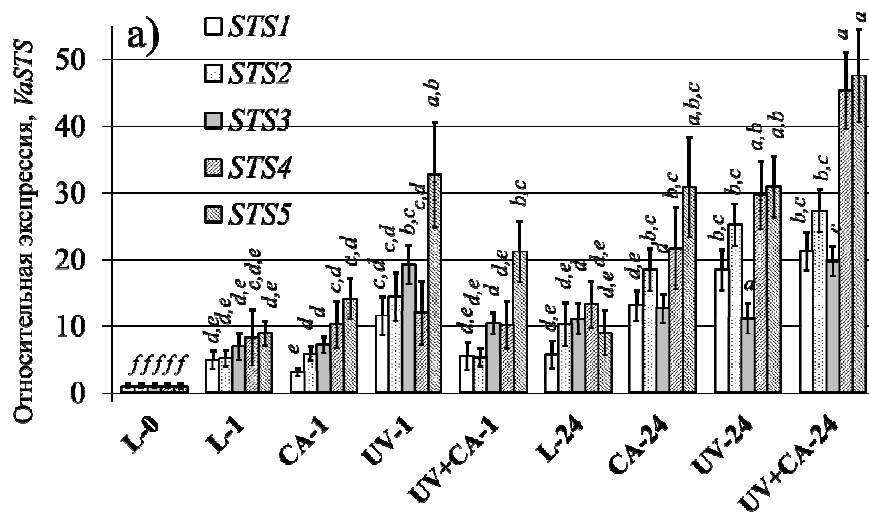
Облучение УФ-С в присутствии СА оказало наиболее сильное влияние на содержание стильбенов, приведя к достоверному увеличению общего содержания стильбенов в 3.4 раза (Таблица 13). Это увеличение было обусловлено возрастанием содержания *m*-пицеида (в 11.1 раза), *цис*- и *m*- ϵ -виниферина (в 1.6 и 8.7 раза), *m*-резвератрола (в 3.4 раза), *цис*-пицеида (в 2 раза), *m*- δ -виниферина (в 1.5 раза). Установлено, что обработка как УФ-С, так и СА не влияла на спектр образующихся стильбенов.

Таблица 13 – Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в листьях черенков винограда амурского *Vitis amurensis*, культивируемых в контрольных условиях, в присутствии *пара*-кумаровой кислоты (СА) и/или ультрафиолетового (УФ-С) облучения. Средние значения, содержащиеся одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Стильбены	L-24 (контроль)	СА-24	УФ-24	УФ + СА-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-ε-виниферин</i>	0.003 ± 0.002 ^b	0.013 ± 0.011 ^{ab}	0.023 ± 0.012 ^a	0.026 ± 0.015 ^a
<i>т-ε-виниферин</i>	0.049 ± 0.009 ^c	0.127 ± 0.004 ^a	0.096 ± 0.010 ^{ab}	0.078 ± 0.009 ^b
<i>т-δ-виниферин</i>	0.021 ± 0.002 ^b	0.030 ± 0.002 ^a	0.033 ± 0.005 ^a	0.031 ± 0.003 ^a
<i>т-пицеатаннол</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Общее содержание 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 СА и/или УФ-С увеличивала уровень экспрессии генов *STS* как через 1 час, так и через 24 часа после начала эксперимента (Рисунок 11). Насыщение СА в сочетании с воздействием УФ-С приводило к наиболее значительной активации экспрессии генов *STS*. Такая обработка активировала экспрессию девяти генов *VaSTS* (*VaSTS1-9*) в 1.8–7 раз по сравнению с L-1 и L-24 (Рисунок 11 а, б). При насыщении СА экспрессия *VaSTS5* и *VaSTS6* значительно повышалась по сравнению с необработанными листьями (24 ч, Рисунок 11 а, б). Также наблюдалось увеличение экспрессии *VaSTS3*, 5 и 9 через 1 ч после воздействия УФ-С (Рисунок 11 а, б) и экспрессии *VaSTS1*, 2, 4, 5 и 7 через 24 ч после облучения УФ-С (Рисунок 11 а, б). 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.



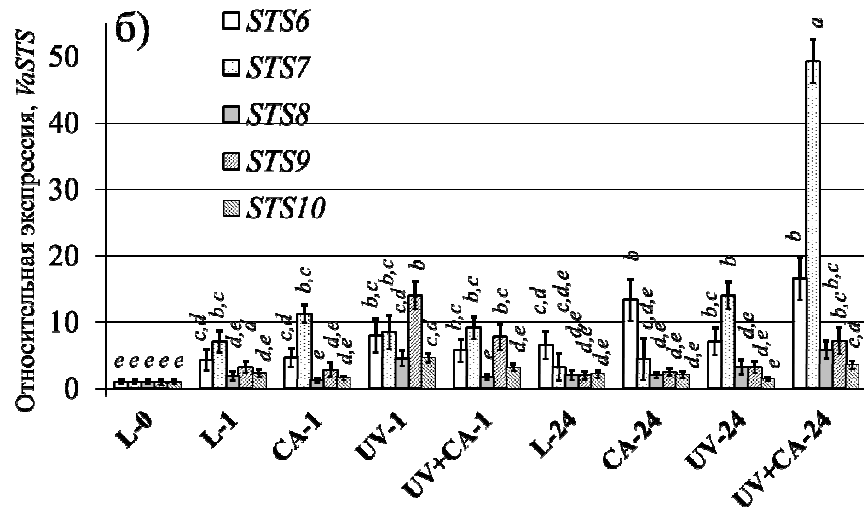


Рисунок 11 – Анализ экспрессии генов биосинтеза стильбенов в листьях *Vitis amurensis* после обработки пара-кумаровой кислотой (CA) и ультрафиолетом С (УФ-С) с использованием ПЦР РВ. Уровни транскрипции стильбен синтаз *STS1–5* (а); уровни транскрипции генов *STS6–10* (б). L-0 – РНК экстрагировали сразу после разделения лианы виноградной лозы на черенки; L-1 – 1 час в контрольных условиях; CA-1 – 1 час в присутствии 0.5 мМ СА; UV-1 – 1 час после УФ-С в течение 20 минут; UV+CA-1 – через 1 час после обработки УФ-С и СА (УФ-С 20 минут; 0.5 мМ СА в течение 1 часа); L-24 – 24 часа в контрольных условиях; CA-24 – 24 часа в присутствии 0.5 мМ СА; UV-24 – 24 часа после УФ-С в течение 20 минут; UV+CA-24 – 24 часа после обработки УФ-С и СА (УФ-С 20 мин; 0.5 мМ СА в течение 24 ч). Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

3.1.3. Накопление стильбенов в нетрансгенных каллусах *V. amurensis* после обработки УФ-С и при добавлении в питательные среды активаторов и ингибиторов биосинтеза вторичных метаболитов растений

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 *m*-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 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 *m*-резвератрола, *m*-пицеид, *m*-резвератрол, *m*- ϵ -виниферин, *m*- δ -виниферин (Рисунок 12). 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 *m*-пицеатаннол, однако в то же время присутствовал дигликозид *m*-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 *m*-резвератрола составило 0.04 ± 0.2 мг/г сухой биомассы (Таблица 14, Kiselev et al. 2013; Aleynova et al. 2016; Kiselev et al. 2021).

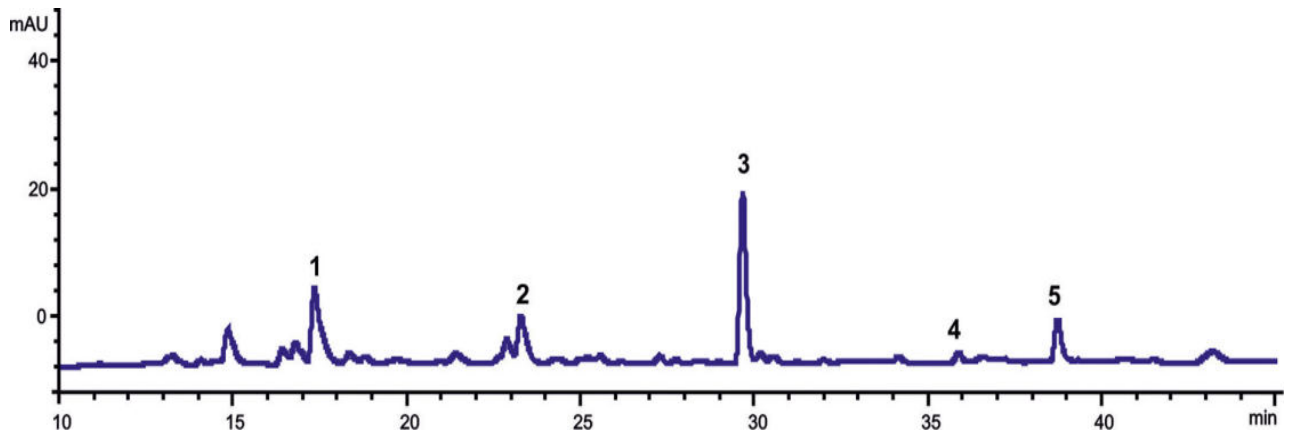


Рисунок 12 – Хроматографический профиль ВЭЖХ для этанольных экстрактов каллусной культуры клеток винограда *Vitis amurensis* V7, зарегистрированный при 310 нм. Клетки высушивали на 35-й день культивирования. Дигликозид *m*-резвератрола (1), *m*-пицеид (2), *m*-резвератрол (3), *m*- ϵ -виниферин (4), *m*- 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 14 и 15.

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 *m*-резвератрола культурой V7 достоверно возросла в 2.6–3 раза (Таблица 14). Также значительно возрастало общее содержание стильбенов в 4.3–4.7 раза, до 1.4 мг/г сухой биомассы (Таблица 14).

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 *m*-резвератрола в клетках V7 в 2.2 раза, а общее содержание стильбенов увеличивалось в 4.3–8 раз (Таблица 14).

Добавление деметилирующего агента (5A) в питательные среды вызвало небольшое дозозависимое увеличение содержания *m*-резвератрола (Таблица 14), 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 *m*-резвератрола является *пара*-кумаровая кислота (CA), поэтому мы добавляли это вещество в питательные среды, чтобы оценить стимулирующее действие этого предшественника на содержание стильбенов. Добавление CA достоверно увеличивало содержание *m*-резвератрола в 3–4 раза, при этом общее содержание стильбенов возрастало в 4–4.3 раза (Таблица 14).

Известно, что обработка УФ-С является наиболее сильным внешним воздействием, активирующим биосинтез стильбенов в растении. В нашем случае УФ-С достоверно увеличивал содержание *m*-резвератрола: в 2.8–3 раза, по сравнению с необработанными контрольными клетками

(Таблица 15). 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 15).

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 *m*-резвератрола в 2.5 раза до 0.1 мг/г сухой биомассы, но большее увеличение содержания *m*-резвератрола было достигнуто при использовании А23187. В результате применения ионофора содержание *m*-резвератрола достигало 0.28–0.39 мг/г сухой биомассы, что было одним из самых высоких значений для нетрансгенных каллусных культур винограда амурского (Таблица 14).

Данные, представленные в Таблице 14, позволили перейти к анализу участия кальциевых сенсоров в регуляции биосинтеза стильбенов, что подробно будет детально рассмотрено в последующих главах.

Таблица 14 – Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после добавления в питательные среды различных веществ. Средние значения, содержащиеся одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Воздействие	Общее содержание стильбенов	Содержание <i>m</i> -резвератрола	Ссылки
Контрольная культура клеток V2 или V7	0.3 ±0.1 ^c	0.04 ±0.02 ^d	Kiselev et al. 2013; Aleynova et al. 2016; Kiselev et al. 2021
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 + CA, 0.1 mM	1.2 ±0.38 ^b	0.12 ±0.06 ^{cd}	Kiselev et al. 2021
V7 + CA, 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 mM) + W7	н.и.	0.01 ±0.01 ^d	Kiselev et al. 2013
V2 + SA (0.1 mM) + W7	н.и.	0.03 ±0.01 ^d	Kiselev et al. 2013

V2 + 5A, 0.05 mM	н.и.	0.06 ±0.02 ^{cd}	Tyunin et al. 2012
V2 + 5A, 0.1 mM	н.и.	0.09 ±0.02 ^{cd}	Tyunin et al. 2012

A23187 – ионофор кальция; SA – *para*-кумаровая кислота; MeJA – метилжасмонат; SA – салициловая кислота; W7 – N-(6-аминогексил)-5-хлоро-1-нафталинсульфонамид; УФ-С – ультрафиолет С; 5A – деметилирующий агент 5-азацитидин; н.и. – не измерялось.

3.1.4. 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 *Agrobacterium 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 *m*-резвератрола в культуре клеток VB2, активно экспрессирующей ген *rolB*, значительно увеличилось более чем в 700 раз (Таблица 15). Важно отметить, что содержание *m*-резвератрола в клетках VB2 достигало 31.5 мг/г сухой биомассы, что является одним из самых высоких значений *m*-резвератрола, полученных для культур клеток растений и известных растительных источников. Увеличивалось содержание *m*-резвератрола и при трансформации клеток винограда геном *rolC*, в 25-36 раз (Таблица 15).

Культуру клеток VB2 использовали в качестве модельного объекта для исследования полученного феномена сверхпродукции *m*-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 *m*-резвератрола в клетках VB2 зависит от активности кальциевых каналов всех основных типов, поскольку содержание *m*-резвератрола в клетках VB2 значительно уменьшалось при добавлении LaCl_3 , Ver и NA в питательные среды (Таблица 15).

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 *m*-резвератрола в клетках VB2. Исследовали влияние ингибитора Туг-фосфатаз фениларсиноксида (Рао) (Reyes et al. 2006) и общего ингибитора фосфатаз ортованадата натрия (Van) (Giacometti et al. 2004) на аккумуляцию *m*-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 15).

Установлено, что эффект сверхпродукции *m*-резвератрола в клетках VB2 продержался в течение трех лет, после чего содержание *m*-резвератрола постепенно снижалось до уровня в 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 *m*-резвератрола (Таблица 14, Kiselev et al. 2013).

Таблица 15 – Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после трансформации генами *rolB* и *rolC* из агробактерий *Agrobacterium rhizogenes*. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$). 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 Туг-фосфата; Van – ортованадат натрия, ингибитор фосфатаз.

Воздействие	Содержание <i>m</i> -резвератрола	Ссылки
Контрольная культура клеток VV	0.03 ±0.02 ^e	Kiselev et al. 2013; Aleynova et al. 2016;
Контрольная культура клеток КА-0	0.04 ±0.02 ^e	Kiselev et al. 2021
VB1, слабая экспрессия гена <i>rolB</i>	0.06 ±0.02 ^e	Kiselev et al. 2007
VB2, сильная экспрессия гена <i>rolB</i>	31.48 ±3.01 ^a	Kiselev et al. 2007
Культура клеток VB2 с	5.23 ±2.11 ^{bc}	Dubrovina et al. 2009

добавлением LaCl ₃ , 1 мМ		
Культура клеток VB2 с добавлением Ver, 0.5 мМ	5.31 ±1.87 ^{bc}	Dubrovina et al. 2009
Культура клеток VB2 с добавлением Ver, 1 мМ	1.12 ±0.33 ^d	Dubrovina et al. 2009
Культура клеток VB2 с добавлением NA, 50 μМ	4.76 ±1.15 ^c	Dubrovina et al. 2009
Культура клеток VB2 с добавлением Рао, 5 μМ	3.34 ±0.95 ^{cd}	Kiselev et al. 2007
Культура клеток VB2 с добавлением Van, 0.1 мМ	10.17 ±2.03 ^b	Kiselev et al. 2007
VC1, слабая экспрессия гена <i>rolC</i>	0.99 ±0.01 ^d	Dubrovina et al. 2010
VCE, сильная экспрессия гена <i>rolC</i>	1.44 ±0.08 ^d	Dubrovina et al. 2010

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

Для растений характерно наличие кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK или СРК), кальмодулинов (CaM), кальмодулин-подобных белков (CML), кальций и кальмодулин-зависимых протеинкиназы (CCaMK), кальцийнейрин-В-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 *СРК*, *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 *m*-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; Dubrovina et al. 2013).

С помощью ПЦР РВ было показано, что трансформация геном *rolB* и дальнейшая активация содержания стильбенов сопровождалась достоверным сильным увеличением транскрипции гена *VaCDPK20* (Рисунок 13). 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 13).

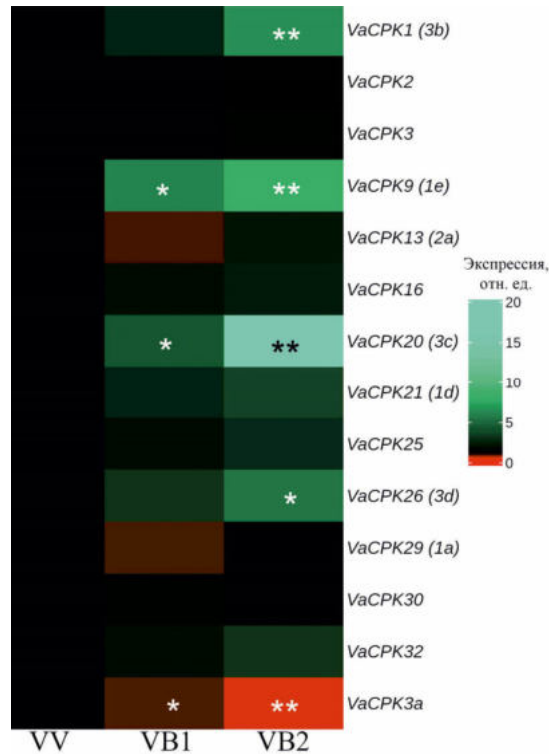


Рисунок 13 – Тепловая карта уровней экспрессии генов *VaCPK* в клеточных культурах винограда *Vitis amurensis* с низким содержанием стильбенов (культура клеток VV) и с высоким содержанием стильбенов (культуры клеток VB1 и VB2). Уровни транскриптов *VaCPK* определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР. Цветовая 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*, *VaCaM9* и *VaCaM10* (Dubrovina et al. 2019). Полученные данные показали, что уровни транскрипта *VaCaM8* в листьях и клеточных культурах снижались после обработки SA, MeJa и SA (Рисунок 14 а). 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 14 а).

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 (Рисунок 14 б). В целом, экспрессия *VaCaM10* незначительно реагировала на обработку SA, MeJA или CA (Рисунок 14 с). Только УФ-излучение значительно повышало экспрессию *VaCaM10* в клеточных культурах и листьях (в 1.6–2.5 раза; Рисунок 14 с).

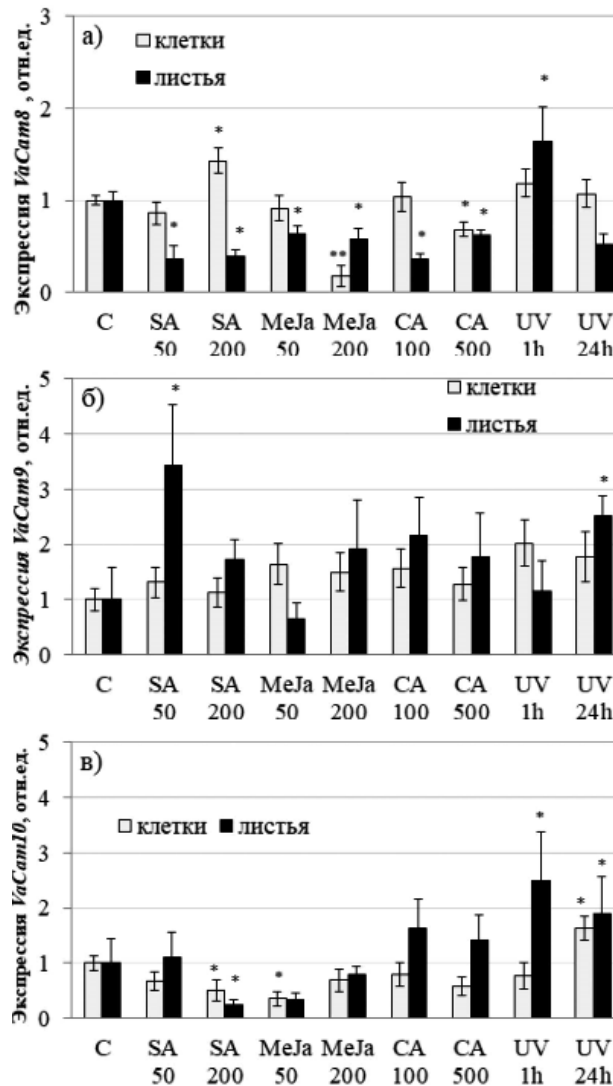


Рисунок 14 – Экспрессия генов *VaCaM8* (а), *VaCaM9* (б) и *VaCaM10* (с). С – контрольные условия (для листьев - 24 часа в фильтрованной воде при температуре 25 °С; для клеточных культур – 35 дней роста в среде W_{B/A}); SA 50 – с 50 мкМ салициловой кислоты; SA 200 – с 200 мкМ салициловой кислоты; MeJA 50 - с 50 мкМ метилжасмонатной кислоты; MeJA 200 – с

200 мкМ метилжасмоновой кислоты; SA 100 – с 100 мкМ р-кумаровой кислоты; SA 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, SA и UV-C (Рисунок 15). 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 15). Следовательно, эти гены представляют наибольший интерес для дальнейших генетических исследований. Экспрессия остальных 31 генов *VaCML* снизилась в большинстве образцов (Рисунок 15). 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-С повышал экспрессию *VaCML9a*, 51, 52, 55, 76, 82, 90/91, 93 и 95 в культуре клеток V7 (Рисунок 15) и экспрессию *VaCML48*, 55, 65, 83 в виноградных черенках (Рисунок 15) 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 15). Мы обнаружили, что обработка УФ-С оказала наибольшее положительное влияние на экспрессию *VaCML* по сравнению с обработкой MeJA, SA и CA, 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 (Рисунок 15) и экспрессия *VaCML44*, 51, 65, 94 только в виноградных листьях при всех используемых концентрациях (Рисунок 15). Экспрессия *VaCML41b*, 84 и *VaCML41b*, 73, 106 значительно снизилась после обработки MeJA в культуре клеток винограда V7 и листьях, соответственно (Рисунок 15).

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 (Рисунок 15), а генов *VaCML21*, 54, 65 и 66 – в листьях (Рисунок 15). Кроме того, экспрессия *VaCML92* и *VaCML48*, 74 значительно снизилась после обработки SA в культуре клеток винограда V7 и листьях соответственно (Рисунок 15).

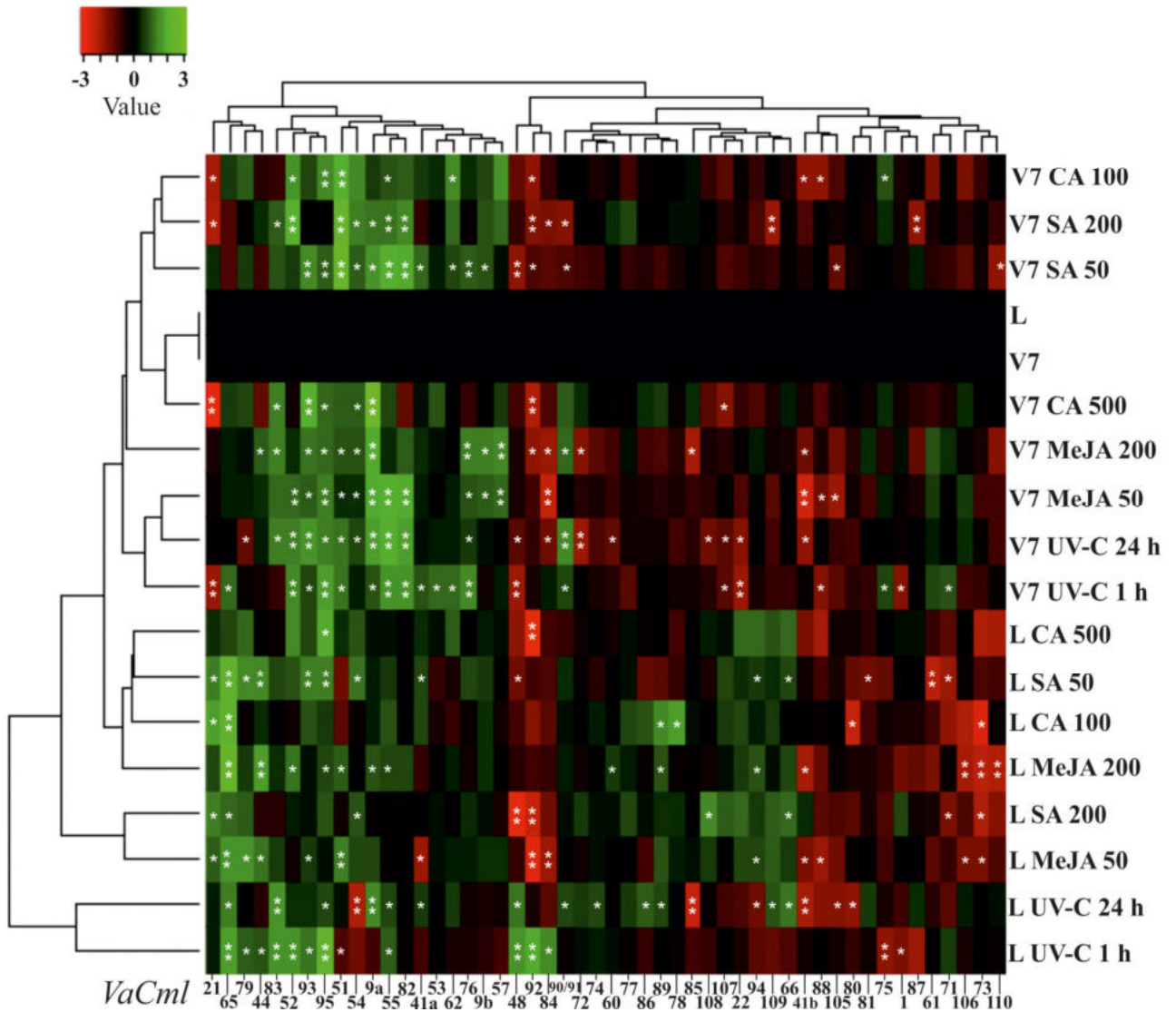


Рисунок 15 – Тепловая карта уровней экспрессии *VaCml* после ультрафиолетового облучения (UV-C) в культуре клеток *Vitis amurensis* V7 и черенках с одним листом. Уровни экспрессии *VaCml* были определены с помощью количественной ОТ-ПЦР. Цветовая шкала отражает увеличение (зеленый) и уменьшение (красный) 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 *p*-кумаровой кислоты; CA 0.5 – с 500 мкМ *para*-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. Анализ иерархической кластеризации с использованием метода полной кластеризации связей в Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>), с кластеризацией как методов обработки, так и значений.

Ранее были описаны восемь генов *CBL* на основе хорошо известного генома культивируемой виноградной лозы *V. vinifera* (Xi et al. 2017). Однако в геномном 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 16).

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 16 а,б). Уровни транскриптов *VaCBL5*, *VaCBL10a-3* и *VaCBL13-1* также значительно повышались при обеих дозах SA (*VaCBL10a-3*) и MeJA (*VaCBL5*, *VaCBL10a-3*, *VaCBL13-1*), но это повышение было обнаружено только в клеточных культурах (Рисунок 16 а). Уровни других вариантов транскрипта *VaCBL* существенно не изменились после обработки культур клеток виноградной лианы *V. amurensis* SA, MeJA, SA и UV-C (Рисунок 16). В отличие от клеточных культур, обработка черенков виноградной лианы *V. amurensis* привела к значительному снижению уровней большинства транскриптов *VaCBL* (Рисунок 16 б). Кроме того, экспрессия транскриптов *VaCBL10a-1*, *10b* и *13-3* увеличилась в некоторых отдельных пробах (Рисунок 16).

Возможно, что *VaCBL4-1* участвует в биосинтезе стильбенов в виноградной лозе в качестве положительного регулятора реакции на ультрафиолетовое облучение. Транскрипты *VaCBL10a-1*, *10b* и *13-3*, *VaCBL5*, *VaCBL10a-3* и *VaCBL13-1* также могут оказывать небольшое положительное влияние на биосинтез стильбенов, поскольку их экспрессия увеличивалась только при одной дозе используемых индукторов (Рисунок 16).

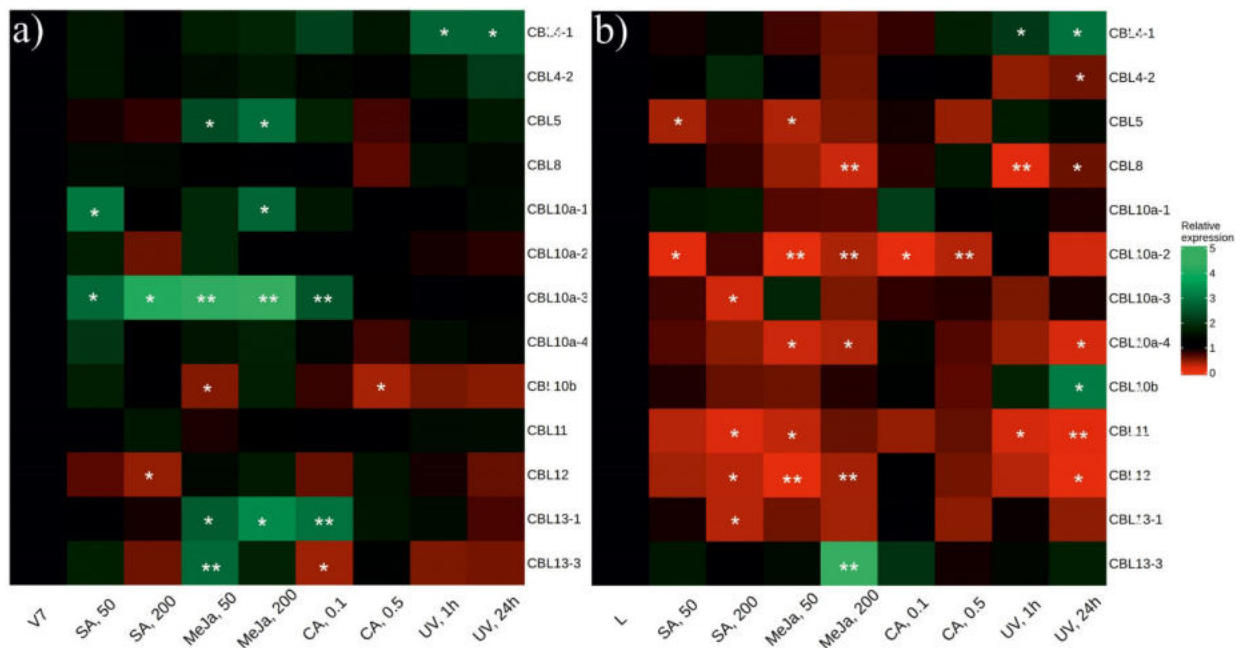


Рисунок 16 – Тепловая карта уровней экспрессии *VaCBL* у винограда *Vitis amurensis* после обработки салициловой кислотой (SA), метилжасмонатом (MeJA), *para*-кумаровой кислотой (CA) и ультрафиолетовым облучением (UV-C). (а) культура калусных клеток *V. amurensis* V7; (б) листья лиан *V. amurensis*. 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 $W_{B/A}$; 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 *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 17). 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

(Kiselev et al. 2023). Таким образом, мы проанализировали уровни 27 разных транскриптов генов *VaCIPK* (Рисунок 17).

Аналогично *VaCBLs*, уровни транскриптов большинства *VaCIPK* значительно снизились после применения SA, MeJA, CA и UV-C (Рисунок 17), что было ожидаемо из-за известного взаимодействия CBL-CIPK. Следовательно, список генов-сенсоров кальция, негативно регулирующих накопление стильбена, 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*, *VaCIPK41-1* и *VaCIPK41-2* (Рисунок 17 а). Следовательно, *VaCIPK31* (повышенный после обработки MeJA), *VaCIPK41-1* (повышенный после MeJA) и *VaCIPK41-2* (повышенный после CA) могут играть роль в активации накопления стильбенов в ответ на MeJA и CA. Кроме того, мы обнаружили активацию уровней транскриптов *VaCIPK29*, *VaCIPK32*, *VaCIPK38*, *VaCIPK41-5* и *VaCIPK41-6* после применения только одной дозы препаратов SA, MeJA, UV-C и MeJA в культурах клеток и листьях винограда (Рисунок 17).

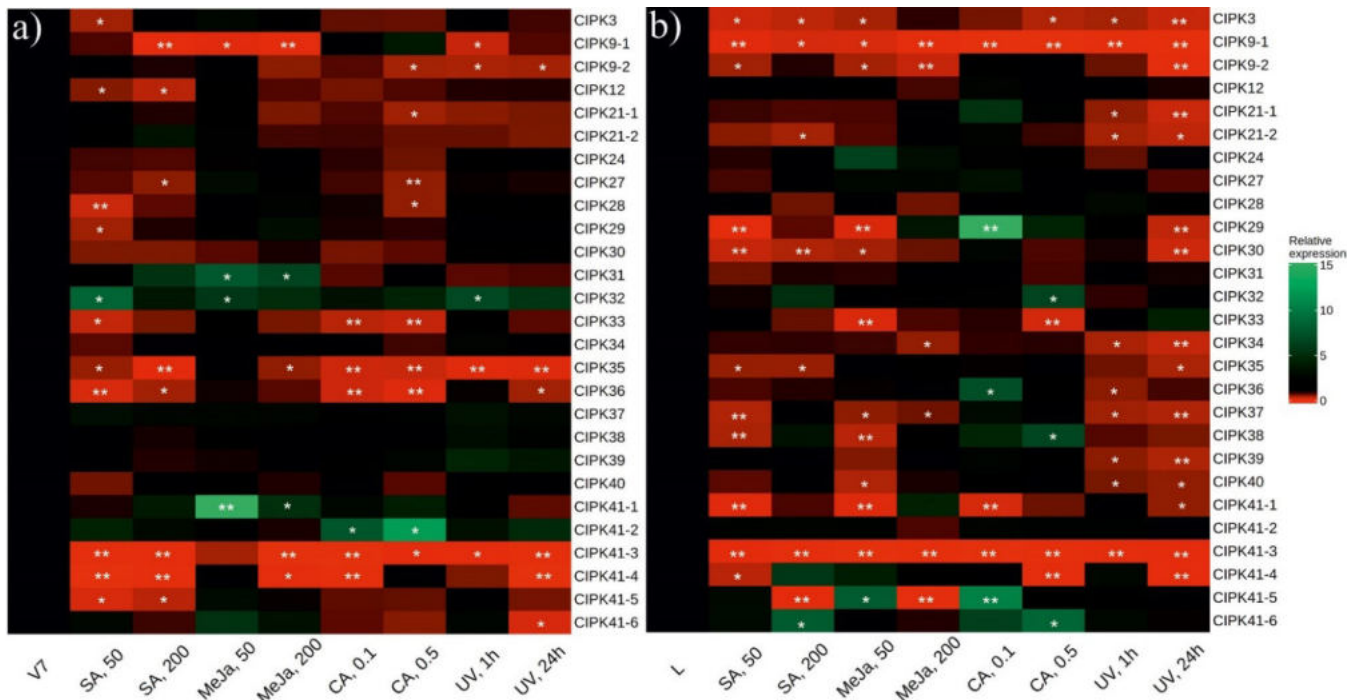


Рисунок 17 – Тепловая карта уровней экспрессии *VaCIPK* у винограда *Vitis amurens* после добавления салициловой кислоты (SA), метилжасмоната (MeJA), *para*-кумаровой кислоты (CA) и обработки

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, SA и UV-C по сравнению с контролем. V7 и L – контрольные необработанные условия (для культур клеток V7 35 дней роста в среде $W_{B/A}$; 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; SA 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 *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 стильбенов.

Было показано, что экспрессия гена *VaCCaMK* существенно не изменялась в культурах клеток винограда при добавлении в питательные среды SA, MeJA, SA и после обработки UV-C (Рисунок 18). 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.

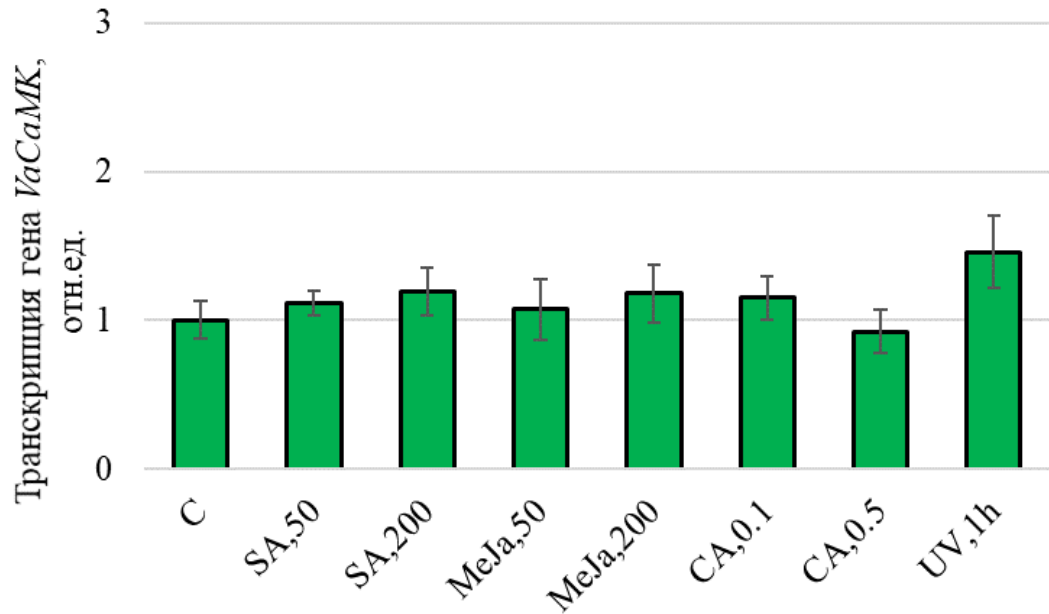


Рисунок 18 – Экспрессия гена *VaCCaMK* в культурах клеток винограда *Vitis amurensis* при добавлении в питательные среды индукторов биосинтеза стильбенов. С – контрольные условия (35 дней роста в среде WB/A); SA 50 – среды с добавлением 50 мкМ салициловой кислоты; SA 200 – 200 мкМ салициловой кислоты; MeJA 50 - 50 мкМ метилжасмонатной кислоты; MeJA 200 – 200 мкМ метилжасмоновой кислоты; CA 100 – 100 мкМ р-кумаровой кислоты; CA 500 – 500 мкМ р-кумаровой кислоты; UV 1 h – 1 ч ультрафиолетового облучения С; UV 24 h – 24 ч ультрафиолетового облучения С.

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

Эксперименты по влиянию ингибиторов/активаторов кальциевых каналов, экспрессии кальциевых сенсоров, а также ингибиторов фосфотаз и киназ, на продукцию *m*-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 *CPK* 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 16).

Установлено, что сверхэкспрессия нескольких разных генов *CDPK* (*VaCPK1*, 16, 20, 26, 29 и *VaCPK32*) увеличивала биосинтез *m*-резвератрола и других стильбенов, но самым ярким положительным влиянием на содержание *m*-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 16). 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 *m*-резвератрола и сверхэкспрессия генов *VaCPK1*, 16, 26, 29 и *VaCPK32*, но всего до 0.57 мг/г сухой биомассы (Таблица 16), что намного меньше, чем сверхэкспрессия генов *rol* или *VaCPK20*. Сверхэкспрессия *VaCPK3a*, 9, 13, 21, 25 и *VaCPK30* либо достоверно увеличивала содержание *m*-резвератрола, но не во всех

независимо полученных линиях, либо это увеличение было статистически недостоверно (Таблица 16).

Таблица 16 – 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 ($p < 0.05$).

Воздействие	Общее содержание стильбенов	Содержание <i>m</i> -резвератрола	Ссылки
Контрольная культура клеток VV/KA-0	0.4 ± 0.2 ^c	0.04 ± 0.02 ^f	Kiselev et al. 2013; Aleynova et al. 2016; Kiselev et al. 2021
Сверхэкспрессия <i>VaCPK3a</i>	н.и.	0.05 ± 0.02 ^f	Kiselev et al. 2013
KA19-II, слабая экспрессия <i>VaCPK1</i>	0.5 ± 0.2 ^c	0.29 ± 0.10 ^{de}	Aleynova et al. 2015
KA19-I, сильная экспрессия <i>VaCPK1</i>	0.5 ± 0.2 ^c	0.30 ± 0.11 ^{de}	Aleynova et al. 2015
KA08-IV, слабая экспрессия <i>VaCPK9</i>	н.и.	0.09 ± 0.01 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
KA08-I, сильная экспрессия <i>VaCPK9</i>	н.и.	0.29 ± 0.16 ^{de}	Aleynova et al. 2015
KA15-IV, слабая экспрессия <i>VaCPK13</i>	н.и.	0.12 ± 0.03 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
KA15-II, сильная экспрессия <i>VaCPK13</i>	н.и.	0.10 ± 0.02 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
KA23-II, сверхэкспрессия <i>VaCPK16</i>	1.2 ± 0.1 ^a	0.37 ± 0.12 ^{cd}	Дубровина и др. 2018
KA23-III, сверхэкспрессия <i>VaCPK16</i>	1.0 ± 0.2 ^{ab}	0.20 ± 0.08 ^{de}	Дубровина и др. 2018
KA-09-II, слабая экспрессия <i>VaCPK20</i>	н.и.	0.61 ± 0.21 ^b	Aleynova-Shumakova et al. 2014;
KA-09-I, сильная экспрессия <i>VaCPK20</i>	н.и.	4.21 ± 0.86 ^a	Aleynova-Shumakova et al. 2014;
KA07-I, слабая экспрессия <i>VaCPK21</i>	н.и.	0.08 ± 0.02 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
KA07-III, сильная экспрессия <i>VaCPK21</i>	н.и.	0.07 ± 0.02 ^{ef}	Aleynova et al. 2015
KA22-I, слабая экспрессия <i>VaCPK25</i>	1.0 ± 0.4 ^{ab}	0.13 ± 0.04 ^{ef}	Дубровина и др. 2018
KA22-IV, сильная экспрессия <i>VaCPK25</i>	1.2 ± 0.3 ^a	0.41 ± 0.11 ^{cd}	Дубровина и др. 2018
KA18-I, слабая экспрессия <i>VaCPK26</i>	0.5 ± 0.2 ^c	0.24 ± 0.11 ^{de}	Aleynova et al. 2015
KA18-II, сильная экспрессия <i>VaCPK26</i>	1.0 ± 0.2 ^{ab}	0.57 ± 0.17 ^{bc}	Aleynova et al. 2015
KA10-II, слабая экспрессия <i>VaCPK29</i>	н.и.	0.19 ± 0.04 ^{de}	Aleynova et al. 2015
KA10-III, сильная экспрессия <i>VaCPK29</i>	н.и.	0.17 ± 0.03 ^{de}	Aleynova et al. 2015
KA21-I, слабая экспрессия <i>VaCPK30</i>	0.5 ± 0.1 ^c	0.11 ± 0.02 ^{ef}	Дубровина и др. 2018
KA21-IV, сильная	0.7 ± 0.1 ^{bc}	0.14 ± 0.05 ^{ef}	Дубровина и др. 2018

экспрессия <i>VaCPK30</i>			
КА20-I, слабая экспрессия <i>VaCPK32</i>	0.7 ±0.2 ^{bc}	0.23 ±0.07 ^{dc}	Дубровина и др. 2018
КА20-III, сильная экспрессия <i>VaCPK32</i>	1.2 ±0.3 ^a	0.21 ±0.08 ^{dc}	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 *m*-резвератрола в нескольких независимо полученных трансгенных линиях, в линии 65-1 с высокой сверхэкспрессией гена *VaCML65* содержание *m*-резвератрола доходило до 18.1 мг/г сухой биомассы (Таблица 17).

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 *m*-резвератрола до 2.3 мг/г сухой биомассы, но это значимое увеличение было характерно только для одной полученной линии из трех (Aleynova et al. 2022; Таблица 17).

Таблица 17 – Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после трансформации генами кальмодулин-подобных белков (Aleynova et al. 2022). 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}

3.1.7. Накопление стильбенов в трансгенных каллусных культурах винограда амурского *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих гены транскрипционных факторов

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 арабидопсис *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; Czemplin 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 (Lee et al. 2001; Vaillancourt et al. 2002).

Первые попытки найти транскрипционные факторы, участвующие в регуляции биосинтеза стильбенов (Höll et al. 2013; 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 (Höll et al. 2013; 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 *m*-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 *m*-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 *m*-резвератрола и его производных в культуре клеток винограда. Было показано, что сильная сверхэкспрессия гена *VaMyb60* достоверно увеличивала содержание *m*-резвератрола до 16.8 мг/г сухой биомассы и общее содержание стильбенов до 18.4 мг/г сухой биомассы (Таблица 18). Достоверно увеличивала содержание *m*-резвератрола и сверхэкспрессия гена *VaMyb40*, но в меньшей степени (до 2.5–3.9 мг/г сухой биомассы) (Таблица 18).

Таблица 18 – Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после трансформации генами транскрипционных факторов *Myb*. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Воздействие	Общее содержание стильбенов, мг/г	Содержание <i>m</i> -резвератрола, мг/г	Ссылки
Контрольная культура клеток КА0	1.1 ±0.3 ^d	0.25 ±0.05 ^e	Kiselev et al. 2013; Aleynova et al. 2016; Kiselev et al. 2021
40-1, слабая экспрессия <i>VaMyb40</i>	5.1 ±1.3 ^{bc}	3.93 ±1.36 ^{cd}	Ananov et al. 2022
40-3, сильная экспрессия <i>VaMyb40</i>	4.9 ±1.1 ^c	2.48 ±1.21 ^d	Ananov et al. 2022
60-1, слабая экспрессия <i>VaMyb60</i>	8.2 ±1.2 ^b	6.41 ±1.53 ^{bc}	Ananov et al. 2022
60-3, сильная экспрессия <i>VaMyb60</i>	18.4 ±2.7 ^a	16.81 ±2.39 ^a	Ananov et al. 2022

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

Известно, что STS являются ключевыми ферментами в биосинтезе *m*-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 *m*-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 *m*-резвератрола VV или КА0 количество мРНК *VaSTS1* было достаточно высоким относительно других форм генов *VaSTS* (Kiselev et al. 2009), а увеличение содержание *m*-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 *m*-резвератрола и общее содержание всех стильбенов (Таблица 19), но только в случае сверхэкспрессии гена *VaSTS7* наблюдаемое увеличение было статистически достоверным во всех полученных линиях (Таблица 19, Aleynova et al. 2016). Содержание *m*-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 КА0 (Таблица 19).

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 оставшееся гены *PjSTS2* и *PjSTS3*.

Более интересные результаты в сравнении с сверхэкспрессией генов *VaSTS1*, 2 и 7 были получены при сверхэкспрессии генов *STS* из ели *P. jezoensis*. Так содержание *m*-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 19). 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 *m*-резвератрола при трансформации отдельными генами *STS* был ниже, чем при сверхэкспрессии используемых ранее регуляторных генов, таких как *СРК*, *СМЛ* 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*.

Таблица 19 – Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в каллусных культурах клеток винограда *Vitis amurensis* после трансформации генами стильбен синтаза винограда *V. amurensis* и ели *Picea jezoensis*. Средние значения, содержащие одинаковые буквы, статистически не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки ($p < 0.05$).

Воздействие	Общее содержание стильбенов	Содержание <i>m</i> -резвератрола	Ссылки
Контрольная культура клеток КА0	0.2 ±0.10 ^d	0.03 ±0.01 ^e	Kiselev et al. 2013; Aleynova et al. 2016; Kiselev et al. 2021
ST1-I, сильная экспрессия <i>VaSTS1</i>	0.24 ±0.11 ^{cd}	0.08 ±0.03 ^{de}	Aleynova et al. 2016
ST1-IV, слабая экспрессия <i>VaSTS1</i>	0.36 ±0.12 ^{cd}	0.15 ±0.04 ^{de}	Aleynova et al. 2016
ST2-I, сильная экспрессия <i>VaSTS2</i>	0.60 ±0.16 ^{bc}	0.21 ±0.05 ^{cd}	Aleynova et al. 2016

ST2-II, слабая экспрессия <i>VaSTS2</i>	0.25 ±0.08cd	0.07 ±0.02 ^e	Aleynova et al. 2016
ST7-I, сильная экспрессия <i>VaSTS7</i>	0.48 ±0.18bc	0.22 ±0.09 ^{cd}	Aleynova et al. 2016
ST7-II, слабая экспрессия <i>VaSTS7</i>	0.42 ±0.17cd	0.21 ±0.09 ^{cd}	Aleynova et al. 2016
zST1-1, слабая экспрессия <i>PjSTS1a</i>	1.14 ±0.71ab	0.79 ±0.56 ^{bc}	Suprun et al. 2020
zST1-3, сильная экспрессия <i>PjSTS1a</i>	0.68 ±0.19bc	0.12 ±0.04 ^{de}	Suprun et al. 2020
zST2-1, слабая экспрессия <i>PjSTS2</i>	0.50 ±0.11bc	0.06 ±0.01 ^e	Suprun et al. 2020
zST2-3, сильная экспрессия <i>PjSTS2</i>	0.55 ±0.21bc	0.10 ±0.03 ^{de}	Suprun et al. 2020
zST3-1, слабая экспрессия <i>PjSTS3</i>	1.01 ±0.40ab	0.53 ±0.15 ^{bc}	Suprun et al. 2020
zST3-2, сильная экспрессия <i>PjSTS3</i>	3.06 ±2.01a	2.44 ±1.35 ^a	Suprun et al. 2020

3.1.9. Накопление стильбенов в трансгенных растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены стильбен синтаз

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 линии *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 19 а, интрон 135 нуклеотидов).

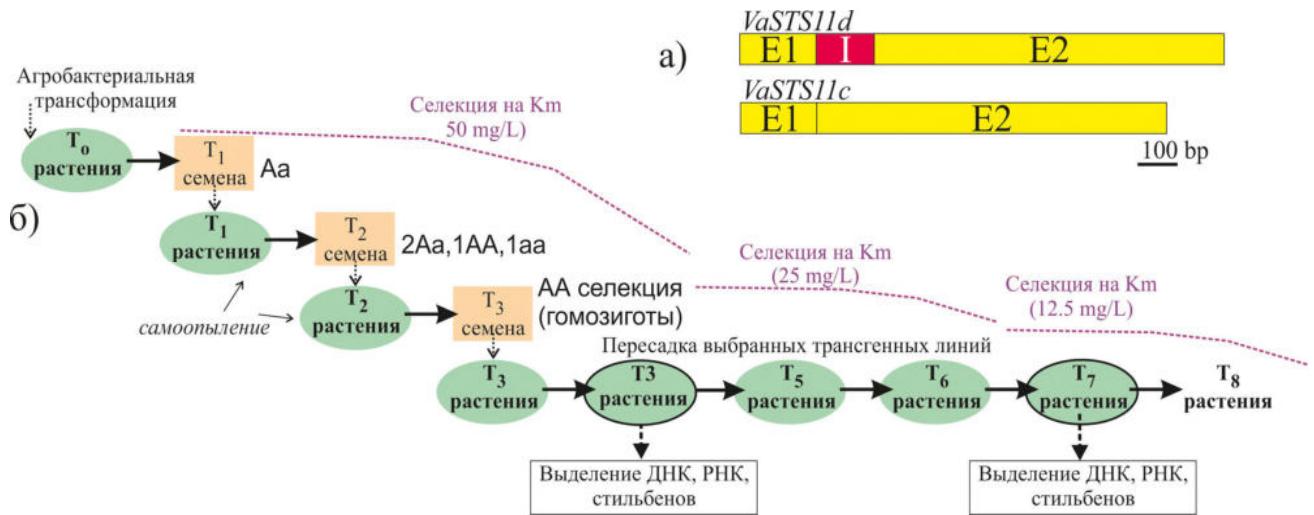


Рисунок 19 – а) Схематическое изображение трансгенов *VaSTS11c* (OQ645979) *VaSTS11d* (OQ645980); E1 – первый экзон, I – интрон, E2 – второй экзон. б) Схематическое изображение процедуры отбора трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*; T₀ – трансформированные растения *A. thaliana*; T₁-T₈ – различные поколения трансгенных растений *A. thaliana*; Km – 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* (Рисунок 20) и *VaSTS11c*, *VaSTS11d* (Рисунок 21).

Было показано, что уровень транскрипции мРНК во всех пробах, выделенных из трансгенных растений, был значительно выше, чем в контрольных растениях КА0 (Рисунок 20, 21), 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 20). Данная разница объясняется тем, что метилирование последовательности белок-кодирующей последовательности трансгена *VaSTS1* во всех 3-х полученных линиях была в 1.9-2.4 раза ниже, чем метилирование последовательности трансгена *VaSTS7* (Рисунок 22; Ogneva et al. 2021a).

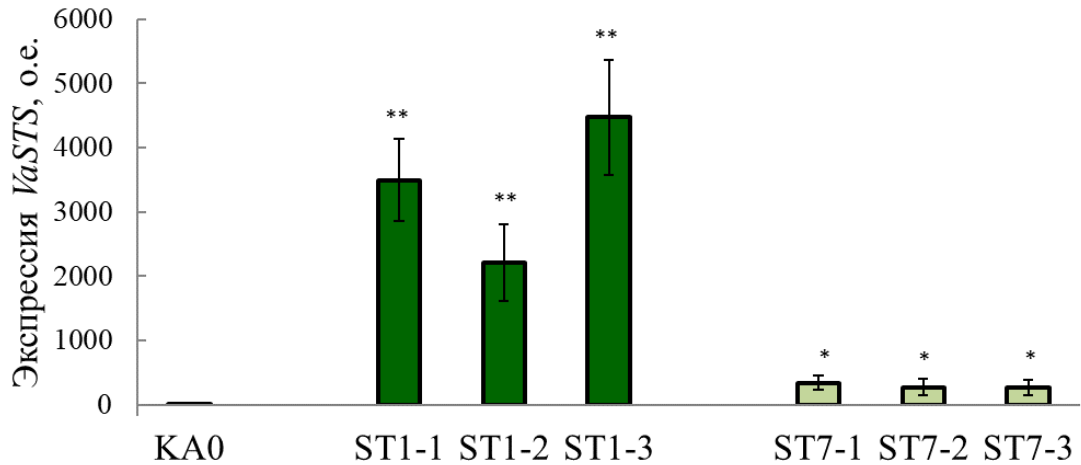


Рисунок 20 – Экспрессия *VaSTS1* (линии ST1-1, 2, 3) и *VaSTS7* (ST7-1, 2, 3) трансгенов в полученных гомозиготных линиях растений *Arabidopsis thaliana*. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями количества мРНК *VaSTS* у растений КА0, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII* (парный *t*-критерий Стьюдента); о.е. – относительные единицы.

Также экспрессия *VaSTS11* трансгенов была достоверно выше, чем в контроле КА0 или диком типе Wt (Рисунок 21). 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*) (Рисунок 21). Интересно отметить, что эта разница в экспрессии уменьшалась при выращивании следующих поколений и к седьмому поколению экспрессия трансгена *VaSTS11* была достоверно выше только в одной линии STS11d-1 (Рисунок 21).

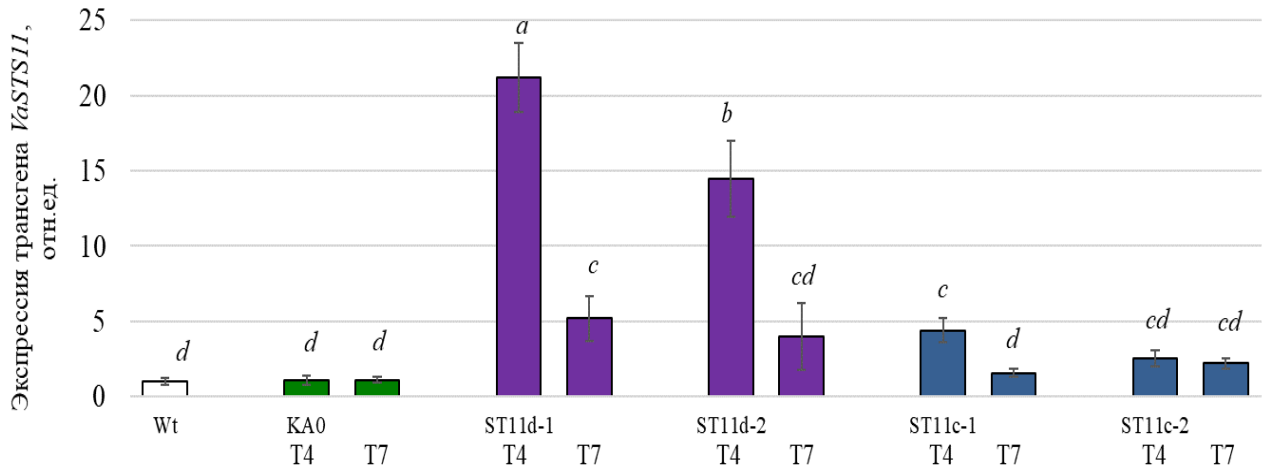


Рисунок 21 – Экспрессия трансгена *VaSTS11d* (линии ST11d-1, 2) и *VaSTS11c* (ST11c-1, 2) трансгенов в полученных гомозиготных линиях растений *Arabidopsis thaliana*. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка. Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались при использовании одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), за которым следовал тест множественного сравнения Тьюки ($p < 0.05$); Wt – дикий тип; о.е. – относительные единицы.

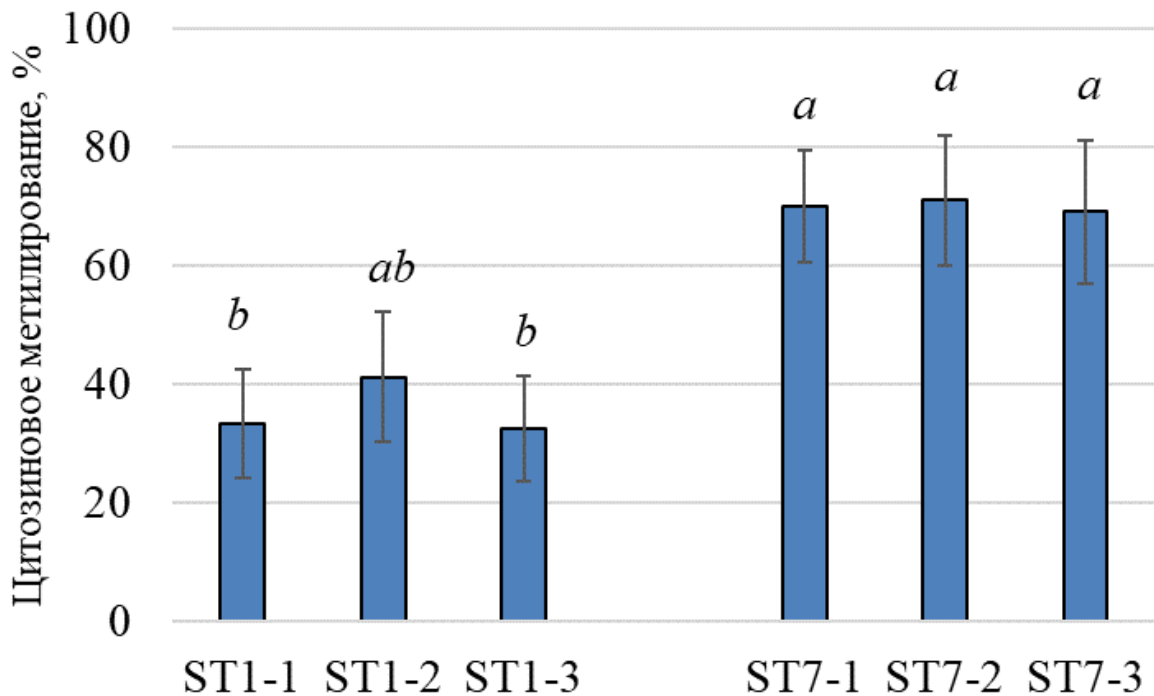


Рисунок 22 – Количественная оценка метилирования генов *VaSTS1* (в линиях ST1-1, ST1-2, ST1-3) и *VaSTS7* (в линиях ST7-1, ST7-2, ST7-3) в трансгенных растениях арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*. ST1-1, ST1-2, ST1-3 – линии растений арабидопсиса, со сверхэкспрессией гена *VaSTS1*; ST7-1, ST7-2, ST7-3 – линии растений арабидопсиса, со сверхэкспрессией гена *VaSTS7*. Данные представлены в виде средних значений \pm SE ($n = 8$). 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 23). 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 23).

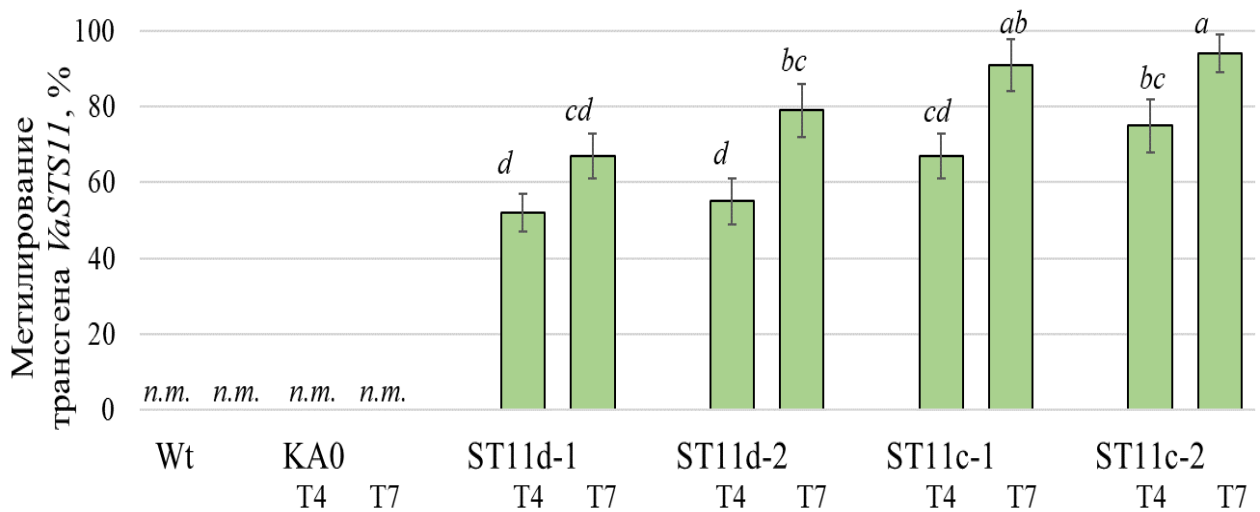


Рисунок 23 – Уровень метилирования цитозина (%) в выбранной части белковых кодирующих областей генов *VaSTS11d* и *VaSTS11c*. Wt – растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа; KA0 - контрольные растения *A. thaliana*, трансформированные вектором, содержащим только селективный маркер *nptII*; ST11d-1, ST11d-2 – растения *A. thaliana*, трансформированные геном *VaSTS11d*; ST11c-1, ST11c-2 – растения *A. thaliana*, трансформированные геном *VaSTS11c*. T4 и T7 – экспрессия *VaSTS11d* и *VaSTS11c* у трансгенных *A. thaliana* поколений T4 и T7; n.m. – не измерялась. Данные представлены в виде среднего значения \pm SE (два независимых эксперимента с восемью техническими повторениями). Средние значения, за которыми следует одна и та же буква, не отличались при использовании *t*-критерия Стьюдента. Статистически значимым считалось значение $p < 0.05$.

При помощи метода ВЭЖХ, нами было показано, что контрольная линия растений *A. thaliana* КА0, не содержит стильбенов (Рисунок 24 а, Таблица 20), в то время как *VaSTS1*-трансгенные растения *A. thaliana*, продуцировали два стильбена: *m*-пицеид и *m*-резвератрол (Рисунок 24 б, Таблица 20).

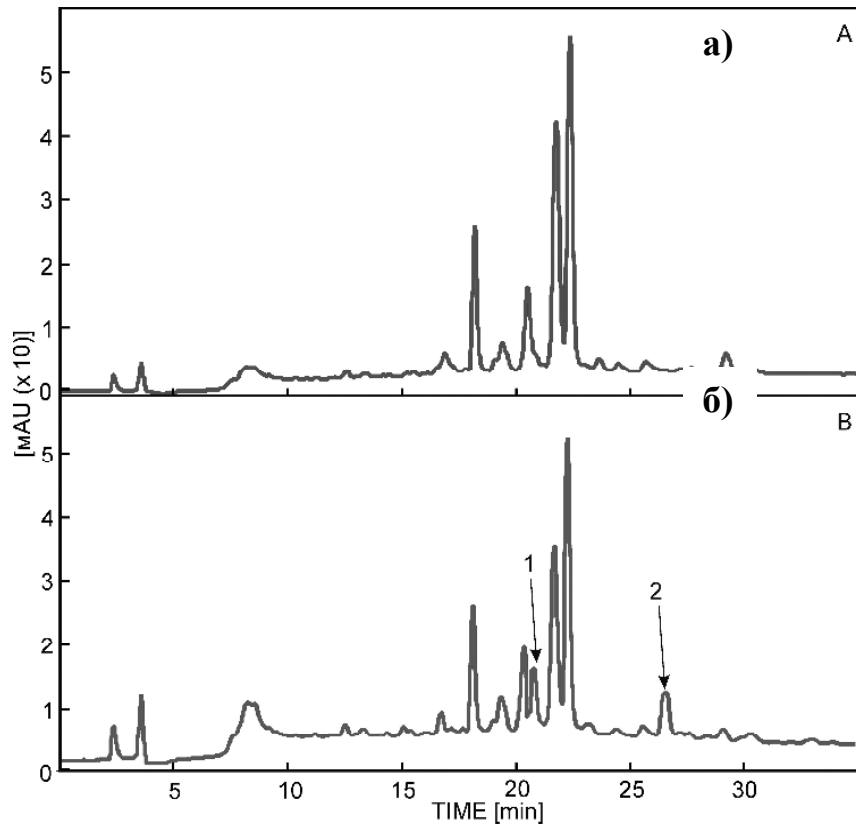


Рисунок 24 – Хроматограмма ВЭЖХ – УФ (310 нм) для экстрактов трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*. (а) КА0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; (б) ST1-3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; *m*-пицеид (1) и *m*-резвератрол (2).

Растения, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7*, продуцировали в основном только *m*-резвератрол (Таблица 20). Наибольшее содержание *m*-пицеида и *m*-резвератрола было обнаружено в растениях *A. thaliana*, которые сверхэкспрессировали ген *VaSTS1*: 8.3–22.7 мкг/г свежей массы (Таблица 20). 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 (Таблица 20). Важно отметить, что из всех стильбенов для трансгенных линий растений ST7 был обнаружен только *m*-резвератрол: 0.02–0.08 мкг/г свежей массы (Таблица 20) 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 *m*-пицеид (Таблица 20) и только одна линия растений, сверхэкспрессирующая трансген *VaSTS11d*, по содержанию стильбенов (линия ST11d-1, 17.9 мкг/г всех стильбенов свежей массы, Таблица 20) приближалась к максимальным значениям, полученным при сверхэкспрессии трансгена *VaSTS1* (линия STS1-3, 22.7 мкг/г всех стильбенов свежей массы, Таблица 20).

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* (Таблица 20). 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 (Таблица 20), по сравнению с тем же геном *VaSTS11c*, но содержащим только белок-кодирующую последовательность (до 7.8 мкг/г всех стильбенов 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 20, Kiselev et al. 2023). Интересно отметить, что это коррелировало

с увеличением метилирования белок кодирующей последовательности трансгенов *VaSTS11* (Рисунок 23, Kiselev et al. 2023). Метилирование последовательности трансгена *VaSTS11c* была достоверно выше, чем у трансгена *VaSTS11d* (Рисунок 23, Kiselev et al. 2023).

Таблица 20 – 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* (Ogneva et al. 2021; Kiselev et al. 2023).

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

Примечание. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (парный *t*-критерий Стьюдента) по сравнению со значениями содержания *m*-пицеида или *m*-резвератрола в 8-

недельных растениях *A. thaliana*, трансформированных пустым вектором КА0.

3.1.10. Устойчивость к абиотическим стрессам *VaSTS1*- и *VaSTS7*-трансгенных растений *A. thaliana*

Ранее было показано, что *STS*-трансгенные растения более устойчивы к разным растительным патогенам (Hain et al. 1990; Coutos-Thévenot et al. 2001; Giorcelli et al. 2004; Schwekendiek et al. 2007; 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 25 а, в, г, Рисунок 26). 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 25 б).

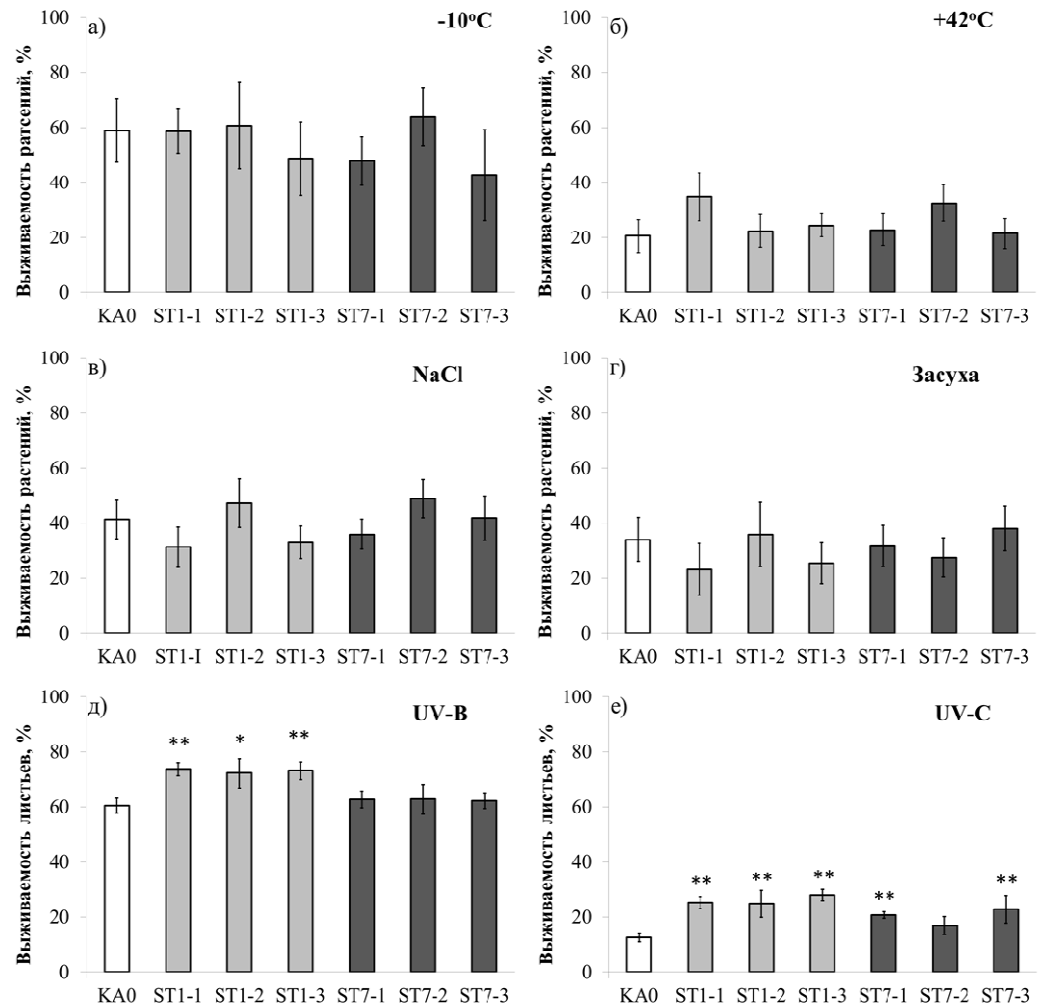


Рисунок 25 – Выживаемость растений (а, г) и листьев (д, е) после стрессов: холода (а), тепла (б), засоления (в), засухи (г), ультрафиолетового облучения В (УФ-В, д), и ультрафиолетового облучения С (УФ-С, е). KA0 - трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1, 2 и 3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; ST7-1, 2 и 3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7*. 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 KA0 (парный t -критерий Стьюдента).



Рисунок 26 – Внешний вид растений *Arabidopsis thaliana* при облучении ультрафиолетом В (УФ-В, 312 нм, а) и ультрафиолетом С (УФ-С, 254 нм, б). 4-недельные растения облучали в течение 10 мин на расстоянии 15 см над горшками с максимальной мощностью, как описано ранее (Ogneva et al. 2021). Согласно инструкции производителя, мы использовали 1800 мкВт/см^2 УФ-В и 930 мкВт/см^2 интенсивности УФ-излучения. Выживаемость листьев определяли как количество явно зеленых листьев через неделю после прекращения воздействия стресса.

Наиболее интересный результат был обнаружен при обработке растений УФ: сверхэкспрессия гена *VaSTS1* увеличивала выживаемость зеленых листьев после обработки УФ-В в 1.2–1.3 раза (Рисунок 25 д, Рисунок 26). Это увеличение было статистически значимым для всех *VaSTS1*-трансгенных растений (Рисунок 25 д). Сверхэкспрессия гена *VaSTS7* также увеличивала жизнеспособность листьев, облученных УФ-В, но эта устойчивость не была статистически значимой (Ogneva et al. 2021b; Рисунок 25 д).

Аналогичные результаты были получены при применении УФ-С, однако отрицательное влияние на выживаемость листьев было намного сильнее (Рисунок 25 е, Рисунок 26), несмотря на то что интенсивность УФ-С излучения была почти в 2 раза меньше (1800 мкВт/см^2 УФ-В против 930 мкВт/см^2 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 2.0–2.3 раза по сравнению с растениями КА0 *A. thaliana* (Рисунок 25 е). 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, Ogneva et al. 2021a; Рисунок 25 е).

3.1.11. 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 27 а,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 27 а, б). Однако размер розетки обработанных растений в возрасте 2 месяцев существенно не отличался от размера розетки контрольных растений, обработанных водой (Рисунок 27 с), 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, поэтому сдерживающее действие обработки стильбенов было характерно только для проростков *A. thaliana*.

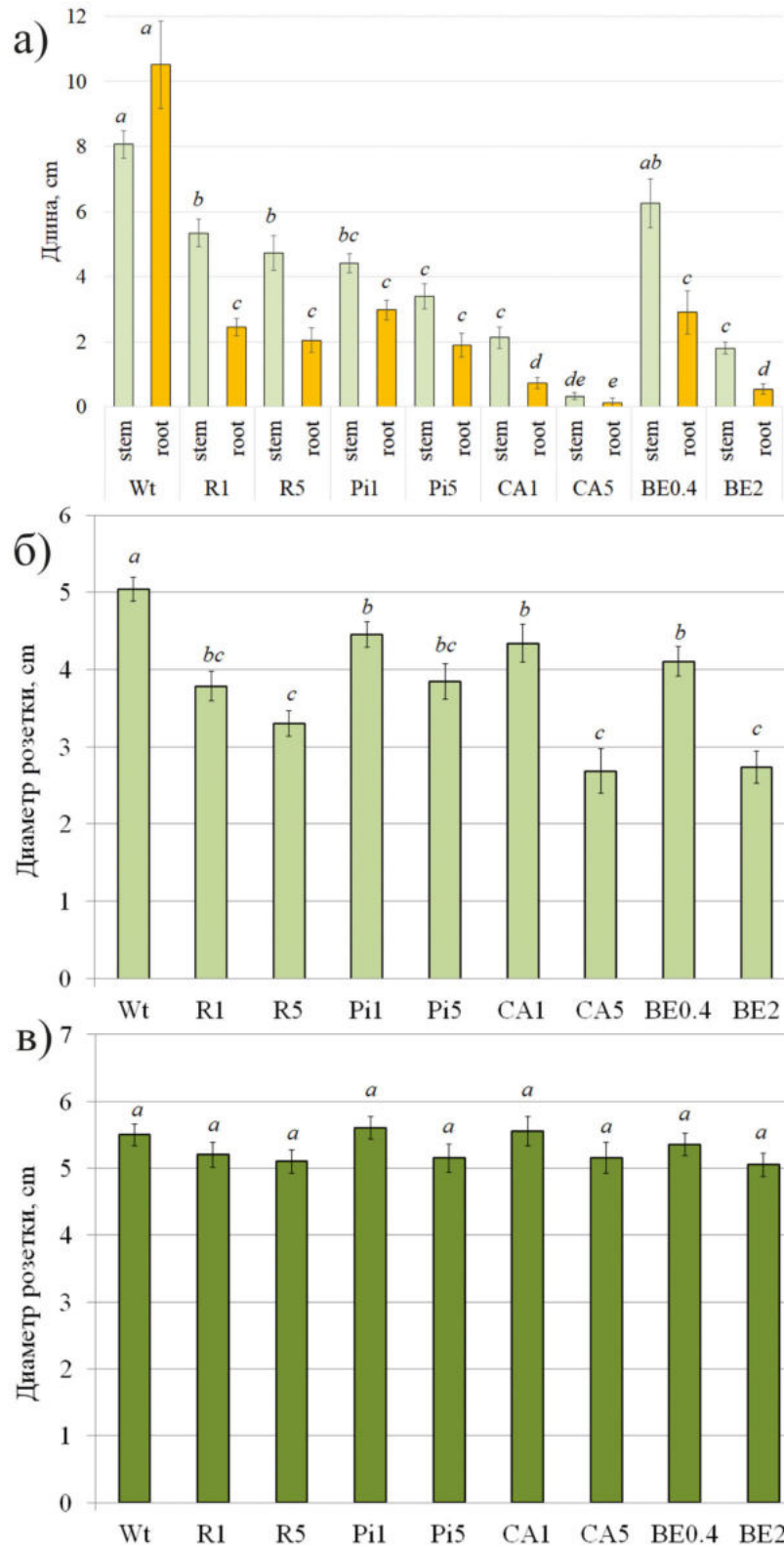


Рисунок 27 – Длина стебля (stem) и корня (root) 7-дневных проростков *Arabidopsis thaliana* (а), выращенного на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS с добавлением стильбеновых соединений (*m*-резвератрол, *m*-пицеид), *пара*-кумаровой кислоты, или этанолового экстракта коры ели *Picea jezoensis*. Затем 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 *m*-резвератрола

соответственно; Pi1 и Pi5 – добавление 1- и 5-мм *m*-пицеида соответственно; CA1 и CA5 – добавление 1- и 5-мм *para*-кумаровой кислоты соответственно; BE1 и BE5 – добавление экстракта еловой коры 0.4 и 2 г/л соответственно. Данные представлены в виде среднего значения \pm SE (два независимых эксперимента с двадцатью техническими повторениями). 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 ($p < 0.05$).

3.1.12. 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: *para*-кумаровой кислотой (CA) (Рисунок 28 в) и *транс*-коричной кислотой (CiA) (Рисунок 28 г). В качестве положительного контроля растения обрабатывали октокриленом – веществом, которое используется в качестве ингредиента в разнообразных солнцезащитных продуктах, потому что поглощает ультрафиолетовые лучи.

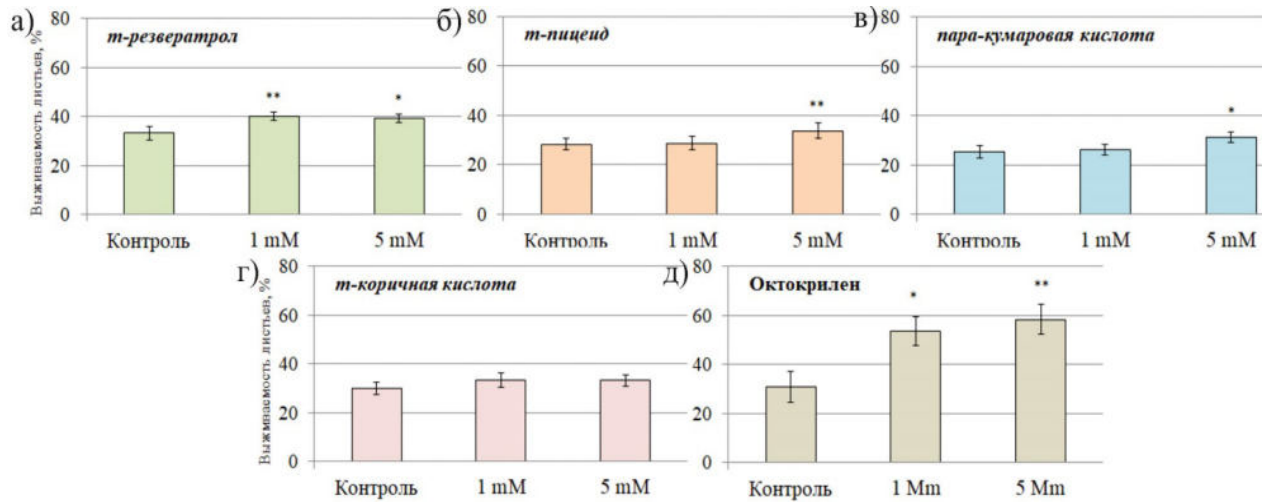


Рисунок 28 – Выживаемость листьев растений *Arabidopsis thaliana* после ультрафиолетового облучения С (УФ-С), обработанных *m*-резвератролом (а), *m*-пицеидом (б), *para*-кумаровой кислотой (в), *транс*-коричной кислотой (г) и октокриленом (д) в концентрации 1 мМ и 5 мМ, в качестве контроля растения 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 *m*-резвератрол, оказывали достоверное защитное действие от УФ-С облучения во всех используемых дозах (1 и 5 мМ; Рисунок 28 а). Количество живых зеленых листьев было на 5.4–6.3% больше при обработке *m*-резвератролом, чем в листьях, обработанных просто водой. Но в тоже время защитное действие *m*-резвератрола было в 2–3 раза меньше, чем у октокрилена – вещества, которое поглощает ультрафиолетовое излучение (Рисунок 28 д).

Предшественники фенольных соединений (СА и СiА) и другие стильбены (*m*-пицеид) намного слабее защищают от УФ облучения: СА и *m*-пицеид оказывают небольшое достоверное положительное действие только при высоких концентрациях (5 мМ) (Рисунок 28 в, г). Таким образом, впервые с помощью прямого нанесения стильбенов (*m*-резвератрола) на листья растений показано их защитное действие против УФ (Ogneva et al. 2021b).

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. Конкретные условия абиотических стрессов на растениях *A. thaliana* ранее были установлены в предыдущем исследовании, проведенном Дубровиной и др. в 2015 году (Dubrovina et al. 2015).

В нашем эксперименте мы подвергли растения месячного возраста обработке стильбенами и СА в течение 12 ч при температуре 22°C в течение ночи. После обработки растений растворами стильбенов и СА, мы наблюдали снижение выживаемости растений после воздействия холода (Рисунок 29 а). Практически все используемые растворы приводили к снижению выживаемости растений, в большинстве случаев это снижение не было статистически значимым. Однако при обработке 5 мМ раствором *m*-пицеида выживаемость растений снизилась в 2.5 раза или на 60.6% (Рисунок 29 а).

Результаты показали, что, хотя большинство обработок существенно не снижали выживаемость растений, нанесение 5 мМ раствора *m*-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 стильбенами 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 29 б). 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) *m*-резвератрола и экстракта ели оказала положительное влияние на выживаемость растений (Рисунок 29 в). 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 29 г).

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.

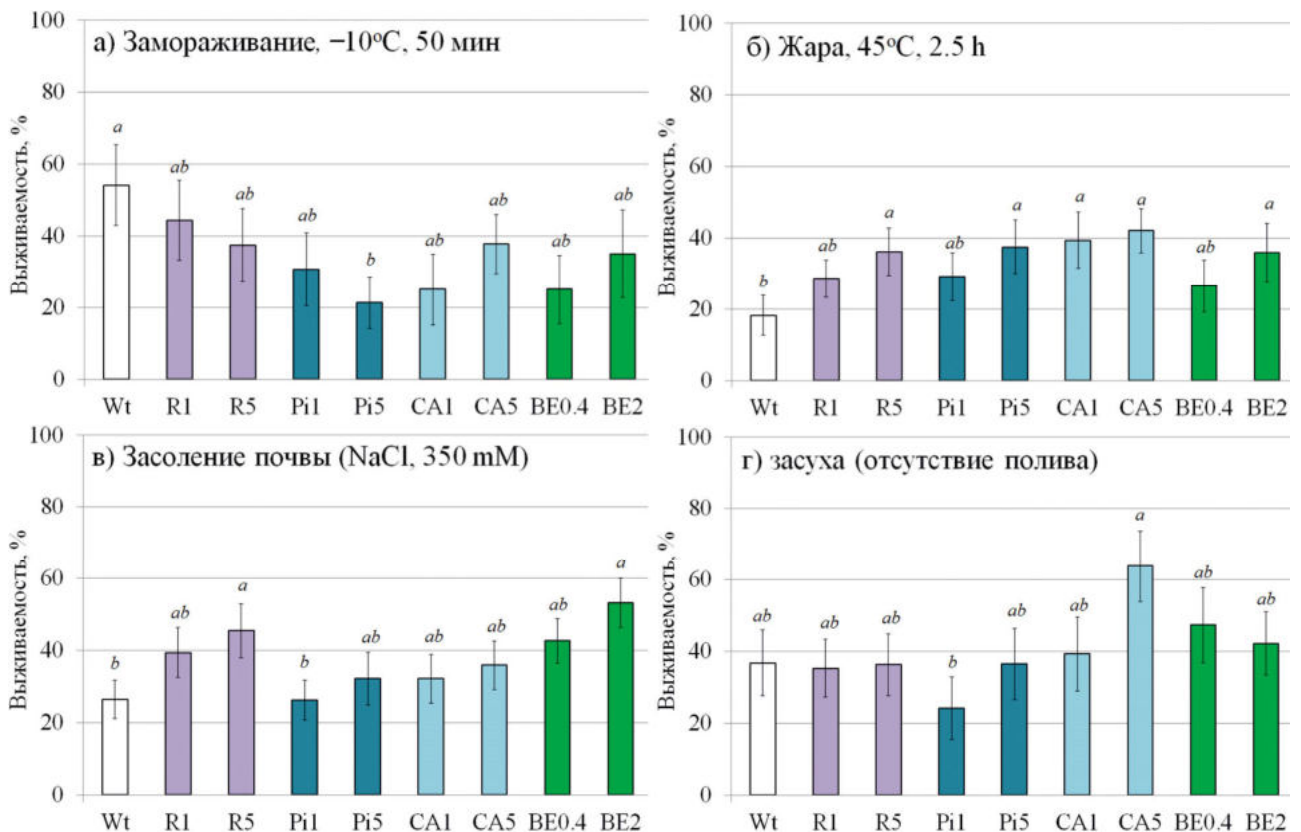


Рисунок 29 – Реакция растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа на замораживание (а), жару (б), засоление почвы (в) и засуху (г), обработанных водой (Wt), водными растворами, содержащими 1 и 5 мМ *m*-резвератрола (R1 и R5 соответственно), 1 и 5 мМ *m*-пицеида (Pi1 и Pi5 соответственно), 1 и 5 мМ *para*-кумаровой кислоты (CA1 и CA5 соответственно), 0.4 и 2 г/л

экстракта коры ели (BE0.4 и BE2 соответственно). Данные представлены в виде среднего значения \pm SE (пять независимых экспериментов с двадцатью техническими повторами в каждом эксперименте). 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 ($p < 0.05$).

3.1.13. Экспрессия генов метаболизма фитогормонов и защитных генов арабидопсиса при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами

Сначала мы изучили влияние различных растворов стильбена 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*) (Lehmann et al. 2017; Sato et al. 2022), 4 гена метаболизма цитокининов (*AtCYP735A2*, *AtUGT76C2*, *AtCKX4* и *AtCKX5*) (Takei et al. 2004; Bartrina et al. 2011; Wang et al. 2011), 2 гена метаболизма гиббереллинов (*AtGA3ox2* и *AtGA2ox2*) (Curaba et al. 2004; Plackett et al. 2012), 4 гена метаболизма абсцизовой кислоты (*AtNCED3*, *AtABA1*, *AtABA2* и *AtABA3*) (Milborrow 2001; Barrero et al. 2006; Behnam et al. 2013) и 2 гена метаболизма этилена (*AtEIN2* и *AtEIN3*) (Binder et 2004; 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 30). Однако экспрессия генов, связанных с метаболизмом цитокининов и этилена, не претерпела существенных изменений (Рисунок 30).

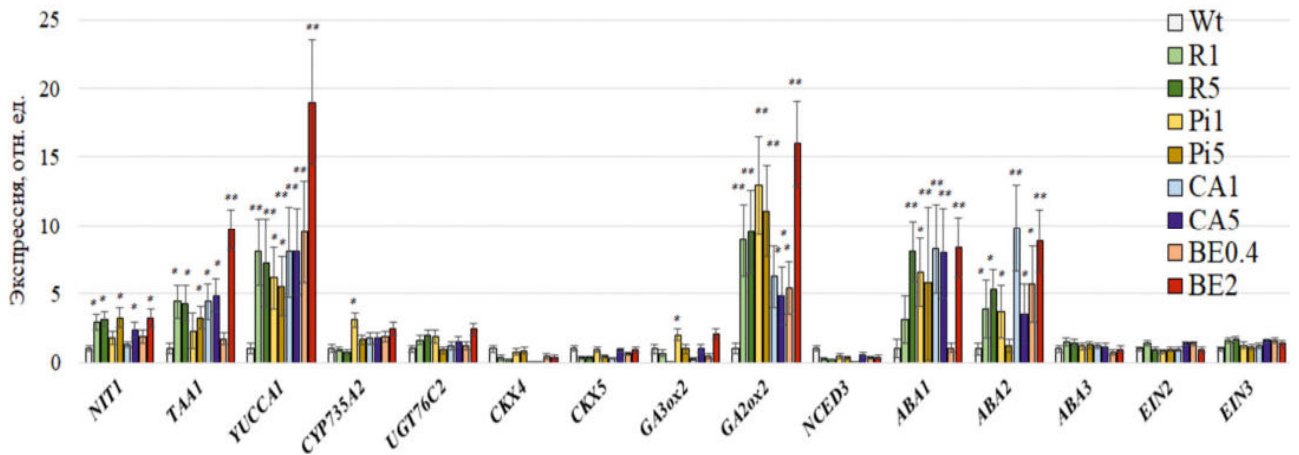


Рисунок 30 – Уровень количества транскриптов генов метаболизма фитогормонов *AtNIT1*, *AtTAA1*, *AtYUCCA1*, *AtCYP735A2*, *AtUGT76C2*, *AtCKX4*, *5*, *AtGA3ox2*, *AtGA2ox2*, *AtNCED3*, *AtABA1*, *2*, *3*, *AtEIN2*, *3* у проростков *Arabidopsis thaliana*, обработанных стильбенами или *para*-кумаровой кислотой. Wt – проростки *A. thaliana* дикого типа; R1 и R5 – проростки *A. thaliana*, выращенные на питательной среде ½ MS с добавлением *m*-резвератрола 1 и 5 мМ соответственно; Pi1 и Pi5 – добавление *m*-пицеида 1 и 5 мМ соответственно; CA1 и CA5 – добавление из *para*-кумаровой кислоты 1 и 5 мМ соответственно; BE1 и BE5 – добавление экстракта еловой коры 0.4 и 2 г/л соответственно. 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 31), кодирующих факторы транскрипции (*AtABI3*, *4*, *5*, *AtCBF1*, *AtDREB1A*, *2A*, *RD26*) (Brocard-Gifford et al. 2004; Heidari et al. 2019; Mizoi et al. 2019; Fujita et al. 2004), протеинфосфатазы (*AtABI1*, *2*) (Brocard-Gifford et al. 2004),

абсцисс-связывающий фактор (*AtABF*) (Wang et al. 2016), дегидрины (*AtCOR15, 17, AtRab18, AtLEA*) (Thomashow, 1998; Mowla et al. 2006; 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*) (Liu et al. 2010; 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*) (Msanne et al. 2012; 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. Как правило, экспрессия *AtRbcL* у здоровых растений стабильно высока и может влиять на общее развитие растений.

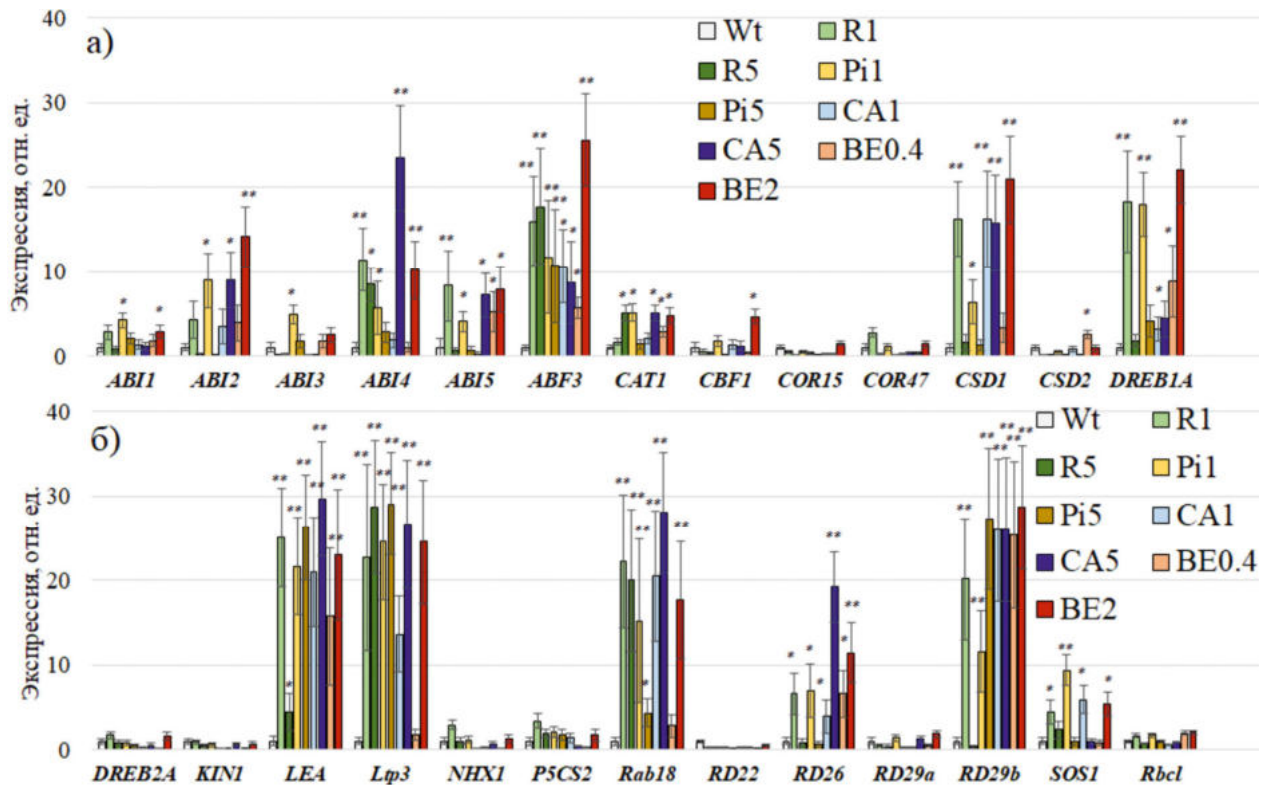


Рисунок 31 – Уровень количества транскриптов стресс-чувствительных генов *AtABI1*, 2, 3, 4, 5, *AtABF3*, *AtCAT1*, *AtCBF1*, *AtCOR15*, 47, *AtCSD1*, 2, *AtDREB1A*, 2A, *AtKIN1*, *AtLEA*, *AtLtp3*, *AtNHX1*, *AtP5CS2*, *AtRab18*, *AtRD22*, 26, 29a, 29b, *AtSOS1* и *AtRbcl* в проростках *Arabidopsis thaliana*, обработанных стильбенами или *napa*-кумаровой кислотой. Wt – проростки *A. thaliana* дикого типа; R1 и R5 – проростки *A. thaliana*, выращенные на питательной среде ½ MS с добавлением *m*-резвератрола 1 и 5 мМ соответственно; Pi1 и Pi5 – добавление *m*-пицеида 1 и 5 мМ соответственно; CA1 и CA5 – добавление *napa*-кумаровой кислоты 1 и 5 мМ соответственно; BE1 и BE5 – добавление экстракта еловой коры 0.4 и 2 г/л соответственно. 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.

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 31). 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 31).

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 *m*-изорапонтин (в ели, тетрагидроксилированный стильбен с метоксигруппой), *m*-астрингин (в ели, тетрагидрокси-*транс*-стильбен), *m*-пиностильбенозид (в сосне, гликозилированный дигидроксилированный стильбен с метоксигруппой) и *m*-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 стилибенов (до 32 мг/г сухой массы). Наиболее сильными стимулами для увеличения биосинтеза стилибенов стали ультрафиолетовое облучение и сверхэкспрессия генов *rolB* и некоторых генов *CDPK* (в первую очередь *VaCPK20*). Однако полученный уровень стилибенов 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 стилибенов в клетках растений на молекулярном уровне.

Детали молекулярно-генетического механизма, стимулирующего биосинтез стилибенов растений, были изучены недостаточно. Поэтому в настоящей работе было дополнено общее представление о регуляции биосинтеза стилибенов и описаны основные участники данного процесса. Анализ современной литературы и наших результатов (Таблица 14, 15) показывает, что с биохимической точки зрения биосинтез стилибенов регулируется сигнальными системами растений, в частности кальциевой сигнальной системой, а также стрессовыми фитогормонами (SA, JA, ET, ABA) и продукцией АФК (Рисунок 32).

Наши исследования позволили идентифицировать растительные протеинкиназы (СРК) и факторы транскрипции (например, MYB40 или MYB60) в качестве вероятных важнейших регуляторов биосинтеза стилибенов в растительных клетках (Таблица 16, 17, 18). 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 32).

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 стильбенов. Таким образом, АФК и стрессовые фитогормоны, по-видимому, служат промежуточными звеньями в сигнальном пути для экспрессии генов биосинтеза стильбенов. 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 стильбенов.

СРК, каскад MAPK и гормональная сигнализация могут активировать экспрессию *STS* и других генов, ответственных за биосинтез стильбенов, скорее всего посредством активации транскрипционных факторов. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, фосфорилируются ли транскрипционные факторы, участвующие в регуляции биосинтеза стильбенов, растительными СРК и MAPK. Ранее были идентифицированы некоторые растительные СРК как киназы, фосфорилирующие фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL), важный элемент в биосинтезе фенилпропаноидов, включая стильбены (Cheng et al. 2001; Allwood et al. 2002). Следовательно, возможно, что в растительных клетках существуют более короткие пути активации биосинтеза стильбенов по сравнению с путями, включающими индукцию транскрипции стильбен синтаз (*STS*) с помощью специфических транскрипционных факторов (Рисунок 32).

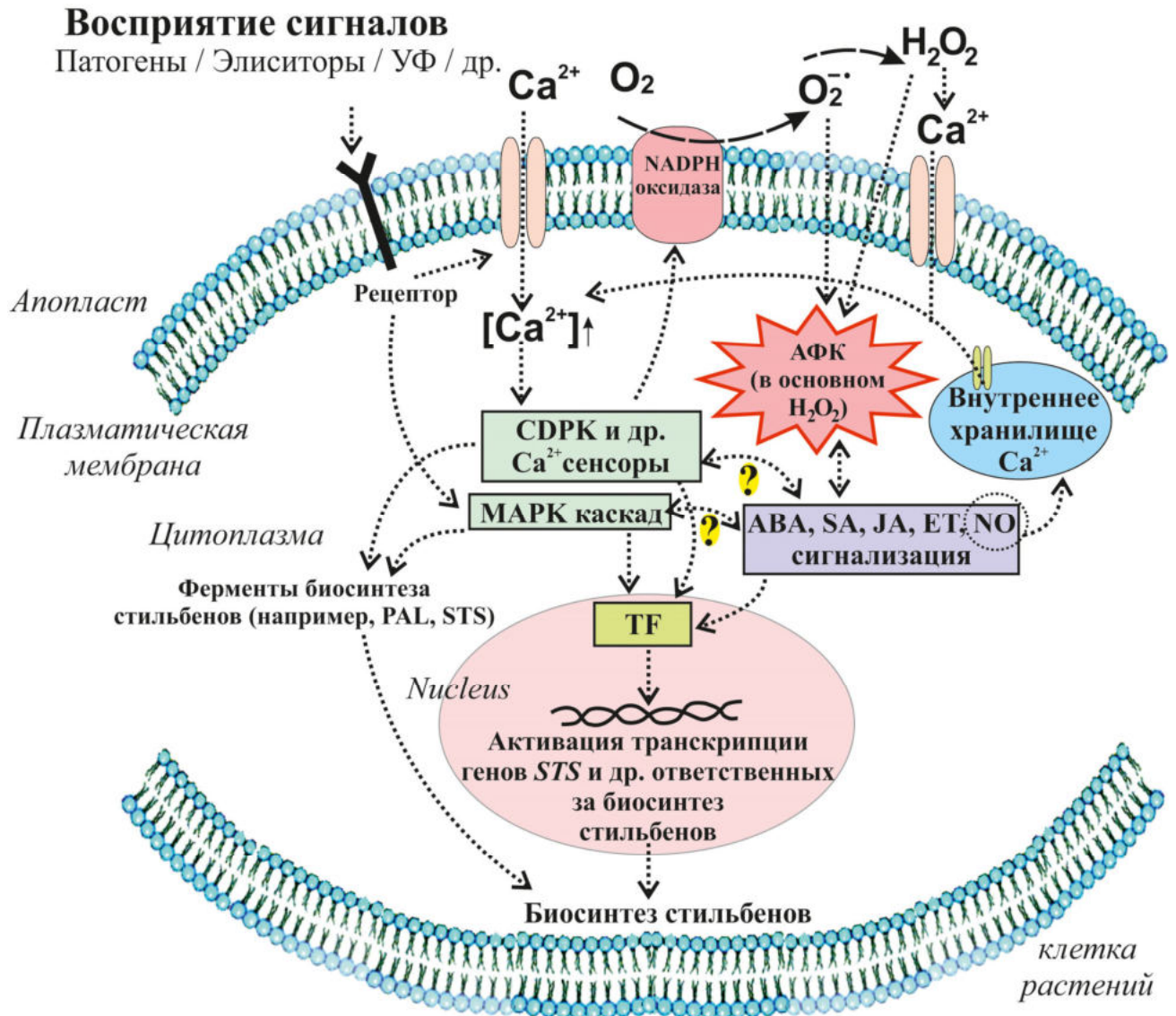


Рисунок 32 – Гипотетическая модель передачи сигнала, приводящая к активации биосинтеза стильбенов в клетках растений. Ультрафиолетовое (УФ) излучение, элиситоры, эфффекторы патогенов и другие сигналы окружающей среды воспринимаются специфическими рецепторами. Распознавание внешнего сигнала приводит к устойчивому притоку Ca²⁺, повышению уровня цитоплазматического кальция ([Ca²⁺]), активации каскадов протеинкиназ и выработке активных форм кислорода (АФК), что способствует передаче сигналов от растительных гормонов и активации ряда транскрипционных факторов (TF) либо генов биосинтеза стильбенов (например, PAL – фенилаланин-аммиак-лиазы). TF активируют транскрипцию генов, ответственных за биосинтез стильбенов. Оксид азота (NO) активирует отток Ca²⁺ из внутренних хранилищ и запускает выработку АФК. CDPK – 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 25, 28, 29). Поэтому в настоящей работе предложено использовать экстракты растений богатых источников (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 (Timperio et al. 2012; 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 33). 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 (Timperio et al. 2012; 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 33), что в итоге так же имеет положительное влияние на выживаемость растений.

Полученные в настоящей работе данные показывают (Рисунок 30, 31), 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 30, 31), т.е. активация происходила не всех исследуемых генов, а если положительно действовал резвератрол, то и остальные стильбены увеличивали экспрессию эти гены. Это говорит о

специфичном действии стильбенов, как бывает в случае связывания с определенными специфическими рецепторами и дальнейшей активацией соответствующих транскрипционных факторов, связанных с этими рецепторами.

Сходное действие используемых стильбенов и *para*-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.

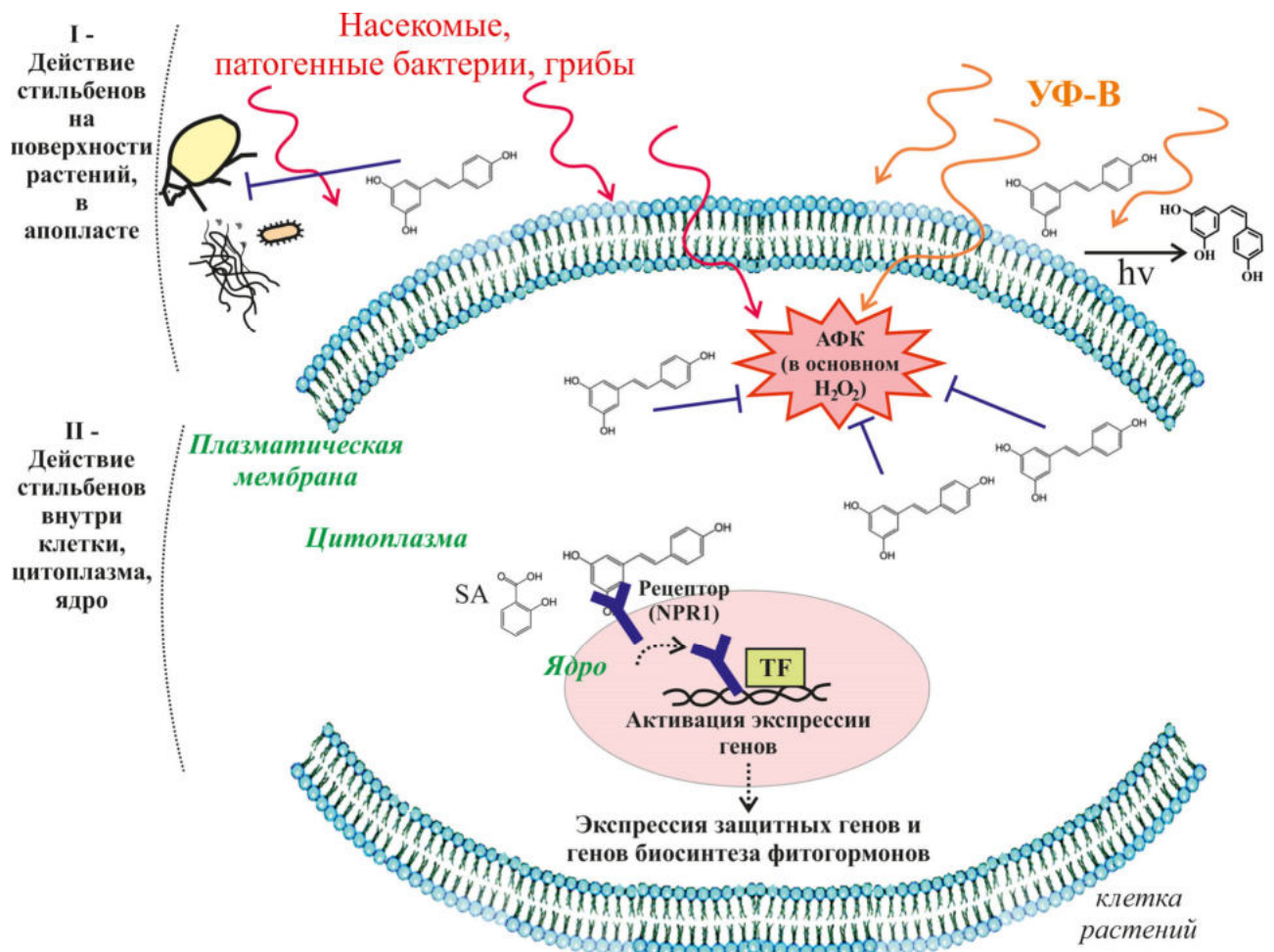


Рисунок 33 – Предположительная модель действия стильбенов в растениях. Стильбены на модели представлены в виде молекул *транс*- и *цис*-резвератрола. АФК – активные формы кислорода; SA – салициловая кислота; УФ-В – ультрафиолет В; TF – факторы транскрипции.

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 30, 31).

Таким образом, в настоящей работе впервые показано, что стильбены (на примере *m*-резвератрола и *m*-пицеида) могут стимулировать экспрессию ряда генов (например, гены метаболизма фитогормонов и стресс-чувствительные гены). Это значит, что стильбены 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Физиология растений / Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко [и др.]. – Москва: Издательский центр "Академия", 2005. – 640 с.
2. Ванюшин Б. Ф. Энзиматическое метилирование ДНК – эпигенетический контроль за генетическими функциями клетки // Биохимия. – 2005. – Т. 71. – С. 598-611.
3. Дубровина А. С. Роль генов кальций-зависимых протеинкиназ *CPK16*, *CPK25*, *CPK30* и *CPK32* в биосинтезе стильбенов и стрессоустойчивости винограда *Vitis amurensis* RUPR. / А. С. Дубровина, О. А. Алейнова, А. Ю. Маняхин, К. В. Киселев // Прикладная биохимия и биотехнология. – 2018. – Т. 54. – С. 391-399.
4. Киселев К. В. Экспрессия генов стильбен синтаз в хвое ели аянской *Picea jezoensis* / К. В. Киселев, З. В. Огнева, А. Р. Супрун, Ю. Н. Журавлев // Генетика. – 2016. – Т. 52. – С. 1279-1286.
5. Киселев К. В. (2017) Экспрессия генов транскрипционных факторов R2R3 MYB в растениях и клеточных культурах *Vitis amurensis* Rupr. с различным содержанием резвератрола / К. В. Киселев, О. А. Алейнова, А. П. Тюнин // Генетика. – 2017. – Т. 53. – С. 460-467.
6. Павлова О. А. *Rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes* / О. А. Павлова, Т. В. Матвеева, Л. А. Лутова // Экологическая генетика. – 2013. – Т. 11. – С. 59-68.
7. Сигнальные системы клеток растений / И. А. Тарчевский – Москва: "Наука", 2002. – 294 с.
8. Тюнин А. П. Влияние повышенной экспрессии транскрипционного фактора *VaMyb1* на биосинтез резвератрола в клетках амурского винограда (*Vitis amurensis*) / А. П. Тюнин, К. В. Киселев // Физиология растений. – 2017. – Т. 64. – С. 47-54.
9. Adachi H. Kinase-mediated orchestration of NADPH oxidase in plant immunity / H. Adachi, H. Yoshioka // Briefings in Functional Genomics. – 2015. – Vol. 14. – P. 253-259.

10. Adrian M. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride (AlCl_3) / M. Adrian, P. Jeandet, R. Bessis, J. M. Joubert // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1996. – Vol. 44. – P. 1979-1981.
11. Adrian M. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation / M. Adrian, P. Jeandet, A. C. Douillet-Breuil, L. Tesson, R. Bessis // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2000. – Vol. 48. – P. 6103-6105.
12. Agarwal M. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance / M. Agarwal, Y. Hao, A. Kapoor [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281. – P. 37636-37645.
13. Aggarwal B. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies / B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R. Aggarwal [et al.] // Anticancer Research. – 2004. – Vol. 24. – P. 2783-2840.
14. Ahn S. Y. Comparison of accumulation of stilbene compounds and stilbene related gene expression in two grape berries irradiated with different light sources / S. Y. Ahn, S.A. Kim, S.J. Choi, H.K. Yun // Horticulture, Environment, and Biotechnology. 2015. – Vol. 56. – P. 36–43.
15. Ahuja I. Phytoalexins in defense against pathogens / I. Ahuja, R. Kissen, A. M. Bones // Trends in Plant Science. – 2012. – Vo. 17. P. 73–90.
16. Aleynova O. A. Regulation of resveratrol production in *Vitis amurensis* cell cultures by calcium-dependent protein kinases / O. A. Aleynova, A.S. Dubrovina, A. Y. Manyakhin [et al.] // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2015. – Vol. 175. – P. 1460–1476.
17. Aleynova O. A. Stilbene accumulation in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. overexpressing *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS7* genes / O. A. Aleynova, V. P. Grigorchuk, A. S. Dubrovina [et al.] // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2016. – Vol. 125. – P. 329-339.

18. Aleynova O. A. Activation of stilbene synthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* by calcium-dependent protein kinases *VaCPK1* and *VaCPK26* / O. A. Aleynova, A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2017. – Vol. 130. – P. 141-152.

19. Aleynova O. A. Effect of calmodulin-like gene (*CML*) overexpression on stilbene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / O. A. Aleynova, A. R. Suprun, A. A. Ananov [et al.] // *Plants-Basel*. – 2022. – Vol. 11. – P. 171.

20. Aleynova-Shumakova O. A. *VaCPK20* gene overexpression significantly increased resveratrol content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / O.A. Aleynova-Shumakova, A.S. Dubrovina, A.Y. Manyakhin [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. P. 5541-5549.

21. Allwood E. G. Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean / E. G. Allwood, D. R. Davies, C. Gerrish, G. P. Bolwell // *Plant Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 49. – P. 533-544.

22. Almagro L. Dissecting the transcriptional response to elicitors in *Vitis vinifera* cells / L. Almagro, P. Carbonell-Bejerano, S. Belchi-Navarro [et al.] // *PLoS One*. 2014. – Vol. 9. – P. e109777.

23. Almagro L. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine / L. Almagro, S. Belchi-Navarro, A. Martinez-Marquez [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2015. – Vol. 97. – P. 361-367.

24. Altschul S.F. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1990. – Vol. 215. – P. 403-410.

25. Ananov A. A. Effect of *VaMyb40* and *VaMyb60* overexpression on stilbene biosynthesis in cell cultures of grapevine *Vitis amurensis* Rupr. / A. A. Ananov, A. R. Suprun, O. A. Aleynova [et al.] // *Plants-Basel*. – 2022. – Vol. 11. – P. 1916.

26. Anderson R. M. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae* / R. M. Anderson, K. J. Bitterman, J. G. Wood [*et al.*] // *Nature*. – 2003. – Vol. 423. – P. 181-185.
27. Arora J. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose / J. Arora, S. Goyal, K. G. Ramawat // *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. – 2010. – Vol. 46. – P. 430-436.
28. Asano T. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the *CDPKs* gene family in rice / T. Asano, N. Tanaka, G. Yang [*et al.*] // *Plant Cell Physiology*. – 2005. – Vol. 46. – P. 356-366.
29. Athar M. Resveratrol: a review of pre-clinical studies for human cancer prevention / M. Athar, J. H. Back, X. Tang [*et al.*] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2007. – Vol. 224. – P. 274-283.
30. Aziz M. H. Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms / M.H. Aziz, R. Kumar, N. Ahmad // *International Journal of Oncology*. – 2003a. – Vol. 23. – P. 17-28.
31. Aziz A. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew / A. Aziz, P. Trotel-Aziz, L. Dhuciq [*et al.*] // *Phytopathology*. – 2006. – Vol. 96. – P. 1188–1194.
32. Austin M. B. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases / M.B. Austin, J. P. Noel // *Natural Product Reports*. – 2003. – Vol. 20: 79–110.
33. Barcelo A. R. Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines / A. R. Barcelo, F. Pomar, M. Lopez-Serrano, M. A. Pedreno // *Functional Plant Biology*. – 2003. – Vol. 30. – P. 577–591.
34. Barrero J. M. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in

response to salt stress / J. M. Barrero, P. L. Rodríguez, V. Quesada [et al.] // Plant, Cell & Environment. – 2006. – Vol. 29. – P. 2000–2008.

35. Bartrina I. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana* / I. Bartrina, E. Otto, M. Strnad [et al.] // Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – P. 69–80.

36. Bavaresco L. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea* / L. Bavaresco, D. Petegolli, E. Cantu [et al.] // Vitis. – 1997. – Vol. 36. – P. 77–83.

37. Becatti E. Postharvest treatments with ethylene on *Vitis vinifera* (cv Sangiovese) grapes affect berry metabolism and wine composition / E. Becatti, G. Genova, A. Ranieri, P. Tonutti // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 159. – P. 257–266.

38. Behnam B. Characterization of the promoter region of an Arabidopsis gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription / Behnam B., Iuchi S., Fujita M. [et al.] // DNA Research. – 2013. – Vol. 20. – P. 315–324.

39. Bekesiova I. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* / I. Bekesiova, J. P. Nap, L. Mlynarova // Plant Molecular Biology Reporter. – 1999. – Vol. 17. – P. 269-277.

40. Belchí-Navarro S. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate / S. Belchí-Navarro, L. Almagro, D. Lijavetzky [et al.] // Plant Cell Reports. – 2012. – Vol. 31. – P. 81-89.

41. Belchí-Navarro S. Induction of trans-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv Monastrell / S. Belchí-Navarro, L. Almagro, A. B. Sabater-Jara [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2013. – Vol. 170. – P. 258-264.

42. Belhadj A. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin

accumulation in grapevine cell cultures / A. Belhadj, N. Telef, C. Saigne [*et al.*] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2008. – Vol. 46. – P. 493-499.

43. Benova B. Analysis of selected stilbenes in *Polygonum cuspidatum* by HPLC coupled with CoulArray detection / B. Benova, M. Adam, K. Onderkova [*et al.*] // *Journal of Separation Science*. – 2008. – Vol. 31. – P. 2404–2409.

44. Berli F. Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis / F. Berli, J. D'Angelo, B. Cavagnaro [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – P. 2892–2898.

45. Bigeard J. Nuclear signaling of plant MAPKs / J. Bigeard, H. Hirt // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 469.

46. Binder B. M. Short-term growth responses to ethylene in *Arabidopsis* seedlings are EIN3/EIL1 independent / B. M. Binder, L. A. Mortimore, A. N. Stepanova [*et al.*] // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 136. – P. 2921–2927.

47. Binder B. M. Ethylene signaling in plants // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – P. 7710–7725.

48. Boue S. M. Postharvest accumulation of resveratrol and piceatannol in sugarcane with enhanced antioxidant activity / S.M. Boue, B.Y. Shih, M.E. Burow [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. Vol. 61. – P. 8412–8419.

49. Brinker A. M. Time course of piceatannol accumulation in resistant and susceptible sugarcane stalks after inoculation with *Colletotrichum falcatum* / A. M. Brinker, D. S. Seigler // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1993. – Vol. 42. – P. 169–176.

50. Brocard-Gifford I. The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth / I. Brocard-Gifford, T. J. Lynch, M. E. Garcia [*et al.*] // *Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16. – P. 406–421.

51. Burn J. E. Genes conferring late flowering in *Arabidopsis thaliana* / J. E. Burn, D. R. Smyth, W. J. Peacock, E. S. Dennis // *Genetica*. – 1993. – Vol. 90. P. 147-155.
52. Cessna S. G. Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent release of Ca^{2+} from internal stores / S.G. Cessna, P.S. Low // *Planta*. – 2001. – Vol. 214. – P. 126-134.
53. Chalal M. Antimicrobial activity of resveratrol analogues / M. Chalal, A. Klinguer, A. Echairi [et al.] // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19. – P. 7679-7688.
54. Che J. X. Transcriptome analysis reveals the genetic basis of the resveratrol biosynthesis pathway in an endophytic fungus (*Alternaria* sp MG1) isolated from *Vitis vinifera* / J. X. Che, J. L. Shi, Z. H. Gao, Y. Zhang // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1257.
55. Chen H. Quality assessment of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) grown on Prince Edward Island as a source of resveratrol / H. Chen, T. Tuck, X. Ji [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61. – P. 6383–6392.
56. Cheng S. H. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts / S. H. Cheng, J. Sheen, C. Gerrish, G. P. Bolwell // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 503. – P. 185–188.
57. Cheng S. H. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family / S. H. Cheng, M. R. Willmann, H. C. Chen, J. Sheen // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 129. – P. 469-485.
58. Cvikrová M. Induced changes in phenolic acids and stilbenes in embryogenic cell cultures of Norway spruce by culture filtrate of *Ascocalyx abietina* / M. Cvikrová, J. Malá, M. Hrubcová [et al.] // *Journal of Plant Diseases and Protection*. – 2008. – Vol. 115. – P. 57-62.

59. Chang X. Jasmonates are induced by the PAMP flg22 but not the cell death-inducing elicitor Harpin in *Vitis rupestris* / X. Chang, M. Seo, Y. Takebayashi [et al.] // Protoplasma. – 2017. – Vol. 254. – P. 271-283.
60. Chang X. The phytoalexin resveratrol regulates the initiation of hypersensitive cell death in Vitis cell / X. Chang, E. Heene, F. Qiao, P. Nick // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. P. e26405.
61. Chiron H. Gene induction of stilbene biosynthesis in Scots pine in response to ozone treatment, wounding, and fungal infection / H. Chiron, A. Drouet, F. Lieutier [et al.] // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 124. – P. 865-872.
62. Chong J. L. Metabolism and roles of stilbenes in plants / J. L. Chong, A. Poutaraud, P. Hugueney // Plant Science. – 2009. – Vo. 177. – P. 143-155.
63. Chung I. M. Tissue specific and inducible expression of resveratrol synthase gene in peanut plants / I. M. Chung, M. R. Park, S. Rehman, S. J. Yun // Molecular Cell. – 2001. – Vol. 12. P. 353–359.
64. Chung I. M. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants / I. M. Chung, M. R. Park [et al.] // Plant Science. – 2003. – Vol. 164. – P. 103–109.
65. Corso M. Comprehensive transcript profiling of two grapevine rootstock genotypes contrasting in drought susceptibility links the phenylpropanoid pathway to enhanced tolerance / M. Corso, A. Vannozzi, E. Maza [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2015. – Vol. 66. – P. 5739–5752
66. Coutos-Thévenot P. *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter / P. Coutos-Thévenot, B. Poinssot, A. Bonomelli [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2001. – Vol. 52. – P. 901-910.
67. Curaba J. *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis / J. Curaba, T. Moritz, R. Blervaque [et al.] // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 136. – P. 3660–3669.

68. Czempl S. R2R3 Myb transcription factors: key regulators of the flavonoid biosynthetic pathway in grapevine / S. Czempl, S. C. Heppel, J. Bogs // *Protoplasma*. – 2012. – Vol. 249. – P. 109-118.

69. Dai R. Transcriptional expression of stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet Sauvignon grapevine / R. Dai, H. Ge, S. Howard, W. Qiu // *Plant Science*. – 2012. – Vol. 197. – P. 70–76.

70. Dar T. A. Jasmonates counter plant stress: a review / T. A. Dar, M. Uddin, M. M. A. Khan [*et al.*] // *Environmental and Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 115. – P. 49–57.

71. Daroch F. *In vitro* antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori* / F. Daroch, M. Hoeneisen, C. L. Gonzalez [*et al.*] // *Microbios*. – 2001. Vol. 104. – P. 79-85.

72. de la Lastra C. A. Resveratrol as an antioxidant and prooxidant agent: mechanisms and clinical implications / C. A. de la Lastra, I. Villegas // *Biochemical Society Transactions*. – 2007. – Vol. 35. – P. 1156-1160.

73. Degu A. Polyphenolic responses of grapevine berries to light, temperature, oxidative stress, abscisic acid and jasmonic acid show specific developmental-dependent degrees of metabolic resilience to perturbation / A. Degu, B. Ayenew, G. R. Cramer, A. Fait // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 212. – P. 828–836.

74. Delaunois B. Molecular engineering of resveratrol in plants / Delaunois B., Cordelier S., Conreux A. [*et al.*] // *Plant Biotechnology Journal*. – 2009. – Vol. 7. – P. 2-12.

75. Deluc L. G. Water deficit increases stilbene metabolism in Cabernet Sauvignon berries / L. G. Deluc, A. Decendit, Y. Papastamoulis [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59. – P. 289–297.

76. Deng N. Transcriptome characterization of *Gnetum parvifolium* reveals candidate genes involved in important secondary metabolic pathways of

flavonoids and stilbenoids / N. Deng, E. M. Chang, M. H. Li [*et al.*] // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 174.

77. Deng N. High temperature and UV-C treatments affect stilbenoid accumulation and related gene expression levels in *Gnetum parvifolium* / N. Deng, C. X. Liu, E. M. Chang [*et al.*] // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2017. – Vol. 25. P. 43–49.

78. Docherty J.J. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication / J. J. Docherty, M. M. Fu, B. S. Stiffler [*et al.*] // *Antiviral Research*. – 1999. – Vol. 43. – P. 145-155.

79. Domingos P. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants / P. Domingos, A. M. Prado, A. Wong [*et al.*] // *Molecular Plant*. – 2015. – Vol. 8. – P. 506–520.

80. Dong E. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time / E. Dong, H. Du, L. Gardner // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20. – P. 533-534.

81. Donnez D. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms / D. Donnez, P. Jeandet, C. Clément, E. Courot // *Trends in Biotechnology*. – 2009. – Vol. 27. – P. 706-713.

82. Draczynska-Lusiak B. Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease / B. Draczynska-Lusiak, A. Doung, A. Y. Sun // *Molecular and Chemical Neuropathology*. – 1998. – Vol. 33. – P. 139–148.

83. Du Q. H. Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics / Q. H. Du, C. Peng, H. Zhang // *Pharmaceutical Biology*. – 2013. – Vol. 51. – P. 1347–1354.

84. Duan D. Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris* / D. Duan, D. Halter, R. Baltenweck [*et al.*] // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – Vo. 66. – P. 3243–3257.

85. Duan D. An ancestral allele of grapevine transcription factor MYB14 promotes plant defence / D. Duan, S. Fischer, P. Merz [*et al.*] // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – Vol. 67. – P. 1795–180.

86. Dubrovina A. S. Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in *CDPK* gene expression / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev, M. V. Veselova [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2009. – Vol. 66. – P. 1194–1206.

87. Dubrovina A. S. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* / A. S. Dubrovina, A. Y. Manyakhin, Y. N. Zhuravlev, K. V. Kiselev // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2010. – Vol. 88. – P. 727-736.

88. Dubrovina A. S. Expression of calcium-dependent protein kinase (*CDPK*) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev, V. S. Khristenko // Journal of Plant Physiology. – 2013. – Vol. 170. – P. 1491–1500.

89. Dubrovina A. S. *VaCPK20*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., mediates cold and drought stress tolerance / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev, V. S. Khristenko // Journal of Plant Physiology. – 2015. – Vol. 185. – P. 1-12.

90. Dubrovina A. S. 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 / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev, O. A. Aleynova // Acta Physiologiae Plantarum. – 2016. – Vol. 38. – P. 78.

91. Dubrovina A. S. Regulation of stilbene biosynthesis in plants / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // Planta. – 2017. – Vol. 346. – P. 597-623.

92. Eleftherianos I. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition / I. Eleftherianos, S. Boundy, S. A. Joyce [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 2419–2242.

93. Estrela J. M. Pterostilbene: biomedical applications / J. M. Estrela, A. Ortega, S. Mena [et al.] // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2013. – Vol. 50. – P. 65–78.

94. Evers D. L. 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene (resveratrol) inhibits human cytomegalovirus replication and virus-induced cellular signaling / D. L. Evers, X. Wang, S. M. Huong [*et al.*] // *Antiviral Research.* – 2004. – Vol. 63. – P. 85-95.
95. Fabro G. Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis* / G. Fabro, I. Kovács, V. Pavet [*et al.*] // *Molecular Plant-Microbe Interactions.* – 2004. – Vol. 17. – P. 343–350.
96. Fang L. Myb14, a direct activator of STS, is associated with resveratrol content variation in berry skin in two grape cultivars / L. Fang, Y. Hou, L. Wang [*et al.*] // *Plant Cell Reports.* – 2014. – Vol. 33. – P. 1629-1640.
97. Faurie B. Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures / B. Faurie, S. Cluzet, J. M. Merillon // *Journal of Plant Physiology.* – 2009. – Vol. 166. – P. 1863–1877.
98. Ferreira S. Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions / S. Ferreira, F. Silva, J.A. Queiroz [*et al.*] // *International Journal of Food Microbiology.* – 2014. – Vol. 180. P. 62–68.
99. Ferri M. Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures / M. Ferri, L. Righetti, A. Tassoni // *Journal of Plant Physiology.* – 2011. – Vol. 168. – P. 189–195.
100. Figueiras T. S. Activation energy of light induced isomerization of resveratrol / T. S. Figueiras, M. T. Neves-Petersen, S. B. Petersen // *Journal of Fluorescence.* – 2011. – Vol. 21. – P. 1897–1906.
101. Finnegan E.J. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development / E. J. Finnegan, W. J. Peacock, E. S. Dennis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 8449-8454.

102. Finnegan E. J. DNA methylation in plants / E. J. Finnegan, R. K. Genger, W. J. Peacock, E. S. Dennis // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 49. – P. 223-247.
103. Finnegan E. J. Plant DNA methyltransferases / E.J. Finnegan, K.A. Kovac // *Plant Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 43. – P. 189-201.
104. Flamini R. (2013) An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis / R. Flamini, M. De Rosso, F. De Marchi [*et al.*] // *Metabolomics*. – 2013. – Vol. 9. – P. 1243–1253.
105. Flamini R. Stilbene oligomer phytoalexins in grape as a response to *Aspergillus carbonarius* infection / R. Flamini, A. Zanzotto, M. de Rosso [*et al.*] // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2016. – Vol. 93. – P. 112–118.
106. Fremont L. Biological effects of resveratrol // *Life Science*. – 2000. – Vol. 66. – P. 663-673.
107. Frombaum M. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases / M. Frombaum, S. Le Clanche, D. Bonnefont-Rousselot, D. Borderie // *Biochimie*. – 2012. – Vol. 94. – P. 269-276.
108. Fujita M. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway / M. Fujita, Y. Fujita, K. Maruyama [*et al.*] // *Plant Journal*. – 2004. – Vol. 39. – P. 863–876.
109. Cai Z. Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability / Z. Cai, A. Kastell, C. Speiser, I. Smetanska // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 171. – P. 330–340.
110. Gargantini P.R. A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula* / P. R. Gargantini, S. Gonzales-Rizzo, D. Chinchilla [*et al.*] // *Plant Journal*. – 2006. – Vol. 48. – P. 843-856.
111. Giacometti S. Tyrosine phosphorylation inhibits the interaction of 13-3-3 proteins with the plasma membrane H⁺-ATPase / S. Giacometti, L. Camoni, C. Albumi [*et al.*] // *Plant Biology*. – 2004. – Vol. 6. – P. 422-431.

112. Giorcelli A. Expression of the stilbene synthase (*StSy*) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides / A. Giorcelli, F. Sparvoli, F. Mattivi [*et al.*] // *Transgenic Research*. – 2004. – Vol. 13. – P. 203-214.

113. Giovinazzo G. Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food / G. Giovinazzo, I. Ingrosso, A. Paradiso [*et al.*] // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 2012. – Vol. 67. – P. 191–199.

114. Goldberg D. M. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality / D. M. Goldberg, S. E. Hahn, J. G. Parkes // *Clinica Chimica Acta*. – 1995. – Vol. 237. – P. 155-187.

115. Goll M. G. Eukaryotic cytosine methyltransferases / M. G. Goll, T. H. Bestor // *Annual Review of Biochemistry*. – 2005. – Vol. 74. – P. 481-514.

116. Gonzalez-Barrio R. Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. ‘Superior’ white table grapes / R. Gonzalez-Barrio, D. Beltran, E. Cantos [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. Vol. 54. – P. 4222–4228.

117. Greene L. M. Combretastatins: more than just vascular targeting agents? / L. M. Greene, M. J. Meegan, D.M. Zisterer // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2015. – Vol. 355. – P. 212–227.

118. Grimmig B. Ozone-induced gene expression occurs via ethylene-dependent and -independent signaling / B. Grimmig, M. N. Gonzalez-Perez, G. Leubner-Metzger [*et al.*] // *Plant Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 51. – P. 599–607.

119. Gruenbaum Y. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA / Y. Gruenbaum, T. Naveh-Many, H. Cedar, A. Razin // *Nature*. – 1981. – Vol. 5826. – P. 860-862.

120. Guldás N. Antimicrobial effect of piceatannol, a resveratrol metabolite, on *Staphylococcus aureus* / N. Guldás, T. Uysal, H. Ellidokuz, Y. Basbınar // *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*. – 2019. – Vol. 3. – P. 184-187.

121. Hain R. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol / R. Hain, B. Bieseler, H. Kindl [et al.] // Plant Molecular Biology. – 1990. – Vol. 15. – P. 325-335.

122. Hall D. Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*) / D. Hall, V. De Luca // Plant Journal. – 2007. – Vol. 49. – P. 579-591.

123. Hammerbacher A. Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection / A. Hammerbacher, S. G. Ralph, J. Bohlmann [et al.] // Plant Physiology. – 2011. – Vol. 157. – P. 876–890.

124. Harju A. M. Wounding response in xylem of Scots pine seedlings shows wide genetic variation and connection with the constitutive defence of heartwood / A.M. Harju, M. Venalainen, T. Laakso, P. Saranpaa // Tree Physiology. – 2009. – Vol. 29. – P. 19–25.

125. Harju A. Stilbenes as constitutive and induced protection compounds in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) / A. Harju, M. Venalainen // Genetic Technical Reports PSW-GTR. – 2012. – Vol. 240. P. 20–26.

126. Harper J. F. Plants, symbiosis and parasites: a calcium signaling connection / J.F. Harper, A. Harmon // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2005. – Vol. 6. – P. 555-566.

127. Harmon A.C. The CDPK superfamily of protein kinases / A. C. Harmon, M. Gribskov, E. Gubrium, J. F. Harper // New Phytologist. – 2001. – Vol. 151. – P. 175-183.

128. Harshavardhan V. T. AtRD22 and AtUSPL1, members of the plant-specific BURP domain family involved in *Arabidopsis thaliana* drought tolerance / V. T. Harshavardhan, L. Van Son, C. Seiler [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – P. e110065.

129. Hashimoto K. Calcium decoding mechanisms in plants / K. Hashimoto, J. Kudla // Biochimie. – 2011. – Vol. 93. – P. 2054-2059.

130. Hatmi S. Osmotic stress-induced polyamine oxidation mediates defence responses and reduces stress-enhanced grapevine susceptibility to *Botrytis cinerea* / S. Hatmi, P. Trotel-Aziz, S. Villaume [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2014. – Vol. 65. – P. 75–88.

131. He X. C. Overexpressing fusion proteins of 4-coumaroyl-CoA ligase (4CL) and stilbene synthase (STS) in tobacco plants leading to resveratrol accumulation and improved stress tolerance / X. C. He, F. Y. Xue, L. L. Zhang [et al.] // Plant Biotechnology Reports. – 2018. – Vol. 12. – P. 295-302.

132. Heidari P. Comparative analysis of C-repeat binding factors (CBFs) in tomato and Arabidopsis // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2019. – Vol. 62. – P. e19180715.

133. Heredia A. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product, resveratrol / A. Heredia, C. Davis, R. Redfield // Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2000. – Vol. 25. – P. 246-255.

134. Howitz K. T. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan / K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H. Y. Cohen [et al.] // Nature. – 2003. – Vol. 425. – P. 191-196.

135. Holl J. The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera* / J. Holl, A. Vannozzi, S. Czemplin [et al.] // Plant Cell. – 2013. – Vol. 25. – P. 4135–4149.

136. Houille B. Composition and tissue-specific distribution of stilbenoids in grape canes are affected by downy mildew pressure in the vineyard / B. Houille, S. Besseau, G. Delanoue [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2015. – Vol. 63. – P. 8472–8477.

137. Huang L. Expression of a grape *VqSTS36*-increased resistance to powdery mildew and osmotic stress in *Arabidopsis* but enhanced susceptibility to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis* and Tomato / L. Huang, X. J. Yin, X. M. Sun [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. – 19. – P. 2985.

138. Huang X. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – Vol. 1218. – P. 3890–3899.

139. Hung L. M. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes / L. M. Hung, J. K. Chen, S. S. Huang [*et al.*] // *Cardiovascular Research*. – 2000. – Vol. 47. – P. 549–555.

140. Ikeda Y. Plant imprinted genes identified by genome-wide approaches and their regulatory mechanisms // *Plant and Cell Physiology*. – 2012. – Vol. 53. – P. 809–816.

141. Ioannidis K. Identification of black pine (*Pinus nigra* Arn.) heartwood as a rich source of bioactive stilbenes by qNMR / K. Ioannidis, E. Melliou, P. Alizoti, P. Magiatis // *Journal of The Science of Food and Agriculture*. – 2017. – Vol. 97. – P. 1708-1716.

142. Inyai C. Development of a rapid immunochromatographic strip test for the detection of mulberroside A / C. Inyai, J. Komaikul, T. Kitisripanya [*et al.*] // *Phytochemical Analysis*. – 2015. – Vol. 26. – P. 423-427.

143. Jaillon O. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla / O. Jaillon, J. M. Aury, B. Noel [*et al.*] // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – P. 463-467.

144. Jang M. S. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes / M. S. Jang, E. N. Cai, G. O. Udeani [*et al.*] // *Science*. – 1997. – Vol. 275. – P. 218-220.

145. Jayatilake G. S. Isolation and identification of a stilbene derivative from the Antarctic sponge *Kirkpatrickia variolosa* / G. S. Jayatilake, B. J. Baker // *Journal of Natural Products*. – 1995. – Vol. 58. – P. 1958–1960.

146. Jeandet P. Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism / P. Jeandet, A.C. Douillt-Breuil, R. Bessis [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50. – P. 2731-2741.

147. Jeandet P. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants / P. Jeandet, B. Delaunois, A. Conreux [et al.] // BioFactors. – 2010. – Vol. 36. – P. 331-341.

148. Jez J. M. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases / J. M. Jez, M. D. Austin, J. Ferrer [et al.] // Chemical Biology. – 2000. – Vol. 12. – P. 919-930.

149. Jyske T. Yield of stilbene glucosides from the bark of young and old Norway spruce stems / T. Jyske, T. Laakso, H. Latva-Maenpaa [et al.] // Biomass and Bioenergy. – 2014. – Vol. 71. – P. 216-227.

150. Jyske T. M. Seasonal variation in formation structure, and chemical properties of phloem in *Picea abies* as studied by novel microtechniques / T.M. Jyske, J.P. Suuronen, A.V. Pranovich [et al.] // Planta. – 2015. – Vol. 242. – P.613–629.

151. Jyske T. In planta localization of stilbenes within *Picea abies* phloem / T. Jyske, K. Kuroda, J.P. Suuronen [et al.] // Plant Physiology. – 2016. – Vol. 172. – P. 913–928.

152. Kageyama A. Abscisic acid induces biosynthesis of bisbibenzyls and tolerance to UV-C in the liverwort *Marchantia polymorpha* / A. Kageyama, K. Ishizaki, T. Kohchi [et al.] // Phytochemistry. – 2015. – Vol. 117. – P. 547–553.

153. Kalantari H. Physiological effects of resveratrol / H. Kalantari, D. K. Das // BioFactors. – 2010. – Vol. 36. – P. 401–406.

154. Kasiotis K. M. Resveratrol and related stilbenes: their anti-aging and anti-angiogenic properties / K. M. Kasiotis, H. Pratsinis, D. Kletsas, S. A. Haroutounian // Food and Chemical Toxicology. – 2013. – Vol. 61. – P. 112-120.

155. Katsuyama Y. Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in *Escherichia coli* / Y. Katsuyama, N. Funa, S. Horinouchi // Biotechnology Journal. – 2017. – Vol. 2. – P. 1286–1293.

156. Khan M. I. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants / M. I. Khan, M. Fatma, T. S. Per [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2015. – Vol. 6. – P. 462.

157. Khattar S. Resveratrol from dietary supplement to a drug candidate: an assessment of potential / S. Khattar, S. A. Khan, S. A. A. Zaidi // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Vol. 15. – P. 957

158. Kikuchi H. Novel aromatics bearing 4-O-methylglucose unit isolated from the oriental crude drug *Bombyx batryticatus* / H. Kikuchi, N. Takahashi, Y. Oshima // *Tetrahedron Letters*. – 2004. – Vol. 45. – P. 367–370.

159. Kim J. S. Composition and quantitative analysis of stilbenoids in Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and fruits with DAD/UV HPLC / J. S. Kim, T. Y. Ha, J. Y. Ahn [et al.] // *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. – 2008. – Vol. 37. – P. 124–128.

160. Kiselev K. V. The *rolC* gene induces expression of a pathogenesis-related B-1,3-glucanase in transformed ginseng cells / K. V. Kiselev, M. I. Kusaykin, A. S. Dubrovina [et al.] // *Phytochemistry*. – 2006. – Vol. 67. – P. 2225–2231.

161. Kiselev K. V. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina, M. V. Veselova [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2007. – Vol. 128. – P. 681–692.

162. Kiselev K. V. The effect of salicylic acid on phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *Vitis amurensis* cell culture / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina, G. A. Isaeva, Y. N. Zhuravlev // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 57. – P. 415–421.

163. Kiselev K. V. A new method for analysing gene expression based on frequency analysis of RT-PCR products obtained with degenerate primers / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2010. – Vol. 32. – P. 495–502.

164. Kiselev K. V. Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine / K. V. Kiselev, A. P. Tyunin, A. Y. Manyakhin, Y. N. Zhuravlev // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2011. – Vol. 105. – P. 65–72.

165. Kiselev K. V. 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* / K. V. Kiselev, O. A. Shumakova, A. Y. Manyakhin, A. N. Mazeika // *Plant Growth Regulation*. – 2012. – Vol. 68. P. 371–381.

166. Kiselev K. V. Effects of the calmodulin antagonist W7 on resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* Rupr. / K. V. Kiselev, O. A. Shumakova, A. Y. Manyakhin // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 2013a. – Vol. 31. – P. 1369–1575.

167. Kiselev K. V. 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. / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina, O. A. Shumakova [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2013b. – Vol. 32. – P. 431–442.

168. Kiselev K.V. Involvement of DNA methylation in the regulation of *STS10* gene expression in *Vitis amurensis* / K. V. Kiselev, A. P. Tyunin, Y. N. Zhuravlev // *Planta*. – 2013c. – Vol. 237. – P. 933–941.

169. Kiselev K. V. Effect of plant stilbene precursors on the biosynthesis of resveratrol in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures / K. V. Kiselev, O. A. Shumakova, A. Y. Manyakhin // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2013d. – Vol. 49. – P. 53–58.

170. Kiselev K.V. Salicylic acid induces alterations in the methylation pattern of the *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS10* genes in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures / K. V. Kiselev, A. P. Tyunin, Y.A. Karetin // *Plant Cell Reports*. – 2015. – Vol. 34. – P. 311–320.

171. Kiselev K.V., Grigorochuk V.P., Ogneva Z.V., Suprun A.R., Dubrovina A.S. (2016) Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis*. *Phytochemistry*. – 2016. – Vol. 131. – P. 57–67.

172. Kiselev K.V. Stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr / K. V.

Kiselev, O. A. Aleynova, V. P. Grigorchuk, A. S. Dubrovina // *Planta*. – 2017. – Vol. 245. – P. 151–159.

173. Kiselev K. V. 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 / K. V. Kiselev, Z. V. Ogneva, A. R. Suprun [et al.] // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2019. – Vol. 41. P. 28.

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

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

176. Kiselev K. V. 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. / K. V. Kiselev, O. A. Aleynova, Z. V. Ogneva [et al.] // *Plants-Basel*. – 2023. – Vol. 12. – P. 1562.

177. Knight M. R. Wind-induced plant motion immediately increases cytosolic calcium / M. R. Knight, S. M. Smith, A. J. Trewavas // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 1992. – Vol. 89. – P. 4967-4971.

178. Ko J. H. The role of resveratrol in cancer therapy / J. H. Ko, G. Sethi, J. Y. Um [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – P. 2589.

179. Kobayashi M. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase / M. Kobayashi, I. Ohura, K. Kawakita [et al.] // *Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – P. 1065-1080.

180. Komaikul J. Enhanced mulberroside A production from cell suspension and root cultures of *Morus alba* using elicitation / J. Komaikul, T.

Kitisripanya, H. Tanaka [*et al.*] // Natural Product Communications. – 2015. – Vol. 10. – P. 1253-1256.

181. Kouakou T. H. (2009) Polyphenol levels in two cotton (*Gossypium hirsutum* L.) callus cultures / T. H. Kouakou, Y. J. Kouadio, P. W. Teguo [*et al.*] // Acta Botanica Gallica. – 2009. – Vol. 156. – P. 223-231.

182. Ku K.L. Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol / K.L. Ku, P.S. Chang, Y.C. Cheng, C.Y. Lien // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – Vol. 53. – P. 3877-3881.

183. Kumar S.N. Bioactive stilbenes from a *Bacillus* sp. N strain associated with a novel rhabditid entomopathogenic nematode / S. N. Kumar, J. V. Siji, K. N. Rajasekharan [*et al.*] // Letters in Applied Microbiology. – 2012. – Vol. 54. – P. 410–417.

184. Kurkela S. Structure and expression of Kin2, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana* / S. Kurkela, M. Borg-Franck // Plant Molecular Biology. – 1992. – Vol. 19. – P. 689–692.

185. Laavola M. Pinosylvin and monomethylpinosylvin, constituents of an extract from the knot of *Pinus sylvestris*, reduce inflammatory gene expression and inflammatory responses *in vivo* / M. Laavola, R. Nieminen, T. Leppanen [*et al.*] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2015. – Vol. 63. – P. 3445–3453.

186. Lai T. N. H. Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtus tomentosa* / T. N. H. Lai, M. F. Herent, J. Quetin-Leclercq [*et al.*] // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 138. – P. 1421–1430.

187. Lambert C. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars / C. Lambert, T. Richard, E. Renouf [*et al.*] // Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – Vol. 61. – P. 11392–11399.

188. Larronde F. Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars / F. Larronde, S. Krisa, A. Decendit [*et al.*] // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 17. – P. 946–950.

189. Larronde F. Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants / F. Larronde, J. P. Gaudillere, S. Krisa, [et al.] // American Journal of Enology and Viticulture. – 2003. – Vol. 54. – P. 60–63.

190. Latva-Mäenpää H. Variation of stilbene glucosides in bark extracts obtained from roots and stumps of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) / H. Latva-Mäenpää, T. Laakso, T. Sarjala [et al.] // Trees – Structure and Function. – 2013. – Vol. 27. – P. 131–139.

191. Lee M. W. A novel jasmonic acid-inducible rice *MYB* gene associates with fungal infection and host cell death / M.W. Lee, M. Qi, Y. Yang // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2001. – Vol. 14. – P. 527-535.

192. Lecourieux D. Calcium in plant defence-signalling pathways / D. Lecourieux, R. Ranjeva, A. Pugin // New Phytologist. – 2006. – Vol. 171. – P. 249-269.

193. Lehmann T. Arabidopsis NITRILASE 1 contributes to the regulation of root growth and development through modulation of auxin biosynthesis in seedlings / T. Lehmann, T. Janowitz, B. Sánchez-Parra [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2017. – Vol. 8. – P. 36.

194. Leighton F. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans / F. Leighton, A. Cuevas, V. Guasch [et al.] // Drugs under Experimental and Clinical Research. – 1999. – Vol. 25. – P. 133-141.

195. Lepak A. Creating a water-soluble resveratrol-based antioxidant by site-selective enzymatic glucosylation / A. Lepak, A. Gutmann, S. T. Kulmer, B. Nidetzky // ChemBioChem. – 2015. – Vol. 16. – P. 1870–1874.

196. Levy J. A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses / J. Levy, C. Bres, R. Geurts [et al.] // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 1361-1364.

197. Li W. DNA methylation and histone modifications regulate *de novo* shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating *WUSCHEL* expression and auxin

signaling / W. Li, H. Liu, Z. J. Cheng [*et al.*] // PLOS Genetics. – 2011. – Vol. 7. – P. e1002243.

198. Li H. Evolutionary and functional analysis of mulberry type III polyketide synthases / H. Li, J. Liang, H. Chen [*et al.*] // BMC Genomics. – 2016. – Vol. 17. – P. 540.

199. Liu H. AtNHX3 is a vacuolar K⁺/H⁺ antiporter required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis thaliana* / H. Liu, R. Tang, Y. Zhang [*et al.*] // Plant, Cell & Environment. – 2010. – Vol. 33. – P. 1989–1999.

200. Liu L. Review: research progress in amur grape, *Vitis amurensis* Rupr. / L. Liu, H. Li // Canadian Journal of Plant Science. – 2013. – Vol. 93. – P. 565–575.

201. Livak K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001. – Vol. 25. – P. 402–408.

202. Ludwig A. A. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk / A. A. Ludwig, T. Romeis, J. D. G. Jones // Journal of Experimental Botany. – 2004. – Vol. 55. – P. 181–188.

203. Lygin A. V. Inhibitory effects of stilbenes on the growth of three soybean pathogens in culture / A. V. Lygin, C. B. Hill, M. Pawlowski [*et al.*] // Phytopathology. – 2014. – Vol. 104. – P. 843–850.

204. Lyons M. M. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries / M. M. Lyons, C. W. Yu, R. B. Toma [*et al.*] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2003. – Vol. 51. – P. 5867–5870.

205. Maddox C. E. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa* / C. E. Maddox, L. M. Laur, L. Tian // Current Microbiology. – 2010. – Vol. 60. – P. b 53–58.

206. Manela N. Phenylalanine and tyrosine levels are rate-limiting factors in production of health promoting metabolites in *Vitis vinifera* cv. Gamay Red cell suspension / N. Manela, M. Oliva, R. Ovadia [*et al.*] // Front Plant Science. – 2015. – Vol. 6. – P. 538.

207. Marinella M. A. Indomethacin and resveratrol as potential treatment adjuncts for SARS-CoV-2/COVID-19 // International Journal of Clinical Practice. – 2020. – Vol. 74. – P. 13535.

208. Martens S. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. / S. Martens, A. Preuss, U. Matern // Phytochemistry. – 2010. – Vol. 71. – P. 1040-1049.

209. Martin A. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon / Martin A., Troadec C., Boualem A. [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 461. – P. 1135-1137.

210. Matus J. T. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes / J. T. Matus, F. Aquea, P. Arce-Johnson // BMC Plant Biology. – 2008. – Vol. 8. – P. 83.

211. Milborrow B. V. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis // Journal of Experimental Botany. – 2001. – Vol. 521. – P. 1145–1164.

212. Mizoi J. Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* / J. Mizoi, N. Kanazawa, S. Kidokoro [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2019. – Vol. 294. – P. 902–917.

213. Morales M. Oxidation of *trans*-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gamay Rouge grape (*Vitis vinifera*) berries / M. Morales, J. Alcantara, A. Ros Barcelo // American Journal of Enology and Viticulture. – 1997. – Vol. 48. – P. 33-38.

214. Mori T. Structural insight into the enzymatic formation of bacterial stilbene / T. Mori, T. Awakawa, K. Shimomura [et al.] // Cell Chemical Biology. – 2016. – Vol. 23. – P. 1468–1479.

215. Mowla S.B. Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress

tolerance / S. B. Mowla, A. Cuypers, S. P. Driscoll [*et al.*] // *Plant Journal*. – 2006. – Vol. 48. – P. 743–756.

216. Msanne J. Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes / J. Msanne, J. Lin, J. M. Stone, T. Awada // *Planta*. 2011. – Vol. 234. – P. 97–107.

217. Muilu-Makela R. Osmotic stress affects polyamine homeostasis and phenolic content in proembryogenic liquid cell cultures of Scots pine / R. Muilu-Makela, J. Vuosku, L. Hamberg [*et al.*] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2015. – Vol. 122. – P. 709-726.

218. Mulat D. G. Rapid chemical characterisation of stilbenes in the root bark of Norway spruce by off-line HPLC/DAD-NMR / D. G. Mulat, H. Latva-Maenpaa, H. Koskela [*et al.*] // *Phytochemical Analysis*. – 2014. – Vol. 25. – P. 529–536.

219. Nawkar G.M. UV-Induced cell death in plants / G. M. Nawkar, P. Maibam, J. H. Park [*et al.*] // *International Journal of Molecular Science*. – 2013. – Vol. 14. – P. 1608-1628.

220. Nicolas P. The basic leucine zipper transcription factor ABSCISIC ACID RESPONSE ELEMENT-BINDING FACTOR2 is an important transcriptional regulator of abscisic acid-dependent grape berry ripening processes / P. Nicolas, D. Lecourieux, C. Kappel [*et al.*] // *Plant Physiology*. – 2014. – Vol. 164. – P. 365–383.

221. Nivison H. Ribulose biphosphate carboxylase synthesis in barley leaves / H. Nivison, C. Stocking // *Plant Physiology*. – 1983. – Vol. 73. – P. 906–911.

222. Ogneva Z.V. Tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing grapevine *VaSTS1* or *VaSTS7* genes to cold, heat, drought, salinity, and ultraviolet irradiation / Z.V. Ogneva, O.A. Aleynova, A.R. Suprun [*et al.*] // *Biologia Plantarum*. – 2021a. – Vol. 65. – P. 111-117.

223. Ogneva Z.V. Exogenous stilbenes improved tolerance of *Arabidopsis thaliana* to a shock of ultraviolet B radiation / Z. V. Ogneva, V. V. Volkonskaia, A. S. Dubrovina [et al.] // Plants-Basel. – 2021b. – Vol. 10. – P. 1282.

224. Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol // Current Medicinal Chemistry. – 2006. – Vol. 13. – P. 87-98.

225. Ovesná Z. Antioxidant activity of resveratrol, piceatannol and 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxy-trans-stilbene in three leukemia cell lines / Z. Ovesná, K. Kozics, Y. Bader [et al.] // Oncology Reports. – 2006. – Vol. 16. – P. 617-624.

226. Pallauf K. Resveratrol and lifespan in model organisms / K. Pallauf, G. Rimbach, P. M. Rupp [et al.] // Current Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 23. – P. 4639-4680.

227. Pan Q. H. Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation / Q. H. Pan, L. Wang, J. M. Li // Plant Science. – 2009. – Vol. 176. – P. 360–366.

228. Pangeni R. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery / Pangeni R., Sahni J.K., Ali J. [et al.] // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2014. – Vol. 11. – P. 1285–1298.

229. Parage C. Structural, functional, and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine / C. Parage, R. Tavares, S. Réty [et al.] // Plant Physiology. – 2012. – Vol. 160. – P. 1407-1419.

230. Paterson A. H. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses / A. H. Paterson, J. E. Bowers, R. Bruggmann [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 457. – P. 551–556.

231. Pennisi E. Chemical shackles for genes // Science. – 1996. – Vol. 273. – P. 574-575.

232. Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology // The FASEB Journal. – 2003. – Vol 17. – P. 1975-1985.

233. Plackett A.R. Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis* gibberellin 20-oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant

paralogs / A. R. Plackett, S. J. Powers, N. Fernandez-Garcia [*et al.*] // *Plant Cell*. – 2012. – Vol. 24. – P. 941–960.

234. Preisig-Muller R. Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes / R. Preisig-Muller, A. Schwekendiek, I. Brehm, H. J. Reif, H. Kindl // *Plant Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 39. – P. 221–229.

235. Pineros M. Characterization of the high-affinity verapamil binding site in a plant plasma membrane Ca²⁺-selective channel / M. Pineros, M. Tester // *The Journal of Membrane Biology*. – 1997. – Vol. 157. – P. 139–145.

236. Peng X.L. Analysis of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid in vegetable foods using high-performance liquid chromatography / X. L. Peng, J. Xu, X. F. Sun [*et al.*] // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 2015. – Vol. 66. – P. 729–773.

237. Piao S. J. Simultaneous determination of five characteristic stilbene glycosides in root bark of *Morus albus* L. (Cortex Mori) using high-performance liquid chromatography / S. J. Piao, L. X. Chen, N. Kang, F. Qiu // *Phytochemistry Analysis*. – 2011. – Vol. 22. – P. 230–235.

238. Piotrowska H. Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol / H. Piotrowska, M. Kucinska, M. Murias // *Mutation Research*. – 2012. – Vol. 750. – P. 60–82.

239. Pearce R. B. Effects of exposure to high ozone concentrations on stilbenes in Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bark and on its lignification response to infection with *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1996. – Vol. 48. P. 117–129.

240. Pezet R. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. // *FEMS Microbiology Letters*. – 1998. – Vol. 167. – P. 203–208.

241. Plumed-Ferrer C. The antimicrobial effects of wood-associated polyphenols on food pathogens and spoilage organisms / C. Plumed-Ferrer, K.

Vakevainen, H. Komulainen [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2013. – Vol. – 164. – P. 99–107.

242. Poinssot B. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity / B. Poinssot, E. Vandelle, M. Bentejac [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2003. – Vol. 16. – P. 553-564.

243. Powell R. G. Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae / R. G. Powell, M. R. Tepaske, R. D. Plattner [et al.] // Phytochemistry. – 1994. – Vol. 35. – P. 335–338.

244. Puhakainen T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis / T. Puhakainen, M. W. Hess, P. Mäkelä [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2004. – Vol. 54. – P. 743–753.

245. Regev-Shoshani G. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation / G. Regev-Shoshani, O. Shoseyov, I. Bilkis, Z. Kerem // Biochemistry Journal. – 2003. – Vol. 374. – P. 157-163.

246. Ramsay N. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity / N. Ramsay, B. Glover // Trends in Plant Science. – 2005. – Vol. 10. – P. 63-70.

247. Reddy A. S. N. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression / A. S. N. Reddy, G. S. Ali, H. Celesnik, I. S. Day // Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – P. 2010–2032.

248. Ragab A.S. Detection and quantitation of resveratrol in tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.) / A. S. Ragab, J. Van Fleet, B. Jankowski [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 54. – P. 7175–7179.

249. Renaud S. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease / S. Renaud, M. de Lorgeril // The Lancet. – 1992. – Vol. 339. – P. 1523–1526.

250. Reid K. E. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry

development / K. E. Reid, N. Olsson, J. Schlosser [*et al.*] // BMC Plant Biology. – 2006. – Vol. 6. – P. 27.

251. Reyes D. Evidence of a role for tyrosine dephosphorylation in the control of postgermination arrest of development by abscisic acid in *Arabidopsis thaliana* L. / D. Reyes, D. Rodriguez, G. Nicolas, C. Nicolas // Planta. – 2006. – Vol. 223. – P. 381-385.

252. Rimando A. M. Determination of stilbenes in blueberries / A. M. Rimando, R. Cody // LC-GC North America. – 2005. – Vol. 23. – P. 1192–1200.

253. Rimando A.M. In planta production of the highly potent resveratrol analogue pterostilbene via stilbene synthase and O-methyltransferase co-expression / A. M. Rimando, Z. Pan, J. J. Polashock [*et al.*] // Plant Biotechnology Journal. – 2012. – Vol. 10. – P. 269–283.

254. Rimm E. B. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits / E. B. Rimm, A. Klatsky, D. Grobbee, M. J. Stampfer // British Medical Journal. – 1996. – Vol. 312. – P. 731-736.

255. Ritter H. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase / H. Ritter, G. E. Schulz // Plant Cell. – 2004. – Vol. 12. – P. 3426-3436.

256. Riviere C. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae / C. Riviere, A. D. Pawlus, J. M. Merillon // Natural Product Reports. – 2012. – Vol. 29. – P. 1317–1333.

257. Roberts D.M. Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants / D. M. Roberts, A. C. Harmon // Annual review of plant physiology and plant molecular biology. – 1992. – Vol. 43. – P. 375-414.

258. Rokaya M.B. Active constituents in *Rheum acuminatum* and *Rheum australe* (Polygonaceae) roots: a variation between cultivated and naturally growing plants / M.B. Rokaya, P. Marsik, Z. Muenzbergova // Biochemical Systematics and Ecology. – 2012. – Vol. 41. – P. 83–90.

259. Rosemann D. Plant responses to ozone: II. Induction of stilbene biosynthesis in scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings / D. Rosemann, W. Heller, H. Sandermann // *Plant Physiology*. – 1991. – Vol. 97. – P. 1280-1286.

260. Rudolf J.R. Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses / J.R. Rudolf, A. V. Resurreccion // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – Vol. 53. – P. 10186–10192.

261. Sae-Lee N. Enhancement of phenolics, resveratrol and antioxidant activity by nitrogen enrichment in cell suspension culture of *Vitis vinifera* / N. Sae-Lee, O. Kerdchoechuen, N. Laohakunjit // *Molecules*. – 2014. – Vol. 19. P. 7901–7912.

262. Sanders D. Communication with calcium / D. Sanders, C. Brownlee, J. F. Harper // *The Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11. – P. 691–706.

263. Sarig P. Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifera* / P. Sarig, T. Zahavi, Y. Zutkhi [et al.] // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 1996. – Vol. 48. – P. 403–415.

264. Sato A. Indole-3-pyruvic acid regulates TAA1 activity, which plays a key role in coordinating the two steps of auxin biosynthesis / A. Sato, K. Soeno, R. Kikuchi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2022. – Vol. 119. – P. e2203633119.

265. Schmidlin L. A stress-inducible resveratrol *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine / L. Schmidlin, A. Poutaraud, P. Claudel [et al.] // *Plant Physiology*. – 2008. – Vol. 148. – P. 1630-1639.

266. Schubert R. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence / R. Schubert, R. Fischer, R. Hain [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 1997. – Vol. 34. – P. 417–426.

267. Schwekendiek A. Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities / A. Schwekendiek, O. Spring, A. Heyerick [et

al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – Vol. 55. – P. 7002-7009.

268. Sergent T. Characterization of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) heartwood extractives: identification of resveratrol and piceatannol / T. Sergent, S. Kohnen, B. Jourez [et al.] // Wood Science and Technology. – 2014. – Vol. 48. – P. 1005–1017.

269. Shankar S. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential // Frontiers in Bioscience. – 2007. – Vol. 12. – P. 4839-4854.

270. Shao L. 2,3,5,4'- tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside biosynthesis by suspension cells cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb and production enhancement by methyl jasmonate and salicylic acid / L. Shao, S. J. Zhao, T. B. Cui [et al.] // Molecules. – 2012. – Vol. 17. – P. 2240-2247.

271. Shi J. *Alternaria* sp. MG1, a resveratrol producing fungus: isolation, identification, and optimal cultivation conditions for resveratrol production / J. Shi, Q. Zeng, Y. Liu, Z. Pan // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2012. Vol. 95. – P. 369–379.

272. Shi J. L. The comparative analysis of the potential relationship between resveratrol and stilbene synthase gene family in the development stages of grapes (*Vitis quinquangularis* and *Vitis vinifera*) / J. L. Shi, M. Y. He, J. L. Cao [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2014. – Vol. 74. – P. 24–32.

273. Shen T. (2009) Natural stilbenes: an overview / T. Shen, X. N. Wang, H. X. Lou // Natural Product Reports. – 2009. – Vol. 26. – P. 916–935.

274. Shumakova O. A. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with coumaric acid / O. A. Shumakova, A. Y. Manyakhin, K. V. Kiselev // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2011. – Vol. 165. P. 1427–1436.

275. Siemann E. H. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine / E. H. Siemann, L. L. Ceasy // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 1992. – Vol. 43. – P. 49-52.

276. Sobolev V. S. Localized production of phytoalexins by peanut (*Arachis hypogaea*) kernels in response to invasion by *Aspergillus* species // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – Vol. 56. – P. 1949–1954.

277. Sobolev V. S. Production of phytoalexins in peanut (*Arachis hypogaea*) seed elicited by selected microorganisms // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61. – P. 1850–1858.

278. Soleas G. Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention / G. Soleas, E. Diamandis, D. Goldberg // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 1997. – Vol. 11. – P. 287-313.

279. Spena A. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants / A. Spena, T. Schmulling, C. Koncz, J. S. Schell // *EMBO Journal*. – 1987. – Vol. 6. – P. 3891-3899.

280. Steward N. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress / N. Steward, M. Ito, Y. Yamaguchi [*et al.*] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – P. 37741-37746.

281. Suprun A. R. Effect of spruce *PjSTS1a*, *PjSTS2*, or *PjSTS3* gene overexpression on stilbene biosynthesis in callus cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / A.R. Suprun, Z.V. Ogneva, A.S. Dubrovina, K.V. Kiselev // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2020. – Vol. 67. – P. 234–239.

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

283. Suzuki M. Multiomics in grape berry skin revealed specific induction of the stilbene synthetic pathway by ultraviolet-C irradiation / M. Suzuki, R. Nakabayashi, Y. Ogata [*et al.*] // *Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 168. – P. 47–59.

284. Takaoka M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.) // Journal of Faculty of Science Hokkaido Imperial University. – 1940. – Vol. 3. – P. 1-16.

285. Takei K. Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-Zeatin / K. Takei, T. Yamaya, H. Sakakibara // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 79. P. 41866–41872.

286. Tang K. Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings / K. Tang, J. C. Zhan, H. R. Yang, W. D. Huang // Journal of Plant Physiology. – 2010. – Vol. 167. – P. 95–102.

287. Tassoni A. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures / A. Tassoni, S. Fornale, M. Franceschetti [et al.] // New Phytologist. – 2005. – Vol. 166. – P. 895-905.

288. Tassoni A. Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis / A. Tassoni, L. Durante, M. Ferri // Journal of Plant Physiology. – 2012. – Vol. 169. – P. 775–781.

289. Taurino M. Jasmonates elicit different sets of stilbenes in *Vitis vinifera* cv. Negramaro cell cultures / M. Taurino, I. Ingrosso, L. D'amico [et al.] // Springerplus. – 2015. Vol. 4. – P. 49.

290. Tavares S. *Vitis vinifera* secondary metabolism as affected by sulfate depletion: diagnosis through phenylpropanoid pathway genes and metabolites / S. Tavares, D. Vesentini, J. C. Fernandes [et al.] // Plant Physiology and Biochemistry. – 2013. – Vol. 66. – P. 118–126.

291. Teixeira A. Berry phenolics of grapevine under challenging environments / A. Teixeira, J. Eiras-Dias, S. D. Castellarin, H. Geros // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Vol. 14. – P. 18711–18739.

292. Thomas A. J. The isolation of nucleic acid fractions from plant leaves and their purine and pyrimidine composition / A. J. Thomas, H. S. Sherratt // Biochemistry Journal. – 1956. – Vol. 62. – P. 1-4.

293. Thomashow M. F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // *Plant Physiology*. – 1998. – Vol. 118. – P. 1–8.

294. Timperio A. M. Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions / A. M. Timperio, A. D'Alessandro, M. Fagioni [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2012. – Vol. 50. – P. 65–71.

295. Tirichine L. Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development / L. Tirichine, H. Imaizumi-Anraku, S. Yoshida [et al.] // *Nature*. – 2006. – Vol. 441. – P. 1153-1156.

296. Tisserant L. P. Enhanced stilbene production and excretion in *Vitis vinifera* cv Pinot Noir hairy root cultures / L. P. Tisserant, A. Aziz, N. Jullian [et al.] // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21. – P. 1703.

297. Tyunin A. P. Effects of 5-azacytidine induced DNA demethylation on methyltransferase gene expression and resveratrol production in cell cultures of *Vitis amurensis* / A. P. Tyunin, K. V. Kiselev, Y. N. Zhuravlev // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2012. – Vol. 111. – P. 91-100.

298. Tyunin A. P. Differences in the methylation patterns of the *VaSTS1* and *VaSTS10* genes of *Vitis amurensis* Rupr. / A. P. Tyunin, K. V. Kiselev, Y. A. Karetin // *Biotechnology Letters* – 2013. – Vol. 35. – P. 1525–1532.

299. Tyunin A. P. Alternations in *VaSTS* gene cytosine methylation and *t*-resveratrol production in response to UV-C irradiation in *Vitis amurensis* Rupr. cells / A. P. Tyunin, K. V. Kiselev // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2016. – Vol. 124. – P. 33-45.

300. Tyunin A. P. Influence of increased expression of *VaMyb1* transcription factor on biosynthesis of resveratrol in the cells of Amur grape (*Vitis amurensis*) / A. P. Tyunin, K. V. Kiselev // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2017. – Vol. 64. – P. 41–47.

301. Tyunin A. P. Stilbene content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with cinnamic and caffeic acids /

A. P. Tyunin, N. N. Nityagovsky, V. P. Grigorchuk, K. V. Kiselev // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2018. – Vol. 65. – P. 150-155.

302. Tyunin A. P. The effect of explant origin and collection season on stilbene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / A. P. Tyunin, A. R. Suprun, N. N. Nityagovsky [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2019. – Vol. 136. – P. 189-196.

303. Tzfira T. Agrobacterium T-DNA integration: molecules and models / T. Tzfira, J. Li, B. Lacroix, Citovsky V. // *Trends in Genetics: TIG*. – 2004. – Vol. 20. – P. 375.

304. Vandelle E. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses / E. Vandelle, B. Poinssot, D. Wendehenne [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2006. – Vol. 19. – P. 429-440.

305. Vaillau F. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack / F. Vaillau, X. Daniel, M. A. Tronchet [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2002. – Vol. 99. – P. 10179-10184.

306. Velasco R. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety / R. Velasco, A. Zharkikh, M. Troggio [et al.] // *PLoS ONE*. – 2007. – Vol. 2. – P. 1326.

307. Vingtdeux V. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease / V. Vingtdeux, U. Dreses-Werringloer, H. Zhao [et al.] // *BMC Neuroscience*. – 2008. – Vol. 9 (Suppl 2). – P. S6.

308. Vitrac X. Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection / X. Vitrac, J. P. Monti, J. Vercauteren [et al.] // *Analytica Chimica Acta*. – 2002. – Vol. 458. – P. 103–110.

309. Wang W. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on

its accumulation / W. Wang, K. Tang, H. R. Yang [*et al.*] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2010. – Vol. 48. – P. 142–152.

310. Wang J. N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana* / J. Wang, X. M. Ma, M. Kojima [*et al.*] // *Plant Cell Physiology*. – 2011. – Vol. 52. – P. 2200–2213.

311. Wang F. Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses / F. Wang, X. Cui, Y. Sun, C. H. Dong // *Plant Cell Reports*. – 2013. – Vol. 32. – P. 1099–1109.

312. Wang C. P. Mulberroside A protects against ischemic impairment in primary culture of rat cortical neurons after oxygen-glucose deprivation followed by reperfusion / C. P. Wang, L. Z. Zhang, G. C. Li [*et al.*] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2014a. – Vol. 92. – P. 944–954.

313. Wang J. Three new resveratrol derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. / J. Wang, D. G. Cox, W. Ding [*et al.*] // *Marine Drugs*. – 2014b. – Vol. 12. – P. 2840–2850.

314. Wang J. F. Resveratrol synthesis under natural conditions and after UV-C irradiation in berry skin is associated with berry development stages in ‘Beihong’ (*V. vinifera* × *V. amurensis*) / J. F. Wang, L. Ma, H. F. Xi [*et al.*] // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 168. – P. 430–438.

315. Wang X. F. Naturally active oligostilbenes / X. F. Wang, C. S. Yao // *Journal of Asian Natural Products Research*. – 2016. – Vol. 18. – P. 376–407.

316. Wang Z. Overexpressing *Arabidopsis ABF3* increases tolerance to multiple abiotic stresses and reduces leaf size in alfalfa / Z. Wang, G. Su, M. Li [*et al.*] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2016. – Vol. 109. – P. 199–208.

317. Warren R. L. Improved white spruce (*Picea glauca*) genome assemblies and annotation of large gene families of conifer terpenoid and phenolic defense metabolism / R. L. Warren, C. I. Keeling, M. M. Yuen [*et al.*] // *Plant Journal*. – 2015. – Vol. 83. – P. 189–212.

318. Wassenegger M. RNA-directed *de-novo* methylation of genomic sequences in plants / M. Wassenegger, S. Heimes, L. Riedel, H. L. Sanger // *Cell*. – 1994. – Vol. 76. – P. 567-576.
319. Watts K. T. Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli* / K. T. Watts, P. C. Lee, C. Schmidt-Dannert // *BMC Biotechnology*. – 2006. – Vol. 6. – P. 22.
320. Weiskirchen S. Resveratrol: how much wine do you have to drink to stay healthy? / S. Weiskirchen, R. Weiskirchen // *Advances in Nutrition*. – 2016. – Vol. 7. – P. 706–718.
321. White P. J. Calcium in plants / P. J. White, M. R. Broadley // *Annals of Botany*. – 2003. – Vol. 92. – P. 487-511.
322. Wyatt G. R. Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids // *Biochem. Journal*. – 1951. – Vol. 48. – P. 581-584.
323. Wong D. C. A systems-oriented analysis of the grapevine R2R3-MYB transcription factor family uncovers new insights into the regulation of stilbene accumulation / D. C. Wong, R. Schlechter, A. Vannozzi [*et al.*] // *DNA Research*. – 2016. – Vol. 23. – P. 451–466.
324. Wood J. G. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans / J. G. Wood, B. Rogina, S. Lavu [*et al.*] // *Nature*. – 2004. – Vol. 430. – P. 686-689.
325. Wu Y. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid / Y. Wu, D. Zhang, J. Y. Chu // *Cell Reports*. – 2012. – Vol. 1. – P. 639-647.
326. Xi H. F. Differential response of the biosynthesis of resveratrols and flavonoids to UV-C irradiation in grape leaves / H. F. Xi, L. Ma, L. N. Wang // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. – 2015. – Vol. 43. – P. 163–172.
327. Xi Y. The *CBL* and *CIPK* gene family in grapevine (*Vitis vinifera*): Genome-wide analysis and expression profiles in response to various abiotic

stresses / Y. Xi, J. Liu, C. Dong, Z. M. Cheng // *Frontiers in Plant Science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 978.

328. Xiao W. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability / W. Xiao, K. D. Custard, R. C. Brown [*et al.*] // *Plant Cell*. – 2006. – Vol. 18. – P. 805-814.

329. Xing T. Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts / T. Xing, X. Wang, K. Malik, B. Miki // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2001. 14: 1261-1264.

330. Xu L. Advances in the study of oxyresveratrol / L. Xu, C. Liu, W. Xiang [*et al.*] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 10. – P. 44–54.

331. Xu A. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon / A. Xu, J. C. Zhan, W. D. Huang // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2015. Vol. 122. – P. 197-211.

332. Yang M. H. Investigation of microbial elicitation of trans-resveratrol and trans-piceatannol in peanut callus led to the application of chitin as a potential elicitor / M. H. Yang, C. H. Kuo, W. C. Hsieh [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2010. Vol. 58. – P. 9537-9541.

333. Yang H. Altered growth and improved resistance of *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* by overexpression of the basic amino acid transporter AtCAT1 / H. Yang, S. Postel, B. Kemmerling, U. Ludewig // *Plant, Cell & Environment*. – 2014. – Vol. 37. – P. 1404–1414.

334. Yang T. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin / T. Yang, L. Fang, C. Nopo-Olazabal [*et al.*] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 63. – P. 3942-3950.

335. Yang T. A stilbenoid-specific prenyltransferase utilizes dimethylallyl pyrophosphate from the plastidic terpenoid pathway / T. Yang, L. Fang, A. M. Rimando [*et al.*] // *Plant Physiology*. – 2016. – Vol. 171. – P. 2483-2498.

336. Yu C. K. Y. (2005) A stilbene synthase gene (*SbSTS1*) is involved in host and nonhost defense responses in sorghum / C. K. Y. Yu, K. Springob, J. Schmidt [*et al.*] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 138. – P. 393–401.

337. Yu C. K. Y. Accumulation of trans-piceid in sorghum seedlings infected with *Colletotrichum sublineolum* / C.K.Y. Yu, C. H. Shih, I. K. Chu, C. Lo // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69. – P. 700–706.

338. Yue X. Correlation of aquaporins and transmembrane solute transporters revealed by genome-wide analysis in developing maize leaf / X. Yue, X. Zhao, Y. Fei, X. Zhang // *Comparative and Functional Genomics*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 546930.

339. Zhao J. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites / J. Zhao, L. C. Davis, R. Verpoorte // *Biotechnology Advances*. – 2005. – Vol. 23. – P. 283-333.

340. Zhang Y. Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells / Y. Zhang, S. Z. Li, J. Li, X. Pan [*et al.*] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128. – P. 13030-13031.

341. Zhang Y. Multi-level engineering facilitates the production of phenylpropanoid compounds in tomato / Y. Zhang, E. Butelli, S. Alseekh [*et al.*] // *Nature Communications*. – 2015a. – Vol. 6. – P. 8635.

342. Zhang K. Genome-wide identification and expression analysis of the *CDPK* gene family in grape, *Vitis* spp. / K. Zhang, Y.-T. Han, F.-L. Zhao [*et al.*] // *BMC Plant Biology*. – 2015b. – Vol. 15. – P. 164.

343. Zhang D. Overexpression of a cotton nonspecific lipid transfer protein gene, *GhLTP4*, enhances drought tolerance by remodeling lipid profiles, regulating abscisic acid homeostasis and improving tricarboxylic acid cycle in cotton / D.

Zhang, J. Li, M. Li [*et al.*] // Environmental and Experimental Botany. – 2022. – Vol. 201. – P. 104991.

344. Zhou J. Variations in the levels of mulberroside A, oxyresveratrol, and resveratrol in mulberries in different seasons and during growth / J. Zhou, S. X. Li, W. Wang [*et al.*] // The Scientific World Journal. – 2013. – Vol. 2013. – P. 380692.

345. Zhou Q. Resveratrol derivatives in four tissues of six wild Chinese grapevine species / Q. Zhou, Y. Du, S. Cheng [*et al.*] // New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. – 2015. – Vol. 43. – P. 204–213.

346. Zhou G. Molecular evolution and functional divergence of stress-responsive Cu/Zn superoxide dismutases in plants / G. Zhou, C. Liu, Y. Cheng [*et al.*] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – P. 7082.

347. Zhu F. Cloning, expression pattern analysis and subcellular localization of resveratrol synthase gene in peanut (*Arachis hypogaea* L.) / F. Zhu, J. Han, S. Liu [*et al.*] // American Journal of Plant Sciences. – 2014. – Vol. 5. – P. 3619–3631.

348. Zinser C. Induction of stilbene synthase and cinnamyl alcohol dehydrogenase mRNAs in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings / C. Zinser, D. Ernst, H. Sandermann // Planta. – 1998. – Vol. 204. – P. 169–176.

349. Zorzete P. Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field / P. Zorzete, T. A. Reis, J. D. Felicio [*et al.*] // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 129. – P. 957–964.

350. Vannozzi A. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses / A. Vannozzi, I. B. Dry, M. Fasoli [*et al.*] // BMC Plant Biology. – 2012. – Vol. 12. – P. 130.

351. Vastano B.C. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum* / B. C. Vastano, Y. Chen, N. Zhu [*et al.*] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2000. – Vol. 48. – P. 253–256.

352. Vezzulli S. Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine / S. Vezzulli, S. Civardi, F. Ferrari, L. Bavaresco // *American Journal of Enology and Viticulture*. – 2007. – Vol. 58. – P. 530–533.

353. Vlot A.C. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease / A. C. Vlot, D. A. Dempsey, D. F. Klessig // *Annual Review of Phytopathology*. – 2009. – Vol. 47. – P. 177–206.

354. Vrchotova N. The stilbene and catechin content of the spring sprouts of *Reynoutria species* / N. Vrchotova, B. Sera, J. Triska // *Acta Chromatographica*. – 2007. – Vol. 19. – P. 21–28.