

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ НАЗЕМНОЙ
БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ» ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Махазен Дмитрий Сергеевич

**Регуляция генов семейства *JAZ* посредством РНК-интерференции как
инструмент активации вторичного метаболизма в клеточных культурах
растений**

Специальность 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н., Веремейчик Галина Николаевна

ВЛАДИВОСТОК - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Клеточные культуры растений как альтернативный источник вторичных метаболитов.....	15
1.1.1. Клеточные культуры растений.....	15
1.1.2. Группы вторичных метаболитов и их применение.....	18
1.1.3. Регуляция биосинтеза вторичных метаболитов	22
1.2. Роль сигнальной системы жасмоновой кислоты в регуляции вторичного метаболизма	25
1.2.1. История и функции ЖК.....	25
1.2.2. Сигнальная система жасмоновой кислоты.....	27
1.2.3. Роль JAZ во взаимодействии сигнальной системы ЖК с другими сигнальными системами растительной клетки.....	30
1.3. РНК-интерференция как инструмент биоинженерии растений.....	37
1.3.1. Биоинженерия растений.....	37
1.3.2. РНК-интерференция	40
1.3.3. Агробактериальная трансформация.....	44
1.4. Вторичные метаболиты <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
1.4.1. Ботаническая характеристика арабидопсиса	46
1.4.2. Азот-, серосодержащие вторичные метаболиты арабидопсиса...	47
1.4.3. Фармакологические свойства азот-, серосодержащих метаболитов арабидопсиса.....	51

1.5. Вторичные метаболиты <i>Vitis vinifera</i>	53
1.5.1. Ботаническая характеристика винограда	54
1.5.2. Вторичные метаболиты винограда	55
1.5.3. Фармакологические свойства <i>транс</i> -резвератрола и других вторичных метаболитов винограда	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	61
2.1. Биоинформатический анализ	61
2.2. Создание генетических конструкций	62
2.2.1. Создание имиРНК для таргетирования гена <i>AtJAZ1</i>	62
2.2.2. Создание имиРНК для таргетирования гена <i>VvJAZ9</i>	63
2.3. Получение и культивирование клеточных линий	67
2.3.1. Получение трансгенной клеточной культуры <i>A. thaliana</i>	67
2.3.2. Получение клеточных культур <i>V. vinifera</i>	67
2.3.3. Постановка стрессовых экспериментов	68
2.4. Молекулярно-генетические анализы	69
2.4.1. Определение трансгенности полученных клеточных культур	69
2.4.2. Экстракция РНК и синтез кДНК	70
2.4.3. Количественный анализ экспрессии генов методом ПЦР-РВ	71
2.5. Химический анализ вторичных метаболитов клеточных культур	72
2.5.1. Растворители и реактивы	72
2.5.2. Подготовка образцов для анализа	73
2.5.3. Анализ экстракта клеточной культуры арабидопсиса	73
2.5.4. Анализ экстракта клеточной культуры винограда	74
2.6. Статистика	75

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	76
3.1. Биоинформатический анализ гена <i>AtJAZ1</i> арабидопсиса и гена <i>VvJAZ9</i> винограда.....	76
3.1.1. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей JAZ арабидопсиса и винограда.	76
3.1.2. Анализ белок-белковых взаимодействий AtJAZ1	77
3.2. Получение генетических конструкций и трансгенных клеточных культур арабидопсиса и винограда.	79
3.2.1. Получение генетических конструкций и трансгенных культур клеток арабидопсиса	80
3.2.2. Получение генетических конструкций и трансгенных клеточных линий винограда	84
3.3. Содержание вторичных метаболитов в клеточных культурах арабидопсиса и винограда	88
3.3.1. Биосинтез азот-, серосодержащих метаболитов в контрольной и трансгенной клеточных культурах арабидопсиса	88
3.3.2. Биосинтез <i>транс</i> -резвератрола в контрольной и трансгенных клеточных культурах винограда.....	95
3.4. Влияние метилжасмоната на культуры арабидопсиса и винограда... ..	98
3.4.1. Влияние метилжасмоната на культуры арабидопсиса	98
3.4.2. Влияние метилжасмоната на культуры винограда	99
3.5. Влияние стрессовых условий (соль, холод) на рост и содержание камалексина в клеточных линиях арабидопсиса	103
3.6. Молекулярный механизм JAZ-опосредованного взаимодействия ЖК, АБК и АФК сигнальных систем при холодовом стрессе.....	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111

ВЫВОДЫ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	116

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

6-БАП – 6-бензил-аминопурин

bHLH – семейство белков, имеющих основную структуру спираль-петля-спираль (от англ. basic helix-loop-helix)

CBF/DREB – транскрипционные факторы, связывающие C/DRE элемент (от англ. C-repeat/dehydration-responsive element binding factors)

CYP – цитохром P450 (от англ. cytochrome), суперсемейство монооксигеназ эукариот

HSF – транскрипционные факторы теплового шока (от англ. Heat Shock Factors)

JAZ – транскрипционные факторы семейства Jasmonate ZIM-домен

MYB – семейство транскрипционных факторов, имеющее консервативный myb домен (от англ. Myeloblastosis virus)

MYC – семейство транскрипционных факторов, имеющее консервативный myc домен (от англ. Myelocytomatosis oncogenes)

NAC – сборное семейство растительных транскрипционных факторов, в которое входят три группы: NAM (от англ. no apical meristem), ATAF (от англ. Arabidopsis transcription activation factor) and CUC (от англ. cup-shaped cotyledon) транскрипционных факторов

WRKY – семейство транскрипционных факторов, имеющее консервативный домен WRKYGQK

АБК – абсцизовая кислота

АНУ – альфа-нафтилуксусная кислота

АФК – активные формы кислорода

БС – brassinosteroids

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГБ – gibberellin

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖК – jasmonic acids

ЖК-Иле – jasmonat-isoleucin

имиРНК – искусственные микроРНК

ИГ – indolic glucosinolates

МеЖК – метиловый эфир жасмоновой кислоты (метилжасмонат)

миРНК – микроРНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

СК – salicylic acid

ТФ – transcription factors

ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные исследования биологических функций растительной клетки находят широкое практическое применение в различных сферах использования растительных ресурсов, одной из которых является биотехнология и биоинженерия. Среди различных направлений биотехнологии растений, получение ценных метаболитов растительного происхождения на основе клеточных культур-продуцентов становится все более актуальным и перспективным в связи с ухудшением экологической обстановки и общемировой тенденцией к максимальному сохранению природных ресурсов и биоразнообразия (Eibl *et al.*, 2018; Arya *et al.*, 2020). Основной проблемой в данном направлении является низкая продуктивность клеточных культур многих видов растений. Для решения этой проблемы активно используются методы биотехнологии и поиск современных, универсальных и эффективных инструментов генетической инженерии растительной клетки является актуальной задачей в области биотехнологии и физиологии растений. Современные требования к таким инструментам подразумевают высокий активаторный эффект на биосинтез физиологически активных веществ без ущерба для ростовых характеристик (Krasteva *et al.*, 2020).

Эффективные подходы к активации вторичного метаболизма на основе сверхэкспрессии генов ферментов биосинтеза или транскрипционных факторов развивались в предыдущую декаду, и на ряде культур показали свою эффективность. Альтернативным вариантом применения в биотехнологии является современная система методов геномного редактирования на основе использования сайт-направленных нуклеаз, SDN (Graham *et al.*, 2020). Оптимальный вариант использования методов SND – это ингибирование экспрессии какого-либо гена, в результате чего полученный нетрансгенный организм приобретает новые свойства. Таким образом, поиск таргетных генов, кодирующих супрессионные регуляторные

белки, является наиболее актуальным и перспективным направлением в области исследований биотехнологии растительных клеточных культур-продуцентов.

Вторичные метаболиты растений являются важной частью в защитной системе растительной клетки как от биотического, так и от абиотического стрессовых воздействий. Эти соединения часто называют фитоалексинами, поскольку они обладают свойством защиты от фитопатогенов. Вторичные метаболиты нашли широкое применение в фармакологии, а также имеют важное значение для пищевой и косметической промышленности. Но поскольку биосинтез вторичных метаболитов энергозатратный, то стресс-индуцируемая активация их биосинтеза регулируется для обеспечения биохимического равновесия. Искусственно активированная экспрессия генов, кодирующих ферменты вторичного метаболизма, также будет мишенью для регуляторного аппарата, поскольку может нарушить клеточный гомеостаз. Именно гены супрессионных регуляторных белков представляют интерес для биоинженерных манипуляций с перспективой практического применения, поскольку они более тонко регулируют распределение энергии и потока метаболитов между ростовыми и защитными функциями.

Регуляция биосинтеза вторичных метаболитов осуществляется главным образом сигнальной системой жасмоновой кислоты (ЖК). ЖК – растительный стрессовый гормон, биосинтез которого активируется в ответ на некротрофный патогенез; стресс-индуцируемый избыток ЖК запускает каскадный комплекс, который включает биосинтез фитоалексинов. Взаимосвязь гормональных сигнальных систем растительной клетки обуславливает вовлечение ЖК сигнальной системы так же в ответные реакции на абиотические стрессы (Fernández-Calvo *et al.*, 2011). Ключевыми регуляторными элементами ЖК-сигнальной системы являются не так давно открытые супрессионные факторы транскрипции семейства JAZ (Jasmonate ZIM-domain proteins), которые затем были отнесены к более крупному семейству TIFY (семейство содержащие консервативный (TIF[F/Y]XG)

домен). JAZ белки несут супрессионную функцию на манер обратной связи в ЖК-сигнальной системе. Другими словами, JAZ участвуют в поддержании гомеостаза клетки регулируя избыточную продукцию фитоалексинов и других процессов, специфичных для острой ответной реакции. Таким образом, исследование эффекта инактивации супрессоров семейства JAZ на биосинтез фитоалексинов является актуальным направлением биотехнологии растительной клетки, а исследование сопутствующих молекулярных механизмов представляет высокий научный интерес (Vanholme *et al.*, 2007).

На индивидуальных и множественных *jaz*-мутантах арабидопсиса ранее было сделано предположение, что среди 13 изоформ семейства JAZ, именно JAZ1 играет ключевую роль в регуляции вторичного метаболизма (Song *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2018). Растения арабидопсиса продуцирует широкий спектр вторичных метаболитов, включая азот-, серосодержащие соединения (в том числе индольные глюкозинолаты, а также алкалоид камалексин) и фенилпропаноиды (флавонолы и антоцианы). При этом клеточная культура арабидопсиса является монопродуцентом индольных глюкозинолатов (Bulgakov *et al.*, 2016). Наиболее значимым из производных азот-, серосодержащих соединений арабидопсиса является камалексин. Камалексин, помимо антимикробного действия, проявляет высокую ингибиторную активность в отношении опухолевых (но не нормальных) клеток млекопитающих (Pilatova *et al.*, 2013; Chripkova *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018).

Для исследования универсальности подхода к активации вторичного метаболизма посредством ингибирования экспрессии генов JAZ, мы использовали клеточные культуры арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) и винограда (*Vitis vinifera* L.). Использование винограда в качестве объекта позволяет оценить роль ЖК в механизме реализации фенилпропаноидного пути биосинтеза ценного соединения – *транс*-резвератрола. Таким образом, использование двух растительных систем, реализующих различные биосинтетические пути, позволяет

показать эффективность и универсальность биоинженерного подхода активации вторичного метаболизма за счет ингибирования экспрессии супрессоров семейства *JAZ*. Реализация идеи была проведена методом, основанным на природном механизме РНК-интерференции.

Цель и задачи исследования. Цель представленной работы – оценить эффект ингибирования экспрессии генов *JAZ* на вторичный метаболизм и продуктивность клеточных культур винограда и арабидопсиса, а также исследовать сопутствующие молекулярные механизмы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить трансгенные клеточные культуры арабидопсиса и винограда, экспрессия гена *JAZ* в которых ингибирована посредством механизма РНК-интерференции.

2. Изучить эффект ингибирования экспрессии генов *JAZ* на продукцию азот-, серосодержащих соединений в культуре арабидопсиса и *транс*-резвератрола в культуре винограда. Оценить экспрессию генов ферментов биосинтеза и регуляторных ТФ.

3. Оценить активаторный эффект экзогенной ЖК, как имитации биотического стрессового стимула, на биосинтез и продуктивность фитоалексинов в нормальных и *JAZ*-ингибированных клеточных линиях.

4. Оценить активаторный эффект абиотических стрессовых стимулов (низкие температуры и засоление) на биосинтез и продуктивность фитоалексинов в нормальных и *JAZ*-ингибированных клеточных линиях.

5. Оценить экспрессию маркерных генов основных сигнальных систем растительной клетки (АБК, ЖК и АФК), для выявления их взаимодействия и участия в конститутивной активации ЖК-сигнальной системы, опосредованной ингибированием экспрессии гена *JAZ*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ингибирование экспрессии генов *AtJAZ1* и *VvJAZ9* посредством РНК-интерференции в клеточных культурах *A. thaliana* и *V. vinifera*, приводит к активации биосинтеза камалексина и *транс*-резвератрола, соответственно.

2. Ингибирование экспрессии генов *AtJAZ1* и его гомолога *VvJAZ9* в клеточных культурах арабидопсиса и винограда, соответственно, имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов без значительного ингибирования роста, характерного для природного ЖК-опосредованного ответа.

3. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клетках арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина, а также обеспечивает устойчивость клеточной культуры к холодовому стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной.

4. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: *ICE1*, *MYC2*, *ZAT12*, группы генов *DREB*, *HSF*, *ABF*, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК.

5. Ингибирование экспрессии генов *JAZ* является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

Научная новизна и практическая значимость.

Впервые показано, что индивидуальное ингибирование экспрессии гена *JAZ1* и его гомолога значительно активирует биосинтез вторичных метаболитов в клеточных культурах растений без ущерба ростовым характеристикам, что обеспечивает высокую продуктивность клеточных линий.

Полученные в работе результаты могут быть использованы в области биотехнологического производства фармакологически значимых соединений на основе клеточных культур растений. Кроме того, возможно использование результатов диссертационной работы для проведения теоретических и практических занятий в университете на биологических факультетах.

Личный вклад автора

Большая часть экспериментальной работы выполнена лично автором диссертационной работы; такие работы включают в себя создание генетических конструкций *in silico* и *in vitro*, трансформация и селекция клеточных культур, выделение РНК и обратная транскрипция, анализ экспрессии генов методом ПЦР-РВ, анализ полученных данных и написание статей. Поддержанием клеточных культур в длительном промежутке времени занималась Галина Кирилловна Чернодед. Анализом качественного и количественного содержания вторичных метаболитов занималась Григорчук Валерия Петровна. В процессе молекулярно-биологических работ принимали участие к.б.н. Веремейчик Галина Николаевна, к.б.н. Шкрыль Юрий Николаевич. Также в написании работ и анализе данных принимали участие чл.-корр., д.б.н. Булгаков Виктор Павлович, к.б.н. Шкрыль Юрий Николаевич, к.б.н. Веремейчик Галина Николаевна.

Апробация работы и публикации.

Материалы диссертации изложены в 5 публикациях, из них 2 в журналах из списка ВАК (2 публикации из списка WoS/Scopus). Одна публикация из списка

РИНЦ, и 2 тезисов конференций. Результаты работы представлены на следующих конференциях: XVI Всероссийская молодёжная школа-конференция памяти В.Е. Васьковского (Владивосток, 2017 год), Международная научно-практическая конференция «Вопросы современных научных исследований» (Москва, 2019 год).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 142 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и содержит 3 таблицы. Список литературы насчитывает 232 наименования.

Благодарности. Автор искренне благодарит научного руководителя к.б.н. Веремейчик Галину Николаевну и чл.-корр., д.б.н. Булгакова Виктора Павловича за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Также автор выражает глубочайшую признательность сотрудникам лабораториям биоинженерии, клеточной биологии и биологии развития, бионанотехнологий и биомедицины, ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН за поддержку. Неоценимый вклад в обучение, работу и анализ данных внес к.б.н. Шкрыль Юрий Николаевич. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (18-34-00500), РФФ (20-16-00016).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Клеточные культуры растений как альтернативный источник вторичных метаболитов

Человечество использовало в течение всей своей истории растения в качестве основного источника фитохимических соединений в пищевых, лечебных, культурных и косметических целях (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018). В настоящее время достижения устойчивого развития, глобальное изменение климата, ограниченный доступ к пресной воде, ограниченное снабжение продовольствием и растущие потребности в энергии являются одними из важнейших глобальных проблем, с которыми сталкивается человечество. Технология культивирования клеток растений может решить некоторые из этих проблем, предоставляя эффективные и устойчивые источники фитоингредиентов с уменьшенными энергетическим и углеродным следами (Krasteva *et al.*, 2021).

1.1.1. Клеточные культуры растений

На сегодняшний день выращивание культур клеток растений, тканей и органов в контролируемой асептической среде известная и широко используемая технология получения биологически активных вторичных метаболитов растительного происхождения для нужд фармацевтики (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Данная область науки берет начало от идей немецкого ученого Хаберландта, появившихся в начале XX века. Ранние исследования показали возможность культивирования корней, создания культур эмбрионов и первых культур недифференцированных растительных клеток. Период между 1940-ми и 1960-ми годами был отмечен разработкой новых технологий и усовершенствованием уже используемых. Вскоре доступность этих методов привела к применению клеточных культур в различных областях, а именно: изучение поведения клеток (включая цитологию, метаболизм, морфогенез, эмбриогенез и патологию), модификация растений, хранение зародышевой плазмы, микрклональное

размножение и создание технологий получения вторичных метаболитов, начиная с середины 1960-х годов. В последующие годы новые методы молекулярной биологии позволили подойти к созданию различных клеточных культур большого числа растений, а также генно-модифицированных культур (Thorpe, 2007).

Исследования самого механизма дедифференцировки растительных клеток получило самый большой импульс после открытия фитогормонов. В 1950-х годах идентификация фитогормона, цитокинина, резко изменила стратегии культивирования тканей растений. Используя клеточную культуру табака на питательной среде в присутствии ауксина, индолилуксусной кислоты (ИУК), Скут и его коллеги выделили первый известный цитокинин, кинетин, как вещество, способствующее делению клеток. Изучение влияния различных концентраций ИУК и кинетина на культуру ткани табака показало, что и кинетин, и ИУК необходимы для стимуляции пролиферации клеток. Кроме того, различные соотношения концентраций кинетина к концентрациям ИУК приводили к различным последствиям: к образованию побегов и корней или стимулировался неорганизованный рост клеточной массы (Amasino, 2005). В последующей работе кинетин, ИУК и другие цитокинины и ауксины были протестированы в различных системах культур тканей и на различных видах растений, и во многих случаях наблюдались практически аналогичные эффекты. Эти исследования показали, что баланс фитогормонов, особенно цитокинина и ауксина, является основным фактором, определяющим пролиферацию и морфогенез клеток в культуре тканей растений. В то время как применение фитогормонов стало широко распространенным в тканевых культурах, термин «каллус», первоначально использовавшийся для группы пролиферирующих клеток, образующихся во время заживления ран растения, был расширен, для того чтобы включить в него неорганизованные массы делящихся клеток, индуцированных и поддерживаемых в присутствии экзогенных фитогормонов (Sugiyama, 2015).

В процессе исследования растительных культур были разграничены понятия о типах культур. Культуры клеток одного растения, например, простая каллусная раневая ткань, либо искусственная клеточная культура, которая существует только под действием экзогенных гормонов, имеют существенные различия, как по метаболическим, так и по ростовым параметрам. Тип клеточной культуры зависит от следующих параметров: питательная среда, добавление гормонов, насколько полно прошла дифференцировка, имеет ли культура органогенный потенциал, стабильность клеточной линии, источник первоначальной ткани для создания культуры. Питательная среда может быть различна не только по составу веществ, но и по плотности, если среда жидкая, то получившиеся культуры называют суспензионными. Первоначальный источник ткани также важен и влияет на количество вторичных метаболитов, ростовые характеристики и морфогенность (Evans *et al.*, 2020).

Также существуют множество методов регенерации растений из клеточных культур, широко используемых для размножения редких растений, поддержания генетической стабильности, оздоровления и генетической трансформации (Evans *et al.*, 2020). Стоит отметить еще один важный для исследования тип культур – культуру протопластов. Протопласты можно выделить из различных тканей цельного растения и из культур тканей растений, таких как каллусные и суспензионные культуры. Удаление клеточной стенки для выделения протопластов достигается механически и с использованием ферментативного расщепления. Выделение протопластов путем ферментативного расщепления клеточной стенки на основе комбинации целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ было впервые предложено Э. К. Кокингом в 1960 году и является общепринятым методом. Протопласты — это одноклеточная система, которая используется как для фундаментальных исследований (метаболизма, фотосинтеза и др.), так и для прикладной науки о растениях (Evans *et al.*, 2020).

1.1.2. Группы вторичных метаболитов и их применение

Один из наиболее значимых вариантов практического использования клеточных культур растений – альтернативный источник получения вторичных метаболитов. У разных видов растений идентифицировано несколько десятков тысяч вторичных метаболитов, которые можно разделить (в зависимости от пути их синтеза) на три категории: терпены и терпеноиды, азот-, серосодержащие соединения и фенольные соединения (Anand *et al.*, 2019).

Терпеноиды, так же известные как изопреноиды, представляют собой, пожалуй, самый разнообразный класс природных соединений; их химическое разнообразие представлено более чем 40000 различными структурами. Биосинтез и накопление терпеноидов в растениях зависит от различных стрессовых факторов (Boncan *et al.*, 2020). Терпеноиды условно делят на первичные и вторичные; биологически активные свойства вторичных терпеноидов представляют наибольший интерес. Терпеноиды выполняют множество физиологических функций в живых клетках, а также имеют огромное значение для пищевой и фармакологической промышленности: их используют в качестве усилителей вкуса и цвета, лекарственных препаратов и для нужд сельского хозяйства (Withers and Keasling, 2007). Для широкого спектра терпеноидов была показана фармакологическая активность против таких заболеваний человека, как рак (паклитаксел из *Taxus spp.* L.; винкристин и винбластин из *Catharanthus roseus* L.), малярия (артемизинин из *Artemisia annua* L.) и ВИЧ (кумарины, включая каланолид А из *Calophyllum lanigerum* L.) (Yang *et al.*, 2020). Из природных источников терпеноидные соединения чаще всего получают с низким выходом, поэтому культуры растительных клеток были исследованы в качестве альтернативной стратегии производства. Метаболическая инженерия растений и культур растительных клеток является эффективным инструментом как для увеличения продукции терпеноидов, так и для изменения распределения терпеноидов для достижения желаемых свойств, таких как усиление вкуса, аромата или цвета

(Roberts, 2007). Наиболее яркими примерами коммерческих проектов, основанных на клеточных культурах растений как источнике терпеновых соединений являются: получение гинзенозидов в культуре женьшеня (*Panax ginseng* C. A. Mey.) на базе производств компаний Nitto Denko Corp. (Япония) и Unhwa Corp. (Корея), в качестве добавок в пищу и напитки, а также в косметических целях (Lange, 2018). Производство таксола и винкристина будет описано ниже, так как данные соединения относят к смежной группе вторичных метаболитов - терпеноидсодержащих алкалоидов.

Азот-, серосодержащие соединения являются наиболее важной и интересной в прикладном плане группой вторичных метаболитов. Данные соединения включают в себя группу алкалоидов – биологически активных разнообразных веществ, используемых в медицине и в рекреационных активностях. Алкалоиды включают более 150 семейств и встречаются примерно в 20% видов сосудистых растений, в таких семействах, как Magnoliaceae, Solanaceae, Papaveraceae, Leguminosae, Ranunculaceae, Rubiaceae и Aprocynaceae. Алкалоидные виды растений могут содержать один или несколько алкалоидов. Несмотря на то, что алкалоиды обычно находятся в группе азот-, серосодержащих соединений и отличны от терпенов, их биосинтетические пути пересекаются, что обуславливает присутствие в основном углеродном скелете некоторых алкалоидов компонентов, полученных из терпенового пути. Например, *C. roseus* содержит 130 терпеноидных индольных алкалоидов, включая противоопухолевый винбластин, и их биосинтез может регулироваться несколькими путями (Patra *et al.*, 2013). Алкалоиды могут накапливаться в различных частях растений, включая листья, эпидермальные и гиподермальные клетки, оболочки пучков и в сосудах. Алкалоиды обычно синтезируются из одной из аминокислот – лизин, тирозин или триптофан и чаще всего встречаются в растениях в виде солей органических кислот, в то время как некоторые основные алкалоиды, такие как никотин, встречаются в свободной форме (Ramawat *et al.*, 2009). Часто алкалоиды синтезируются в одном органе растения, но накапливаются в другом. Например, в табаке никотин синтезируется

в корнях, но транспортируется в листья и накапливается в них (Morita *et al.*, 2009). Алкалоиды можно разделить на три подкласса: протоалкалоиды, истинные алкалоиды и атипичные алкалоиды. Протоалкалоиды и истинные алкалоиды синтезируются непосредственно из аминокислот, в то время как предшественником для атипичных алкалоидов являются соединения, отличные от аминокислот, например, терпеноидсодержащие алкалоиды (Singh, 2018).

Наиболее известное соединение в ряду алкалоидов и имеющее самый большой коммерческий потенциал – таксол. Обладая выраженными противораковыми свойствами, таксол стал объектом интереса фармацевтических компаний. Однако, для получения 1 г таксола на основе экстракции коры тиса тихоокеанского (*Taxus brevifolia* Nutt.) необходимо 10 кг коры, что приведет к гибели 3х деревьев. При этом, такого количества будет недостаточно для курсового лечения даже одного пациента. Учитывая, что *T. brevifolia* – одно из самых медленнорастущих деревьев в мире. (Żwawiak and Zaprutko, 2014), использование клеточных культур на данный момент для производства таксола является более оправданным. Такое производство осуществляется на базе следующих компаний: Phyton Biotech Inc. (США/Германия), Bristol-Myers Squibb (США), Samyang Biopharm (Корея). Другое соединение – берберин, обладающее широким спектром биологических активностей (Imenshahidi and Hosseinzadeh, 2019), на данный момент на стадии коммерциализации также производится на основе клеточных культур растения коптис японский (*Coptis japonica* Makino) предприятием Mitsui Chemicals Inc. (Япония) (Lange, 2018).

Растения производят большое количество вторичных метаболитов, содержащих фенольную группу: одну или несколько гидроксильных функциональных групп на бензольных кольцах (Randhir *et al.*, 2004). Эти вещества классифицируются как фенольные соединения. Структура этих фенольных соединений может варьироваться от простой фенольной молекулы до сложного высокомолекулярного полимера (Velderrain-Rodriguez *et al.*, 2014). Фенольные

соединения обнаружены почти во всем царстве растений и почти во всех частях растений, и делятся условно на несколько подгрупп, таких как: фенольные кислоты, гидрокоричные кислоты, танины, стильбены, лигнины, антоцианы, флавоноиды, изофлавоны и другие (Singh, 2018). Как и другие вторичные метаболиты, фенольные соединения растений синтезируются по большей части в ответ на внешние стимулы и обладают противомикробной и антиоксидантной активностью. Кроме того, антоцианы, пигменты различных цветов используются в пищевой промышленности как натуральные пищевые красители. Благодаря высоким антиоксидантным свойствам фенольные соединения исследуются, используются и производятся на основе клеточных культур растений. Так, например, на базе компании Diana Plant Sciences (США) получают полифенольный экстракт из культуры черники (*Vaccinium sp. L.*) (Lange, 2018). Одно из самых известных соединений описанной группы – *транс*-резвератрол, обладает огромным списком биологических активностей, его производство на данный момент стало полностью синтетическим. Однако не все фенольные соединения привлекают столь пристальное внимание химической промышленности, и исследования, направленные на получение клеточных культур-продуцентов полифенолов, имеют прикладное значение (Dias *et al.*, 2016).

На данный момент общее число производств вторичных метаболитов составляет небольшое количество. Однако, исходя из текущих трендов в природопользовании, уменьшению негативного влияния химической промышленности на окружающую среду, увеличению востребованности экопродуктов и другим значимым изменениям в потреблении, клеточные культуры растений являются одним из наиболее привлекательных способов получения метаболитов для использования не только в медицинских целях, но и в пищевых и косметических (Eibl *et al.*, 2018; Arya *et al.*, 2020; Krasteva *et al.*, 2021).

1.1.3. Регуляция биосинтеза вторичных метаболитов

Фармакологические свойства соединений растительного происхождения обусловлены их ролью в физиологии растений. Вторичные метаболиты растений не играют значительной роли в поддержании основных жизненных процессов растений. Однако они крайне важны во взаимодействии растения с окружающей средой, в защите от неблагоприятных условий, реакции на атаку патогенов, и как следствие в адаптации растений к окружающей среде (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Существует множество известных примеров вторичных метаболитов растений и их роль в адаптации к неблагоприятным условиям была установлена. Лимонен (терпен) цитрусовых токсичен по отношению к муравьям-листорезам, которые атакуют растение (dos Santos *et al.*, 2013). Капсаицин (алкалоид) семейства перечных активировать болевые рецепторы травоядных животных, тем самым защищая семена от повреждения (Tewksbury and Nabhan, 2001). Пиносильвин (полифенол) винограда подавляет рост грибка (Seppänen *et al.*, 2004). Метаболиты растений способные к подавлению патогена называют фитоалексинами. Необходимо упомянуть другие вторичные метаболиты – фитоантиципины. Различие между данными видами защитных соединений выражено в механизме действия. Если фитоалексины уже готовы к взаимодействию с патогеном, то фитоантиципины нуждаются в дополнительной реакции, которая активировать их действие. Пример фитоантиципина – глюкозинолаты растений и другие метаболиты, содержащие остаток сахара и биологически активную функциональную группу, связь между которыми разрывается бетаглюкозидазой в опасный для растения момент, высвобождая агликон (например, изотиоцианат) которые в свою очередь токсичен для патогена (Morant *et al.*, 2008).

Продукция вторичных метаболитов в нативном растении очень низкая (обычно менее 1% от сухой массы) и в основном зависит от физиологического состояния и стадии развития растения (Dixon, 2001). Собственно, увеличение

продукции и накопления вторичных метаболитов происходит в растениях, когда они подвергаются различным стрессам, детектируя сигналы окружающей среды. Данные сигналы могут иметь различную природу: физическую (например, изменение температуры или осмоса) или химическую (например, фитогормоны, элиситоры) (Radman *et al.*, 2003). Гормональная система растений воспринимает сигналы и запускает механизм адаптации растения к среде, в том числе и биосинтез определенной группы вторичных метаболитов.

На данный момент открыты различные фитогормоны, регулирующие в основном ответ растения на биотические или абиотические стрессы, такие как: салициловая (СК), абсцизовая (АБК) и жасмоновая кислоты (ЖК), гиббереллин (ГБ), брассиностероиды (БС). Ключевое значение в гормональных путях имеют не отдельные гормональные пути, а взаимодействия между сигнальными путями гормонов растений, которые и способствуют поддержанию баланса между ростом растений и защитой (Huot *et al.*, 2014). Чтобы выживать и размножаться, растения должны не только поддерживать рост, но и противостоять патогенным инфекциям. Таким образом, баланс между ростом растений и защитой имеет важное экологическое, сельскохозяйственное и экономическое значение. Когда растения подвергаются атаке патогена, быстро активируется СК, ЖК и другие сигнальные пути гормонов растений. В то же время сигнальные пути ауксина, БС и ГБ, связанные с ростом растений, подавляются (Dou and Zhou, 2012). Изменения количества и состава гормонов, связанных со стрессом, способствуют более точной, по отношению к виду патогена, защитной реакции растений (Xie *et al.*, 2016). Когда растения подвергаются биотическому стрессу пути передачи сигналов СК, ЖК, ГБ, БС и других гормонов растений имеют определенную устойчивость или, другими словами, амплитуду. Гормональные пути взаимодействуют друг с другом, уменьшая или увеличивая сигналы друг друга (Pieterse *et al.*, 2012). Передача сигналов СК в основном участвует в устойчивости против биотрофных патогенов, тогда как передача сигналов ЖК в основном способствует к увеличению устойчивости против некротрофных патогенов или в некротрофической стадии

гемибиотрофных патогенов (Spoel *et al.*, 2007). Взаимодействие между сигнальными путями ГБ и ЖК играют важную роль в балансе между ростом растений и защите от биотических и абиотических стрессов (Hou *et al.*, 2013; Davière and Achard, 2016). ГБ регулирует многие аспекты роста растений, а ЖК играет важную роль в реакции на стресс. Сигнальные пути АБК и ЖК вместе координируют ответ растений на повреждение тканей насекомыми, препятствуя росту и развитию растений, активируя защитные реакции (Chen *et al.*, 2011).

В последние десятилетия путь передачи сигналов ЖК активно исследовался, но текущее понимание его роли в ответе на различные стрессовые факторы окружающей среды ограничено из-за сложных сетей взаимодействия между множественными стрессами и множественными путями передачи сигналов. До сих пор молекулярный механизм передачи сигналов ЖК в ответах на стресс остается не до конца изученным. Кроме того, в клеточной мембране присутствует множество специфических рецепторов и различные стрессы окружающей среды могут активировать сразу несколько ферментов с последующей активацией вторичных мессенджеров, таких как Ca^{2+} и изменением экспрессии нижестоящих генов. В настоящее время все еще остается много вопросов и пробелов в понимании перекрестных взаимодействий между ЖК и другими гормонами в ответах растений на стресс. Однако можно с уверенностью сказать, что баланс между ростом растений и защитными реакциями зависит от взаимодействия между различными гормональными сигнальными путями и невозможно регулировать избирательно только один компонент данной системы; при изменении одного компонента, влияние будет оказано на большое количество метаболических и ростовых параметров растения, его устойчивость к абиотическим и биотическим стрессам (Yang *et al.*, 2019).

1.2. Роль сигнальной системы жасмоновой кислоты в регуляции вторичного метаболизма

Растения живут в постоянно меняющейся среде, которая часто неблагоприятна в виду регулярных стрессовых воздействий. Эти неблагоприятные условия окружающей среды включают две группы стрессовых факторов: биотические, такие как инфекция патогенными микроорганизмами и нападения травоядных; и абиотические, такие как дефицит воды, экстремальные температуры, дефицит питательных веществ и избыток соли или токсичных металлов, таких как алюминий, арсенат и кадмий, в почве. Засуха, соль и температурный стресс являются основными экологическими факторами, которые влияют на географическое распространение растений в природе, ограничивают продуктивность растений в сельском хозяйстве и угрожают продовольственной безопасности. Неблагоприятные последствия этих абиотических стрессов усугубляются изменением климата, которое, как было предсказано, приведет к увеличению частоты экстремальных погодных явлений (Fedoroff *et al.*, 2010). То, как растения воспринимают сигналы стресса и адаптируются к неблагоприятным условиям окружающей среды, является фундаментальными биологическими вопросами. Кроме того, повышение устойчивости растений к стрессу имеет решающее значение для продуктивности сельского хозяйства, а также для экологической устойчивости, поскольку культуры с низкой устойчивостью к негативным факторам потребляют слишком много воды и удобрений и, таким образом, создают большую нагрузку на окружающую среду.

1.2.1. История и функции ЖК

Жасмоновая кислота и её различные производные представляют собой сигнальные соединения, которые участвуют в регуляции различных процессов в растениях, включая рост, фотосинтез, репродуктивное развитие и реакцию на абиотические и биотические стрессы, такие как защита от травоядных и патогенов. ЖК обнаружили не так давно по сравнению с другими гормонами, такими как:

ауксин, абсцизовая кислота, цитокинин, гибберелловая кислота и этилен. Как сигнальные молекулы, ЖК регулируют экспрессию множества генов в ответ на абиотические стрессы (например, соль, засуха, тяжелые металлы, токсичность микронутриентов, низкая температура) и биотические (патогенные грибы и бактерии, травоядные животные) стрессы (Wasternack, 2007).

Первыми жасмонатами, которые были обнаружены, были метаболиты ЖК, такие как, сложные эфиры гидрокси-жасмона хризантемовой кислоты, выделенных из *Chrysanthemum cinerariifolium* (Sch.Bip.) (Crombie and Elliott, 1961). Однако активные жасмонаты впервые были выделены в начале 1960-х годов, в первую очередь метилжасмонат (МеЖК), который первоначально был обнаружен как летучее вещество, выделяемое цветами жасмина (*Jasminum grandiflorum* L.) (Demole *et al.*, 1962). В течение десятилетия после первоначальной идентификации некоторые из этих соединений были химически синтезированы, их структуры были выяснены, и были опубликованы первые доказательства того, что некоторые из них обладают свойствами ингибирования роста (Aldridge *et al.*, 1971). Было выделено и идентифицировано множество различных производных жасмоновых кислоты, однако только в 2009 главный рецептор жасмонового пути был кристаллизован и методами рентгеноструктурного анализа были получены данные о том, какое именно производное жасмоновой кислоты является лигандом к этому рецептору, и им является (+)-7-изо-ЖК-изолейцин (ЖК-Иле) (Fonseca *et al.*, 2009).

С момента открытия того факта что жасмоновая кислота и её производные способны ингибировать рост растений, было показано большое количество функций и механизмов, в которых ЖК играет, как и непосредственное значение, так и может являться связующим звеном между различными гормональными путями. Консервативная, но гибкая организация этой сигнальной системы согласуется с замечательным спектром защитных свойств, регулируемых ЖК, а также с растущими доказательствами того, что гормон играет критическую роль в обеспечении устойчивости растений как к биотическим стрессам (Wang *et al.*, 2021)

так и ко многим абиотическим, включая высокую засоленность, засуху и перепады температур (Kazan, 2015; Hu *et al.*, 2016). Интересно, что функция жасмонатов не ограничивается повышением устойчивости к стрессам, но действует на различные регуляторные механизмы роста и размножения растений, которые также являются неотъемлемой частью устойчивости к стрессу (Browse, 2009; Wasternack and Hause, 2013) (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Биологические функции сигнальной системы жасмоновой кислоты.

1.2.2. Сигнальная система жасмоновой кислоты

Биосинтез ЖК хорошо охарактеризован у множества однодольных и двудольных растений. ЖК синтезируется в результате последовательного действия ферментов, присутствующих в различных органеллах растения: в пластиде, пероксисоме и цитоплазме (Рисунок 2). Абиотические и биотические стимулы активируют фосфолипазы в пластидной мембране, способствуя синтезу линоленовой кислоты в растении. Линоленовая кислота, предшественник в процессе биосинтеза ЖК, превращается в 12-оксофитодиеновую кислоту посредством оксигенации липоксигеназой (LOX), алленоксид-синтазой (AOS) и алленоксидциклазой (АОС). Затем ЖК синтезируется из 12-оксофитодиеновой кислоты под действием редуктазы 12-оксофитодиеновой кислоты (OPR) и 3 циклами бета-окисления жирных кислот. Таким образом, путь биосинтеза ЖК известен как путь октадеканойдов. В цитозоле метаболические пути ЖК превращают фитогормон в более чем 30 различных активных и неактивных

производных, в зависимости от химической модификации группы карбоновой кислоты, боковой цепи пентенила или пентанонового кольца. Среди ряда метаболитов можно перечислить – свободные ЖК, цис-жасмонат, метилжасмонат и жасмонат-изолейцин которые считаются основными формами биоактивных жасмоновых кислот в растениях. Летучий метилжасмонат, который является сигналом для окружающих растений, продуцируется из жасмоновой кислоты под действием ЖК-карбоксилметилтрансферазы. Фермент JAR1 катализирует обратимое превращение между жасмоновой кислотой и жасмонат-изолейцином (Wasternack and Hause, 2013).

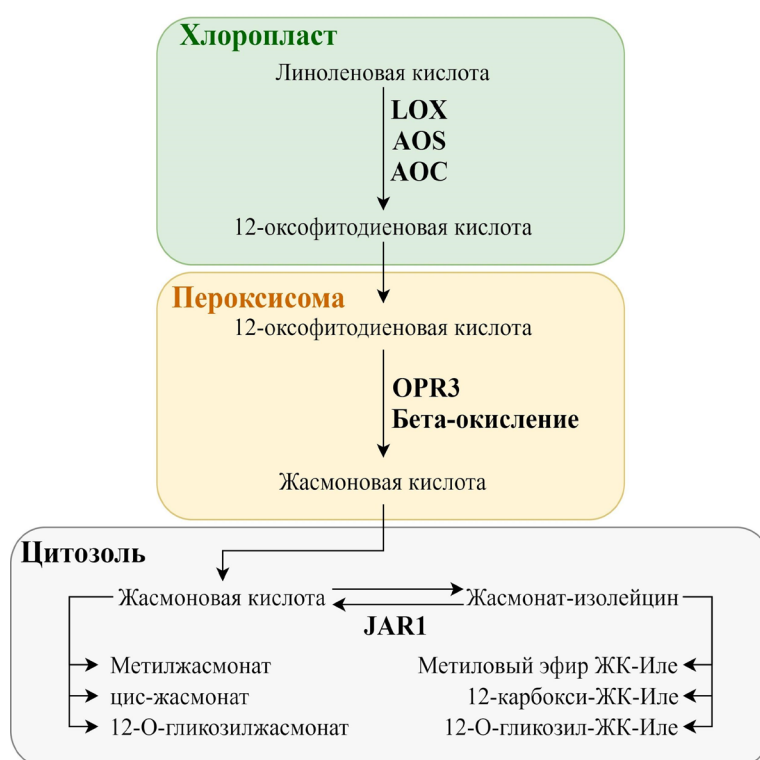


Рисунок 2 – Путь биосинтеза жасмоновой кислоты и её производных. LOX – липоксигеназа; AOS – алленоксид-синтаза; AOC – алленоксидциклаза; OPR3 – оксофитодиеноат-редуктаза 3; JAR1 – Жасмоноил-L-амино-синтетаза 1.

Хотя гормональные реакции важны для адаптации растений, эти реакции в определенные моменты могут быть вредными для растения, если не прекращены вовремя, например, когда угрозы больше нет или, когда необходимо уделять ресурсы организма на ответы на другие стрессы. Реакции, запускаемые ЖК

антагонистически связаны с ростом и репродуктивной функцией растения (Navko *et al.*, 2016). Соответственно, индуцибельные факторы транскрипции, такие как MYC, которые вызывают ответы на стресс, должны быть активны только в течение определенных периодов после индукции. Подобная функциональность обеспечивается петлями отрицательной обратной связи, которые работают со встроенными временными задержками, включая отрицательные регуляторы, выработка которых стимулируется индуцибельными факторами транскрипции (Renner and Schmitz, 2009). Опосредованные жасмонатом транскрипционные ответы тесно связаны с накоплением жасмоновых кислот, в особенности с жасмонат-изолейцином как молекулярного триггера передачи сигналов. Важной чертой данной системы является его быстрое накопление (время накопления ранжируется от секунд до минут) в ответ на повреждение ткани или другие типы стресса (Glauser *et al.*, 2008). Транспорт и катаболизм сигнальных молекул жасмонового пути в последние десятилетия был хорошо изучен. Была показана целая метаболическая сеть, катализирующая биоактивные жасмонаты, используя ферменты цитохрома P450, аминогидролаз и ЖК-оксидазы (Koo and Howe, 2009; Koo and Howe, 2012; Heitz *et al.*, 2016). Превращение ЖК в летучий метилжасмонат с помощью ЖК-карбоксилметилтрансферазы обеспечивает другой метаболический путь уменьшения концентрации ЖК и, таким образом, снижения накопления ЖК-Иле (Stitz *et al.*, 2011).

В дополнение к этой сложной метаболической системе для поддержания гомеостаза различных жасмоновых кислот, существует молекулярные транспортные механизмы для перемещения ЖК внутри и между клетками растения. Кроме стандартных путей перемещения веществ в растении, а также при помощи летучести соединений, на молекулярном уровне важнейшей частью этой системы является транспортер JAT1 ответственный за перемещение не только ЖК-Иле, но и других производных ЖК (Li *et al.*, 2017).

1.2.3. Роль JAZ во взаимодействии сигнальной системы ЖК с другими сигнальными системами растительной клетки

После получения клеткой жасмоновых кислот путем биосинтеза, либо от клетки к клетке, либо по воздуху – запускается системный ответ растения. Вкратце это происходит следующим образом: комплекс SCF^{COI1} соединяясь с ЖК-Иле убиквитинилирует репрессоры семейства JAZ, которые в свою очередь освобождают транскрипционные факторы, меняя экспрессию соответствующих их доменам генов, тем самым регулируя метаболический статус и/или развитие растения (Howe *et al.*, 2018) (Рисунок 3).

Первая часть этого механизма – транспорт в ядро. При стрессовой стимуляции ЖК подвергается биохимическим реакциям с образованием ЖК-Иле, который накапливается в цитоплазме стрессированных клеток. ЖК-Иле транспортируется к ядру и к другим клеткам для защитных реакций. У арабидопсиса субклеточная локализация ЖК регулируется высокоаффинным транспортером, белком-переносчиком жасмоновой кислоты 1 (AtJAT1, также известным как AtABCG16). И плазматическая мембрана, и ядерная мембрана растительных клеток содержат JAT1, через который ЖК или ЖК-Иле экспортируется из цитоплазмы в ядро и апопласт. Следовательно, динамика ЖК или ЖК-Иле в цитоплазме, ядре и апопласте регулируется JAT1 во время стресса (Li *et al.*, 2017).

Специфическая для растений группа белков JAZ играет решающую роль в подавлении активности факторов транскрипции связанных с жасмоновым сигнальным путем. Белки JAZ принадлежат к большому семейству белков TIFY, названному благодаря присутствию высококонсервативного мотива TIF[F/Y]XG (Vanholme *et al.*, 2007). Репрессоры JAZ отличаются от других белков TIFY наличием 27-аминокислотного многофункционального мотива Jas, расположенного рядом с С-концом. Межвидовая изменчивость количества генов JAZ, которая колеблется от одного у *Marchantia polymorpha* L. до более 20 у многих

высших растений, отражает события полногеномной и тандемной дупликации, которые привели к функциональному разнообразию и избыточности в этом быстро развивающемся семействе генов (Bai *et al.*, 2011). Геном арабидопсиса кодирует 13 белков JAZ (JAZ1 – JAZ13), которые подразделяются на 5 филогенетических групп (I – V) (Thireault *et al.*, 2015). Когда клеточные уровни ЖК-Иле ниже пороговой концентрации, мотив Jas принимает расширенную конформацию α -спирали, которая связывается с JAZ-взаимодействующим доменом (JID) около N-конца главной мишени и ТФ жасмонового пути белка MYC. Структурный и биохимический анализы показывают, что домен Jas конкурентно ингибирует связывание MYC с активаторным взаимодействующим доменом (ACID) MED25 комплекса Mediator, который представляет собой эволюционно консервативный мультибелковый комплекс, связывающий ДНК-связанные факторы транскрипции и РНК-полимеразу II, и интегрирует транскрипцию с широким спектром клеточных сигналов (Zhang *et al.*, 2015). Белки JAZ также ослабляют активность MYC за счет связывания белка TOPLESS (TPL), который подавляет экспрессию генов за счет взаимодействия с гистонами, ферментами, модифицирующими хроматин, такие как гистондеацетилаза (HDA) (Ke *et al.*, 2015). TPL и связанные с TPL белки (TPR) специфически взаимодействуют с мотивом EAR, обнаруженными на широком спектре репрессоров транскрипции (Causier *et al.*, 2012). Домен TIFY (ZIM) большинства JAZ связывает TPL или TPR белки косвенно через адаптерный белок NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA), содержащий мотив EAR. Роль TPL как общего репрессора экспрессии генов, вместе со способностью белков TIFY, отличных от JAZ, рекрутировать комплексы NINJA-TPL через мотив TIFY (ZIM), указывает на то, что эти корепрессорные модули не специфичны для передачи сигналов жасмоната, но, вероятно, они являются общими для различных транскрипционных комплексов (Howe *et al.*, 2018).

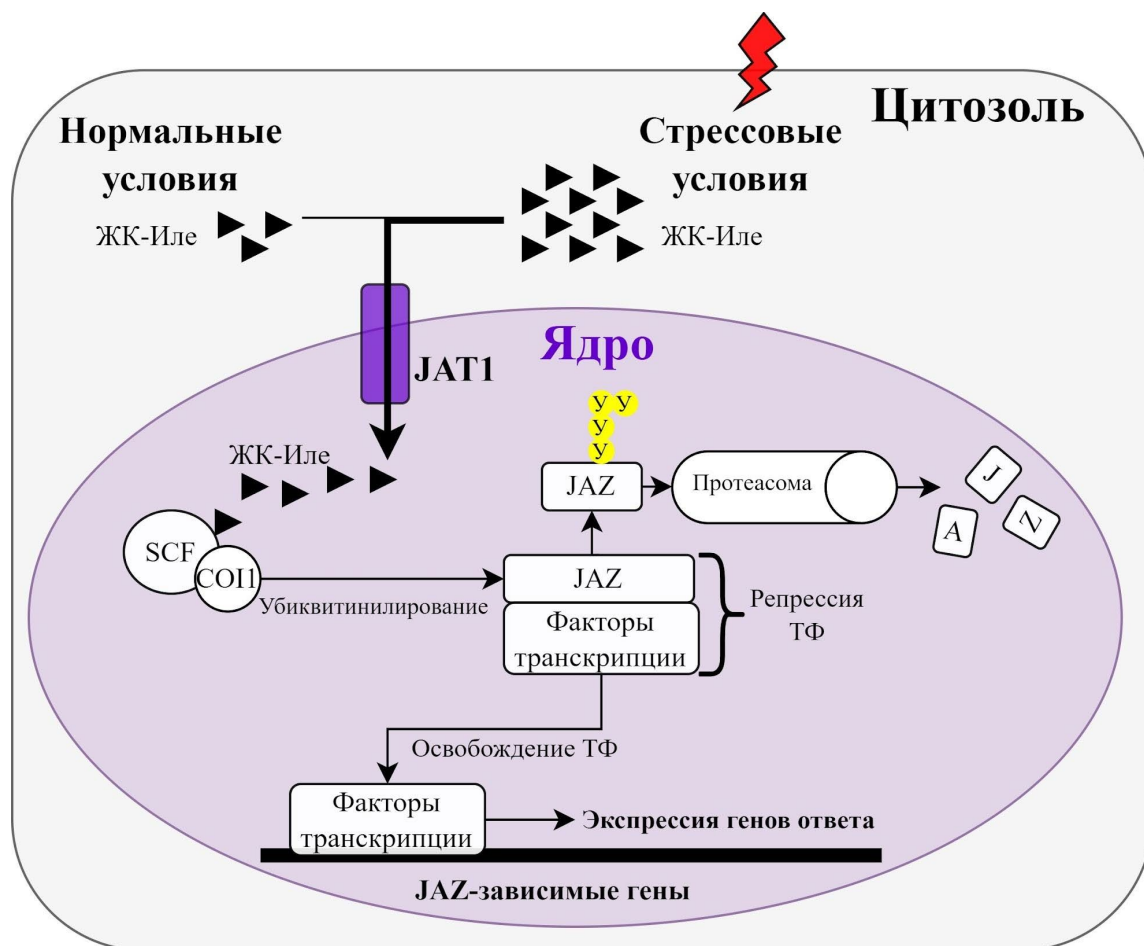


Рисунок 3 – Молекулярный механизм жасмонового сигналинга. В нормальных условиях, белки JAZ связывают факторы транскрипции генов ответа на стресс. При стрессовых условиях возрастает уровень ЖК-Иле, который транспортируется в ядро посредством транспортера JAT1 (транспортер жасмоната 1). ЖК-Иле взаимодействует с SCF^{COI1}, данный комплекс убиквитинилирует белки JAZ, которые затем подвергаются протеасомной деградации. Освободившиеся факторы транскрипции связываются с соответствующими сайтами на хромосомной ДНК, тем самым запуская экспрессию генов ответа.

Критическим этапом в передаче сигнала, является протеолитическое разрушение белков репрессоров JAZ, которое эффективно превращает JAZ-связанные ТФ в активаторы транскрипции. Первый шаг в этой цепи событий включает гормон-зависимое образование корцепторного комплекса, состоящего

из ЖК-Иле, JAZ и F-бокса белка CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1). COI1 является компонентом комплекса E3 убиквитин-лигазы SKP1-CUL1-F-box protein (SCF), специфически взаимодействует со своими субстратами белками JAZ в присутствии ЖК-Иле (Yan *et al.*, 2009). Трехмерная структура корцепторного комплекса COI1-JAZ показала, что мотив Jas (в составе белка JAZ) имеет структуру, в которой короткая консервативная последовательность, названная degron, на N-конце образует петлю, захватывает ЖК-Иле в область связывания лиганда, таким образом формируя стабильный тройной комплекс COI1-ЖК-Иле-JAZ (Sheard *et al.*, 2010). Белки JAZ, которые попадают в комплекс SCF^{COI1} данным гормонозависимым образом, маркируются полиубиквитиновыми цепями и впоследствии разрушаются протеасомой 26S. Сам белок COI1 подвергается множеству уровней регуляции, включая прямую ассоциацию с важным кофактором полифосфата инозита (Mosblech *et al.*, 2011) и регулируемый протеолиз (Yan *et al.*, 2013). ЖК-Иле-индуцированная деструкция JAZ с помощью SCF^{COI1}-протеасомной системы обеспечивает эффективный механизм диссоциации корепрессорных модулей (например, NINJA-TPL) от промоторов генов-мишеней MYC и последующего рекрутирования транскрипционных коактиваторов (Howe *et al.*, 2018).

Также интересным участником данной машинерии являются белки JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE 1 (JAM1), JAM2 и JAM3 (Song *et al.*, 2013). В отличие от MYC, белки JAM не обладают способностью активировать транскрипцию, но сохраняют способность связывания ДНК. Таким образом, белки JAM, по-видимому, конкурируют с факторами транскрипции MYC за связывание с цис-действующими элементами G-бокса в промоторах генов, чувствительных к жасмонатам. Способность белков JAM связывать JAZ посредством консервативного домена JID указывает на то, что активность JAM модулируется изменениями в содержании белков JAZ, но необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять функциональную значимость комплексов JAM-JAZ. Таким образом, данные, полученные на сегодняшний день, не дают полной картины участия JAM

белков в жасмонат-опосредованной регуляции (Fonseca *et al.*, 2014, Howe *et al.*, 2018).

Факторы транскрипции bHLH группы III играют широкую роль в жизненном цикле растений и играют важную роль в сети взаимодействия JAZ-фактора транскрипции. Наиболее охарактеризованное ядро транскрипционной машинерии регулируемой факторами транскрипции JAZ включает белки bHLH подгруппы IIIe, которые включают MYC2, MYC3, MYC4 и MYC5. У большинства видов растений, транскрипционные модули JAZ-MYC особенно важны для контроля продукции специализированных защитных соединений, в том числе полученных из алкалоидных, терпеноидных, фенилпропаноидных и аминокислотных путей биосинтеза (Goossens *et al.*, 2017). Взаимодействие MYC с факторами транскрипции MYB играет решающую роль в регулировании продукции глюкозинолатов, которые формируют взаимоотношения между растениями и травоядными в семействе Brassicaceae (Schweizer *et al.*, 2013). Белки MYC также связаны с MYB21 и MYB24, которые сами взаимодействуют с JAZ, чтобы контролировать развитие тычинок и пыльцы в трехкомпонентном комплексе JAZ–bHLH–MYB (Goossens *et al.*, 2017). Другой комплекс JAZ-bHLH-MYB, состоящий из белков bHLH подгруппы IIIf ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3), GLABRA3 (GL3) и TRANSPARENT TESTA GLABRA8 (TT8), а также MYB75 и GLABRA1 (GL1) R2R3, участвует в контроле инициация трихом и продукция антоцианов (Qi *et al.*, 2015). Помимо множества ролей в регуляции толерантности к биотическому стрессу, несколько исследований продемонстрировали, что специфические модули JAZ-транскрипционного фактора контролируют реакции на абиотический стресс. В арабидопсисе белки JAZ взаимодействуют с белками bHLH подгруппы IIIb, ICE1 и ICE2, способствуя реакции акклиматизации к холоду (Hu *et al.*, 2013). Модули фактора транскрипции JAZ–bHLH также контролируют солеустойчивость риса. В этом случае OsJAZ9 взаимодействует с OsbHLH062 для изменения ионного гомеостаза, а адаптерный белок RICE SALT SENSITIVE3 (RSS3) связывает JAZ с белками bHLH для репрограммирования роста корней в условиях высокой

солености (Toda *et al.*, 2013). Регуляторная сеть JAZ выходит за рамки факторов bHLH и MYB и включает факторы транскрипции из нескольких других семейств. Взаимодействия JAZ с факторами транскрипции YABBY FILAMENTOUS FLOWER (FIL) и YAB3 способствуют накоплению антоцианов, деградации хлорофилла и устойчивости к болезням (Boter *et al.*, 2015), тогда как белки JAZ регулируют старение листьев посредством прямого взаимодействия с WRKY57 (Jiang *et al.*, 2014). Взаимодействие JAZ с ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3) и EIN3-LIKE (EIL1) контролирует жасмонат-этиленовый синергизм развития корневых волосков и защиты от некротрофных патогенов, тогда как взаимодействие MYC с EIN3 или EIL1 противодействует опосредованному этиленом устойчивости растений (Song *et al.*, 2014). В растении *Artemisia annua* L. взаимодействие JAZ с фактором транскрипции AaHD1 регулирует инициацию железистого трихома и, следовательно, содержание в этих структурах лекарственного соединения артемизинина (Yan *et al.*, 2017). Представление о том, что белки JAZ осуществляют прямой контроль над различными факторами транскрипции за пределами семейства MYC, подтверждается генетическим анализом, показывающим, что MYC необходимы для многих, но не всех, JAZ-регулируемых признаков у арабидопсиса (Major *et al.*, 2017). Важный вопрос, который остаётся без ответа касается механизмов, с помощью которых белки JAZ взаимодействуют и репрессируют активность не-MYC регуляторов транскрипции; тогда как MYC связываются почти со всеми белками JAZ, большинство других факторов транскрипции взаимодействуют только с несколькими JAZ. Мотив Jas участвует в некоторых из этих не-MYC взаимодействий, но необходимы дополнительные исследования для определения молекулярных и структурных деталей этих взаимодействий (Chini *et al.*, 2016).

Можно предположить, что белки семейства JAZ образуют центр взаимодействия (Рисунок 4) с различными путями передачи сигналов стресса и развития, которые могут служить для оптимизации приспособленности растений к меняющимся условиям (Goossens *et al.*, 2016). Этот молекулярный модулирует

сигналы различных гормональных путей. Например, баланс роста растений и защиты частично контролируется взаимодействиями JAZ-DELLA, которые интегрируют передачу сигналов ЖК-Иле и гибберелловой кислоты, так что повышенные уровни гибберелловой кислоты усиливают репрессию JAZ и, соответственно, повышенные уровни ЖК-Иле усиливают DELLA-опосредованное подавление роста (Huot *et al.*, 2014). В отдельном модуле, включающем интеграцию жасмонов и гибберелловой кислоты, белки JAZ и DELLA взаимодействуют напрямую и регулируют активность MYC2, GL3, EGL3 и GL1, чтобы контролировать воздушную эмиссию сесквитерпенов в цветках и инициирование трихомов в листьях (Hong *et al.*, 2012). Примеры взаимодействия путей абсцизовой кислоты и ЖК включают убиквитинлигазу E3 KEEP ON GOING (KEG), которая влияет на стабильность белка JAZ12 (Pauwels *et al.*, 2015), а также корцептор абсцизовой кислоты PYL6, который взаимодействует с транскрипционной активностью MYC2 и изменяет ее (Aleman *et al.*, 2016). Опосредованный жасмонатом антагонизм пути салициловой кислоты сильно влияет на иммунитет растений и регулируется прямой активацией факторов транскрипции ANAC с помощью MYC2, MYC3 и MYC4 (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2017). Напротив, рецепторы салициловой кислоты NPR3 и NPR4 участвуют во взаимодействии с JAZ как потенциальный механизм повышения устойчивости к биотрофным патогенам без снижения устойчивости к некротрофным патогенам (Liu *et al.*, 2016). Также имеются данные о SNF1-связанной киназы 1 (SnRK1), которая способствует дестабилизации JAZ, чтобы контролировать индуцированное сахарозой накопление антоцианов (Liu *et al.*, 2017). В совокупности эти данные подчеркивают важность белков JAZ как ключевых узлов для интеграции различных сигналов (Howe *et al.*, 2018).

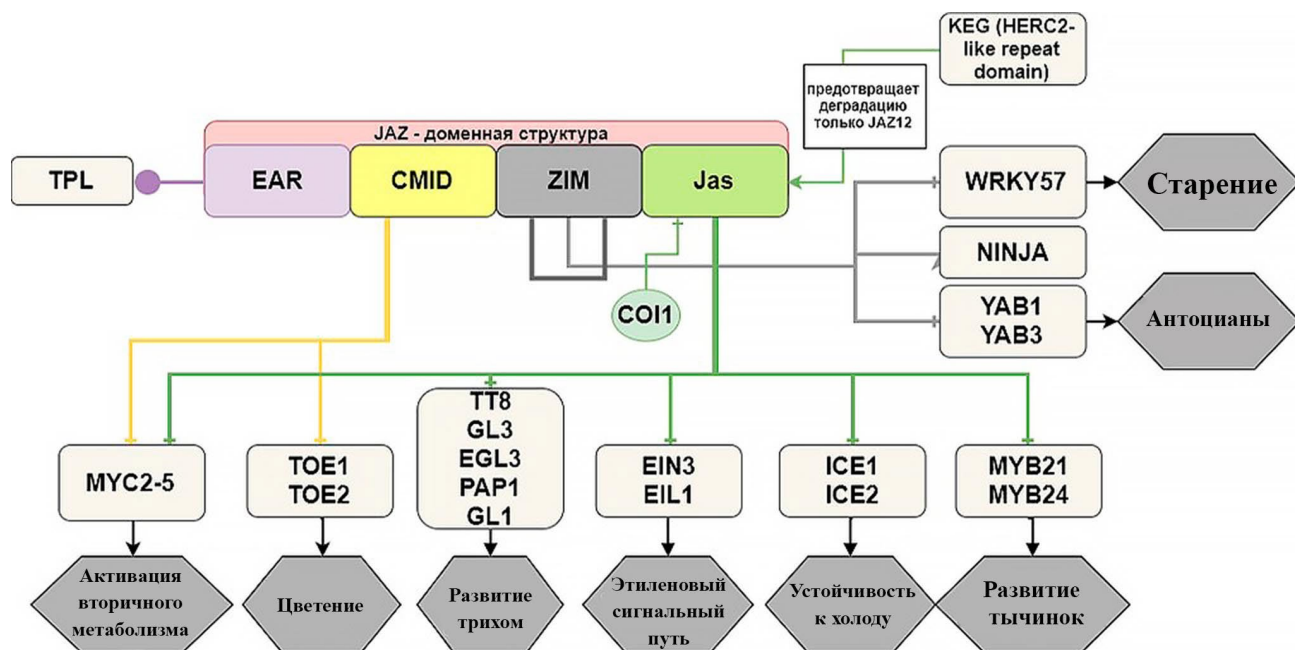


Рисунок 4 – Домены семейства JAZ и их взаимодействие с различными транскрипционными факторами и корепрессорами, а также биологическая функция данных транскрипционных факторов. Расшифровка аббревиатур ТФ и доменов белков JAZ даны в тексте настоящей главы.

Данная работа посвящена изучению эффектов индивидуального ингибирования экспрессии гена *AtJAZ1*, который относится к группе I семейства. В белке *AtJAZ1* присутствуют типичные для семейства домены – Jas, CMID, TIFY (JAZ). Отсутствует домен EAR. Сигнал для протеасомной деградации JAZ degron присутствует на всех трех сплайс вариантах (Howe *et al.*, 2018). Ближайший гомолог *AtJAZ1* в растении винограда *VvJAZ9*, аминокислотная последовательность которого также содержит основные домены семейства JAZ-TIFY (JAZ) и Jas (Zhang *et al.*, 2012).

1.3. РНК-интерференция как инструмент биоинженерии растений

1.3.1. Биоинженерия растений

Биоинженерия – область биологических наук, направленная на решение различных прикладных и фундаментальных задач, включающая в себя

широчайший набор методов исследований. Задачи могут носить прикладной характер и крайне разнообразны, некоторые из них: создание рекомбинантных белков для фармацевтической промышленности, переработка различных трудно разлагаемых отходов, изменение характеристик сельскохозяйственных растений, добавление целых метаболических путей и многое другое. Некоторые результаты биоинженерии произвели революцию в истории человечества, например, создание рекомбинантного инсулина, что облегчило жизнь многих людей. Для фундаментальных работ тоже есть задачи, чаще всего это ингибирование или усиление экспрессии определенного гена или групп генов. Общую основу для таких задач представляет более узкая область, входящая в биоинженерные науки – генетическая инженерия. Генетическая инженерия, в целом, является набором методов, посредством которых производят манипуляции с геномом как на уровне отдельных нуклеотидов, так и целых хромосом (Selivanova *et al.*, 2018; Hendriks *et al.*, 2020; Wikandari *et al.*, 2021).

В XX веке исторически сложился подход к генетической инженерии растений. Данный подход был основан на центральной догме молекулярной биологии подразумевающей передачу информации от ДНК к белку. Появление метода агробактериальной трансформации создало хорошие условия для изучения генов методом гетеро- и гомологичной сверхэкспрессии, что позволяло изучать функции генов при их высокой активности. Однако, практическое применение биоинженерных инструментов для получения культур-суперпродуцентов ограничено общемировым неприятием ГМО ресурсов для пищевой, фармакологической и косметической промышленности (Krasteva *et al.*, 2020). Эффективные подходы к активации вторичного метаболизма на основе сверхэкспрессии генов ферментов биосинтеза или регуляторных белков на данный момент представляют главным образом только научный, фундаментальный интерес. Альтернативным вариантом применения на практике генно-инженерного подхода является современная система методов геномного редактирования на основе использования сайт-направленных нуклеаз, SDN (Graham *et al.*, 2020).

Оптимальный вариант использования методов SND – ингибирование экспрессии какого-либо гена, в результате чего полученный нетрансгенный организм приобретает интересующие свойства. Таким образом, поиск таргетных генов, кодирующих супрессионные регуляторные белки, является наиболее актуальным и перспективным направлением в области исследований биотехнологии растительных клеточных культур-продуцентов. Оптимальным поисковым экспресс-методом инактивации экспрессии гена с целью определения его функции в определенных процессах является метод искусственных миРНК для таргетированного ингибирования экспрессии генов в комплексе с агробактериальной трансформацией для внесения изменений в геном растения.

Можно предположить, что современные методы изменения экспрессии или геномного редактирования генов являются взаимозаменяемыми методами, но это не так. Использование методов, основанных как на РНК-интерференции, так и методов, основанных на использовании сайт-направленных нуклеаз, имеют свои достоинства и недостатки, и необходимо каждый метод оценивать с точки зрения цели и задач. Для поисковых исследований РНК-интерференция является наиболее простым, быстрым и экономически выгодным методом. Во-первых, самым большим достоинством является тот факт, что в клетках и растений и животных уже присутствует машинерия необходимая для РНК-интерференции, и нет необходимости вводить дополнительные белки или процедуры для успешного проведения метода. Например, для успешного редактирования при помощи CRISPR-CAS9 в клетках эукариот необходимо интродуцировать каким-либо образом белки CAS, так как они являются прокариотическими и отсутствуют в геноме эукариот. А после интродукции, необходимо от них избавиться, что увеличивает сложность процедуры. Во-вторых, РНК-интерференцию можно использовать для временного ингибирования экспрессии, введя интерферирующие РНК в клетку, без введения в геном. Это позволяет увеличить охват различных стадий и жизненных циклов клеток, например, в условиях, когда клетка будет в ближайшее время дифференцироваться, а изменение экспрессии необходимо

именно на определенной стадии жизненного цикла; РНК-интерференция является незаменимым выбором для исследователя. И третье – скорость создания культур, для РНК-интерференции, например, с временным ингибированием экспрессии гена может занимать несколько дней. Поэтому РНК-интерференция остается важным и иногда незаменимым методом генной инженерии основанном на природном механизме, и крайне эффективна в поисковых, скрининговых работах, где необходимо быстрое получение данных (Boettcher and McManus, 2015).

1.3.2. РНК-интерференция

До открытия процесса РНК-интерференции, мутантные растения, в которых был ингибирован определённый ген, получались ценной многих лет работы. Такие мутанты могли происходить от растений, выращенных на среде с добавлением мутагена либо вставками Т-ДНК в геном в случайных локусах, в надежде получить необходимый инсерционный мутант. Далее в таких работах была задача скрининга тысяч растений и поиска мутанта, который, например, мог выжить в определенных условиях, либо был морфологически отличен от дикого типа. Последующая локализация локуса, в котором закрепилась мутация была тоже крайне трудоемким процессом. Для примера, в работе Feys и коллег (1994), в результате которой был найден мутант *coil*, было использовано около 200 тысяч семян арабидопсиса выращенных на среде с добавлением этилметансульфоната для поиска мутанта. Однако, с открытием механизма РНК-интерференции, вышеуказанный подход изменился.

РНК-интерференция (англ. RNAi, RNA interference) — это биологический процесс, консервативный у большинства эукариот и характеризующийся подавление экспрессии целевого гена на стадии транскрипции при помощи деградации мРНК целевого гена комплементарными небольшого размера (около 20 н.п.) некодирующими РНК. В конце 1980-х годов, группа учёных изучающих образование пигмента в петунии, сделали парадоксальное наблюдение, что растения, несущие дополнительные копии трансгена, продуцирующего пигмент,

могут иметь цветок с меньшим количеством пигментом либо иметь большие белые непигментированные участки. Механизм этого действующего, названным тогда «косупрессионного» подавления гена эндогенного пигмента был не полностью известен, но РНК, продуцируемая трансгенами, была предложена в качестве посредника подавления (van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990). Впервые же процесс РНК-интерференции был описан у модельной нематоды *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). Существует множество различных видов некодирующих РНК, но в механизме РНК-интерференции задействованы два основных вида: короткие, малые интерферирующие РНК (киРНК) и микроРНК (миРНК). Указанные виды коротких РНК могут использовать одни и те же белки для своей работы, механизм регуляции мРНК также очень консервативен. Основное различие между видами РНК кроется в функции. киРНК выполняют функцию иммунитета против патогенов, в то время как миРНК регулируют экспрессию генов самого растения (Mello and Conte 2004). Так как у растений отсутствует способность к локомоции, эффективно избежать попадания какого-либо патогена невозможно, и вследствие этого, иммунитет растения приобрел различные свойства и механизмы, для успешного выживания в окружающей среде. Одно из свойств иммунитета растений было известно с начала XX века, и имело различные названия в процессе изучения – приобретенный иммунитет, исключение суперинфекции (англ. superinfection exclusion), перекрестная защита (англ. cross protection). Приобретенный иммунитет растений можно описать таким примером: растения, инфицированные менее вирулентными штаммами вируса табачной мозаики (англ. TMV, Tobacco mosaic virus), которые вызывают светло-зеленую мозаику листа, в дальнейшем были устойчивы к суперинфекции более вирулентными штаммами того же вируса, которые вызывают желтую мозаику. Работа такого рода иммунитета обеспечена именно киРНК (Rosa *et al.*, 2018).

Стоит учитывать, что существуют различные производные формы малых РНК, такие как пиРНК (англ. piwi-interacting RNA), транс-действующие (англ. trans-acting) киРНК, pha (англ. phased) киРНК, и в данной главе описан

генерализованный механизм. киРНК генерируются из двухцепочечной РНК (дцРНК), образующейся в результате репликации РНК вируса при помощи растительной эндогенной РНК-зависимой РНК-полимеразой. Данные молекулы дцРНК затем распознаются и расщепляются DCL (англ. Dicer-like) белками с образованием дуплексов киРНК. Растения имеют общий набор белков для разрезания дцРНК, состоящий в основном из четырех белков DCL (DCL1–4). Данные белки при реакции с дцРНК дают разные типы киРНК, различающиеся по размеру. Например, DCL4 генерирует киРНК из 21 нуклеотида, которые играют важную роль именно в противовирусной защите от РНК-вирусов (Deleris *et al.*, 2006). DCL2 генерирует киРНК из 22 нуклеотидов и также задействован в противовирусной защите (Wang *et al.*, 2011). DCL3 генерирует миРНК из 24 нуклеотидов, которые связаны с подавлением транспозонов и повторяющихся элементов (Xie *et al.*, 2004). Участие же DCL3 в противовирусной защите от РНК-вирусов остается неясным (Diaz-Pendon *et al.*, 2007).

После того, как DCL преобразуют дцРНК в дуплексы киРНК, каждый дуплекс киРНК встраивается в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC, англ. RNA-induced silencing complex), главную роль в котором играет белок Argonaute (AGO). Одна цепь дуплексной молекулы выбирается для сохранения в качестве направляющей цепи. Направляющая цепь служит для таргетирования комплиментарных мРНК, что обычно приводит к расщеплению/разрезанию RISC-мишени РНК. Подобно DCL, растения также кодируют несколько AGO (Zhang *et al.*, 2015). Белки AGO состоят из трех основных консервативных доменов: доменов PAZ (Piwi, Argonaute, and Zwiille/Pinhead), MID (middle) и PIWI (P-element-induced whimpru testes). Было показано, что домен PAZ, связывает 3'-конец малых РНК (Ma *et al.*, 2004). С-концевой домен содержит домены MID и PIWI. Место соединения этих двух доменов представляет собой связывающий карман, который закрепляет 5'-конец направляющей РНК (Wang *et al.*, 2011). Белок AGO, взаимодействующий с дуплексом киРНК-РНК-мишень, расщепляет РНК-мишень доменом PIWI, который содержит структуру, подобную РНКазе-Н, и консервативный

каталитический сайт. В результате целевая РНК расщепляется и разрушается (Tolia and Joshua-Tor, 2007).

После выяснения механизма действия РНК-интерференции, было предложено множество методов использования данного механизма для молекулярной биологии. В представленной работе используется метод РНК-интерференции на основе работы Schwab и коллег (2006), в которой был предложен способ клонирования последовательности зрелой миРНК в вектор, уже содержащий одну из регуляторных растительных миРНК. Данный подход применим не только к ингибированию экспрессии генов в растении арабидопсиса, но к другим, например, к винограду (Jelly *et al.*, 2012). Существует множество модификаций метода основанном на механизме РНК-интерференции и влияния на экспрессию: вирусного (Yan *et al.*, 2014), использования АМОs (англ. anti-microRNA oligonucleotides) для подавления эндогенных миРНК (He *et al.*, 2016), множественное ингибирование экспрессии целого семейства генов и другие (Tiwari *et al.*, 2014). Методы искусственной РНК-интерференции могут использоваться не только для фундаментальных исследований, но и для прикладной области, например, агробиотехнологии. Одно из самых перспективных направлений в данной области – увеличение толерантности к различным патогенам, например, к вирусным инфекциям (Lafforgue *et al.*, 2013). В 2017 году трансгенная кукуруза устойчивая к западному кукурузному корневому жуку при помощи технологии РНК-интерференции была одобрена к выращиванию Министерством сельского хозяйства США (<https://www.epa.gov/newsreleases/epa-registers-innovative-tool-control-corn-rootworm>).

На данный момент метод основанный на механизме РНК-интерференции является одним из самых перспективных методов биоинженерии, его использование в фундаментальных исследованиях эффективно, а в прикладных областях ограничивает только законодательное и общественное восприятие ГМО растений (Rosa *et al.*, 2018).

1.3.3. Агробактериальная трансформация

Другим важным и, возможно самым широко используемым, методом биоинженерии растений является метод агробактериальной трансформации, история изучения которого начинается с начала двадцатого века. Первая успешная изоляция бактерий *Agrobacterium tumefaciens* была проведена с галлов на поверхности хризантемы кустарниковой (лат. *Argyranthemum frutescens* L.), и агробактерии были идентифицированы как причина возникновения галлов (Smith and Townsend, 1907). За более чем столетие исследования агробактерий, механизм возникновения галлов, бородачатых корней и сам горизонтальный перенос генов был досконально изучен, породив при этом новую биотехнологическую область трансформации растений и продукции рекомбинантных белков в растительных клетках (Nester, 2015). В природных условиях *A. tumefaciens* использует уникальный природный механизм вирулентности для индукции опухолей: бактерия доставляет фрагменты Т-ДНК (англ. transferred DNA, T-DNA) в клетки растения, где Т-ДНК интегрируется в геном растения. Патогенность агробактерии определяется плазмидой Ti (индуцирующей опухоль, англ. tumor inducing), которая содержит, как и Т-ДНК, так и гены вирулентности (Guo *et al.*, 2011). Гены, содержащиеся в Т-ДНК, могут экспрессироваться в клетках растений временно (транзистентная экспрессия) или стабильно (передаваемая по наследству) (Lacsoix and Citovsky, 2013). Штаммы агробактерий дикого типа нуждаются в генетической модификации, чтобы их можно было легко использовать в лабораторных условиях. Плазида Ti, содержащаяся в большинстве штаммов дикого типа, очень большая, часто более 200 тысяч п.н., и несет более 200 генов. Огромная плазида имеет серьезные недостатки: низкое количество копий, меньшее количество уникальных сайтов рестрикции. Было показано, что для успешного таргетирования Т-ДНК в начале индукции вирулентности, необходимы только последовательности бордеров, определяющих границы Т-ДНК. Поэтому была создана бинарная векторной система, в которой гены вирулентности и Т-ДНК расположены на двух

отдельных плазмидах. Т-ДНК расположена на небольшой плазмиде, а гены интереса встраиваются в область Т-ДНК бинарного вектора. Трансформированный штамм агробактерий кокультивируют с растительными клетками, тем самым передавая ген интереса в геном растения. Данный подход используется в множестве различных протоколов, включающих также различные бинарные векторы, но сама концепция остается неизменной (Păcurar *et al.*, 2011).

1.4. Вторичные метаболиты *Arabidopsis thaliana*

Резуховидка Таля (лат. *Arabidopsis thaliana*; син. арабидопсис) является модельным растением для фундаментальных исследований в рамках генетики, физиологии, молекулярной биологии растений. На данный момент, арабидопсис – самое изученное растение среди всех других. Существует множество других растений, которые были также выбраны как модельные, например, кукуруза, соя, томаты, горох. Однако по количеству публикаций данные растения сильно отстают от арабидопсиса и на это есть причина. Изначально, арабидопсис был выбран для генетических исследований, благодаря полезным особенностям, таким как: короткое время вегетативного периода, что делает исследования более быстрыми в сравнении с исследованиями других распространенных растений; небольшой физический размер растения, благодаря этому удобно выращивать в небольших помещениях или контейнерах, сокращая при этом размер необходимого оборудования, например, климатических камер; а также большое число семян в конце вегетативного периода и самоопыление; небольшой размер генома. Данные особенности и возрастающее количество исследований привело к общепринятому выбору арабидопсиса как основной модели. Появившиеся затем эффективные методы трансформации и данные о полном секвенировании генома арабидопсиса, развитие информационных общедоступных ресурсов, например, TAIR (The Arabidopsis Information Resource), ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center), укрепило его место в биологии растений (Fransz *et al.*, 1998; Meinke *et al.*, 1998; Bevan and Walsh 2005; Koornneef and Meinke 2010).

1.4.1. Ботаническая характеристика арабидопсиса

Арабидопсис – род семейства капустные (лат. Brassicaceae), состоящий из 11 видов. В данной работе под словом арабидопсис будет пониматься конкретный вид, а именно Резуховидка Таля. Арабидопсис однолетнее, реже двулетнее, травянистое растение. Имеет простые или ветвистые стебли различной высоты от 20 до 25 см в среднем. Листья образуют розетку у основания растения, а также несколько листьев на цветущем стебле. Прикорневые листья от зеленого до слегка пурпурного цвета, 1,5–5 см в длину и 2–10 мм в ширину, с целым или крупно зазубренным краем; стеблевые листья мельче, обычно с целым краем. Листья покрыты мелкими одноклеточными волосками, называемыми трихомами. Цветки диаметром 3 мм, расположены щитком; их структура такая же, как у типичных капустных, самоопыляются при раскрытии бутона. Плод – длиной 5–20 мм, содержащий 20–30 семян, при созревании семена достигают 0,5 мм в длину. Весь жизненный цикл, включая прорастание семян, формирование розеточного растения, закрепление основного стебля, цветение и созревание первых семян, завершается за 6–10 недель. Корни просты по структуре, легко поддаются изучению в культуре и не устанавливают симбиотических отношений с азотфиксирующими бактериями. Естественные патогены включают множество насекомых, бактерий, грибов и вирусов. Существует несколько распространенных экотипов, для исследований чаще всего используют экотипы Col-0 и Ler (Krämer, 2015). Арабидопсис легко растет в каменистых, песчаных и известняковых почвах. Обычно он считается сорняком из-за его широкого распространения на сельскохозяйственных полях, обочинах дорог, железнодорожных путях, пустырях и других средах обитания. Географическое распространение арабидопсиса – произрастает в Европе, Азии и Африке в естественных условиях, а также был перенесен на все возможные континенты, кроме Антарктиды. Существует классическая модель первичного местообитания – средиземноморье. По

уточненной модели первичным местом обитания арабидопсиса являлись тропические леса Африки (Fulgione and Hancock 2018).

1.4.2. Азот-, серосодержащие вторичные метаболиты арабидопсиса

Несмотря на свой небольшой размер, короткий жизненный цикл и маленький геном, арабидопсис имеет набор вторичных метаболитов, столь же многочисленный и разнообразный, как и метаболиты других таксонов растений. Благодаря научному вниманию, которое уделялось этому виду в последние десятилетия, и существенному улучшению чувствительности аналитических методов, теперь известно более 170 вторичных метаболитов из трех основных классов: терпеноидные, фенилпропаноидные, такие как антоцианы и флавоноиды, и азот-, серосодержащие соединения, такие как алифатические и индольные глюкозинолаты и камалексин (D'Auria and Gershenzon, 2005). Клеточные культуры арабидопсиса являются монопродуцентами индольных гликозинолатов (Bulgakov *et al.*, 2016).

В растениях арабидопсиса обнаружено большое количество индольных и индольных серосодержащих соединений. Примеры таких метаболитов: *b*-D-глюкопиранозилиндол-3-карбоновая кислота, 6-гидроксииндол-3-карбоновая кислота, 6-O-*b*-D-глюкопиранозид, камалексин. Их накопление часто вызвано инфекцией патогенов, накапливаются они в клеточной стенке (Hagemeyer *et al.*, 2001). Самым интересным и изученным метаболитом данной группы является камалексин. Это вещество широко исследовалось как фитоалексин, т.е. соединение, которое накапливается в ответ на вторжение патогенов и ограничивает их последующий рост (Glawischnig, 2007).

Глюкозинолаты – другая группа вторичных метаболитов, которая считается наиболее характерной для капустных (крестоцветных), так как их распространение в природе практически ограничено данным таксоном. Представляют собой тиоглюкозиды, которые имеют в своем строении сложный эфир N-

гидроксиламиносульфата. Известно более 140 различных структур глюкозинолатов, 36 из которых были обнаружены в растениях арабидопсиса (Reichelt *et al.*, 2002). Механизм действия отличается от других вторичных метаболитов. Глюкозинолаты обнаруживаются во всех органах растения и действуют как защита от травоядных и патогенных микроорганизмов. Но сами по себе глюкозинолаты не обладают защитными свойствами, ими обладают именно продукты их гидролиза. Гидролиз глюкозинолатов происходит при помощи ферментов – мирозиназ, которые находятся отдельно от глюкозинолатов и обладают тиоглюкозидазной активностью. При повреждении тканей растения, мирозиназы и глюкозинолаты смешиваются, продукты гидролиза, например, такие как изотиоцианаты образуются, попадают на патоген или на травоядное животное, повреждая или отпугивая его. Чаще всего данные продукты являются летучими (Vercauteren *et al.*, 2001).

Биосинтез глюкозинолатов происходит из множества аминокислот. Глюкозинолаты делятся на три основные группы: алифатические, полученные из аланина, лейцина, изолейцина, валина или преимущественно метионина; индольные, полученные из триптофана; ароматические, полученные из фенилаланина или тирозина. Самая большая из этих групп с точки зрения обилия и количества структур — это производные метионина (Narun *et al.*, 2020).

Условно, биосинтез индольных глюкозинолатов (ИГ) можно разделить на две стадии: биосинтез ядра и модификацию цепи. Частично пути камалексина и глюкозинолатов пересекаются (Рисунок 5). Триптофансинтаза (TSB1) способна производить триптофан из индола. Ферменты цитохрома P450, CYP79B2 и CYP79B3, превращают производные триптофана в альдоксимы. Затем цитохром P450 CYP83B окисляет альдоксимы до нитрилоксидных соединений, соединение может быть преобразовано в конъюгат глутатиона с помощью трансфераз GSTF9 и GSTF10. Конъюгат метаболизируется с помощью γ -глутамилпептидаз, GGP1 и GGP3. Фермент SUR1 (SUPERROOT1, C-S-лиаза) отвечает за образование

тиогидроксиматов. Следующими двумя процессами в создании структуры ядра глюкозинолатов являются гликозилирование S-глюкозилтрансферазой (UGT74B1) с последующим сульфированием сульфотрансферазами (SOT16, SOT17). Далее происходит модификация боковой цепи индольного глюкозинолата при помощи фермента CYP81F который превращает 3-индолилметил-глюкозинолат (I3M) в гидроксильные глюкозинолаты, такие как 1-гидрокси-3-индолилметил-глюкозинолат (1OH13M) и 4-гидрокси-3-индолилметил-глюкозинолат (4OH13M). Другой стадией биосинтеза индольных глюкозинолатов является превращение гидроксиформ (1OH13M 4OH13M) в метоксиформы, такие как 1-метокси-3-индолилметил GSL (1MOI3M) или 4-метокси-3-индолилметил глюкозинолат (4MOI3M) соответственно. Ключевыми ферментами, способными превращать гидроксил в метоксигруппы, являются индолглюкозинолат-O-метилтрансферазы (IGMT), кодируемые генами IGMT1 и IGMT2 (Harun *et al.*, 2020).

Путь биосинтеза камалексина (Рисунок 5) начинается с триптофана. Триптофан, под действием двух ферментов CYP79B2 и CYP79B3 превращается в индол-3-ацетальдоксим (IAO). Данные ферменты являются функционально избыточными. Первая стадия биосинтеза полностью повторяет таковую в пути биосинтеза глюкозинолатов. Было показано, что растения, в которых CYP79B2 и CYP79B3 ингибированы, не способны биосинтезировать ни камалексин, ни глюкозинолаты (Rauhut and Glawischnig 2009). Следующая стадия представляет собой дегидратацию индол-3-ацетальдоксима до индол-3-ацетонитрила (IAN), катализируемую ферментами CYP71A12 (Millet *et al.*, 2010) и CYP71A13 (Nafisi *et al.*, 2007). В дальнейшем индол-3-ацетонитрил конъюгируется с глутатионом при помощи фермента глутатион-S-трансферазы GSTF6 (Su *et al.*, 2011), затем метаболизируется до цистен-индол-3-ацетонитрила (Cys-IAN) γ -глутамилпептидазами GGP1 и GGP3 (Geu-Flores *et al.*, 2011). В конце пути, фермент CYP71B15/PAD3 катализирует две последние реакции биосинтеза, ведущие к камалексину (Böttcher *et al.*, 2009).

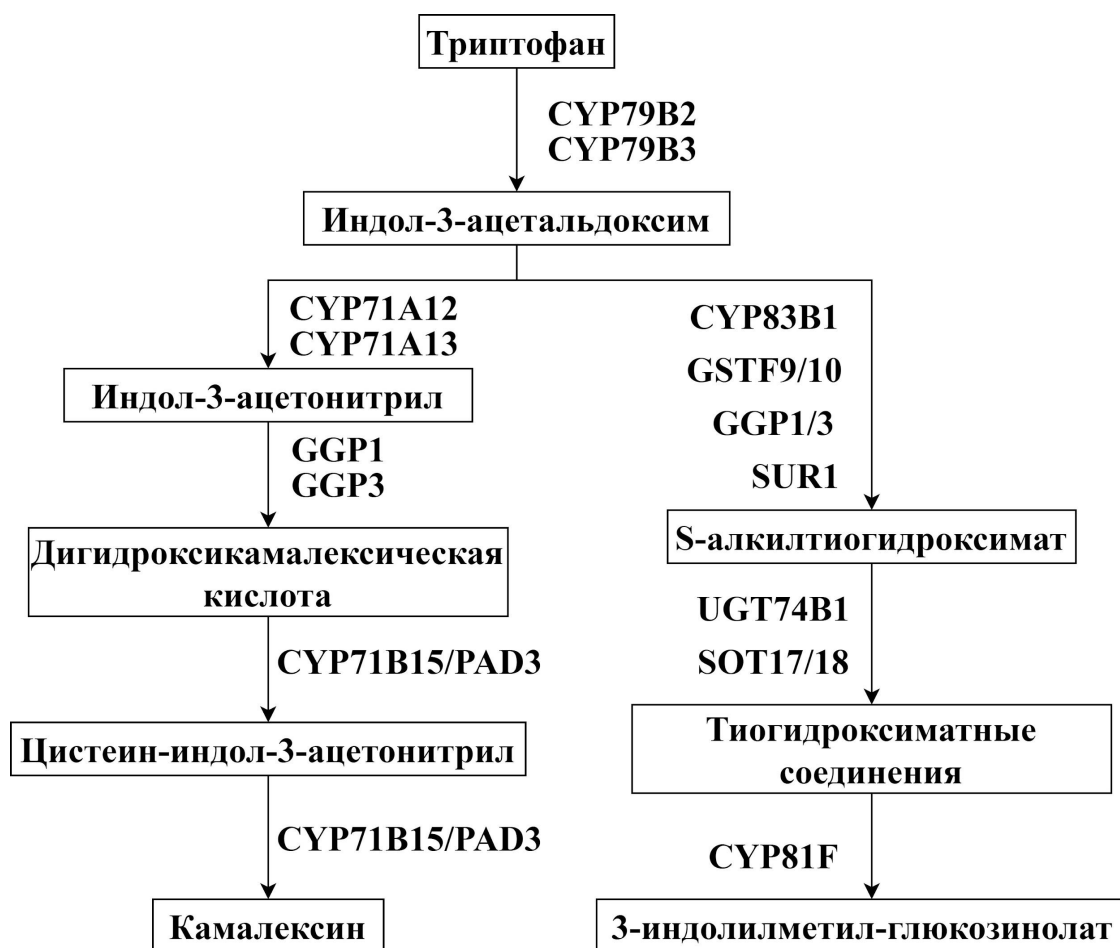


Рисунок 5 – Путь биосинтеза камалексина и индольных глюкозинолатов. Расшифровка аббревиатур ферментов дана в тексте данной главы. CYP – цитохром P450-монооксигеназы, UGT – S-глюкозилтрансферазы, GSTF – глутатион-S-трансферазы, GGP – глутамилпептидазы, SUR1 – SUPERROOT1, C-S-лиаза, SOT – сульфотрансферазы.

Множество исследований подтвердили, что камалексин играет положительную роль в резистентности к патогенам. Например, накопление камалексина коррелировало с устойчивостью к некротрофным грибам, таким как *Alternaria brassicicola* (Nafisi *et al.*, 2007), *Botrytis cinerea* (Ferrari *et al.*, 2007) и *Plectosphaerella cucumerina* (Sanchez-Vallet *et al.*, 2010). Сообщалось также, что камалексин играет защитную роль против биотрофного гриба *Leptosphaeria maculans* (Staal *et al.*, 2006) и оомицете *Phytophthora brassicae* (Schlaeppli *et al.*, 2010).

Основные транскрипционные регуляторы биосинтеза вышеуказанного пути – MYB34, MYB51 и MYB122 принадлежащие к семейству R2R3 (англ. R-repeat)-MYB (англ. myeloblastosis), которые характеризуются как ключевые регуляторы биосинтеза ИГ, в побегах и корнях в присутствии различных гормонов растений (Frerigmann and Gigolashvili 2014). MYB34 известен как важный регулятор биосинтеза ИГ посредством передачи сигналов абсцизовой кислоты (АБК) и жасмоновой кислоты (ЖК), в то время как MYB51 и MYB122 участвуют в биосинтезе ИГ, индуцированном салициловой кислотой (СК)/этиленом (ЭТ) и ЖК/ЭТ, соответственно (Frerigmann *et al.*, 2016). Другая группа факторов транскрипции, MYC2, MYC3 и MYC4, которые взаимодействуют с R2R3-MYB, также непосредственно регулируют биосинтез ИГ, что было показано снижением содержания ИГ в тройных мутантах *myc2/myc3/myc4* арабидопсиса (Fernández-Calvo *et al.*, 2011).

1.4.3. Фармакологические свойства азот-, серосодержащих метаболитов арабидопсиса

Камалексин обладает мощным антимикробным действием против бактериальных и грибковых патогенов растений (Glawischnig *et al.*, 2004), а также против простейшего патогена человека, *Trypanosoma cruzi* (Mezencev *et al.*, 2009). Также было показано, что камалексин проявляет высокую избирательную цитотоксическую активность в отношении линии клеток рака молочной железы человека SKBr3 (Moody *et al.*, 1997) и индуцирует апоптоз в клетках Т-лейкемии (Mezencev *et al.*, 2011). Однако камалексин и его производные демонстрируют минимальное цитотоксическое действие на неопухолевые клетки (Pilatova *et al.*, 2013; Chripkova *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018). Было показано, что камалексин вызывает сокращение клеток и изменение фосфолипидов клеточной мембраны эритроцитов, что предполагает его использование для лечения злокачественных опухолей (Almasry *et al.*, 2017). Было показано, что камалексин увеличивал количество АФК, уменьшал пролиферацию клеток и увеличивал апоптоз более

значительно в лпухолевых клетках по сравнению с контрольными. Повышенная активность каспазы-3/7 и увеличенное количество расщепленного белка PARP, показанные вестерн-блоттингом, свидетельствовали об усилении апоптоза. Исследователи сделали заключение: камалексин более эффективен в агрессивных клетках рака простаты, которые экспрессируют высокие уровни АФК, и этот фитоалексин имеет большой потенциал в качестве нового терапевтического агента для лечения, особенно метастатического рака простаты (Smith *et al.*, 2013). Таким образом, камалексин является потенциальным веществом для лечения злокачественных форм рака, при этом не повреждая нормальные ткани.

Биологическая активность глюкозинолатов зависит от количества их потребления. Поэтому можно разделить их биологическую активность на две категории – негативные и позитивные, которые также варьируются и зависят от типа глюкозинолата. Сообщалось, что употребление некоторых глюкозинолатов нежелательно из-за их гоитрогенной активности (влияние на щитовидную железу) и замедления роста. Продукты распада глюкозинолатов (оксазолидин-2-тионы), могут вызывать морфологические и гистологические аномалии внутренних органов (Brandt *et al.*, 2004, Halkier *et al.*, 2006), примером чего является увеличение веса щитовидной железы у свиней и домашней птицы. Гоитрогенная активность связана с 5-винилоксозолидин-2-тионом (гойтрином) и тиоцианат-ионами. Гойтрин проявляет свое действие, препятствуя синтезу гормонов щитовидной железы. Однако, действие глюкозинолатов может иметь важное диетическое значение. Было показано что у крыс со спонтанной гипертензией, склонных к инсульту, кормление сушеными ростками брокколи снижало окислительный стресс в сердечно-сосудистой системе и тканях почек, о чем свидетельствует более низкая нитрозация белков и повышение уровней глутатиона, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы, что говорит о защитных кардиоваскулярных свойствах глюкозинолатов (Wu *et al.*, 2004).

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что глюкозинолаты могут влиять на многие стадии развития рака, включая индукцию ферментов детоксикации (ферменты фазы II) и ингибирование ферментов активации (Talalay and Zhang, 1996; Hecht, 2000; Talalay and Fahey, 2001). Ферменты, такие как хинонредуктаза, глутатион-S-трансфераза, UDP-глюкуронилтрансфераза и НАДФН-редуктаза, способны конъюгировать с активированными канцерогенами и превращать их в неактивные водорастворимые соединения. Они могут выводиться с мочой, что приводит к нейтрализации потенциальных канцерогенов из клеток млекопитающих. Индукция клеточных ферментов в значительной степени опосредована антиоксидантно-чувствительным элементом (ARE), который регулируется транскрипционным фактором Nrf2 (Nilsson *et al.*, 2006).

Глюкозинолаты также продемонстрировали биологическую активность, которая, помимо прочего, косвенно связана с профилактикой рака. К ним относятся: противовоспалительные свойства за счет регуляции ядерного фактора-каппа В (NF-κB), а также ингибирование воспалительной реакции, стимулированной TNF-α и липополисахаридом (Heiss *et al.*, 2001; Rose *et al.*, 2005; Wierinckx *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005), антибактериальные свойства против *Helicobacter pylori*, известной причины гастрита и также связанной с повышенным риском рака желудка (Fahey *et al.*, 2002; Haristoy *et al.*, 2003; Galan *et al.*, 2004). Эпидемиологические исследования и экспериментальные исследования на клеточных и животных моделях предоставляют доказательства того, что продукты разложения глюкозинолатов и сами глюкозинолаты способствуют укреплению здоровья.

1.5. Вторичные метаболиты *Vitis vinifera*

Виноград культурный на данный момент является одним из самых распространенных сельскохозяйственных растений. Виноград культивируется во всем мире, и это крупнейшая в мире плодовая культура с ежегодным урожаем более 67 млн тонн (Fontana *et al.*, 2013). Согласно данным организации Vitis International

Variety Catalogue (VIVC, www.vivc.de), которая каталогизирует информацию о винограде, количество сортов винограда составляет около 23000; они хранятся и изучаются в 130 институтах в 45 различных странах. Такой огромный интерес вызван продуктами и веществами, получаемыми из винограда. Пищевые продукты включают в себя: вино и продукты виноделия, изюмы, соки. Продукты переработки, такие как семена, жмых, кожица ягод и стебли также используются. Высокий интерес со стороны научного сообщества вызывают вторичные метаболиты винограда. При поиске через базу данных Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) с 1978 по 2021 год можно найти более 14 тысяч публикаций включающих слово *транс*-резвератрол (наиболее изученный вторичный метаболит винограда), и с каждым годом количество таких публикаций растет. Можно сделать вывод – исследования вторичных метаболитов, регуляции их продукции, а также фармацевтических эффектов на данный момент крайне актуально.

1.5.1. Ботаническая характеристика винограда

Виноград культурный (лат. *Vitis vinifera*) — вид принадлежащий к роду Виноград (лат. *Vitis*) и семейству Виноградовые (лат. *Vitaceae*), представленный многолетними кустарниковыми лианами. Лиана является быстрорастущей и достигает длины 12 – 15 метров. Имеет чешуйчатую кору, листья очередные, пальчато-лопастные, листопадные, с 3 – 5 заостренными лопастями, края листьев с крупно-колючими зубцами, размером 5 – 20 см в длину и ширину. Цвет листьев темно-зеленый сверху, глянцевый, светло-зеленые снизу, обычно безволосые. Лоза прикрепляется к опорам усиками. Ветвь состоит из нескольких междоузлий. На узлах растут листья, цветы. Корни винограда обычно опускаются на глубину от 2 до 5 метров, а иногда до 12 – 15 метров и даже больше. Цветки маленькие, от зеленовато-белого до белого цвета, сгруппированы в соцветия, плоды разной формы в зависимости от сорта представляют собой ягоды, сгруппированные в грозди. Чашечка одностворчатая, с 5 короткими зубцами. Венчик состоит из пяти

лепестков, сросшихся наверху и у основания. Дикий виноград – двудомное растение, мужские и женские цветки возникают на разных растениях, но культивируемые сорта чаще всего однодомны, что позволяет им самоопыляться. Плод — это ягода, известная как виноград, яйцевидная или шаровидная, темно-синяя или зеленоватая, обычно двухместная с 5 семенами; у диких видов он имеет диаметр 6 мм и созревает от темно-пурпурного до черноватого с бледным восковым налетом. Плоды культивируемых сортов разнообразны в зависимости от сорта (Ardenghi *et al.*, 2014).

1.5.2. Вторичные метаболиты винограда

Вторичные метаболиты винограда представлены широким спектром соединений, но наиболее изученной группой в данном растении являются фенольные соединения. Фенольные соединения составляют большую группу вторичных метаболитов, которые биосинтезируются в фенилпропаноидном пути (Рисунок 6). Они широко распространены во всем царстве растений и представляют собой пигменты, антиоксиданты, сигнальные молекулы, структурные элементы и компоненты защитных механизмов (Rienth *et al.*, 2019; Santos-Sánchez *et al.*, 2019). В растениях винограда на 2020 год обнаружено 78 стильбенов (23 мономера, 30 димеров, 8 тримеров, 16 тетрамеров и 1 гексамер), 15 гидроксикоричных кислот, 9 гидроксibenзойных кислот, 17 флаван-3-олов (из которых 9 проантоцианидины), 14 антоцианов, 8 флаванонов, 35 флавонолов, 2 флавона и 5 кумаринов (Goufo *et al.*, 2020).

Биосинтез фенольных соединений начинается с дезаминирования аминокислоты фенилаланина под действием фермента фенилаланинаммиаклиаза (phenylalanine ammonia lyase, PAL) с образованием коричной кислоты. Коричная кислота гидроксiliруется и превращается в п-кумаровую кислоту под действием фермента циннамат-4-гидроксилазы (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) на второй ферментативной стадии. После этого, следующий фермент 4-кумароил-КоА-лигаза (4-coumaroyl CoA ligase, 4CL) катализирует превращение п-кумаровой кислоты в

п-кумароил-КоА, что является важной точкой разветвления, ведущей к образованию различных фенолпропаноидных соединений. Начальные этапы фенолпропаноидного пути в совокупности называются общим фенолпропаноидным путем (general phenylpropanoid pathway, GPP) (Deng and Lu, 2017).

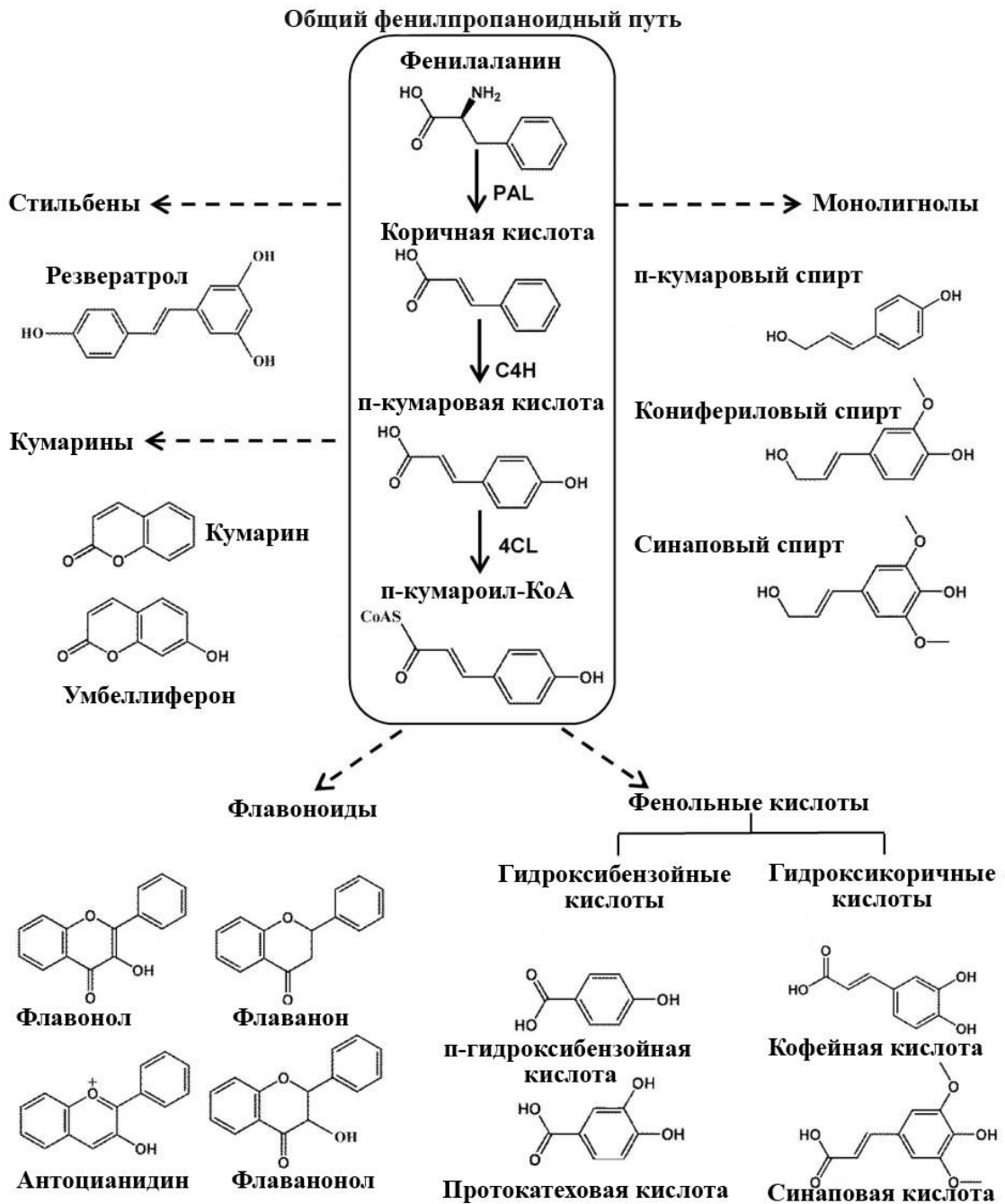


Рисунок 6 – Общий фенолпропаноидный путь биосинтеза вторичных метаболитов. На рисунке в центре обозначен общий путь, стрелками обозначены

различные группы вторичных метаболитов, происходящих из общего пути, для каждой группы даны примеры соединений и их структурные формулы. Рисунок адаптирован с работы Deng и Lu (2017).

С соединения п-кумароил-КоА начинается биосинтез определенных групп: флавоноиды, фенольные кислоты, стильбены, кумарины. Растения винограда известны обилием различных стильбенов. Главная стадия биосинтеза стильбенов – образование основной цепи стильбена, которая катализируется стильбенсинтазой (stilbene synthase, STS), входящей в суперсемейство поликетидсинтаз типа III (Chong *et al.*, 2009; Vannozzi *et al.*, 2012) При помощи фермента STS три молекулы малонил-КоА и одна КоА-эфира производной коричной кислоты превращаются в *транс*-резвератрол или пиносильвин. Определяет конечный продукт реакции исходное производное коричной кислоты (Jeandet *et al.*, 2010). Последующие модификации основной цепи *транс*-резвератрола, такие как гликозилирование, изомеризация, метилирование, олигомеризация и изопренилирование, генерируют различные производные стильбена, такие как писейд, виниферин, астрингин и пицеатаннол и другие (Dubrovina and Kiselev, 2017).

1.5.3. Фармакологические свойства *транс*-резвератрола и других вторичных метаболитов винограда

V. vinifera имеет долгую историю культивирования и селекции, и в течение длительного периода было создано более тысячи сортов винограда, многие из которых все еще используются в сельском хозяйстве (Myles *et al.*, 2011). Влияние потребления продуктов, получаемых из винограда на здоровье человека, было темой исследования для многих научных групп, однако наибольшее внимание привлекла определенная группа фенольных соединений – стильбены: *транс*-резвератрол и его производные.

В 1990-х годах термин «французский парадокс» появился в результате наблюдений за населением Франции, в котором было меньше случаев заболевания

ишемической болезни сердца, несмотря на высокое потребление насыщенных жиров по сравнению с другими странами. Данный парадокс, на тот момент, был объяснен умеренным потреблением вина (Renaud and de Lorgeril, 1992). С тех пор многие исследования вторичных метаболитов винограда получили дополнительный импульс и были сосредоточены на преимуществах умеренного употребления вина, компонентах винограда, которые оказывают благотворное влияние на здоровье человека, особенно в области сердечно-сосудистых заболеваний. Было показано, что полифенолы винограда обладают антиоксидантной активностью, оказывают противовоспалительное, противораковое и антибактериальное действие, а также могут модулировать иммунную систему. Использование вторичных метаболитов винограда получило популярность в пищевой промышленности в качестве натуральных добавок, пищевых красителей или приправ (Šikuten *et al.*, 2020).

Существует мнение, что отдельные исследования влияния вторичных метаболитов на здоровье человека винограда недостаточно достоверны в рамках одного исследования либо одного метода. По возможности, в данной главе будут приведены исследования в рамках мета-анализа различных работ.

В результате мета-анализа 132 работ, связанных с влиянием полифенолов винограда на пролиферацию лейкемических клеточных культур было сделан вывод: полифенолы винограда обладают выраженным антипролиферативным действием на лейкозные клетки, выращенные *in vitro*. Однако необходимы дальнейшие масштабные исследования *in vivo*, чтобы улучшить биодоступность соединений и найти способ избежать токсичности, возникающей при высоких концентрациях. В данных работах были использованы культуры с концентрацией полифенолов намного больше, чем может получить человек из ежедневного питания. Так же было показано взаимодействия между различными компонентами, присутствующими в натуральных продуктах, полученных из винограда или с добавками, могут вызывать антагонистические, синергические или аддитивные

эффекты. Следует провести клинические испытания с пациентами с лейкемией, чтобы определить, можно ли использовать полифенолы винограда в качестве профилактического или лечебного противолейкозного продукта. В данной работе сравнивались различные полифенолы, и *транс*-резвератрол был одним из самых мощных ингибиторов роста лейкемической культуры, 67% ингибирование роста по сравнению с контрольной (García-Martínez *et al.*, 2020).

По данным ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения, <https://www.who.int/>) количество неинфекционных заболеваний, приводящих к смерти, увеличивается, и на 2019 год, болезнь Альцгеймера и другие виды деменций встали на седьмое место по количеству смертей из десяти ведущих причин смерти в мире. Влияние *транс*-резвератрола и полифенолов на данные виды деменций представлены в недавнем обзоре Zhao и коллег (2020). Авторы приходят к выводу – полифенолы винограда могут быть использованы для предотвращения деменций, так как было показано их положительное влияние на когнитивные навыки, мелкую моторику, замедление деменции, улучшение памяти и разговорных навыков. Механизмы данных эффектов разнообразны и не до конца изучены. Еще один важный вывод – необходимо провести больше клинических испытаний и выработать стандартизированную методику для таких испытаний. Также необходимо упомянуть другую позицию – в мета-анализе Farzaei и коллег (2018) приведены обобщенные результаты 226 пациентов из четырех различных исследований. В результате авторы выявили статистически достоверные различия только в двух параметрах: влияние на настроение и усталость, эти параметры существенно менялись в группе пациентов, применявших *транс*-резвератрол в качестве добавки в пищу. Однако стоит учитывать небольшое количество отобранных работ и некоторые параметры были проанализированы только в паре работ, что еще сильнее уменьшает выборку. В заключение, авторы отмечают необходимость большего количества дальнейших клинических исследований.

Существует множество информации о способности полифенолов винограда проявлять антиоксидантную активность, вступать в реакцию с активными формами кислорода (АФК), а также противовоспалительную активность, регулируя экспрессию таких генов, как липоксигеназа (*lipoxygenase*, LOX), синтаза оксида азота (*nitric oxide synthase*, NOS) и циклооксигеназа (*cyclo-oxygenase*, COX) (Malireddy *et al.*, 2012; Yahfoufi *et al.*, 2018). Продукция АФК связана с окислительным стрессом, который запускает реакции воспалительного пути (Salzano *et al.*, 2014). Таким образом, прерывание окислительного процесса ослабляет начало воспалительного каскада. Было показано, что полифенолы обладают антиоксидантной активностью, поглощая радикалы и хелатирующие ионы металлов (например, кверцетин хелатирует ион железа) (Heim *et al.*, 2002). Другие антиоксидантные механизмы, вызываемые полифенолами, представлены блокадой митохондриальной дыхательной цепи, аденозинтрифосфатазы и ксантиноксидазы (Huang *et al.*, 2008). Полифенолы красного винограда способны ингибировать экспрессию генов COX и NOX, тем самым ингибируя продукцию АФК (Biasutto *et al.*, 2012). Также полифенолы винограда способны инактивировать фактор NF- κ B, участвующий в воспалительном процессе (Nam, 2006; Magrone *et al.*, 2008) и регулировать митоген-активированные протеинкиназы (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), которые регулируют транскрипцию генов и активность факторов транскрипции, участвующих в воспалении (Min *et al.*, 2007).

Среди других механизмов противовоспалительного действия, которые могут регулировать полифенолы является подавление пути арахидоновой кислоты (АК). АК высвобождается мембранными фосфолипидами после расщепления фосфолипазой А2. В свою очередь, АК метаболизируется при помощи ферментов COX и LOX с образованием простагландинов (ПГ). Полифенолы способны снижать высвобождение ПГ за счет ингибирования COX и LOX (Kim *et al.*, 1998).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Биоинформатический анализ

Биоинформатический анализ 12 аминокислотных последовательностей JAZ арабидопсиса и 11 JAZ винограда (таблица 1) был проведен в программном комплексе MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021). Анализ филогении был проведен с использованием метода «ближайших соседей» (Saitou and Nei, 1987). Показано оптимальное дерево. Дерево сгенерировано в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического дерева. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода поправки Пуассона и выражены в единицах числа аминокислотных замен на сайт. В данном анализе участвовали 23 аминокислотные последовательности. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (вариант попарного удаления). В окончательном наборе данных было всего 495 позиций.

Таблица 1. Идентификаторы генов, изучаемых в рамках филогенетического анализа. Для последовательностей арабидопсиса идентификаторы даны по базе данных TAIR, для винограда – GenBank.

Название гена	Идентификатор TAIR	Название гена	Идентификатор GenBank
AtJAZ1	AT1G19180	VvJAZ1	XM_002284819
AtJAZ2	AT1G74950	VvJAZ2	XM_002262714
AtJAZ3	AT3G17860	VvJAZ3	XM_003634778
AtJAZ4	AT1G48500	VvJAZ4	XM_002272327
AtJAZ5	AT1G17380	VvJAZ5	XM_002277733
AtJAZ6	AT1G72450	VvJAZ6	XM_002277769
AtJAZ7	AT2G34600	VvJAZ7	XM_002277916
AtJAZ8	AT1G30135	VvJAZ8	CB130922
AtJAZ9	AT1G70700	VvJAZ9	XM_002277121
AtJAZ10	AT5G13220	VvJAZ10	XM_002263220
AtJAZ11	AT3G43440	VvJAZ11	XM_002282652
AtJAZ12	AT5G20900		

Для анализа взаимодействий белка AtJAZ1 был использован программный комплекс BioGRID (Oughtred *et al.*, 2021, <https://thebiogrid.org/>, v4.4) являющийся агрегатором различных баз данных взаимодействий белков. Был выбран минимальный уровень доказательности – 1.

2.2. Создание генетических конструкций

2.2.1. Создание имиРНК для таргетирования гена *AtJAZ1*

Для таргетирования гена *AtJAZ1* *A. thaliana* (AT1G19180, TAIR) последовательность зрелой имиРНК (5'-UCGGCUGACGUGAGUUGCCUU-3') была разработана *in silico* с использованием программы P-SAMS (Fahlgren *et al.*, 2016). Таким образом, экспрессия этой имиРНК на основе уникального нуклеотидного участка не должна препятствовать работе других мРНК арабидопсиса. Создание имиРНК на основе вектора pRS300 осуществляли методом сайт-специфического мутагенеза (Schwab *et al.*, 2006). Пары праймеров, содержащие последовательность зрелой имиРНК и сайты клонирования, были разработаны с использованием программы WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org>), обозначены в соответствии с вышеуказанным протоколом и перечислены в таблице 2. Полученный продукт ПЦР и кассетный вектор pSAT6, содержащий двойной промотор и терминатор гена 35S рРНК вируса мозаики цветной капусты рестрицировали ферментами *Bam*HI и *Hind*III (NEB, Англия) по сайтам рестрикции 5'-GGATCC-3' и 5'-AAGCTT-3', соответственно, и лигировали согласно протоколу производства (NEB, Англия). Полученная конструкция – pSAT6-имиРНК была секвенирована для проверки целостности. Затем кассету, содержащую 35S промотор-имиРНК-35S терминатор, переносили из вектора pSAT6 с использованием фермента *PI-Psp*I (NEB, England) в бинарный вектор pPZP-RCS2, содержащий ген устойчивости к канамицину (*nptII*) (Tzfira *et al.*, 2005). Полученный бинарный вектор переносили в клетки штамма EHA105 *Agrobacterium*

tumefaciens (Hood *et al.*, 1993) с помощью электропорации (GenePulser, BioRad, США) согласно протоколу производителя. Полученный рекомбинантный штамм *A. tumefaciens* использовали для генетической трансформации суспензионных культур клеток арабидопсиса.

2.2.2. Создание имиРНК для таргетирования гена *VvJAZ9*

In silico в программе P-SAMS (Fahlgren *et al.*, 2015) была разработана последовательность зрелой имиРНК (5'-UGGGACUGGGGAGCUUCCCAA-3') для таргетирования гена *V. vinifera JAZ9* (GSVIVG01015042001, Genoscope; XM_002277121, GenBank). Выбранный нуклеотидный участок последовательности уникален для этого растения. Таким образом, экспрессия имиРНК не должна влиять на другие мРНК. Создание имиРНК осуществляли на основе вектора pRS300 методом сайт-специфического мутагенеза (Schwab *et al.*, 2006). Ранее было показано, что данный метод на основе сайт-направленного мутагенеза гена микроРНК 319 арабидопсиса возможно использовать для ингибирования экспрессии генов винограда (Jelly *et al.*, 2012). Для этого с помощью программы WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org>) были разработаны праймеры, содержащие последовательность зрелой имиРНК и необходимые сайты для клонирования; все праймеры были названы в соответствии с вышеуказанным протоколом.

В результате клонирования по вышеуказанному протоколу был получен ПЦР продукт, содержащий последовательность имиРНК и сайты для клонирования. ПЦР продукт и вектор экспрессии pSAT6 разрезали ферментами *Bam*HI и *Hind*III по сайтам рестрикции 5'-GGATCC-3' и 5'-AAGCTT-3', соответственно. Далее ПЦР продукт лигировали в кассетный вектор pSAT6, содержащий двойной промотор и терминатор гена 35S рРНК вируса мозаики цветной капусты. Полученную конструкцию pSAT6-amiRNA секвенировали для проверки целостности. Затем кассету, содержащую 35S промотор-имиРНК-35S терминатор, вырезали из вектора pSAT6 с использованием фермента *PI-Psp*I и лигировали в вектор pPZP-RCS2 (Tzfira *et al.*, 2005). Конечный вектор pPZP, помимо последовательности имиРНК,

также содержал ген устойчивости к канамицину (*nptII*), который позволяет отобрать трансформированные клетки растений. Полученный бинарный вектор переносили в клетки штамма ЕНА105 *A. tumefaciens* (Hood *et al.*, 1993) методом электропорации. Полученный рекомбинантный штамм *Agrobacterium* использовали для получения трансгенных клеточных клеток из растений *V. vinifera*, как описано ранее (Veremeichik *et al.*, 2017).

Таблица 2. Список праймеров использовавшихся в ходе работы

Праймеры используемые для создания имиРНК			
Название праймера	Последовательность 5'->3'		
AtJAZ1Is	GATCGGCTGACGTGAGTTGCCTTCTCTCTTTTGTATTCCA		
AtJAZ1IIa	AGAAGGCAACTCACGTCAGCCGATCAAAGAGAATCAATGA		
AtJAZ1IIIIs	AGAAAGCAACTCACGACAGCCGTTACAGGTCGTGATATG		
AtJAZ1IVa	GAACGGCTGTCGTGAGTTGCTTTCTACATATATATTCCTA		
VvJAZ9Is	GATGGGACTGGGAGCTTCCCAACTCTCTTTTGTATTCCA		
VvJAZ9IIa	AGTTGGGAAGCTCCCCAGTCCCATCAAAGAGAATCAATGA		
VvJAZ9IIIIs	AGTTAGGAAGCTCCCGAGTCCCTTACAGGTCGTGATATG		
VvJAZ9IVa	GAAGGGACTCGGGAGCTTCCТААСТАСАТАТАТАТТССТА		
«А»	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC		
«В»	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG		
Праймеры используемые для проверки генетической конструкции			
Название праймера	Последовательность 5'->3'		
nptD	GAGGCTATTCGGCTATGACTG		
nptR	ATCGGGAGCGGCGATACCGTA		
35S Prom	TCACCATTTACGAACGATAG		
35S Term	GATTTGTAGAGAGAGACTG		
Праймеры используемые для проверки контаминации кДНК хромосомной ДНК			
Название праймера	Последовательность 5'->3'	Размер ампликона с/без интроном	Идентификатор GenBank
AtActF	ACTTTCATCAGCCGTTTTGA	633 н.п.	AY064043.1
AtActR	ACGATTGGTTGAATATCATCAG	190 н.п.	
VvActF	CCTGCCATGTATGTTGCCAT	404 н.п.	AY680701.1
VvActR	GGAGCTGCTCTTTGCAGTTTC	314 н.п.	

Праймеры используемые для ПЦР-РВ			
Название праймера	Последовательность 5'→3'	Идентификатор Genbank	Идентификатор UniProtKB
AtPP2A-F	TAACGTGGCCAAAATGATGC	NM_101203	Q07100
AtPP2A-R	GTTCTCCACAACCGCTTGGT		
AtEF1 α -F	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA	AK226639	Q38845
AtEF1 α -R	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA		
AtSand-F	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	NM_128399	Q9SKN1
AtSand-R	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC		
AtUbq-F	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	DQ027035	P35132
AtUbq-R	TTGTGCCATTGAATTGAACCC		
AtAct2-F	CTTGCACCAAGCAGCATGAA	NM_001338359	Q96292
AtAct2-R	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT		
AtTIP41likeF	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCA	NM_119592	Q8VXY4
AtTIP41likeR	TCAACTGGATACCCTTTCGCA		
AtGAPDH-F	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA	AK222046.1	Q9FX54
AtGAPDH-R	AAACTTGTCGCTCAATGCAATC		
AtMYB34-F	GGATTGAAGAGATGTGGAAAGA	NM_125482	O64399
AtMYB34-R	GTCGTCTTCTTCAGGACTAAAC		
AtMYB51-F	CTATCGGGTCTCCACATTTC	NM_101715	O49782
AtMYB51-R	AGAAACCTCGTAAGTTCTTTCA		
AtMYB122-F	TCGGCCATAGCTCGTAAA	NM_106068	Q9C9C8
AtMYB122-R	GTGGGTCAACGGATCAATAC		
AtWRKY33-F	GGGATGCAACAAGAGGATAATA	NM_129404	Q8S8P5
AtWRKY33R	GGTTCACTCCCACAATCTTC		
AtJAM1-F	CTTGGTTCTGTTTGGTCTTTG	NM_130216	A0A178VP13
AtJAM1-R	GAATCCCTCCAGTCATGTTAG		
AtMYC2-F	GTTTCCGGGTCAGATCAATTA	NM_102998	Q39204
AtMYC2-R	CCGAAGGAATACACGCAATA		
AtICE1-F	GGAGGAAAGGGTAAGAAGAAAG	NM_113586	Q9LSE2
AtICE1-R	GGGACAACCTGATCTAAGCATATA		
ANAC042-F	CACGAAAACCGACTCTCC	NM_129861	Q9SK55
ANAC042-R	GTTTGGTGGTAAGATGGTTG		
AtOBP2-F	GCATCCGTTGGATCTTTGAGC	NM_001035911	Q8L9V6
AtOBP2-R	AAAGCGTATAGCCCCGTCGTT		
AtPYR1-D	CAAACCACAAACATACAAACAC	AY042890	O49686
AtPYR1-R	CAAACATACGAGTATCATCC		
AtPYL4-D	CGACCCTTCACCCTTCTCCG	AY054141	O80920

AtPYL4-R	CTCTCAGCCGCAGTATTCTC		
AtPYL8-D	CTCAGTATCAGAATCGTTG	AK228324	Q9FGM1
AtPYL8-R	CAACAAAGTAACAAGTCTCATC		
AtHAI1-D	GTCAAGTATCATCATCACCG	AY074555.1	A0A1P8BHI8
AtHAI1-R	GTAGATCAACCACCACAACAC		
AtHAB1-D	CGTGTTTTTGGTGTTCCTCGC	BT015409	Q9CAJ0
AtHAB1-R	GTTGTCTTTACTTCCTTTTTG		
AtABI1-D	GATTTTGGCGAGTGACGGGG	AY035073	P49597
AtABI1-R	TTGTCTTTGCTTCCTCTCTG		
AtABF3-D	CTTTGTCCCCTGTTCTTAC	AY054605	Q9M7Q3
AtABF3-R	GCTGATTTTTCTGCTTTTCCAT		
AtABF4-D	CTGTTGCAGCAACTTCTCCA	AY050897	Q9M7Q2
AtABF4-R	CCTTTTGCTGCCCCACGGTC		
AtABF2-D	CACTCTCTCCGTCTCCTTAC	AB017160	Q9M7Q4
AtABF2-R	GATCCTTGCCTGCTTTCGTTG		
AtABF1-D	GTAATATGGGAGGAGCAGGG	AF093544	Q9M7Q5
AtABF1-R	GGGTTTTTCATTATTCAGCC		
AtABI5-D	GTCAGTATGGAGTAGATATG	AF334206	Q9SJM0
AtABI5-R	CTGTTGCTTCCTCTTCCTCTC		
AtABI3-D	CCGCCTCAATTACCGCCAGTG	X68141	Q01593
AtABI3-R	CGTCTCTTGCCTCTAGCTCC		
AtABI4-D	CAACACCAACAGTATCAGAATC	AY560890	A0MES8
AtABI4-R	CGGCGGTGGATGAGTTATTG		
AtABI2-D	CAGTGC GGCGAGTAAAAGAAG	Y08965	O04719
AtABI2-R	CAAATCAACCACTACCACAC		
AtDREB1AD	CAGGATGAGATGTGTGATGC	AB007787	Q9M0L0
AtDREB1AR	CGGACGGAAGCGGCAAAAGC		
AtDREB1BD	GTCAACATGCGCCAAGGATA	NM_118681	P93835
AtDREB1BR	TCGGCATCCCAAACATTGTC		
AtDREB1CD	GAATCCCGGAATCAACCTGT	NM_118679	Q9SYS6
AtDREB1CR	CCCAACATCGCTCTTCATC		
AtDREB2C-D	CATTGGAGTTTGGTGTGGATG	BT026505	Q8LFR2
AtDREB2C-R	CACTGGGCTGCACATAAGGAC		
AtSnRK2.6-D	GAACGATAACACGATGACCAC	AY054624	Q940H6
AtSnRK2.6-R	GTCTTCCTCCATATCGTCATC		
AtSNRK2.2D	GATGTATGGTCTTGCGGTG	NM_001203118	F4J0N1
AtSNRK2.2-R	GAATAGTGATTCTTGTGCCG		
AtSnRK2.3-D	CCTGCTGATCTAATGAACGAG	L05562	Q39193
AtSnRK2.3-R	CTCTCCGCTACTGTCAATGTC		
AtHSFA1-D	GTTTCTTGACGGGTTCTCATCTC	AK229347	P41151

AtHSFA1-R	CTCGGGGTCTTCGGGGTATTC		
AtHSFA3-D	GACGAAGAGACTGAGAACAC	AK117318	Q8GYY1
AtHSFA3-R	CATTATAGTCCATTGTGTTTCC		
AtHSFA6a-D	GAAAGTCACAGAAGTAAAGCAA	DQ447035	Q1PDN3
AtHSFA6a-R	CATCCTCCCCTTGTCCTTG		
AtHSFA2-D	GAGAAGAGACAGCAGCAGATG	AK118744	O80982
AtHSFA2-R	CTCCTCCATAGTCCCCAAGC		
AtZAT12-D	CGTCGTCGCATCCTTGTCCTCC	X98673	Q42410
AtZAT12-R	GTCCACCATCCCTAGACTCAG		

2.3. Получение и культивирование клеточных линий

2.3.1. Получение трансгенной клеточной культуры *A. thaliana*

Контрольная, нетрансформированная каллусная культура *A. thaliana* Col-0, обозначенная в данной работе как AtWT, была получена ранее (Bulgakov *et al.*, 2012). Культуру AtWT трансформировали с использованием штамма *A. tumefaciens* ЕНА105, несущего вектор pPZP с генетической конструкцией, содержащей последовательность имиРНК, нацеленной на ген *AtJAZ1*, как описано (Bulgakov *et al.*, 2012). Трансгенная культура, обозначенная как *jaz1*, была получена после трех месяцев отбора на селективной среде с добавлением канамицина в концентрации 50 мг/л. Каллусные культуры культивировали в пробирках, содержащих 15 мл твердой среды MS (Murashige and Skoog, 1962), с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (таблица 3) в темноте, при 24°C, с 28-дневными интервалами пересева.

2.3.2. Получение клеточных культур *V. vinifera*

Саженьцы *V. vinifera* (сорт Каберне-Совиньон), полученные в питомнике Фанагория (<https://www.en.fanagoria.ru/>), проращивали и выращивали в теплице. Контрольная культура VvWT была получены из листьев растения. Трансгенные культуры VvEV (трансформированная вектором pPZP, содержащим только ген *nptII* для экспрессии в клеточной культуре) и *jaz9* (трансформированная вектором

pPZR, содержащим конструкцию с имиРНК) были так же получены из листьев методом агробактериальной трансформации с последующей селекцией в течение трех месяцев на селективной среде с добавлением канамицина в концентрации 50 мг/л. Контрольная и трансгенные клеточные линии культивировались в пробирках, содержащих 15 мл твердой среды MS (Murashige and Skoog, 1962) с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 2 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты, в темноте, при 24°C, с 28-дневными интервалами между субкультурами (таблица 3).

Таблица 3. Состав сред для культивирования клеточных культур арабидопсиса и винограда

Вещество	Содержание для культур арабидопсиса	Содержание для культур винограда
NH ₄ NO ₃	1,65 г/л	1,65 г/л
KNO ₃	1,9 г/л	1,9 г/л
CaCl ₂	0,44 г/л	0,44 г/л
MgSO ₄	0,37 г/л	0,37 г/л
KH ₂ PO ₄	0,367 г/л	0,367 г/л
Микросоли в соответствии со стандартной средой MS (Murashige and Skoog, 1962)		
Мезоинозин	100 мг/л	100 мг/л
Пептон	100 мг/л	100 мг/л
Сахароза	30 г/л	30 г/л
6-бензиламинопурин	0,5 мг/л	0,5 мг/л
2,4-дихлорфеноксисуксная кислота	0,5 мг/л	-
1-нафтилуксусная кислота	-	2 мг/л
Агар	5,5 г/л	5,5 г/л

2.3.3. Постановка стрессовых экспериментов

Для исследования действия метилжасмоната (МеЖК) на рост и биосинтез вторичных метаболитов в культуральную среду добавляли 5 и 50 мкМ МеЖК (Sigma, США). В контрольных условиях, был добавлен диметилсульфоксид, как растворитель метилжасмоната, в эквивалентной концентрации. Культуры выращивали в стандартных условиях в течение одного месяца.

Влияние холодового стресса на рост каллусов исследовали в следующих условиях: 24°C в течение одной недели, затем 16°C в течение трех недель в климатической камере (Смоленск, СКТБ НТЦ, Россия). Условия солевого стресса создавали добавлением к культуральной среде NaCl (Panreac, США) в концентрации 60 мМ. Биомасса инокулята для стрессовых экспериментов составляла 200 мг (20 г/л) (каждый инокулят взвешивали с помощью электронных весов). Для анализа роста культур в контрольных и стрессовых условиях использовался индекс роста (GI), рассчитанный по формуле:

$$GI = (Wb - Wa)/Wa,$$

где GI – индекс роста; Wb – вес (г/л) свежей биомассы в конечной точке на 1 литр среды; Wa – масса свежей биомассы посевного материала (20 г/л).

Для анализа продуктивности культур использовалась формула:

$$\text{Продуктивность} = C * W$$

где C – содержание (мг/г СВ) метаболита на грамм сухого веса; W – сухой вес (г СВ/л) биомассы в конечной точке для 1 литра среды.

2.4. Молекулярно-генетические анализы

2.4.1. Определение трансгенности полученных клеточных культур

Чтобы доказать успешность трансформации, ДНК клеточной культуры экстрагировали, как описано ранее (Veremeichik *et al.*, 2019); наличие Т-ДНК было проверено с помощью ПЦР с парами праймеров, специфичными для гена *nptII* (*nptD/nptR*) и кассеты экспрессии имиРНК (35S PROM/35S TERM), праймеры приведены в таблице 2. Для проведения ПЦР использовали набор ScreenMix (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Для каждой реакции мы устанавливали образец отрицательного контроля (без образца ДНК) и образец положительного контроля (с добавлением плазмиды, используемой для трансформации растительных клеток). Условия реакций ПЦР для 30 циклов были

следующими: денатурация, 96°C, 30с, отжиг, 55°C, 30 с, элонгация, 72°C, 60 с. Все продукты ПЦР анализировали гель-электрофорезом в 1% агарозе с добавлением бромистого этидия.

2.4.2. Экстракция РНК и синтез кДНК

Выделение тотальной РНК из ткани каллусов было выполнено методом преципитации LiCl, как показано ранее (Shkryl *et al.*, 2016). Полученную суммарную РНК инкубировали с 1 ед. ДНКазы I, не содержащей РНКаз (Jena Bioscience, Германия), в соответствии с руководством производителя. Затем фермент ДНКазу удаляли с помощью BlueSorb (Силекс М, Россия) и осаждали РНК 96% этанолом. Осадок очищали холодным 70% этанолом и ресуспендировали в 30 мкл воды, свободной от РНКазы. Проверку целостности РНК проводили гель-электрофорезом в 1% агарозе. Проверки чистоты и концентрации проводились с помощью спектрофотометра BioSpec Nano (Шимадзу, Япония). Образцы с соотношением 260/280 более 1,8 и соотношением 260/280 более 1,5 использовали для последующего синтеза кДНК и количественной ПЦР.

Для получения кДНК из образцов РНК использовали набор MMLV RT («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Смесь 2,5 мкг образца общей РНК, растворенной в 5 мкл воды, свободной от нуклеаз, и 0,5 нг праймера oligo-dT нагревали до 72°C в течение 5 минут, затем охлаждали на льду. Затем к образцу добавляли раствор 5x буфера MMLV, DTT, dNTP и 100 ед. обратной транскриптазы MMLV. Реакцию проводили в термоциклере C1000 (BioRad, США) в течение 1 ч при 36°C, затем останавливали реакцию в течение 10 мин при 72°C. Полученную кДНК разводили в пять раз. Отсутствие примеси ДНК в образцах арабидопсиса проверяли с помощью ПЦР с парой праймеров (AtActF и AtActR), которая охватывает интрон (443 п.н.) гена актина, в образцах винограда парой (VvActF и VvActR), которая охватывает интрон (90 н.п.). Условия ПЦР были такими, как написано выше. Пары праймеров к гену актина арабидопсиса и винограда, а также идентификаторы генов приведены в таблице 2.

2.4.3. Количественный анализ экспрессии генов методом ПЦР-РВ

Для проведения количественной ПЦР с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали CFX96 (BioRad, США) и 2,5x SYBR Green PCR Master Mix (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя, общий объем 10 мкл, содержащий 250 нМ каждого праймера, 1 мкл пятикратно разбавленного образца кДНК и 2 mM MgCl₂. Для каждого анализа экспрессии гена использовали три биологических повтора в трех технических повторах. Все праймеры, используемые для ПЦР-РВ, были разработаны с учетом температуры отжига 60°C и перечислены в таблице 2. Условия ПЦР были следующими: денатурация 98°C на 30 с, отжиг 60°C 30 с, синтез 72°C на 30 с; 40 циклов. Программное обеспечение BioRad CFX Manager (версия 3.1; Bio-Rad Laboratories Inc., США) использовалось для анализа данных экспрессии qPCR и для проведения анализа кривой плавления. Анализ кривой плавления и электрофорез в 1% агарозе с бромидом этидия проводили, чтобы гарантировать отсутствие неспецифических продуктов ПЦР.

Чтобы определить наиболее подходящие гены «домашнего хозяйства» для ПЦР-РВ для данной культуры, мы руководствовались подходом, описанным Xie *et al.* (2012), в котором рекомендованно одновременное использование нескольких алгоритмов, таких как geNorm, Normfinder, BestKeeper и сравнительный метод Delta-Ct (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). Для проверки мы использовали ранее описанные референсные гены арабидопсиса для ПЦР-РВ (Czechowski *et al.*, 2005). Согласно нашим результатам (Рисунок 7), учитывая наиболее низкий усредненный показатель стабильности экспрессии (геометрического среднего), всесторонний рейтинг RefFinder предполагает использование двух референсных генов – *AtSAND* (AT2G28390) и *AtPP2A* (AT1G13320) для арабидопсиса. Таким образом, оба гена были использованы для нормализации результатов ПЦР-РВ. Тепловые карты экспрессии были созданы с помощью <http://www.heatmapper.ca/tools>.

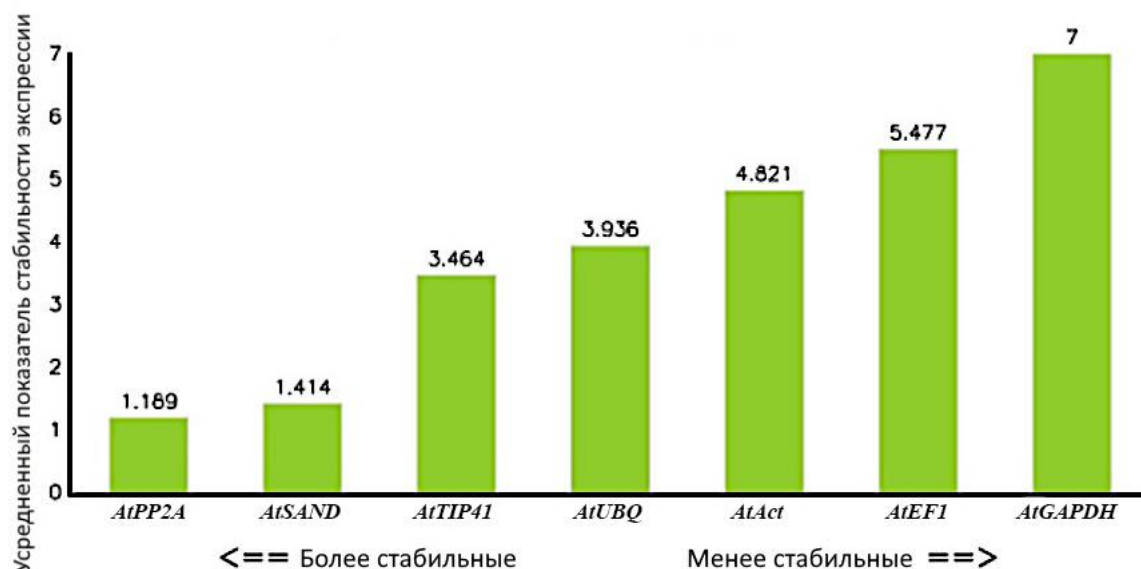


Рисунок 7 – Результат комплексного теста на стабильность экспрессии референсных генов; *AtPP2A* и *AtSAND* являются наиболее стабильными среди исследуемых референсных генов (*AtPP2A*, *AtSAND*, *AtTIP41*, *AtUBQ*, *AtAct*, *AtEF1* и *AtGPDH*, идентификаторы приведены в Таблице 2) для культур арабидопсиса. Вертикальная ось обозначает среднее значение стабильности экспрессии рассчитанного в программном комплексе RefFinder. Меньший показатель означает более стабильную экспрессию референсного гена независимо от окружающих условий.

2.5. Химический анализ вторичных метаболитов клеточных культур

2.5.1. Растворители и реактивы

Все химические вещества, используемые для ВЭЖХ анализов, были аналитической чистоты. В работе были использованы следующие органические растворители и реактивы: ацетонитрил (J.T.Baker, США), метиловый спирт (PanReac, США), муравьиная кислота (Sigma-Aldrich, США). Были приобретены стандартные образцы камалексина (Sigma-Aldrich, США), глюкобрасцидина (PhytoLab GmbH & Co.KG, Германия), *транс*-резвератрола (Sigma-Aldrich, США). Сверхчистую воду (18,2 Мом/см) получали при помощи системы очистки воды стандарта Milli-Q.

2.5.2. Подготовка образцов для анализа

Образцы каллусной ткани сушили до постоянного веса в условиях вакуума (Concentrator plus, Eppendorf, Германия) при комнатной температуре без доступа света. Измельченный материал двукратно экстрагировали в 70% (v/v) метиловом спирте из расчета 2 мл на 100 мг сухой массы. Смесь гомогенизировали, обрабатывали ультразвуком (Elma, Германия) в течение 20 минут и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре без доступа света. Полученные экстракты центрифугировали (Eppendorf, Германия) в течение 10 минут при 15000 об/мин. Супернатант отделяли, очищали с помощью нейлоновой мембраны 0,45 мкм (Millipore, США) и использовали для анализа.

2.5.3. Анализ экстракта клеточной культуры арабидопсиса

Высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием проводили с использованием аналитической системы 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с УФ детектором на диодной матрице и масс-спектрометром Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для разделения компонентов экстрактов использовали обращено-фазовую хроматографию на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 3.5 мкм, Agilent, США) при температуре 40°C. Подвижная фаза состояла из водного 0,1% раствора муравьиной кислоты, (А) и ацетонитрила, (Б). Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0,2 мл/мин по следующей схеме: 0% Б от 0 до 5 мин, (0% Б → 40% Б) до 35 мин, (40% Б → 50% Б) до 40 мин, (5% Б → 100% Б) от 40 до 50 мин, затем 100% Б до 60 мин. УФ-спектры записывали в диапазоне λ от 200 нм до 400 нм. Для количественного определения камалексина сигнал детектора записывали при λ 320 нм. Масс-спектрометрические данные использовали для определения индольных глюкозинолатов в хроматографируемой смеси. Сигнал детектора записывали в режиме ионизации электрораспылением и регистрации отрицательных ионов.

Диапазон регистрируемых значений m/z составил 100 – 1000, поток газа осушителя (N^2) – 8 л/мин, давление газа распылителя (N^2) – 25 psi, потенциал ионного источника был 4,0 кВ, температура газа осушителя – 320°C. При необходимости, тандемную масс-спектрометрию проводили в автоматическом режиме при напряжении фрагментации 1 В. Определение содержания искомым компонентов проводили методом абсолютной градуировки с использованием стандартных образцов камалексина и глюкобрассицина для построения калибровочных графиков.

2.5.4. Анализ экстракта клеточной культуры винограда

Высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим и УФ-детектированием осуществляли с использованием аналитической системы 1260 Infinity (Agilent Technologies, США) с УФ детектором на диодной матрице и масс-спектрометром Bruker HCT ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Разделение проводили на колонке Zorbax C18 (150 × 2,1 мм, 3,5 мкм, Agilent, США) при температуре 40°C. Подвижная фаза состояла из водного раствора 0,1% муравьиной кислоты, (А) и ацетонитрила, (Б). Градиентное элюирование проводили со скоростью потока растворителей 0,2 мл/мин по следующей схеме: 0% Б от 0 до 5 мин, (0% Б → 50% Б) до 40 мин, (50% Б → 100% Б) от 40 до 50 мин, затем 100% Б до 60 мин. УФ-спектры записывали в диапазоне λ от 200 нм до 400 нм. Для количественного определения сигнал детектора записывали при λ 320 нм. Масс-спектрометрический сигнал регистрировали в режиме ионизацией электрораспылением и регистрации отрицательных ионов. Диапазон регистрируемых значений m/z составил 100-1000. Тандемную масс-спектрометрию проводили в автоматическом режиме при напряжении фрагментации 1 В. Определение содержания искомым компонентов проводили методом абсолютной градуировки с использованием стандартных образцов *транс*-резвератрола для построения калибровочных графиков.

2.6. Статистика

Все значения выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Различие $P < 0,05$ считалось значимым. Две независимые категории сравнивались с использованием t -критерия Стьюдента, в то время как сравнения между несколькими группами проводились с помощью ANOVA с последующим протоколом множественного сравнения. Для межгруппового сравнения использовали апостериорный критерий защищенного наименее значимого различия (PLSD) Фишера.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Биоинформатический анализ гена *AtJAZ1* арабидопсиса и гена *VvJAZ9* винограда

3.1.1. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей *JAZ* арабидопсиса и винограда.

Был проведен филогенетический анализ генов группы *JAZ* в двух растениях, которые исследуются в представленной работе: виноград и арабидопсис. На рисунке 8 показано филогенетическое дерево. Данный анализ необходим для поиска среди известных генов *JAZ* винограда ближайшего гомолога гена *JAZ1* арабидопсиса. Для анализа были использованы аминокислотные последовательности, полученные с сайтов NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Список всех номеров дан в таблице 1 в главе материалы и методы.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей показал, что ближайшим гомологом *AtJAZ1* являются изоформы *VvJAZ4* и *VvJAZ9* винограда. Функции двенадцати генов *AtJAZ* арабидопсиса наиболее исследованы, среди них *AtJAZ1* является наиболее изученным с точки зрения регулирования специализированного метаболизма растений. Было показано, что одновременная инактивация десяти генов *JAZ* у арабидопсиса (в том числе *AtJAZ1*) приводили к увеличению содержания индольных глюкозинолатов, сопровождающееся подавлением роста (Guo *et al.*, 2018), при этом индивидуальное ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* привело к увеличению биосинтеза антоцианов через взаимодействия bHLH – MYB между PAP1-TT8 и GL1-GL3 (Song *et al.*, 2011). Таким образом, одной из целей *JAZ*-зависимой репрессии является биосинтез фитоалексинов. Среди 11 генов *JAZ* винограда, *VvJAZ9* и *VvJAZ4* – ближайшие гомологи *AtJAZ1* (Рисунок 8) с гомологией аминокислотных последовательностей 47% и 43%, соответственно. *VvJAZ4* более изучен, чем *VvJAZ9*; было показано что

сверхэкспрессия *VvJAZ4* повлияла на патоген-индуцированную ЖК-сигнальную систему (Zhang *et al.*, 2019). Однако на данный момент данных о роли генов *JAZ* винограда в регуляции вторичного метаболизма отсутствуют. Поскольку, *VvJAZ9* является более близким гомологом *AtJAZ1*, данный ген был выбран для дальнейшей работы (Zhang *et al.*, 2012).

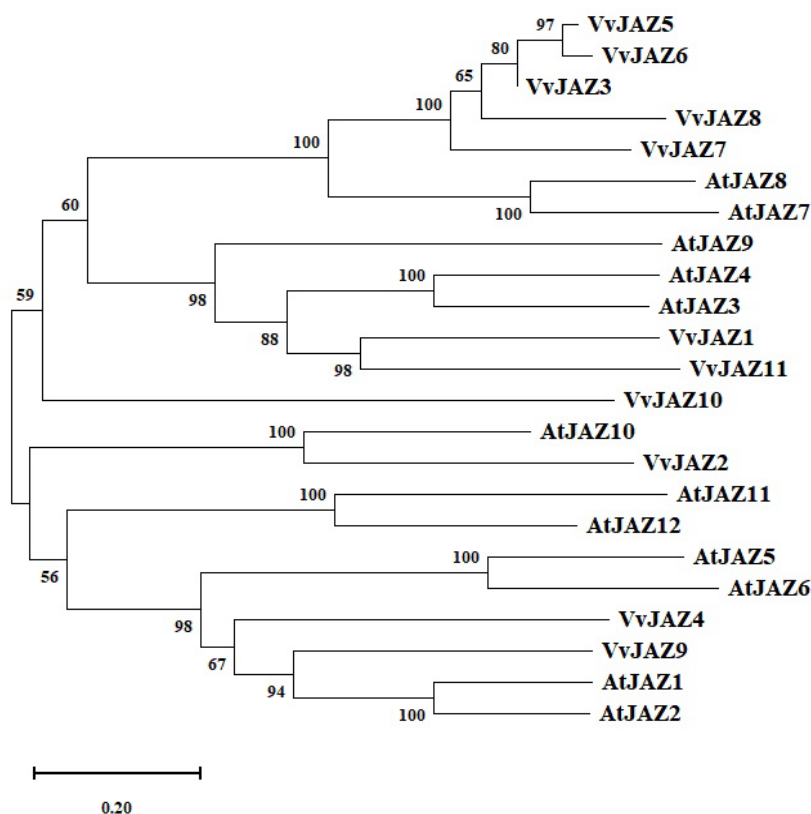


Рисунок 8 – Филогенетическое дерево, основанное на сравнении 23 аминокислотных последовательностей группы JAZ двух различных растений (виноград и арабидопсис) методом присоединения соседей с бутстреп-поддержкой, количество реплик 1000. Построение выполнено в программе MEGA (Версия 10.0)

3.1.2. Анализ белок-белковых взаимодействий *AtJAZ1*

Анализ выполнен в программном комплексе BioGRID (Oughtred *et al.*, 2021, <https://thebiogrid.org/>, v4.4). Проведен поиск взаимодействий первого порядка известных белков с белком *AtJAZ1* (Рисунок 9). Было выявлено 48 белков,

взаимодействующих в рамках первого порядка с белком AtJAZ1, внутри сети было найдено 119 взаимодействий. Такое большое количество взаимодействий говорит о важной роли AtJAZ1 в системе регуляции гормонального сигналинга. Одно из самых интересных взаимодействий – с белком ICE1, который является ключевым при холодовом стрессе (Chinnusamy, 2003). Ранее было достоверно показано наличие физического взаимодействия между AtJAZ1 и ICE1, также было подтверждено AtJAZ1-опосредованное снижение экспрессии генов, регулируемых ICE1 и участвующих в холодной акклимации (Hu *et al.*, 2013). Исходя из данного взаимодействия можно предположить, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* может повлиять на устойчивость к холоду. Также можно отметить и другие примечательные взаимодействия: EIN3, CO, NINJA, GAI, GL3, факторы группы MYB. Эти факторы связывают жасмоновый сигналинг с другими гормональными путями, такими как сигнальные пути абсцизовой кислоты, гиббереллина, этилена. Необходимо учитывать, что данные взаимодействия происходят напрямую, не косвенно, это говорит о том, что *AtJAZ1* и другие *JAZ* гены играют важную роль во множестве клеточных процессов, регулируя взаимодействие сигнальной системы ЖК с другими гормональными сигнальными системами.

интерференция, CRISPR-CAS9. В представленной работе был выбран способ ингибирование экспрессии гена при помощи метода, основанного на механизме РНК-интерференции. Данный метод распространен и адаптирован под различные виды растений. Условно можно разбить процесс получения культур на несколько стадий: создание *in silico* искусственной микроРНК (имиРНК) при помощи программного комплекса; клонирование *in vitro* заданного фрагмента ДНК и перенос фрагмента в бинарный вектор; трансформация и селекция клеточных культур. Для создания *in silico* был выбран программный комплекс P-SAM (Fahlgren *et al.*, 2015), так как именно в данном комплексе была возможность проверки на специфичность имиРНК не только для культуры арабидопсиса, но и для винограда. Клонирование выбранной программой нуклеотидной последовательности было осуществлено по протоколу Schwab *et al.*, 2006, наиболее удобному, высокоспецифичному и с применением распространенных методов молекулярной биологии. Для трансформации растений был использован стандартный метод – агробактериальная трансформация, при помощи бинарного вектора pPZP-RCS2 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994) и штамма агробактерий EHA105 (Hood *et al.*, 1993), промежуточным вектором для создания экспрессионной кассеты был pSAT6 (Tzfira *et al.*, 2005).

3.2.1. Получение генетических конструкций и трансгенных культур клеток арабидопсиса

Кассетный вектор, содержащий имиРНК гена *AtJAZ1*, был создан *in silico* в программе P-SAM, в результате чего была получена последовательность зрелой РНК (5'-UCGGCUGACGUGAGUUGCCUU-3'); затем эта последовательность была получена *in vitro* в соответствии с главой 2.2.1 материалов и методов. Необходимо уточнить, что данная последовательность специфична только к выбранному гену и прошла проверку на специфичность. Генетическую конструкцию 35S-Промотор-имиРНК*AtJAZ1*-35S-Терминатор (Рисунок 10) переносили в бинарный вектор

pPZP-RCS2. Затем бинарный вектор переносили в штамм *A. tumefaciens* EHA105 методом электропорации.

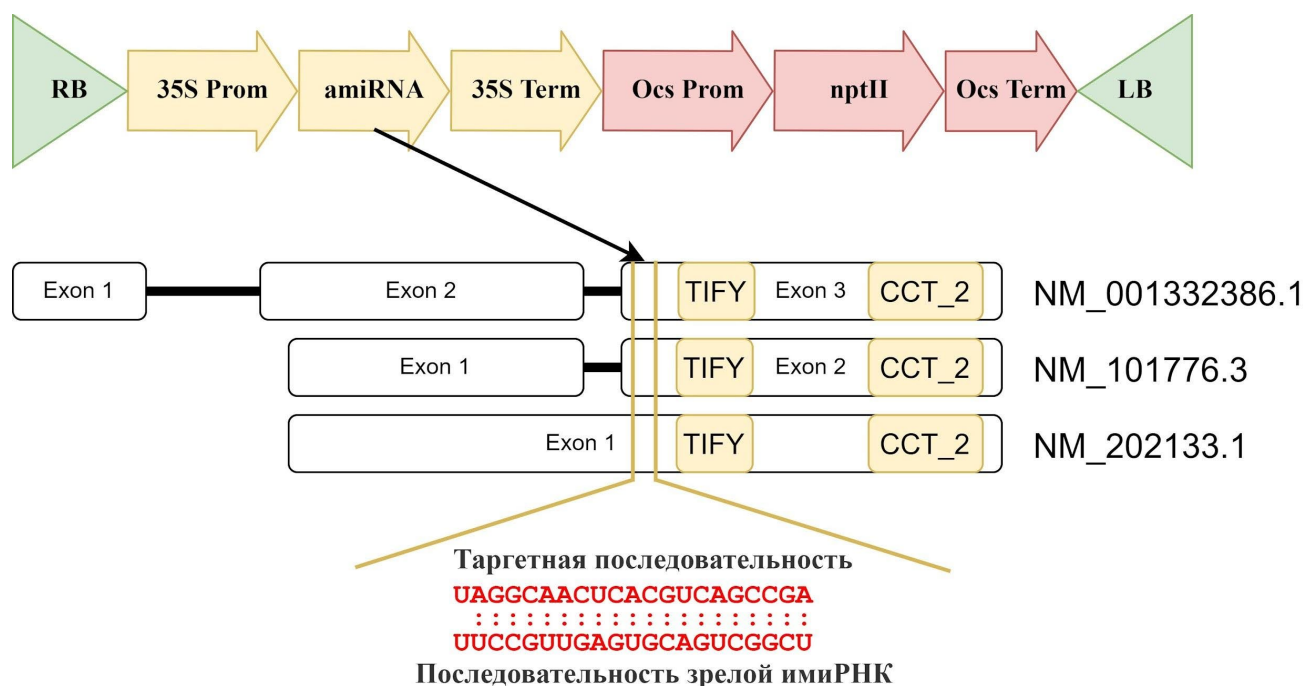


Рисунок 10 – Описание полученной генетической конструкции и ее мишени. Т-ДНК часть вектора pPZP: RB, LB – правая и левая границы; 35S Prom/Term – промотор/терминатор вируса мозаики цветной капусты 35S; Ocs Prom/Term – промотор/терминатор октопинсинтазы; имиРНК – последовательность искусственной микроРНК; *nptII* – неомицин фосфотрансфераза II; amiRNA – ген искусственной миРНК (имиРНК); стрелка от имиРНК к экзонам указывает сайт ингибирования и выравнивание последовательностей зрелой имиРНК и мРНК гена *AtJAZ1* (идентификаторы последовательностей GenBank: NM_101776.3, NM_001332386.1, NM_202133.1). имиРНК нацелена на все три сплайс-варианта мРНК гена *AtJAZ1* в консенсусном сайте.

Контрольная клеточная культура арабидопсиса, обозначенная как AtWT (от англ. Wild Type, дикий тип), была получена ранее из листьев растения *A. thaliana* Col-0 коллективом лаборатории биоинженерии (Bulgakov *et al.*, 2012). В настоящем исследовании клеточную линию AtWT трансформировали посредством

агробактериальной трансформации, с использованием бинарного вектора pPZR, содержащим нацеленную на ген *AtJAZ1* имиРНК. После селекции на среде с добавлением канамицина (50 мг/л) в течение трех месяцев была получена стабильно растущая клеточная линия, устойчивая к канамицину, которая обозначена как *jaz1*. Обе культуры клеток имели сходную морфологию с желтоватым оттенком и рыхлой консистенцией (Рисунок 11).

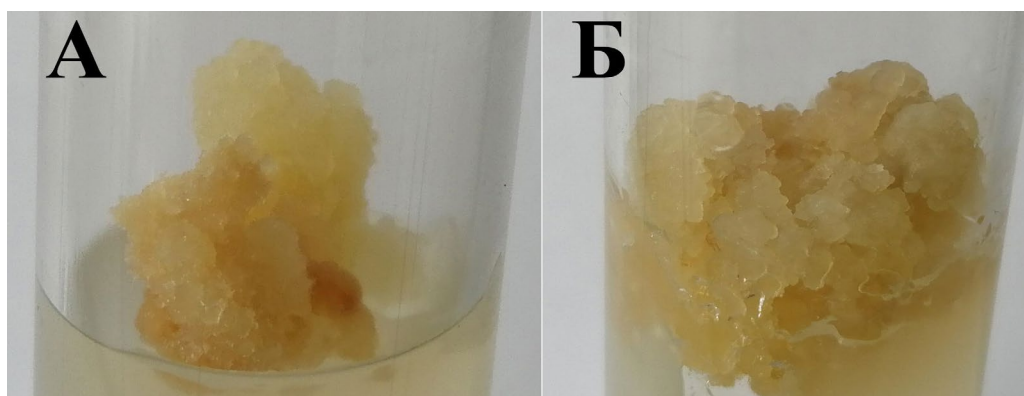


Рисунок 11 – Внешний вид клеточных культур. **А** – нетрансгенная клеточная культура (*AtWT*). **Б** – трансгенная культура (*jaz1*), трансформированная полученной конструкцией.

Для подтверждения успешного переноса гена и экспрессии гена *nptII* были получены образцы ДНК и кДНК из нормальной и трансформированной клеточных линий. Для проверки того, что кДНК не содержала геномной ДНК, была проведена ПЦР с праймерами к гену *AtActin* (Рисунок 12А). Ген-специфический анализ образцов ДНК с использованием пар праймеров для экспрессионной кассеты показал, что перенос гена был успешным (Рисунок 12Б). Для проверки экспрессии *nptII* была проведена ПЦР с парами праймеров к гену *nptII* (Рисунок 12В).

Мы показали, что в пробах кДНК отсутствует геномная ДНК. Полученный ПЦР сигнал в реакции с праймерами к экспрессионной кассете на матрице геномной ДНК указывает на успешный перенос Т-ДНК в геном клеточной линии арабидопсиса при этом, отсутствие ПЦР продукта на матрице кДНК указывает на

отсутствии контаминации векторной плазмидой биоматериала трансгенной клеточной культуры.

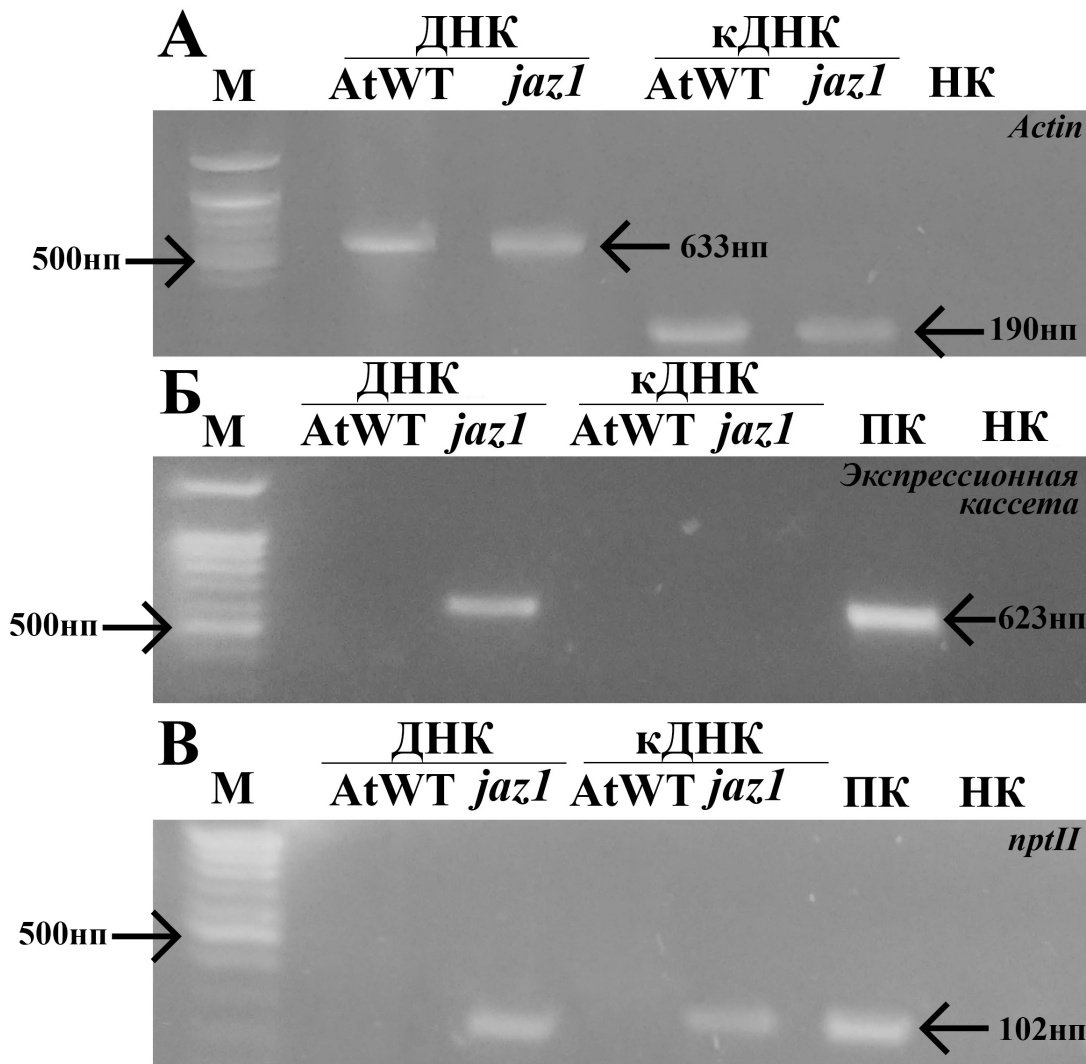


Рисунок 12 – Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР в 1% агарозном геле: AtWT – нетрансгенная, контрольная культура арабидопсиса, *jaz1* – трансгенная культура клеток арабидопсиса. **А** – ПЦР-продукт гена *AtAct1*, охватывающего интрон; **Б** – ПЦР-продукт экспрессионной кассеты; **В** – ПЦР-продукт гена *nptII*; М – маркер молекулярных весов, ПК - положительный контроль (плазмида, несущая конструкцию имиРНК), НК – отрицательный контроль (реакционная смесь без ДНК).

Далее был исследован уровень ингибирования гена *AtJAZ1* в трансгенной культуре по сравнению с контрольной. Анализ был проведен методом ПЦР-РВ;

было показано, что экспрессия гена *AtJAZ1* ниже более чем в пять раз в трансгенной линии по сравнению с контрольной культурой (Рисунок 13), что говорит об успешном получении клеточной культуры с заданными свойствами.

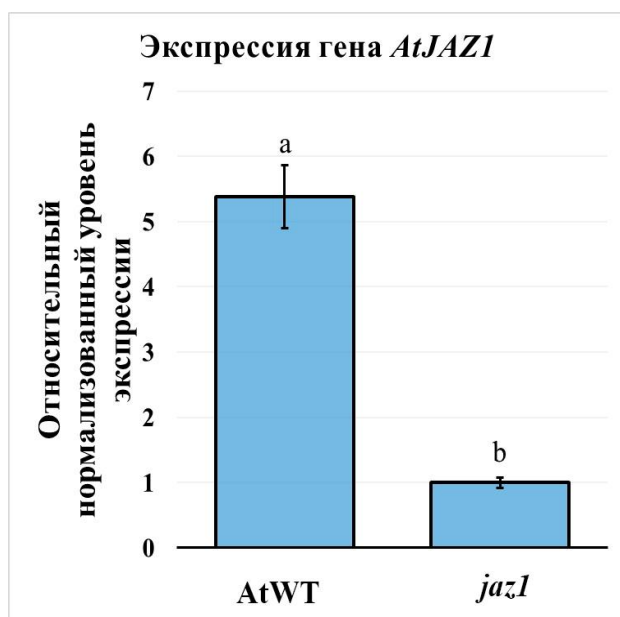


Рисунок 13 – Результат анализа экспрессии гена *AtJAZ1* методом ПЦР-РВ. AtWT – контрольная культура арабидопсиса, *jaz1* – трансгенная культура арабидопсиса. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, *t*-тест).

3.2.2. Получение генетических конструкций и трансгенных клеточных линий винограда

Искусственная микро-РНК (5'-UGGGACUGGGGAGCUUCCCAA-3'), нацеленная исключительно на ген *VvJAZ9*, была разработана *in silico* в программе P-SAM в соответствии с руководством к программе. Указанная имиРНК также прошла проверку на специфичность и способность ингибировать только ген *VvJAZ9*. Данную последовательность клонировали в кассетный вектор в соответствии с главой 2.2.2 материалов и методов, в результате чего была получена

следующая генетическая конструкция: промотор 35S-имиРНК *VvJAZ9*-35S терминатор. Вся генетическая конструкция была перенесена в бинарный вектор pPZP-RCS2. Полученный вектор (Рисунок 14) был перенесен в штамм EHA105 *A. tumefaciens* для последующей генетической трансформации. Также вектор pPZP-RCS2 (содержащий только ген *nptII*) был перенесен в отдельный штамм EHA105 для создания культуры клеток винограда экспрессирующих только ген *nptII* для сравнения эффекта трансформации на культуру клеток.

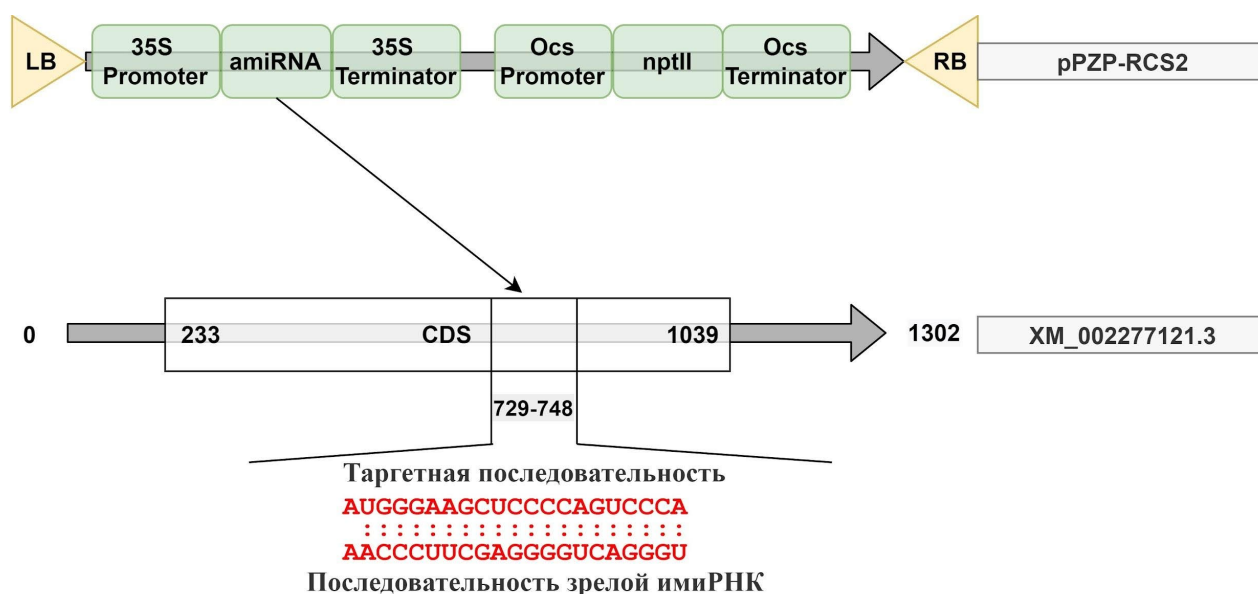


Рисунок 14 – Описание генетической конструкции, содержащей имиРНК, и ее мишень. На рисунке показана часть Т-ДНК вектора pPZP-RCS2: RB, LB – правая и левая границы; 35S-Promoter/35S-Terminator – 35S промотор/терминатор вируса мозаики цветной капусты; Ocs Promoter/Terminator – промотор/терминатор октопинсинтазы; имиРНК – последовательность искусственной микроРНК; *nptII* – ген неомицинофосфотрансферазы II; amiRNA – ген искусственной микроРНК (имиРНК); стрелка от имиРНК указывает сайт ингибирования и выравнивание последовательностей зрелой имиРНК и зрелой мРНК гена *VvJAZ9* (идентификатор последовательности Genbank: XM_002277121.3).

Саженьцы винограда (сорт Каберне-Совиньон) выращивали в контролируемых условиях в течение 6 месяцев в открытом грунте при температуре

24°C и 14 часах светового дня. После появления листьев размером не менее 4 см их собирали для получения культур клеток. Для этого листья стерилизовали, разрезали на экспланты 5 мм и помещали на среду MS с добавлением гормонов 6-бензиламинопурина (0,5 мг/л) и 1-нафтилуксусной кислоты (2 мг/л). Первичный каллус рекультивировали и селектировали до получения однородной, стабильной и активно растущей клеточной линии, обозначенной VvWT (от англ. Wild Type, дикий тип) и используемой в качестве контроля. Для получения трансгенной линии, экспланты кокультивировали с *A. tumefaciens* EHA105, несущим бинарный вектор pPZP-RCS2 с имиРНК, нацеленной на *VvJAZ9*. После селекции на канамицине (50 мг/л) в течение 3-х месяцев была получена клеточная линия, обозначенная *jaz9*. Также была получена линия VvEV (от англ. Empy Vector, пустой вектор), экспрессирующая только ген *nptII*, посредством кокультивирования эксплантов с *A. tumefaciens* EHA105, несущей вектор pPZP-RCS2 без имиРНК.

После селекции все клеточные линии имели схожий внешний вид, плотную консистенцию и светло-бежевый оттенок (Рисунок 15 А-В). ПЦР-РВ использовали для определения уровня экспрессии целевого гена *VvJAZ9* в контрольной и трансгенных клеточных линиях. Было показано, что экспрессия гена *VvJAZ9* уменьшается в 4,5 раз в культуре *jaz9* по сравнению с контрольной культурой и трансгенной культурой VvEV (Рисунок 15Д). Кроме того, успешная трансформация клеточных линий была подтверждена определением уровня экспрессии гена *nptII* методом ПЦР-РВ; был показан высокий уровень экспрессии гена *nptII* в трансгенных культурах, в то время как уровень флуоресценции в образце контрольной культуре был ниже порога обнаружения (Рисунок 15Г).

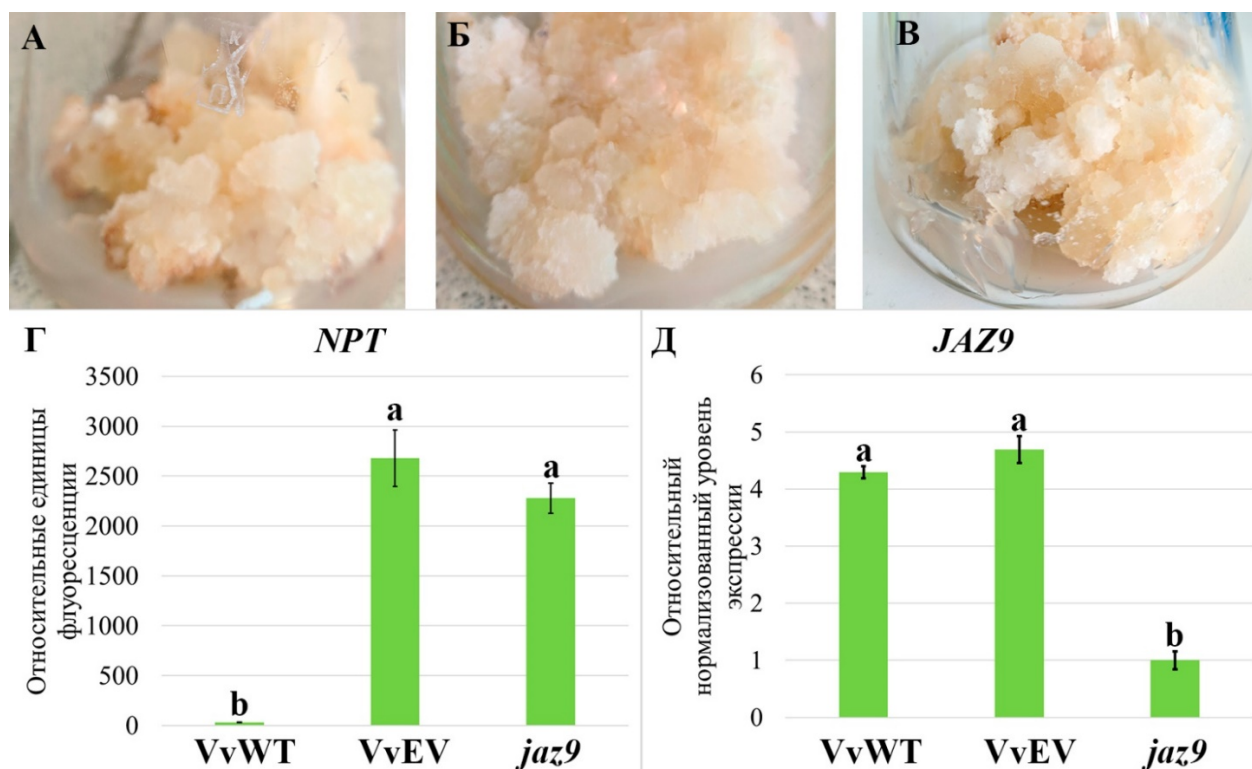


Рисунок 15 – Контрольная и трансгенные клеточные линии винограда культурного. **А, Б, В** – внешний вид клеточных культур: контрольной нетрансгенной линии VvWT и трансгенных, VvEV (трансформированной пустым вектором) и *jaz9* (*VvJAZ9*-ингибированной культуры), соответственно. Результаты анализа ПЦР-РВ: **Г** – относительный уровень экспрессии гена *nptII*, **Д** – сравнение экспрессии гена *VvJAZ9* в контрольной (VvWT) и трансгенных VvEV и *jaz9* клеточных культурах. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера).

имиРНК-опосредованное ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в культуре арабидопсиса и его гомолога, *VvJAZ9*, в культуре винограда обеспечило 4-5-ти кратное снижение экспрессии целевых генов. Таким образом, мы получили две сравнимые системы на основе клеточных культур растений, реализующих различные метаболические пути, для дальнейшего анализа эффекта ингибирования экспрессии генов семейства *JAZ* на биосинтез вторичных метаболитов.

3.3. Содержание вторичных метаболитов в клеточных культурах арабидопсиса и винограда

Путь передачи сигналов ЖК играет важную роль в реакции растения на изменения окружающей среды и различные стрессы, перепрограммируя вторичный метаболизм и распределяя ресурсы для эффективного ответа на стимулы для дальнейшей адаптации и выживания. Этот эффективный ответ зависит от скоординированных действий всех участников процесса – от ТФ, связанных с сигнальной системой ЖК и другими гормонами, до конечных участников – генов биосинтеза вторичных метаболитов. Было показано, что активация пути жасмоновой кислоты приводила к индукции многих генов биосинтеза различных соединений, таких как терпеноидные индольные алкалоиды, никотин, артемизинин и другие (De Geyter *et al.*, 2012).

3.3.1. Биосинтез азот-, серосодержащих метаболитов в контрольной и трансгенной клеточных культурах арабидопсиса

Поскольку основной мишенью для белков группы JAZ является путь жасмонат-опосредованного биосинтеза (Pauwels and Goossens, 2011), мы проанализировали состав вторичных метаболитов в контрольной и трансгенной клеточных линиях с помощью методов ВЭЖХ, сопряженной с масс-спектрометром. Содержание индольных глюкозинолатов (ИГ) и камалексина в трансформированной клеточной культуре арабидопсиса (*jaz1*) отличалось от контрольной культуры. Концентрация индол-3-илметилглюкозинолата, который является предшественником более активных метокси-форм ИГ, была снижена в 3,3 раза в трансгенной культуре по сравнению с контролем. Концентрация метоксиформ, 1-метоксииндол-3-илметилглюкозинолата и 4-метоксииндол-3-илметилглюкозинолата, напротив, увеличилась в трансгенной культуре в 2,8 и 1,2 раза по сравнению с контрольной культурой соответственно (Рисунок 16).

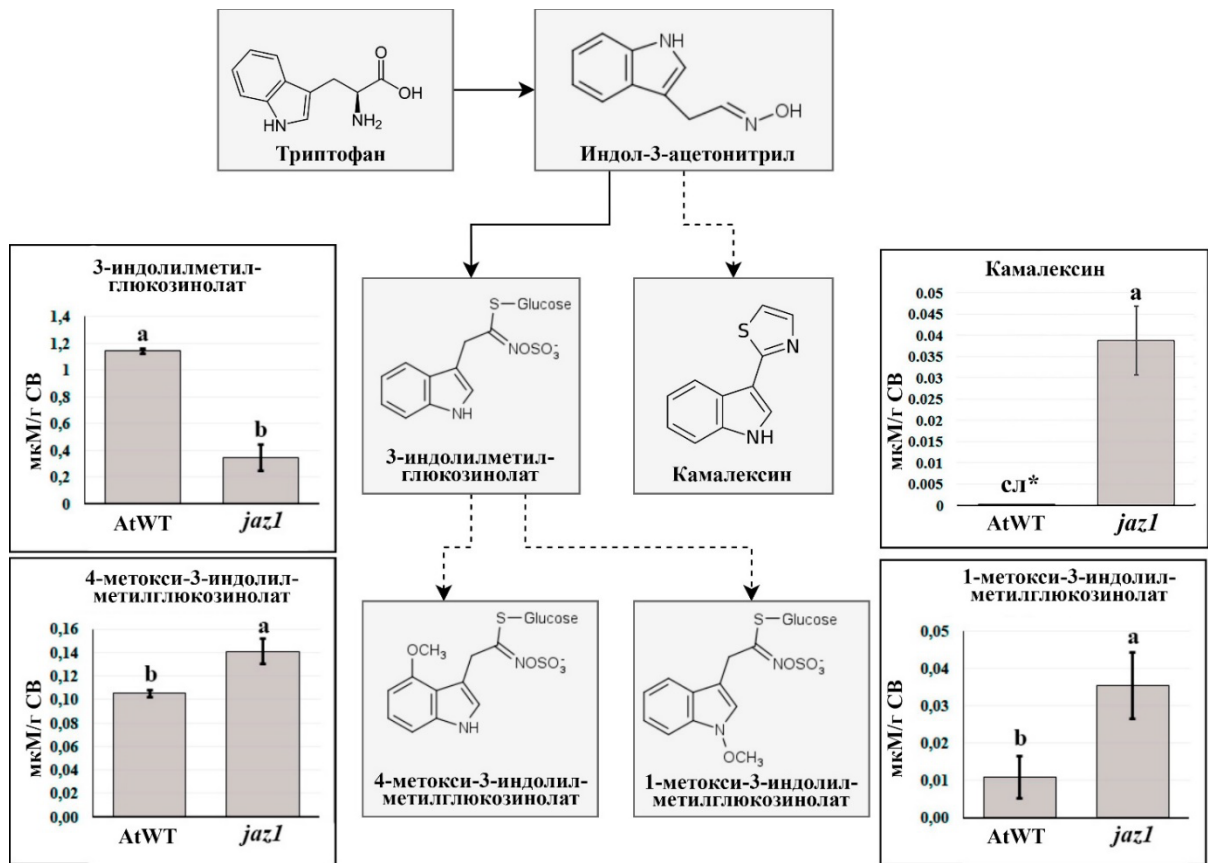


Рисунок 16 – Влияние ингибирования экспрессии гена *AtJAZ1* на ЖК-регулируемый биосинтез производных триптофана. Показаны путь и концентрации (мкМ/г СВ, сухой вес) индольных глюкозинолатов и камалексина в культурах *AtWT* (контрольная) и *jaz1* (трансгенная) в контрольных условиях. Сплошные линии представляют одну реакцию, пунктирная линия – несколько реакций. сл* – следовые количества. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, *t*-тест).

Основной фитоалексин арабидопсиса, камалексин, в контрольной культуре отсутствовал, его возможная концентрация была ниже предела обнаружения детектором хроматографа; однако в трансгенной культуре его концентрация составила 0,045 мкМ/мг сухого веса (Рисунок 16). Идентификацию камалексина в сухих экстрактах каллусов *jaz1* проводили с использованием сравнения хроматографических и масс-спектрометрических данных, таких как время удерживания, УФ-профиль и паттерны фрагментации MS2 ионов-

предшественников $[M+H]^+$ при m/z 201 стандартного раствора камалексина (Рисунок 17А) и образцов клеточных линий (Рисунок 17Б, В).

Индекс роста трансгенной и контрольной культур статистически значимо не отличался, и составил для контрольной культуры $5,9 \pm 0,53$, а для трансгенной $5,79 \pm 0,42$, значения даны как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Продуктивность для контрольной культуры невозможно определить, так как содержание камалексина составило ниже предела обнаружения прибора; для трансгенной культуры продуктивность составила $27,65 \pm 2,32$ мкг/л среды, значения также даны как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Так как биосинтез камалексина является индуцибельным в ответ на атаку патогена, конкретнее в ответ на активацию гормональных путей, можно сделать вывод, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* привело к активации какого-либо сигнального пути. Для дальнейшей оценки эффекта ингибирования экспрессии гена *AtJAZ1* были исследованы факторы транскрипции, относящиеся к биосинтезу камалексина. Группа MYB34/51/122 является ключевой для регуляции вышеуказанного пути. Эти три гена регулируют биосинтез камалексина и ИГ в ответ на передачу гормональных сигналов: MYB51 зависит от передачи сигналов салициловой кислоты и этилена, MYB34 регулируется путями абсцизовой и жасмоновой кислот, MYB122 – жасмоновой кислоты и этилена (Frerigmann and Gigolashvili, 2014).

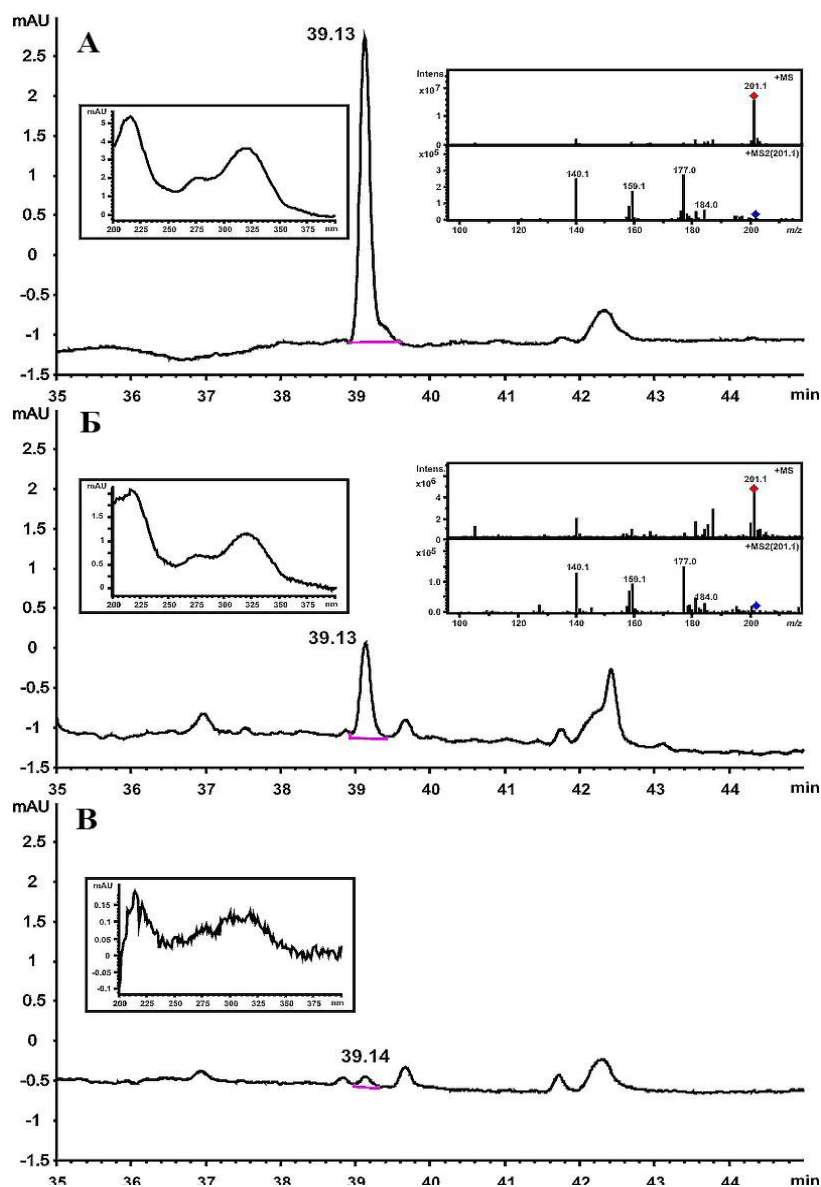


Рисунок 17 – Определение камалексина с помощью ВЭЖХ-УФ-МС в экстрактах трансгенной клеточной культуры *jaz1*. Хроматографический профиль стандартного раствора камалексина с концентрацией 0,01 мкмоль/мл (**А**), а также камалексина в экстрактах трансгенной культуры *jaz1* (**Б**) и контрольной культуры *AtWT* (**В**). Хроматограммы были записаны при длине волны 320 нм, все спектральные данные были получены от вершины интересующих пиков, УФ-спектры (слева) были получены с использованием диодно-матричного детектора, спектры полного сканирования (справа, сверху) и спектры ионов-продуктов. Ионы-предшественники $[M+H]^+$ при m/z 201 (справа, внизу) были получены в режиме положительных ионов.

Основные факторы транскрипции, регулирующие путь камалексина, различались по экспрессии между контрольной и трансгенной культурами. Экспрессия гена MYB34 была в 4,7 раза выше в трансгенной культуре; однако экспрессия генов MYB51 и MYB122 в контрольной культуре была достоверно выше, но не более, чем в 2 раза (Рисунок 18А). Данные MYB регулируют экспрессию генов ферментов верхнего порядка CYP79B2/B3 (Freigmann *et al.*, 2015). Уровни экспрессии этих ферментов существенно не изменились в клетках *jaz1* (Рисунок 18А). Напротив, экспрессия ферментов двух конечных реакций CYP71A12, CYP71A13 и CYP71B15 резко увеличивалась в клетках *jaz1* по сравнению с контрольной культурой AtWT (в 12, 12 и 8 раз соответственно) (Рисунок 18Б). Транскрипционные факторы WRKY33 и NAC42 вносят значительный вклад в регуляцию экспрессии генов ферментов биосинтеза двух конечных реакций. Будучи основным регулятором ответа на биотрофные патогены, WRKY33 связан с передачей сигналов как салициловой кислоты, так и жасмоновой кислоты, и было показано, что он является негативным регулятором белков JAZ, поскольку может связываться с W-боксами (Saga *et al.*, 2012, Birkenbihl *et al.*, 2012). Экспрессия гена *WRKY33*, который регулирует экспрессию генов *CYP71A12* и *CYP71A13*, увеличилась в 8 раз; Экспрессия гена *NAC42*, который регулирует экспрессию генов *CYP71A12*, *CYP71A13* и *CYP71B15*, была увеличена более чем в 20 раз в клетках *jaz1* по сравнению с AtWT (Рисунок 18Б).

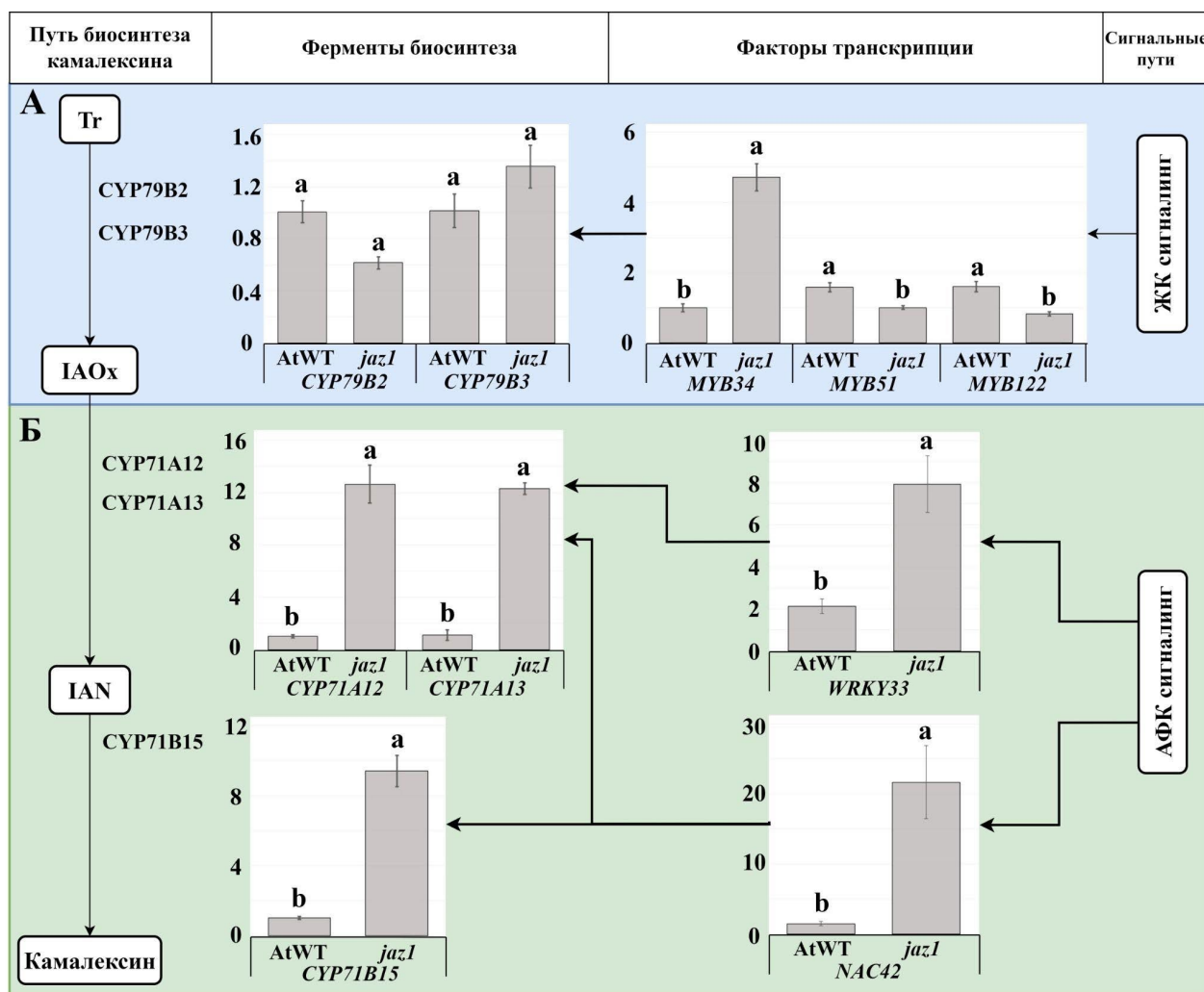


Рисунок 18 – Анализ экспрессии генов ключевых ферментов биосинтеза камалексина и связанных факторов транскрипции. По оси Y всех гистограмм указано нормализованное кратное изменение относительной экспрессии генов в клеточных культурах AtWT (контрольная) и *jaz1* (трансгенная). **А** – восходящий путь, Tr – триптофан, IAOx – индол-3-ацетальдоксим, MYB34/51/122 – основные регулирующие ТФ ферментов первой ступени, CYP79B2 и CYP79B3; **Б** – нисходящий путь, IAN – индол-3-ацетонитрил; NAC42 и WRKY33 – ТФ, контролирующие две последние стадии биосинтеза, катализируемые ферментами CYP71A12, CYP71A13 и CYP71B15. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, *t*-тест).

Анализ содержания фенилпропаноидных производных (флавоноидов и антоцианов) в клеточных культурах арабидопсиса показал их полное отсутствие (данные не приведены). Ранее было показано (Bulgakov *et al.*, 2016), что отсутствие фенольных соединений в клеточных культурах арабидопсиса связано с блокировкой экспрессии основного ТФ, регулирующего фенилпропаноидный путь, MYB11 (Pandey *et al.*, 2015). Кроме того, ранее было показано, что агробактериальная трансформация клеточной культуры пустым вектором не оказывает влияния на биосинтез камалексина и ИГ (Bulgakov *et al.*, 2016). Таким образом, можно предположить, что ингибирование гена *AtJAZ1* не способно повлиять на заблокированный в клеточных культурах фенилпропаноидный биосинтетический путь, и в данном аспекте необходимы исследования на растении.

При активации биосинтеза камалексина за счет 5-ти кратного ингибирования экспрессии гена *AtJAZ1* мы не обнаружили значительного эффекта на рост клеточной культуры. Таким образом, можно предположить, что *AtJAZ1* не принимает непосредственного участия в регуляции роста, что имеет немаловажное значение в биоинженерии растений. Ранее было показано, что ингибирование различных групп генов *JAZ* во множественных мутантах арабидопсиса в большинстве случаев приводило к ингибированию роста (Major *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018; Major *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021), однако индивидуальная роль в данном процессе *AtJAZ1* не была определена. В результате интерпретации данных анализа экспрессии и ВЭЖХ вторичных метаболитов, можно предположить, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* повлияло на содержание конечного продукта – камалексина и ИГ путем активации экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих данный путь. Изменилась экспрессия не только генов группы *MYB*, но и *WRKY33* и *NAC42*, которые регулируются АФК-зависимой сигнальной системой. Полученные данные указывают на вовлеченность репрессоров группы *JAZ* в процессы взаимодействия ЖК-зависимой и ЖК-независимых сигнальных систем.

3.3.2. Биосинтез *транс*-резвератрола в контрольной и трансгенных клеточных культурах винограда

В течение последних десятилетий был достигнут значительный прогресс в изучении передачи сигналов жасмоновой кислоты на таких модельных растениях, как арабидопсис (Ghorbel *et al.*, 2021). Однако данная тема для многих других видов растений, включая виноград, остается слабо изученной. Изучение механизмов ЖК-опосредованной регуляции представляет особый интерес для культурных, экономически важных растений, поскольку она вносит значительный вклад в устойчивость к стрессовым факторам и регулирует выработку вторичных метаболитов.

Мы исследовали содержание *транс*-резвератрола в полученных контрольной и трансгенных культурах (*jaz9*, VvEV) винограда методом ВЭЖХ (Рисунок 19 А-В). Ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* привело к увеличению содержания *транс*-резвератрола в трансгенной культуре *jaz9* почти в 10 раз (Рисунок 19Г) по сравнению с контрольной культурой и VvEV культурой клеток. Количество *транс*-резвератрола в трансгенной *jaz9* культуре составляло в среднем 2,13 мг/г сухого веса, тогда как в контрольной культуре оно составляло в среднем 0,2 мг/г сухого веса, в трансгенной векторной культуре VvEV содержание *транс*-резвератрола статистически значимо не отличалось от нетрансгенной культуры клеток.

Активация сигнального пути жасмоновой кислоты может иметь несколько биологических последствий (Ruan *et al.*, 2019). Однако его основные эффекты приводят к перераспределению растительных ресурсов в сторону увеличения производства вторичных метаболитов и замедления роста (Guo *et al.*, 2018; Ali and Baek 2020). Чтобы определить влияние ингибирования экспрессии гена *VvJAZ9* на накопление биомассы, изучали ростовые характеристики клеточных линий. Мы показали, что ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* в трансгенной культуре приводит к снижению индекса роста на 26% (Рисунок 19Д). Несмотря на

подавление роста, продуктивность (Рисунок 19Е) линии трансгенных клеток (1,375 мг/л) была почти в 7 раз выше, чем у контрольной культуры (0,202 мг/л). Продуктивность и индекс роста контрольной клеточной культуры и культуры VvEV статистически значимо не отличались.

Анализ эффекта ингибирования экспрессии гена *VvJAZ9* на биосинтетические показатели в культуре клеток винограда показал, что почти 5-ти кратное снижение экспрессии гена *VvJAZ9* приводит к активации биосинтеза *транс*-резвератрола в 10 раз. Однако, в данном случае мы наблюдали негативное влияние на ростовые характеристики трансгенной культуры. Таким образом, на основе полученных данных, можно с уверенностью заключить, что *AtJAZ1* и его гомолог *VvJAZ9* играют важную роль в регуляции вторичного метаболизма. О негативном влиянии ингибирования *VvJAZ9* на рост трансгенной культуры можно сделать несколько предположений. Возможно, на ростовых характеристиках трансгенных клеток негативно сказалось высокое содержание *транс*-резвератрола, однако, активация биосинтеза *транс*-резвератрола на основе других подходов не оказывала негативного влияния на рост клеточных культур (Veremeichik *et al.*, 2016). При этом, ингибирование роста трансгенной культуры винограда было не критичное, и, учитывая отсутствие негативного влияния на рост в трансгенной культуре арабидопсиса, можно сделать однозначное заключение об отсутствии критического негативного влияния ингибирования экспрессии исследуемых генов *JAZ* на ростовые показатели культур при значительной активации вторичного метаболизма. Чтобы делать выводы о роли данной группы гомологов *JAZ* в регуляции роста на уровне общей физиологии растений, необходимы дополнительные исследования с использованием растений.

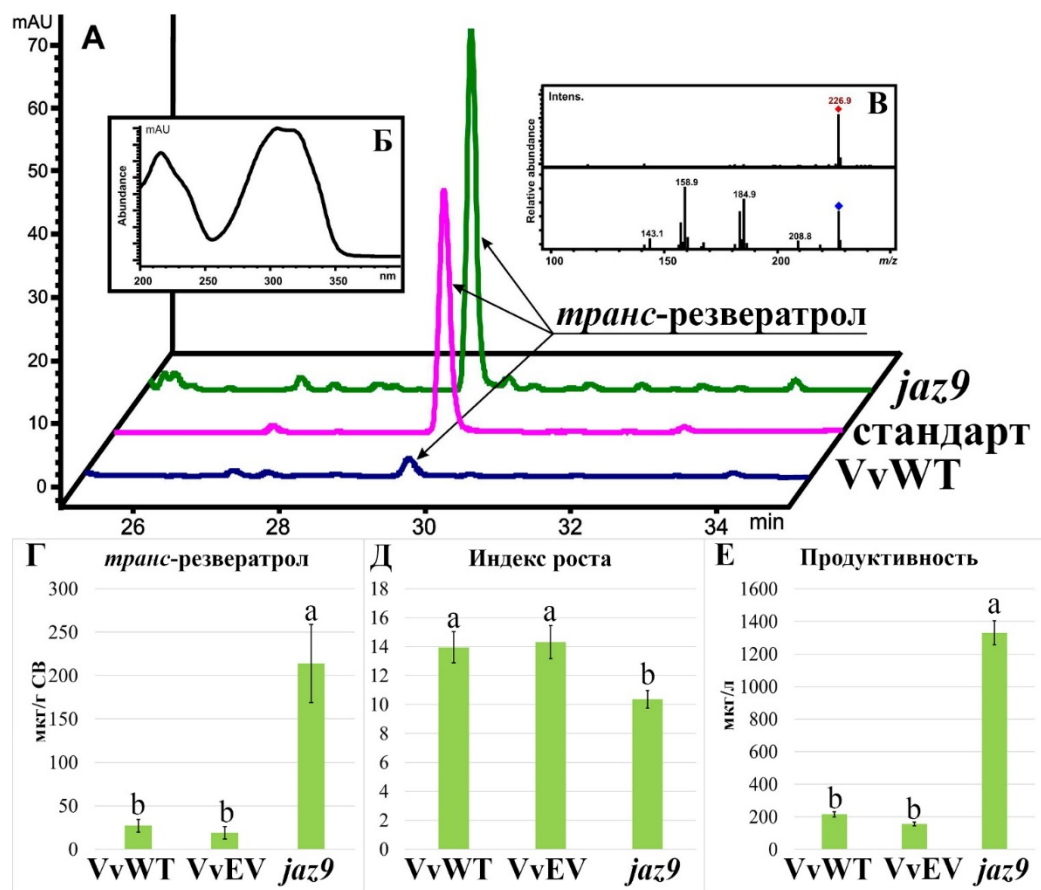


Рисунок 19 – Рост и содержание *транс-резвератрола* в контрольной VvWT и в трансгенных VvEV (трансформированная вектором pPZP) и *jaz9*, (VvJAZ9-ингибированная) культурах. **А** – определение *транс-резвератрола* с помощью ВЭЖХ-УФ-МС в экстрактах VvWT и *jaz9* клеточных культур. Хроматограммы записывали при длине волны 310 нм; все спектральные данные были получены от вершины интересующих пиков: УФ-спектры (**Б**) были получены с использованием диодно-матричного детектора; спектры полного сканирования и спектры ионов-продуктов ионов-предшественников [M-H] – при m/z 227 (**В**) были получены с помощью электроспрея в режиме отрицательных ионов. Сравнение содержания (мкг/г сухого веса) *транс-резвератрола* (**Г**), индекса роста (**Д**) и продуктивности (мкг/л) (**Е**) в контрольной и трансгенных клеточных культурах. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера).

3.4. Влияние метилжасмоната на культуры арабидопсиса и винограда

Экзогенная ЖК, доступная для клеток растений в форме метилжасмоната, используется в биологических исследованиях физиологических процессов растений, как имитация ЖК-зависимых реакций клеток, в том числе для активации вторичного метаболизма, за счет перераспределения доступных ресурсов в сторону продукции вторичных метаболитов с ингибированием роста (Но *et al.*, 2020). В нашем исследовании мы сравнили, на сколько схожи эффекты экзогенного МеЖК и 5-ти кратного ингибирования экспрессии генов *AtJAZ1* и *VvJAZ9* в клетках арабидопсиса и винограда, соответственно.

3.4.1. Влияние метилжасмоната на культуры арабидопсиса

Были изучены ростовые характеристики и содержание камалексина в контрольной и трансгенной культурах арабидопсиса при воздействии метилжасмоната в концентрациях 5 мкМ и 50 мкМ. МеЖК в используемых концентрациях не оказал значительного влияния на рост клеточных культур, при этом мы наблюдали дозозависимое повышение содержания камалексина как в контрольной, так и в трансгенной клеточных линиях. Уровень активации биосинтеза камалексина в контрольной культуре при высокой дозе МеЖК был почти в 4 раза ниже, чем в трансгенной культуре в контрольных условиях. Добавление 5 мкМ МеЖК не оказало значительного влияния на содержание камалексина в культуре *jaz1*, однако 50 мкМ МеЖК увеличивали продукцию камалексина в *jaz1* почти в 2 раза, с 23 до 45 мкг/л (Рисунок 20).

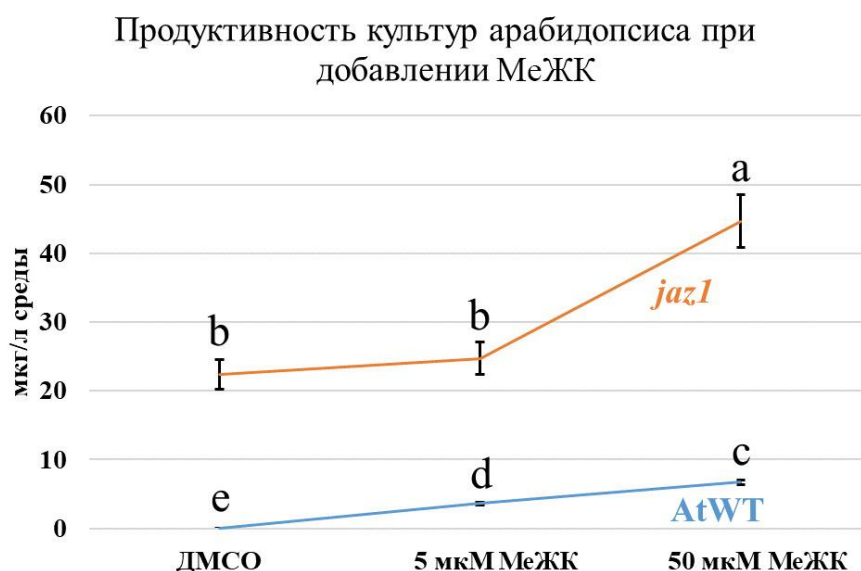


Рисунок 20 – Влияние метилжасмоната (5 и 50 мкМ) на продукцию камалексина (мкг/л среды) в AtWT (синяя линия, контрольная клеточная культура) и *jaz1* (оранжевая линия, трансгенная клеточная культура). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера).

3.4.2. Влияние метилжасмоната на культуры винограда

Добавление МеЖК в концентрации 5 мкМ в среду снизило индекс роста контрольной культуры винограда VvWT на 75%, в то время как рост трансгенной культуры *jaz9* уменьшился на 53%. При увеличении концентрации МеЖК до 50 мкМ, рост контрольной культуры был полностью ингибирован. В случае трансгенной культуры, добавление 50 мкМ МеЖК ингибировало рост на 75%, аналогично уровню ингибирования роста контрольной культуры на концентрации МеЖК 5 мкМ (Рисунок 21А). Таким образом, рост контрольной VvWT и трансгенной *jaz9* клеточных культур винограда при добавлении МеЖК в концентрации 5 мкМ составил 25% и 47%, соответственно, от индекса роста в контрольных условиях (Рисунок 21Б).

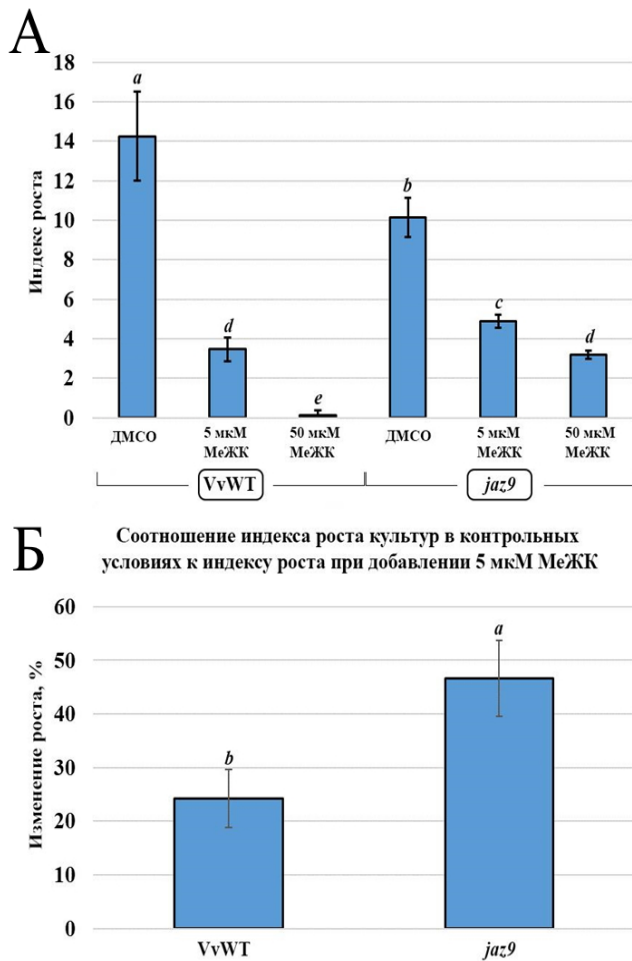


Рисунок 21 – Сравнение роста VvWT (контрольная) и *jaz9* (трансгенная) культур, выращенных в присутствии 5 и 50 мкМ МеЖК. А – индекс роста, Б – соотношение индекса роста клеточных культур, выращенных в присутствии 5 мкМ МеЖК к индексу роста в контрольных условиях. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера).

Транс-резвератрол анализировали только в культурах, выращенных в присутствии 5 мкМ МеЖК, ввиду нежизнеспособности контрольной культуры в присутствии 50 мкМ МеЖК. В контрольной культуре содержание *транс-резвератрола* незначительно увеличилось, при этом в трансгенной культуре (*jaz9*) его содержание возросло до 410 мкг/г сухой массы, что выше, чем в контрольных условиях на 37% (Рисунок 22А). Однако продуктивность контрольной линии

снизилась более, чем в 2 раза, трансгенной линии *jaz9* – в 1,2 раза, по сравнению с контрольными условиями, в виду ингибирования роста (Рисунок 22Б).

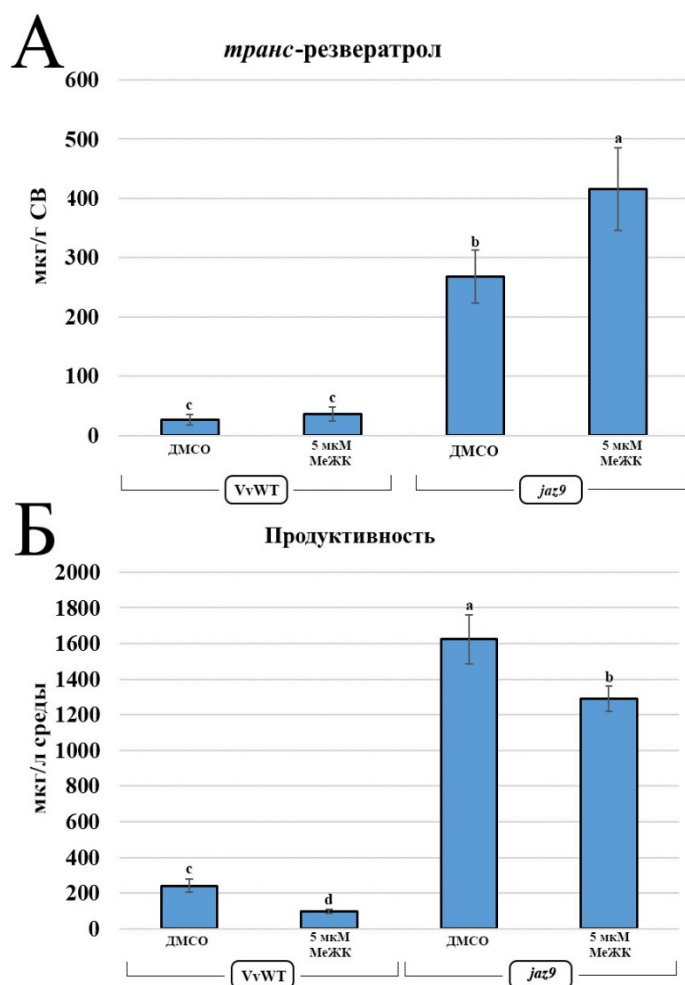


Рисунок 22 – Содержание, мкг/г СВ (**А**) и продуктивность мкг/л (**Б**) *транс-резвератрола* в VvWT (контрольная) и *jaz9* (трансгенная) культурах, выращенных в присутствии 5 мкМ МеЖК. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера).

Полученные результаты могут показаться парадоксальным, так как ингибирование экспрессии репрессоров *AtJAZ1* и *VvJAZ9* должно приводить к усилению реакции на метилжасмонат: активации вторичного метаболизма и ингибирование роста. Полностью объяснить такую реакцию на данный момент невозможно, однако подобные данные были получены ранее на растениях

арабидопсиса в работе Liu и коллег (2021). В данной работе было показано, что ингибирование группы *JAZ* генов *jaz1/jaz2/jaz5/jaz6* приводило к статистически значимому большей длине корня растения арабидопсиса при добавлении 5 мкМ метилжасмоната по сравнению с длиной корней контрольных растений. Ингибирование же других групп генов *JAZ* (с исключением *AtJAZ1* из группы) либо вызывало меньшие по длине по сравнению с контролем корни, либо неотличимые по длине. Мы ингибировали экспрессию в клеточных культурах винограда самого близкого по гомологии гена, что говорит о возможной роли именно гомолога гена *AtJAZ1* – *VvJAZ9* в данном эффекте. Однако, нельзя не отметить достоверные различия между эффектами исследуемых генов: ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* не оказало влияния на рост трансгенной культуры арабидопсиса, так же, как и экзогенный МеЖК на рост контрольной культуры; в то же время, ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* оказало слабый, но достоверный ингибирующий эффект на рост трансгенной культуры винограда, так же, как и экзогенный МеЖК ингибировал рост контрольной культуры. Таким образом, можно сделать вывод, что ожидаемые эффекты от манипуляций с регуляторными белками ЖК сигнальной системы зависят от объекта исследования – конкретного вида растения или от реализуемого биосинтетического пути. Полученные данные указывают на необходимость углубленного изучения молекулярных механизмов ЖК-опосредованных реакций на различных растительных объектах, не только на модельном растении арабидопсиса. В передаче сигнала жасмоновой кислоты роль генов *JAZ*, вероятно, не является универсальной или избыточной, а каждый ген несет определенную специфику, которую также необходимо исследовать в дальнейшем.

3.5. Влияние стрессовых условий (соль, холод) на рост и содержание камалексина в клеточных линиях арабидопсиса

Увеличение содержания триптофана при воздействии стрессов в виде холода, соли и добавления абсцизовой кислоты (Arif *et al.*, 2018) дает основание предполагать, что сигнальный путь абсцизовой кислоты и абиотического стресса могут быть вовлечены в биосинтез камалексина. Ранее было показано, что ЖК положительно регулирует сигнальный путь, связанный с общей устойчивостью к холоду (Hu *et al.*, 2017). Связь между сигнальным путем ЖК и солеустойчивостью была обнаружена в работе с *jaz3* мутантом (Geng *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2016). Следовательно, мы предположили, что подавление экспрессии одного из репрессоров пути ЖК, гена *AtJAZ1*, может повлиять не только на биосинтез камалексина, но и изменить толерантность трансгенных клеток к холоду и/или соли. Мы проанализировали влияние абиотических стрессовых воздействий, таких как холод и соль, на рост клеточных линий арабидопсиса и продукцию камалексина.

Были изучены параметры роста контрольной клеточной культуры и трансгенной культуры *jaz1* при воздействии холода и солевого стресса (Рисунок 23А). В условиях холодного стресса (16°C в течение 14 дней) индекс роста трансгенной культуры значительно отличался от контрольной. Рост контрольной культуры при холодном стрессе был ингибирован на 46%, а трансгенной культуры – только на 22%. В условиях солевого стресса (60 mM NaCl в течение 30 дней) достоверной разницы в индексе роста между контрольной и культурой клеток *jaz1* не обнаружено. Рост контрольной и трансгенной культур был ингибирован примерно на 36% (Рисунок 23А).

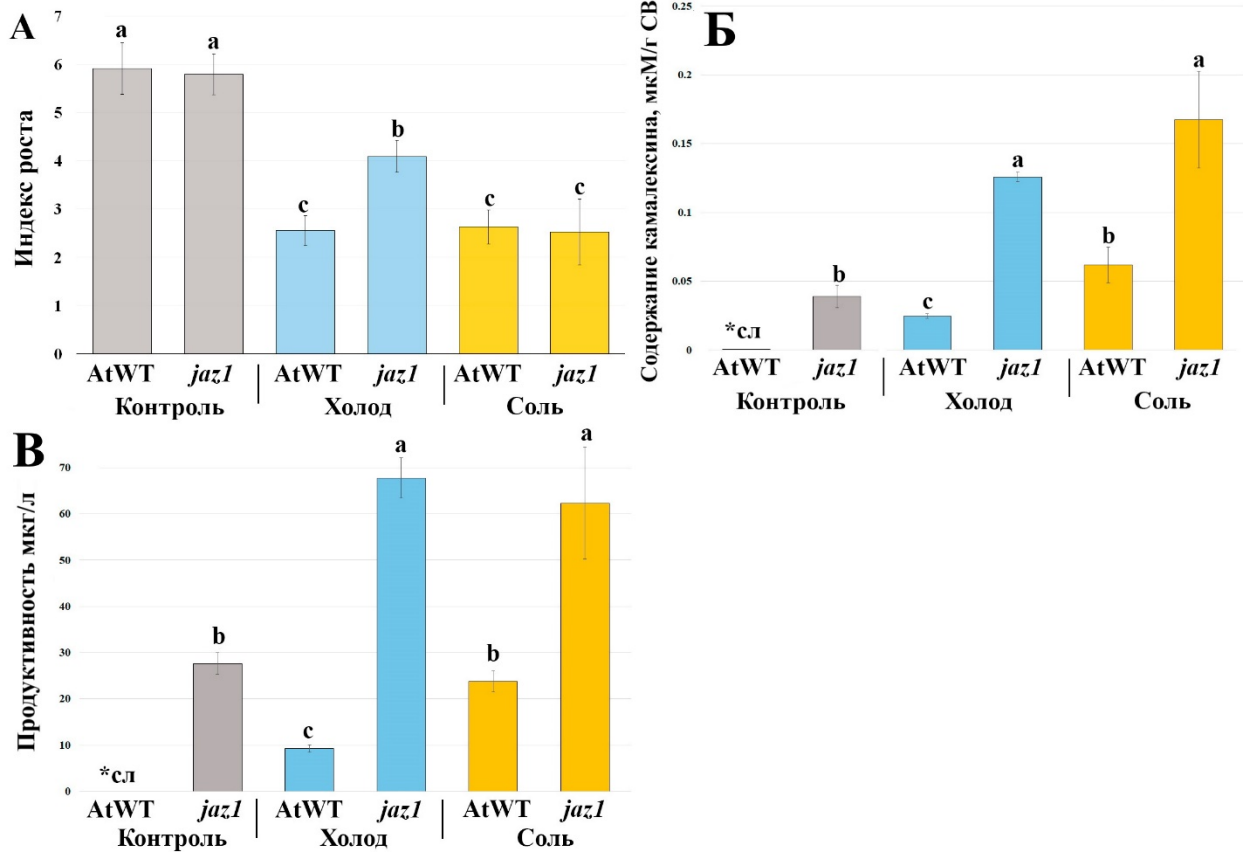


Рисунок 23 – Рост и содержание камалексина в клеточных культурах AtWT (контрольная) и *jaz1* (трансгенная) в стрессовых условиях. Индекс роста (А), концентрацию камалексина (Б), продуктивность камалексина (В) измеряли для культур AtWT и *jaz1*, выращиваемых в контрольных условиях (серые столбцы), 24°C в течение 3 недель; в условиях холода (синие столбцы), 24°C в течение 1 недели и 16°C в течение 2 недель; 60 mM NaCl (оранжевые столбцы) в течение 3 недель. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера). *сл – обнаружены только следовые количества.

Мы проанализировали влияние холодового и солевого воздействий на биосинтез камалексина в трансгенной линии *jaz1* по сравнению с контрольной линией AtWT (Рисунок 23Б). В культуре AtWT уровень содержания камалексина при холодовом и солевом стрессах был значительно выше по сравнению с

контрольными условиями. При этом, уровень содержания камалексина в контрольной культуре при стрессовых воздействиях были не выше, чем в линии *jaz1* без какого-либо абиотического стрессового фактора. Мы показали, что холодовое и солевое воздействие оказывают примерно одинаковое действие на биосинтез камалексина в трансгенной клеточной линии – содержание камалексина увеличено в трансгенной культуре в 3 раза, с 0,05 мкМ до 0,15 мкМ.

Далее была изучена продукция камалексина в клеточных линиях *AtWT* и *jaz1* (Рисунок 23В). В контрольной линии *AtWT* камалексин был обнаружен только при холодовом и солевом стрессах. Принимая во внимание ингибирование роста, индуцированное холодом, продукция камалексина в контрольной культуре составляла 10 мкг/л, что составляет примерно треть от продуктивности камалексина в культуре *jaz1* (около 30 мкг/л) в контрольных условиях. Подавление роста культуры *AtWT* солевым стрессом было аналогично подавлению холодовым стрессом. Содержание и продукция камалексина в контрольной культуре в условиях солевого стресса было увеличено и достигало уровня трансгенной культуры в контрольных условиях.

Холодовой стресс увеличивал продукцию камалексина в культуре *jaz1*, и, учитывая устойчивость культуры трансгенных клеток к холодовому стрессу и, как следствию, небольшому ингибированию роста, продукция камалексина увеличилась более чем в два раза (около 70 мкг/л). Однако ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* не изменило толерантность к солевому стрессу, тем самым при подавлении роста культур изначально более высокий уровень содержания не отразился на продуктивности, таким образом продукция камалексина у культуры *jaz1* при солевом стрессе увеличивалась до концентраций, наблюдаемых при холодовом стрессе (70 мкг/л) (Рисунок 23В).

Мы показали, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* может приводить к изменению устойчивости к холодовому стрессу, и одновременному увеличению содержания камалексина, тем самым значительно изменяя продуктивность

культур. Несмотря на то, что обычно активация вторичного метаболизма при добавлении ЖК ведет к смещению баланса между ростом и вторичным метаболизмом в сторону второго, целевое ингибирование экспрессии одного из репрессоров пути ЖК способно увеличить продукцию и устойчивость к холоду клеточных культур, не влияя на ростовые характеристики.

3.6. Молекулярный механизм JAZ-опосредованного взаимодействия ЖК, АБК и АФК сигнальных систем при холодовом стрессе

Мы показали одновременную активацию биосинтеза камалексина и увеличенную устойчивость к холоду, вызванную ингибированием экспрессии гена *AtJAZ1* арабидопсиса. Более того, ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* удвоило индуцированным холодовым стрессом содержание камалексина. Для того, чтобы прояснить молекулярный механизм, мы изучили экспрессию ключевых генов, регулируемых сигнальными системами ЖК, АБК и сигналов АФК, а также генов, связанных с передачей сигналов холодового стресса в культурах клеток *AtWT* и *jaz1* в контрольных условиях и при воздействии холодового стресса (Рисунок 24).

Прежде всего была изучена экспрессия гена *AtJAZ1* при холодовом стрессе в сравнении с контрольной культурой. Низкая температура приводила к увеличению экспрессии *AtJAZ1* в контрольной культуре, тогда как в трансгенной культуре уровень экспрессии *AtJAZ1* не изменялся и оставался на прежнем уровне, в 6 раз ниже, чем в культуре *AtWT* в контрольных условиях и в 23 раза ниже, чем в линии *AtWT* на холоде. Под воздействием холода экспрессия факторов транскрипции JAZ1-мишеней *AtMYC2* и *AtJAM1* значительно снижалась и увеличивалась в культуре *AtWT*, соответственно. В культуре *jaz1* уровни экспрессии MYC2, главного активатора нижележащих генов-мишеней пути жасмоновой кислоты, были увеличены по сравнению с контрольной культурой как в контрольных, так и в холодных условиях. Экспрессия гена *AtJAM1*, являющегося антагонистом *AtMYC2*, была равна уровням контрольной культуры и не изменялась под

воздействием холода в линии *jaz1*, в то время как в линии AtWT на холоде экспрессия *AtJAM1* увеличилась в 4 раза (Рисунок 24).

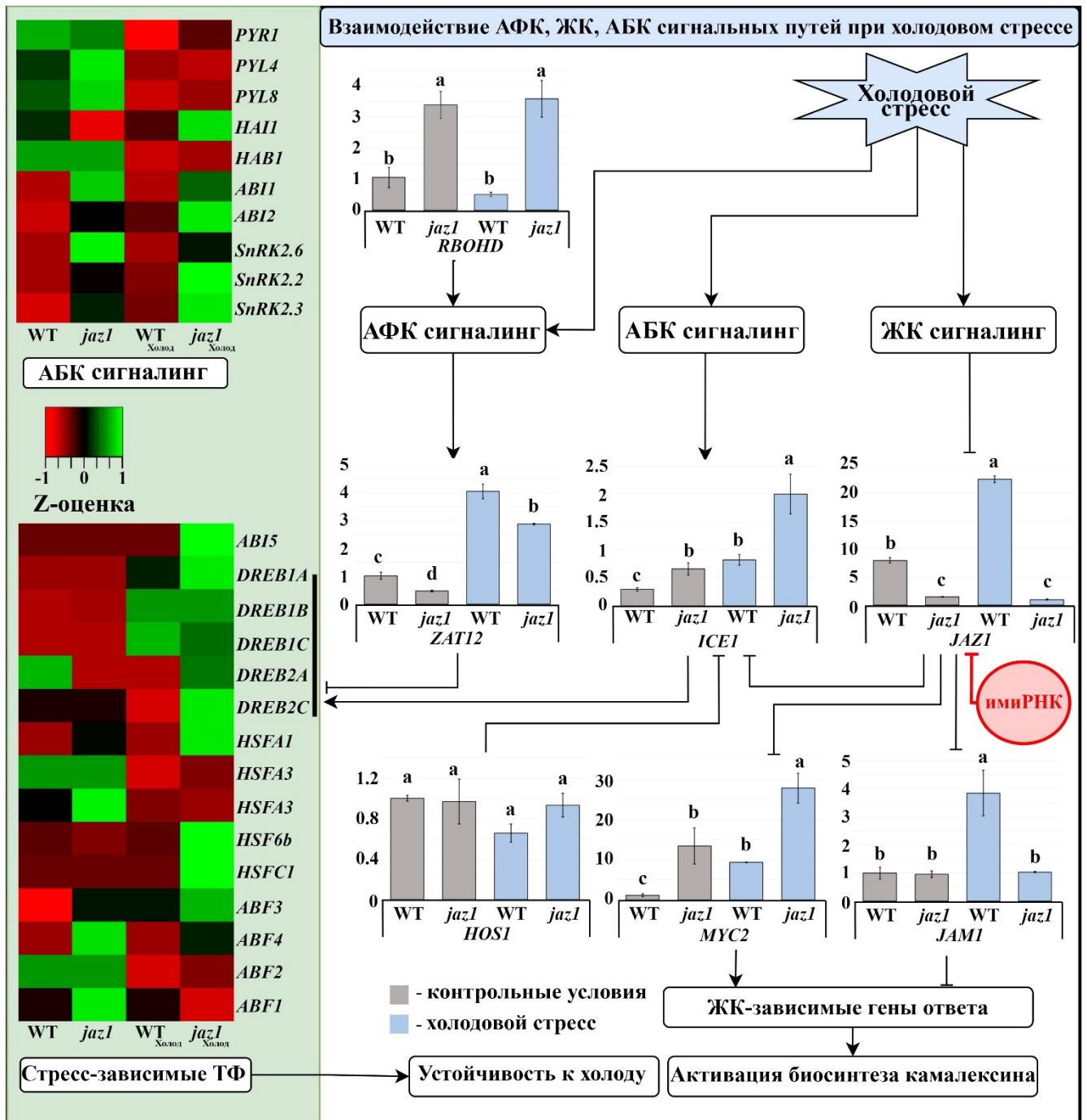


Рисунок 24 – Анализ экспрессии генов в клеточных культурах AtWT (контрольная) и *jaz1* (трансгенная) в контрольных условиях и при холодном стрессе. Левая панель: тепловые карты, полученные на основе ПЦР-РВ анализа экспрессии генов АБК сигналинга (рецепторы, фосфатазы, киназы) и основных

стресс-зависимых ТФ (группы *DREB*, *HSF*, *ABF*); правая панель: анализ экспрессии генов, связанных с устойчивостью к холодовому стрессу и передачей сигналов АБК (*ICE1* и *HOS1*), АФК (*RBOHD* и *ZAT12*) и пути ЖК (*JAZ1*, *MYC2* и *JAM1*). Красный овал (ими-РНК) указывает на схеме мишень РНК-ингибирования, ген *AtJAZ1*. На вертикальной оси всех гистограмм обозначена нормализованная относительная экспрессия гена. Описание вышеуказанных генов даны в тексте диссертации. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Различные буквы над планками погрешностей указывают на статистически значимые различия средних значений ($P < 0,05$, LSD Фишера).

Анализ экспрессии маркеров передачи сигналов АФК – генов *AtRBOHD* и *AtZAT12*, показал возможные взаимодействия между *AtJAZ1* и передачей сигналов АФК. Мы показали, что экспрессия *AtRBOHD* в клетках культуры *jaz1* стабильно увеличивалась более чем в 3 раза по сравнению с контрольной. Продолжительное воздействие холода не влияло на экспрессию *AtRBOHD* ни в контрольной, ни в трансгенных клеточных линиях (Рисунок 24). Уровень экспрессии негативного регулятора СВФ-зависимого пути – *AtZAT12*, увеличивались как в контрольной, так и в трансгенной культурах при холодовом стрессе, но уровень его экспрессии был значительно выше в контрольной культуре по сравнению с культурой *jaz1* (Рисунок 24).

Оценить роль *AtJAZ1* при холодовом стрессе невозможно без анализа другого важнейшего гормона растений – абсцизовой кислоты. Было показано что, экспрессия ключевого фактора транскрипции при холодовом стрессе *AtICE1* была выше в культуре *jaz1* по сравнению с *AtWT* (Рисунок 24). Под действием пониженных температур уровень экспрессии гена *AtICE1*, и одновременное действие, и холода, и ингибирования *AtJAZ1* вызывало аддитивный эффект. Экспрессия репрессора *AtICE1*, гена *AtHOS1*, была одинаковой в обеих культурах и не изменялась при воздействии холода. Гены, кодирующие ассоциированные с АБК факторы транскрипции такие как, *AtABF1*, *AtABF3* и *AtABF4* (но не *AtABF2* и *AtABI5*), были активированы (Рисунок 24). Однако в контрольных условиях ни

один из генов CBF/DREB не был активирован в линиях *jaz1*, ни генов, ответственных за термотолерантность (таких как *AtDREB2A* и *AtDREB2C*), ни генов, ответственных за устойчивость к холоду (CBF1/ DREB1B, CBF2/DREB1C и CBF3/DREB1A). В то же время воздействие холодом, в соответствии с предыдущими результатами (Hu *et al.*, 2013), активировало гены холодоустойчивости CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C и CBF3/DREB1A (Рисунок 24).

Мы также изучили экспрессию генов, кодирующих рецепторы PYR/PYL/RCAR абсцизового сигналинга, протеинфосфатазы 2C (PP2C), такие как HAI1, HAB1, ABI1 и ABI2 (Рисунок 24). Экспрессия гена рецептора *AtPYL* практически не изменилась в линиях *jaz1*. Экспрессия генов протеинфосфатаз PP2Cs была различной: *AtABI1* и *AtABI2* активировались в клеточных культурах *jaz1*, в то время как *AtHAI1* подавлялась (Рисунок 24). Экспрессия гена *AtHAB1* не изменилась. Невозможно функционально различить ABI1/ABI2 и HAI1 на уровне их молекулярных взаимодействий (Tischer *et al.*, 2017). Однако существует функциональное различие, заключающееся в том, что *AtHAI1* участвует в АБК-независимой передаче сигналов, связанной с устойчивостью к засухе (Bhaskara *et al.*, 2012). При этом было показано увеличение экспрессии генов киназ группы *SnRK*, положительных регуляторов *AtICE1*, при воздействии холода в трансгенной культуре.

Экспрессия генов группы *HSF* была различной в обеих культурах. Гены *AtHSFA1*, *AtHSFC1* и *AtHSFA6b* экспрессировались в трансгенной культуре аналогично контрольной культуре; в условиях холодового стресса не наблюдалось значительного изменения в контрольной культуре *AtWT*, тогда как в трансгенной культуре уровень экспрессии значительно повышался. Экспрессия генов *AtHSFA2* и *AtHSFA3* была снижена в холодных условиях в трансгенной культуре, но ее уровень отличался в контрольных условиях; в контрольной культуре уровень

экспрессии гена *AtHSFA3* был выше, чем в трансгенной линии, а *AtHSFA2* - выше в трансгенной линии (Рисунок 24).

Ингибирование гена экспрессии гена *AtJAZ1* позволяет снять природную блокировку жасмонового сигнального пути, которая обеспечивает перераспределение ресурсов клетки в отсутствие стрессовых воздействий. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* мимикрирует не только патоген-индуцированную ЖК-зависимую активацию вторичного метаболизма, но и устойчивость к холоду. ЖК не является непосредственным регулятором устойчивости к холоду, однако играет в данном процессе немаловажную роль, тесно взаимодействуя посредством ТФ, в том числе и репрессоров семейства JAZ, с ключевыми при холодовом стрессе сигнальными системами, АФК (взаимосвязанную с кальциевой сигнальной системой) и АБК (Sinha *et al.*, 2015). Молекулярный анализ показал, что индивидуальное ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* положительно влияет на экспрессию генов, ответственных за акклимацию именно к холоду – киназы группы SnRK, DREB1A, ABI5 (АБК регуляция), ICE1 (АФК и АБК регуляция). Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что активация этих генов при ингибировании *AtJAZ1* возможна за счет тесного взаимодействия ЖК сигнальной системы и сигнальных систем АБК и АФК, причем в большей степени системы АФК. Другими словами, мишеней для непосредственной или опосредованной репрессии JAZ вне ЖК-сигнальной системы значительно больше, чем известно на данный момент. Определение более точных молекулярных механизмов требует дополнительных исследований на целом растении с дополнительными вариантами модуляции экспрессии *AtJAZ1*. На данном этапе, можно заключить, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* (как и его гомологов) не только позволяет получить продуктивную клеточную культуру, но и является перспективным инструментом для модуляции холодовой устойчивости растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение фармацевтически ценных метаболитов растительного происхождения на основе клеточных культур-суперпродуцентов становится все более актуальным и перспективным направлением в области биотехнологии растений, в связи с ухудшением экологической обстановки и общемировой тенденцией к максимальному сохранению природных ресурсов и биоразнообразия (Eibl *et al.*, 2018; Arya *et al.*, 2020). Низкая продуктивность клеточных культур является основной проблемой в данном направлении. Современные требования к инструментам биоинженерии растений подразумевают высокий активаторный эффект на биосинтез интересующих соединений без ущерба ростовым характеристикам клеточных культур (Krasteva *et al.*, 2020). Практическое применение генно-инженерных подходов для оптимизации продуктивности клеточных культур как ресурсов для пищевой, фармакологической и косметической промышленности ограничено общемировыми требованиями к применяемым подходам (Krasteva *et al.*, 2020). Таким образом поиск генов, кодирующих супрессионные регуляторные белки, является наиболее актуальным и перспективным направлением в области исследований биотехнологии растительных клеточных культур-продуцентов, соответствующим современным тенденциям и требованиям, а также возможностям геномного редактирования.

В представленной работе мы впервые показали, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клеточной культуре *A. thaliana* приводит к активации биосинтеза азот-, серосодержащих соединений, не ингибируя накопление биомассы трансгенной культуры (Makhazen *et al.*, 2021a). Для подтверждения полученного эффекта, была проведена работа по ингибированию экспрессии ближайшего гомолога гена *AtJAZ1* – гена *VvJAZ9* винограда в клеточной культуре *V. Vinifera*. Впервые было показано, что данный подход позволяет также увеличить содержание *транс*-резвератрола, который продуцируется в фенилпропаноидном пути биосинтеза, отличным от пути биосинтеза камалексина (Makhazen *et al.*,

2021b). Высокая научная значимость полученного и подтвержденного эффекта заключается в возможности использования научных данных о репрессорных механизмах, перспективных в качестве таргетных генов для геномного редактирования с целью активации биосинтеза ценных растительных соединений. Применение таких биоинженерных подходов позволит получить альтернативные ресурсы для практического применения с учетом современных требований к качеству ресурса.

Помимо подтверждения действия ингибирования экспрессии репрессорных генов семейства *JAZ* на биосинтез камалексина, глюкозинолатов и *транс*-резвератрола, был проведен комплексный анализ молекулярного механизма полученного эффекта. Мы показали, что ингибирование экспрессии генов *JAZ* имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов (Makhazen et al., 2021a). Так же, как это происходит в растении в ответ на стрессовое воздействие, главным образом, атаку некротрофных патогенов. Однако, искусственная активация ЖК сигнального пути протекает без значительного ингибирования роста, характерного для природного ЖК-опосредованного ответа. Помимо ЖК-зависимого ответа на некротрофный патогенез, фитоалексины вырабатываются так же в ответ на абиотические стрессовые воздействия. Мы показали, что ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клеточных культурах арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина. Кроме того, было показано, что ингибирование гена *AtJAZ1* обеспечивает толерантность клеточной культуры к холодovому стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной. Обнаруженный эффект является перспективным направлением для исследований генов группы *JAZ* как мишеней для биоинженерного получения холодоустойчивых растений. Анализ экспрессии маркерных стрессовых генов показал, что ингибирование экспрессии *JAZ* генов изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых

генов ответа на стрессовые воздействия: *ICE1*, *MYC2*, *ZAT12*, группы генов *DREB*, *HSF*, *ABF*, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК (Makhazen et al., 2021a).

Таким образом, ингибирование экспрессии генов *JAZ* является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

ВЫВОДЫ

1. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* посредством РНК-интерференции в клеточной культуре *A. thaliana* приводит к активации биосинтеза азот-, серосодержащих соединений, не ингибируя накопление биомассы трансгенной культуры. Содержание метоксиглюкозинолатов увеличивается до трех раз по сравнению с контрольной культурой; содержание камалексина достигает 9 мкг/г сухого веса при недетектируемом уровне в контрольной культуре.

2. Ингибирование экспрессии гена *VvJAZ9* (ближайшего гомолога гена *AtJAZ1* арабидопсиса) в клеточной культуре *V. vinifera* приводит увеличению содержания *транс*-резвератрола в десять раз по сравнению с контрольной клеточной культурой; при этом продуктивность трансгенной клеточной культуры в 7 раз выше по сравнению с контрольной клеточной культурой, учитывая снижение индекса роста трансгенной культуры клеток.

3. Ингибирование экспрессии генов *AtJAZ1* и его гомолога *VvJAZ9* в клеточных культурах арабидопсиса и винограда, соответственно, имитирует действие сигнальной системы ЖК, что обеспечивает активацию биосинтеза фитоалексинов. Однако, искусственная активация ЖК сигнального пути протекает без значительного ингибирования роста, характерного для природного жасмонат-опосредованного ответа.

4. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* в клеточной культуре арабидопсиса усиливает активаторные действия абиотических стрессов (соль, холод) на биосинтез камалексина. В стрессовых условиях в трансгенной культуре увеличивается продуктивность камалексина до 68 мкг/л, что в 3-7 раз больше, чем в контрольной культуре.

5. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* обеспечивает устойчивость клеточной культуры к холодному стрессу, что способствует увеличению продуктивности камалексина за счет слабого ингибирующего действия низких температур на рост трансгенной культуры по сравнению с контрольной.

Обнаруженный эффект является перспективным направлением для биоинженерного получения холодоустойчивых растений.

6. Ингибирование экспрессии гена *AtJAZ1* изменяет конститутивную и индуцибельную экспрессию ключевых генов ответа на стрессовые воздействия: *ICE1*, *MYC2*, *ZAT12*, группы генов *DREB*, *HSF*, *ABF*, что обеспечивает увеличение продуктивности трансгенной культуры при воздействии холода за счёт активации вторичного метаболизма и снижения отрицательного воздействия холода на рост культуры через взаимодействие сигнальных путей АБК, ЖК и АФК.

7. Ингибирование экспрессии генов *JAZ* является перспективным универсальным биотехнологическим инструментом для активации биосинтеза фенилпропаноидных производных и азот-, серосодержащих соединений, обладающих фармакологическими свойствами, с целью получения рентабельных альтернативных источников на основе высокопродуктивных клеточных культур растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akula R. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants / R. Akula, G. A. Ravishankar // *Plant Signaling & Behavior*. – 2011. – Vol. 6. – № 11. – P. 1720-1731.
2. Aldridge D. C. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae* / D. C. Aldridge, S. Galt, D. Giles, W. B. Turner // *Journal of the Chemical Society C*. – 1971. – Vol. 1. – P. 1623.
3. Aleman F. An ABA-increased interaction of the PYL6 ABA receptor with MYC2 Transcription Factor: A putative link of ABA and JA signaling / F. Aleman, J. Yazaki, M. Lee [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 28941.
4. Ali Md. S. Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants / Md. S. Ali, K.-H. Baek // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 2. – P. 621.
5. Almasry M. Camalexin-induced cell membrane scrambling and cell shrinkage in human erythrocytes / M. Almasry, M. Jemaà, M. Mischitelli [et al.] // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 41. – № 2. – P. 731-741.
6. Amasino R. 1955: Kinetin Arrives. The 50th Anniversary of a new plant hormone / R. Amasino // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 138. – 1955. – № 3. – P. 1177-1184.
7. Anand U. A Comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery / U. Anand, N. Jacobo-Herrera, A. Altemimi, N. Lakhssassi // *Metabolites*. – 2019. – Vol. 9. – A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics. – № 11. – P. 258.
8. Ardenghi N. M. G. A taxonomic survey of the genus *Vitis* L. (Vitaceae) in Italy, with special reference to Elba Island (Tuscan Archipelago) / N. M. G. Ardenghi, G. Galasso, E. Banfi [et al.] // *Phytotaxa*. – 2014. – Vol. 166. – № 3. – P. 163.
9. Arif M. A. Abscisic acid, cold and salt stimulate conserved metabolic regulation in the moss *Physcomitrella patens* / M. A. Arif, S. Alseekh, J. Harb [et al.] // *Plant Biology*. – 2018. – Vol. 20. – № 6. – P. 1014-1022.

10. Arya S. S. Next-generation metabolic engineering approaches towards development of plant cell suspension cultures as specialized metabolite producing biofactories / S. S. Arya, J. E. Rookes, D. M. Cahill, S. K. Lenka // *Biotechnology Advances*. – 2020. – Vol. 45. – P. 107635.
11. Bai Y. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family / Y. Bai, Y. Meng, D. Huang [et al.] // *Genomics*. – 2011. – Vol. 98. – № 2. – P. 128-136.
12. Bevan M. The *Arabidopsis* genome: a foundation for plant research / M. Bevan, S. Walsh // *Genome Research*. – 2005. – Vol. 15. – № 12. – P. 1632-1642.
13. Bhaskara G. B. Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs / G. B. Bhaskara, T. T. Nguyen, P. E. Verslues // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 160. – № 1. – P. 379-395.
14. Biasutto L. Resveratrol and health: the starting point / L. Biasutto, A. Mattarei, M. Zoratti // *ChemBioChem*. – 2012. – Vol. 13. – Resveratrol and Health. – № 9. – P. 1256-1259.
15. Birkenbihl R. P. *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection / R. P. Birkenbihl, C. Diezel, I. E. Somssich // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 159. – № 1. – P. 266-285.
16. Boettcher M. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR / M. Boettcher, M. T. McManus // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 58. – № 4. – P. 575-585.
17. Boncan D. A. T. Terpenes and terpenoids in plants: interactions with environment and insects / D. A. T. Boncan, S. S. K. Tsang, C. Li [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – Terpenes and Terpenoids in Plants. – № 19. – P. 7382.
18. Boter M. FILAMENTOUS FLOWER is a direct target of JAZ3 and modulates responses to jasmonate / M. Boter, J. F. Golz, S. Giménez-Ibañez [et al.] // *The Plant Cell*. – 2015. – Vol. 27. – № 11. – P. 3160-3174.

19. Böttcher C. The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana* / C. Böttcher, L. Westphal, C. Schmotz [et al.] // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – № 6. – P. 1830-1845.
20. Brandt K. Health promoting compounds in vegetables and fruits / K. Brandt, L. P. Christensen, J. Hansen-Møller [et al.] // *Trends in Food Science & Technology*. – 2004. – Vol. 15. – № 7-8. – P. 384-393.
21. Browse J. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone / J. Browse // *Annual Review of Plant Biology*. – 2009. – Vol. 60. – P. 183-205.
22. Bulgakov V. P. Engineering high yields of secondary metabolites in *Rubia* cell cultures through transformation with *Rol* genes. In: *Plant secondary metabolism engineering*. A. G. Fett-Neto ed. / V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik. // Totowa, NJ: Humana Press, 2010. – Vol. 643. – P. 229-242.
23. Bulgakov V. P. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense / V. P. Bulgakov, T. Y. Gorpenchenko, G. N. Veremeichik [et al.] // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 158. – № 3. – P. 1371-1381.
24. Bulgakov V. P. The *rolB* gene activates secondary metabolism in *Arabidopsis* calli via selective activation of genes encoding MYB and bHLH transcription factors / V. P. Bulgakov, G. N. Veremeichik, V. P. Grigorchuk [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2016. – Vol. 102. – P. 70-79.
25. Causier B. The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis* / B. Causier, M. Ashworth, W. Guo, B. Davies // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 158. – № 1. – P. 423-438.
26. Chen Q. The basic Helix-Loop-Helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis* / Q. Chen, J. Sun, Q. Zhai [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 9. – P. 3335-3352.

27. Chini A. Redundancy and specificity in jasmonate signalling / A. Chini, S. Gimenez-Ibanez, A. Goossens, R. Solano // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2016. – Vol. 33. – P. 147-156.
28. Chinnusamy V. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis* / V. Chinnusamy // *Genes & Development*. – 2003. – Vol. 17. – № 8. – P. 1043-1054.
29. Chong J. Metabolism and roles of stilbenes in plants / J. Chong, A. Poutaraud, P. Hugueney // *Plant Science*. – 2009. – Vol. 177. – № 3. – P. 143-155.
30. Chripkova M. Antiproliferative effect of indole phytoalexins / M. Chripkova, F. Zigo, J. Mojzis // *Molecules*. – 2016. – Vol. 21. – № 12. – P. 1626.
31. Crombie L. Chemistry of the natural pyrethrins / L. Crombie, M. Elliott // *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. – 1961. – Vol. 19. – P. 120-164.
32. Czechowski T. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* / T. Czechowski, M. Stitt, T. Altmann [et al.] // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 139. – № 1. – P. 5-17.
33. D'Auria J. C. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed / J. C. D'Auria, J. Gershenzon // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2005. – Vol. 8. – № 3. – P. 308-316.
34. Davière J.-M. A pivotal role of DELLAs in regulating multiple hormone signals / J.-M. Davière, P. Achard // *Molecular Plant*. – 2016. – Vol. 9. – № 1. – P. 10-20.
35. De Geyter N. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism / N. De Geyter, A. Gholami, S. Goormachtig, A. Goossens // *Trends in Plant Science*. – 2012. – Vol. 17. – № 6. – P. 349-359.
36. Deleris A. Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense / A. Deleris, J. Gallego-Bartolome, J. Bao [et al.] // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – № 5783. – P. 68-71.
37. Demole E. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin / E. Demole, E. Lederer, D. Mercier // *Helvetica Chimica Acta*. – 1962. – Vol. 45. – № 2. – P. 675-685.

38. Deng Y. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants / Y. Deng, S. Lu // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2017. – Vol. 36. – № 4. – P. 257-290.
39. Dias M. I. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review / M. I. Dias, M. J. Sousa, R. C. Alves, I. C. F. R. Ferreira // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – Vol. 82. – P. 9-22.
40. Diaz-Pendon J. A. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b Protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs / J. A. Diaz-Pendon, F. Li, W.-X. Li, S.-W. Ding // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – № 6. – P. 2053-2063.
41. Dixon R. A. Natural products and plant disease resistance / R. A. Dixon // *Nature*. – 2001. – Vol. 411. – № 6839. – P. 843-847.
42. dos Santos J. C. Plant-derived products for leaf-cutting ants control. In: *Insecticides - Development of safer and more effective technologies* S. Trdan ed. / J. C. dos Santos, R. Zanetti, D. F. de Oliveira [et al.]. // IntechOpen, 2013. – P. 1-22.
43. Dou D. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground / D. Dou, J.-M. Zhou // *Cell Host & Microbe*. – 2012. – Vol. 12. – № 4. – P. 484-495.
44. Dubrovina A. S. Regulation of stilbene biosynthesis in plants / A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // *Planta*. – 2017. – Vol. 246. – № 4. – P. 597-623.
45. Eibl R. Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends / R. Eibl, P. Meier, I. Stutz [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102. – № 20. – P. 8661-8675.
46. Espinosa-Leal C. A. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds / C. A. Espinosa-Leal, C. A. Puente-Garza, S. García-Lara // *Planta*. – 2018. – Vol. 248. – № 1. – P. 1-18.
47. Evans D. E. *Plant Cell Culture* / D. E. Evans, J. O. D. Coleman, A. Kearns; 1st Edition // London : Taylor & Francis, 2020. – P. 1-108.
48. Fahey J. W. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzopyrene-induced stomach tumors /

- J. W. Fahey, X. Haristoy, P. M. Dolan [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2002. – Vol. 99. – № 11. – P. 7610-7615.
49. Fahlgren N. P-SAMS: a web site for plant artificial microRNA and synthetic trans-acting small interfering RNA design / N. Fahlgren, S. T. Hill, J. C. Carrington, A. Carbonell // Bioinformatics. – 2015. – P. btv534.
50. Farzaei M. H. Effect of resveratrol on cognitive and memory performance and mood: A meta-analysis of 225 patients / M. H. Farzaei, R. Rahimi, S. Nikfar, M. Abdollahi // Pharmacological Research. – 2018. – Vol. 128. – P. 338-344.
51. Fedoroff N. V. Radically Rethinking Agriculture for the 21st Century / N. V. Fedoroff, D. S. Battisti, R. N. Beachy [et al.] // Science. – 2010. – Vol. 327. – № 5967. – P. 833-834.
52. Fernández-Calvo P. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses / P. Fernández-Calvo, A. Chini, G. Fernández-Barbero [et al.] // The Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – № 2. – P. 701-715.
53. Ferrari S. Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic Acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3 / S. Ferrari, R. Galletti, C. Denoux [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 144. – № 1. – P. 367-379.
54. Feys B. *Arabidopsis* Mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. / B. Feys, C. E. Benedetti, C. N. Penfold, J. G. Turner // The Plant Cell. – 1994. – P. 751-759.
55. Fire A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* / A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 391. – № 6669. – P. 806-811.

56. Fonseca S. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate / S. Fonseca, A. Chini, M. Hamberg [et al.] // *Nature Chemical Biology*. – 2009. – Vol. 5. – № 5. – P. 344-350.
57. Fonseca S. bHLH003, bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses / S. Fonseca, P. Fernández-Calvo, G. M. Fernández [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. e86182.
58. Fontana A. R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics / A. R. Fontana, A. Antonioli, R. Bottini // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61. – № 38. – P. 8987-9003.
59. Fransz P. Cytogenetics for the model system *Arabidopsis thaliana* / P. Fransz, S. Armstrong, C. Alonso-Blanco [et al.] // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 13. – № 6. – P. 867-876.
60. Frerigmann H. MYB34, MYB51, and MYB122 distinctly regulate indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / H. Frerigmann, T. Gigolashvili // *Molecular Plant*. – 2014. – Vol. 7. – № 5. – P. 814-828.
61. Frerigmann H. The role of MYB34, MYB51 and MYB122 in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / H. Frerigmann, E. Glawischnig, T. Gigolashvili // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 6. – P. 654.
62. Frerigmann H. Regulation of pathogen-triggered tryptophan metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB transcription factors and indole glucosinolate conversion products / H. Frerigmann, M. Piślewska-Bednarek, A. Sánchez-Vallet [et al.] // *Molecular Plant*. – 2016. – Vol. 9. – № 5. – P. 682-695.
63. Fulgione A. Archaic lineages broaden our view on the history of *Arabidopsis thaliana* / A. Fulgione, A. M. Hancock // *New Phytologist*. – 2018. – Vol. 219. – № 4. – P. 1194-1198.
64. Galan M. V. Oral broccoli sprouts for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: a preliminary report / M. V. Galan, A. A. Kishan, A. L. Silverman // *Digestive Diseases and Sciences*. – 2004. – Vol. 49. – № 7-8. – P. 1088-1090.

65. García-Martínez D. J. Grape polyphenols to arrest in vitro proliferation of human leukemia cells: A systematic review and meta-analysis / D. J. García-Martínez, J. Calzada Funes, C. Martín Saborido, C. Santos // *Food Reviews International*. – 2020. – P. 1-18.
66. Gelvin S. B. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants / E. E. Hood, S. B. Gelvin, L. S. Melchers, A. Hoekema // *Transgenic Research*. – 1993. – Vol. 2. – № 4. – P. 208-218.
67. Geng Y. A Spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis* / Y. Geng, R. Wu, C. W. Wee [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 6. – P. 2132-2154.
68. Geu-Flores F. Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis* / F. Geu-Flores, M. E. Møldrup, C. Böttcher [et al.] // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 6. – P. 2456-2469.
69. Gimenez-Ibanez S. JAZ2 controls stomata dynamics during bacterial invasion / S. Gimenez-Ibanez, M. Boter, A. Ortigosa [et al.] // *The New Phytologist*. – 2017. – Vol. 213. – № 3. – P. 1378-1392.
70. Glauser G. Spatial and temporal dynamics of jasmonate synthesis and accumulation in *Arabidopsis* in response to wounding / G. Glauser, E. Grata, L. Dubugnon [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 24. – P. 16400-16407.
71. Glawischnig E. Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis* / E. Glawischnig, B. G. Hansen, C. E. Olsen, B. A. Halkier // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 21. – P. 8245-8250.
72. Glawischnig E. Camalexin / E. Glawischnig // *Phytochemistry*. – 2007. – Vol. 68. – № 4. – P. 401-406.
73. Goossens J. Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses / J. Goossens, P. Fernández-Calvo, F. Schweizer, A. Goossens // *Plant Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 91. – № 6. – P. 673-689.

74. Goossens J. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling / J. Goossens, J. Mertens, A. Goossens // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 68. – № 6. – P. 1333-1347.
75. Goufo P. A reference list of phenolic compounds (including stilbenes) in grapevine (*Vitis vinifera* L.) roots, woods, canes, stems, and leaves / P. Goufo, R. K. Singh, I. Cortez // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 398.
76. Graham N. Plant genome editing and the relevance of off-target changes / N. Graham, G. B. Patil, D. M. Bubeck [et al.] // *Plant Physiology*. – 2020. – Vol. 183. – № 4. – P. 1453-1471.
77. Guo M. Agrobacterium-mediated genetic transformation: history and progress. In: Genetic transformation. M. Alvarez ed. / M. Guo, X. Bian, X. Wu, M. Wu. // IntechOpen, 2011. – P. 1-28.
78. Guo Q. JAZ repressors of metabolic defense promote growth and reproductive fitness in *Arabidopsis* / Q. Guo, Y. Yoshida, I. T. Major [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115. – № 45. – P. E10768-E10777.
79. Hajdukiewicz P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation / P. Hajdukiewicz, Z. Svab, P. Maliga // *Plant Molecular Biology*. – 1994. – Vol. 25. – № 6. – P. 989-994.
80. Halkier B. A. Biology and biochemistry of glucosinolates / B. A. Halkier, J. Gershenzon // *Annual Review of Plant Biology*. – 2006. – Vol. 57. – № 1. – P. 303-333.
81. Haristoy X. Efficacy of sulforaphane in eradicating *Helicobacter pylori* in human gastric xenografts implanted in nude mice / X. Haristoy, K. Angioi-Duprez, A. Duprez, A. Lozniewski // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47. – № 12. – P. 3982-3984.
82. Harun S. A comprehensive gene inventory for glucosinolate biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* / S. Harun, M.-R. Abdullah-Zawawi, H.-H. Goh, Z.-A. Mohamed-Hussein // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2020. – Vol. 68. – № 28. – P. 7281-7297.

83. Havko N. Control of carbon assimilation and partitioning by jasmonate: An accounting of growth–defense tradeoffs / N. Havko, I. Major, J. Jewell [et al.] // *Plants*. – 2016. – Vol. 5. – № 1. – P. 7.
84. He L. Efficient and specific inhibition of plant microRNA function by anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) *in vitro* and *in vivo* / L. He, M. Xie, J. Huang [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2016. – Vol. 35. – № 4. – P. 933-945.
85. Hecht S. S. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates / S. S. Hecht // *Drug Metabolism Reviews*. – 2000. – Vol. 32. – № 3-4. – P. 395-411.
86. Heim K. E. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships / K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2002. – Vol. 13. – № 10. – P. 572-584.
87. Heiss E. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms / E. Heiss, C. Herhaus, K. Klimo [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 34. – P. 32008-32015.
88. Heitz T. The rise and fall of jasmonate biological activities. In: *Lipids in plant and algae development: Subcellular biochemistry*. Y. Nakamura, Y. Li-Beisson eds. / T. Heitz, E. Smirnova, E. Widemann [et al.]. // Cham : Springer International Publishing, 2016. – Vol. 86. – P. 405-426.
89. Hendriks D. CRISPR-Cas tools and their application in genetic engineering of human stem cells and organoids / D. Hendriks, H. Clevers, B. Artigiani // *Cell Stem Cell*. – 2020. – Vol. 27. – № 5. – P. 705-731.
90. Ho T.-T. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures / T.-T. Ho, H. N. Murthy, S.-Y. Park // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 3. – P. 716.
91. Hong G.-J. Arabidopsis MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression / G.-J. Hong, X.-Y. Xue, Y.-B. Mao [et al.] // *The Plant Cell*. – 2012. – Vol. 24. – № 6. – P. 2635-2648.

92. Hou X. Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense / X. Hou, L. Ding, H. Yu // *Plant Cell Reports*. – 2013. – Vol. 32. – № 7. – P. 1067-1074.
93. Howe G. A. Modularity in jasmonate signaling for multistress resilience / G. A. Howe, I. T. Major, A. J. Koo // *Annual Review of Plant Biology*. – 2018. – Vol. 69. – № 1. – P. 387-415.
94. Hu H. GhJAZ2 negatively regulates cotton fiber initiation by interacting with the R2R3-MYB transcription factor GhMYB25-like / H. Hu, X. He, L. Tu [et al.] // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 88. – № 6. – P. 921-935.
95. Hu Y. Jasmonate regulates the inducer of CBF expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis* / Y. Hu, L. Jiang, F. Wang, D. Yu // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 8. – P. 2907-2924.
96. Hu Y. Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress: crosstalk with other phytohormones / Y. Hu, Y. Jiang, X. Han [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 68. – № 6. – P. 1361-1369.
97. Huang X.-F. Synthesis of resveratrol analogues, and evaluation of their cytotoxic and xanthine oxidase inhibitory activities / X.-F. Huang, H.-Q. Li, L. Shi [et al.] // *Chemistry & Biodiversity*. – 2008. – Vol. 5. – № 4. – P. 636-642.
98. Huot B. Growth–defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness / B. Huot, J. Yao, B. L. Montgomery, S. Y. He // *Molecular Plant*. – 2014. – Vol. 7. – № 8. – P. 1267-1287.
99. Imenshahidi M. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review / M. Imenshahidi, H. Hosseinzadeh // *Phytotherapy research: PTR*. – 2019. – Vol. 33. – № 3. – P. 504-523.
100. Jamshidi-Kia F. Medicinal plants: Past history and future perspective / F. Jamshidi-Kia, Z. Lorigooini, H. Amini-Khoei // *Journal of Herbmed Pharmacology*. – 2018. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-7.

101. Jeandet P. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants / P. Jeandet, B. Delaunoy, A. Conreux [et al.] // *BioFactors* (Oxford, England). – 2010. – Vol. 36. – № 5. – P. 331-341.
102. Jelly N. S. Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos / N. S. Jelly, P. Schellenbaum, B. Walter, P. Maillot // *Transgenic Research*. – 2012. – Vol. 21. – № 6. – P. 1319-1327.
103. Jiang Y. Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence / Y. Jiang, G. Liang, S. Yang, D. Yu // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 230-245.
104. Kazan K. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance / K. Kazan // *Trends in Plant Science*. – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 219-229.
105. Ke J. Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors / J. Ke, H. Ma, X. Gu [et al.] // *Science Advances*. – 2015. – Vol. 1. – № 6. – P. e1500107.
106. Kim H. P. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs / H. P. Kim, I. Mani, L. Iversen, V. A. Ziboh // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. – 1998. – Vol. 58. – № 1. – P. 17-24.
107. Koo A. J. K. Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine / A. J. K. Koo, G. A. Howe // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 3. – P. 19.
108. Koo A. J. K. The wound hormone jasmonate / A. J. K. Koo, G. A. Howe // *Phytochemistry*. – 2009. – Vol. 70. – № 13-14. – P. 1571-1580.
109. Koornneef M. The development of *Arabidopsis* as a model plant / M. Koornneef, D. Meinke // *The Plant Journal*. – 2010. – Vol. 61. – № 6. – P. 909-921.
110. Krämer U. Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana* / U. Krämer // *eLife*. – 2015. – Vol. 4. – P. e06100

111. Krasteva G. Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods / G. Krasteva, V. Georgiev, A. Pavlov // *Engineering in Life Sciences*. – 2021. – Vol. 21. – № 3-4. – P. 68-76.
112. Lacroix B. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation / B. Lacroix, V. Citovsky // *The International Journal of Developmental Biology*. – 2013. – Vol. 57. – № 6-7-8. – P. 467-481.
113. Lafforgue G. Improving the effectiveness of artificial microRNA (amiR)-mediated resistance against Turnip mosaic virus by combining two amiRs or by targeting highly conserved viral genomic regions / G. Lafforgue, F. Martínez, Q.-W. Niu [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87. – № 14. – P. 8254-8256.
114. Lange B. M. Commercial-scale tissue culture for the production of plant natural products: Successes, failures and outlook. In: *Biotechnology of natural products* W. Schwab [et al.] eds. / B. M. Lange // Cham : Springer International Publishing, 2018. – P. 189-218.
115. Li Q. Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isoleucine is essential for jasmonate signaling / Q. Li, J. Zheng, S. Li [et al.] // *Molecular Plant*. – 2017. – Vol. 10. – № 5. – P. 695-708.
116. Liu B. Functional specificity, diversity, and redundancy of *Arabidopsis* JAZ family repressors in jasmonate and COI1-regulated growth, development, and defense / B. Liu, K. Seong, S. Pang [et al.] // *New Phytologist*. – 2021. – Vol. 231. – № 4. – P. 1525-1545.
117. Liu L. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity / L. Liu, F.-M. Sonbol, B. Huot [et al.] // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 13099.
118. Liu X.-J. MdSnRK1.1 interacts with MdJAZ18 to regulate sucrose-induced anthocyanin and proanthocyanidin accumulation in apple / X.-J. Liu, X.-H. An, X. Liu [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2017. – Vol. 68. – № 11. – P. 2977-2990.

119. Ma J.-B. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain / J.-B. Ma, K. Ye, D. J. Patel // *Nature*. – 2004. – Vol. 429. – № 6989. – P. 318-322.
120. Magrone T. Polyphenols from red wine modulate immune responsiveness: biological and clinical significance / T. Magrone, G. Candore, C. Caruso [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2008. – Vol. 14. – № 26. – P. 2733-2748.
121. Major I. T. Regulation of growth-defense balance by the JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-MYC transcriptional module / I. T. Major, Y. Yoshida, M. L. Campos [et al.] // *The New Phytologist*. – 2017. – Vol. 215. – № 4. – P. 1533-1547.
122. Major I. T. A phytochrome B-independent pathway restricts growth at high levels of jasmonate defense / I. T. Major, Q. Guo, J. Zhai [et al.] // *Plant Physiology*. – 2020. – Vol. 183. – № 2. – P. 733-749.
123. Makhazen D. S. Inhibition of the JAZ1 gene causes activation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis* callus cultures / D. S. Makhazen, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2021a. – Vol. 342. – P. 102-113.
124. Makhazen D. S. RNA inhibition of the JAZ9 gene increases the production of resveratrol in grape cell cultures / D. S. Makhazen, G. N. Veremeichik, Y. N. Shkryl [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2021b. – Vol. 147. – № 3. – P. 611-618.
125. Malireddy S. Phytochemical antioxidants modulate mammalian cellular epigenome: Implications in health and disease / S. Malireddy, S. R. Kotha, J. D. Secor [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2012. – Vol. 17. – № 2. – P. 327-339.
126. Meinke D. W. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis / D. W. Meinke, J. M. Cherry, C. Dean [et al.] // *Science*. – 1998. – Vol. 282. – № 5389. – P. 662, 679-682.
127. Mello C. C. Revealing the world of RNA interference / C. C. Mello, D. Conte // *Nature*. – 2004. – Vol. 431. – № 7006. – P. 338-342.

128. Mezencev R. *Trypanosoma cruzi*: Antiproliferative effect of indole phytoalexins on intracellular amastigotes in vitro / R. Mezencev, M. Galizzi, P. Kutschy, R. Docampo // *Experimental Parasitology*. – 2009. – Vol. 122. – № 1. – P. 66-69.
129. Mezencev R. Camalexin induces apoptosis in T-leukemia Jurkat cells by increased concentration of reactive oxygen species and activation of caspase-8 and caspase-9 / R. Mezencev, T. Updegrove, P. Kutschy [et al.] // *Journal of Natural Medicines*. – 2011. – Vol. 65. – № 3-4. – P. 488-499.
130. Millet Y. A. Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns / Y. A. Millet, C. H. Danna, N. K. Clay [et al.] // *The Plant Cell*. – 2010. – Vol. 22. – № 3. – P. 973-990.
131. Min Y.-D. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line / Y.-D. Min, C.-H. Choi, H. Bark [et al.] // *Inflammation Research*. – 2007. – Vol. 56. – № 5. – P. 210-215.
132. Moody C. J. Synthesis and cytotoxic activity of indolyl thiazoles: / C. J. Moody, J. R. Roffey, M. A. Stephens, I. J. Stratford // *Anti-Cancer Drugs*. – 1997. – Vol. 8. – № 5. – P. 489-499.
133. Morant A. V. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense / A. V. Morant, K. Jørgensen, C. Jørgensen [et al.] // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69. – № 9. – P. 1795-1813.
134. Morita M. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum* / M. Morita, N. Shitan, K. Sawada [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 7. – P. 2447-2452.
135. Mosblech A. Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana* / A. Mosblech, C. Thurow, C. Gatz [et al.] // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 65. – № 6. – P. 949-957.

136. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473-497.
137. Myles S. Genetic structure and domestication history of the grape / S. Myles, A. R. Boyko, C. L. Owens [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108. – № 9. – P. 3530-3535.
138. Nafisi M. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis / M. Nafisi, S. Goregaoker, C. J. Botanga [et al.] // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19. – № 6. – P. 2039-2052.
139. Nam N.-H. Naturally occurring NF-kB inhibitors / N.-H. Nam // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2006. – Vol. 6. – № 8. – P. 945-951.
140. Napoli C. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans / C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen // *The Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2. – № 4. – P. 279-289.
141. Nester E. W. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer / E. W. Nester // *Frontiers in Plant Science*. – 2015. – Vol. 5. – P. 730.
142. Nilsson J. Variation in the content of glucosinolates, hydroxycinnamic acids, carotenoids, total antioxidant capacity and low-molecular-weight carbohydrates in *Brassica* vegetables / J. Nilsson, K. Olsson, G. Engqvist [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2006. – Vol. 86. – № 4. – P. 528-538.
143. Oughtred R. The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions / R. Oughtred, J. Rust, C. Chang [et al.] // *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. – 2021. – Vol. 30. – № 1. – P. 187-200.
144. Păcurar D. I. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation / D. I. Păcurar, H. Thordal-Christensen, M. L. Păcurar [et al.] // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – 2011. – Vol. 76. – № 2. – P. 76-81.

145. Pandey A. Constitutive expression of Arabidopsis MYB transcription factor, AtMYB11, in tobacco modulates flavonoid biosynthesis in favor of flavonol accumulation / A. Pandey, P. Misra, P. K. Trivedi // *Plant Cell Reports*. – 2015. – Vol. 34. – № 9. – P. 1515-1528.
146. Patra B. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants / B. Patra, C. Schluttenhofer, Y. Wu [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. – 2013. – Vol. 1829. – № 11. – P. 1236-1247.
147. Pauwels L. The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade / L. Pauwels, A. Goossens // *The Plant Cell*. – 2011. – Vol. 23. – № 9. – P. 3089-3100.
148. Pauwels L. The RING E3 ligase KEEP ON GOING modulates JASMONATE ZIM-DOMAIN12 stability / L. Pauwels, A. Ritter, J. Goossens [et al.] // *Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 169. – № 2. – P. 1405-1417.
149. Pieterse C. M. J. Hormonal modulation of plant immunity / C. M. J. Pieterse, D. Van der Does, C. Zamioudis [et al.] // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2012. – Vol. 28. – № 1. – P. 489-521.
150. Pilatova M. In vitro toxicity of camalexin derivatives in human cancer and non-cancer cells / M. Pilatova, L. Ivanova, P. Kutschy [et al.] // *Toxicology in Vitro*. – 2013. – Vol. 27. – № 2. – P. 939-944.
151. Qi T. Regulation of jasmonate-mediated stamen development and seed production by a bHLH-MYB complex in *Arabidopsis* / T. Qi, H. Huang, S. Song, D. Xie // *The Plant Cell*. – 2015. – Vol. 27. – № 6. – P. 1620-1633.
152. Radman R. Elicitation of plants and microbial cell systems / R. Radman, T. Saez, C. Bucke, T. Keshavarz // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2003. – Vol. 37. – № 1. – P. 91.
153. Ramawat K. G. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants / K. G. Ramawat, S. Dass, M. Mathur. In: *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine* K. G. Ramawat ed. // Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2009. – P. 7-32.

154. Randhir R. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors / R. Randhir, Y.-T. Lin, K. Shetty // *Process Biochemistry*. – 2004. – Vol. 39. – № 5. – P. 637-646.
155. Rauhut T. Evolution of camalexin and structurally related indolic compounds / T. Rauhut, E. Glawischnig // *Phytochemistry*. – 2009. – Vol. 70. – № 15-16. – P. 1638-1644.
156. Reichelt M. Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana* / M. Reichelt, P. D. Brown, B. Schneider [et al.] // *Phytochemistry*. – 2002. – Vol. 59. – № 6. – P. 663-671.
157. Renaud S. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease / S. Renaud, M. de Lorgeril // *Lancet*. – 1992. – Vol. 339. – № 8808. – P. 1523-1526.
158. Renner F. Autoregulatory feedback loops terminating the NF- κ B response / F. Renner, M. L. Schmitz // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2009. – Vol. 34. – № 3. – P. 128-135.
159. Rienth M. Oregano essential oil vapour prevents *Plasmopara viticola* infection in grapevine (*Vitis Vinifera*) and primes plant immunity mechanisms / M. Rienth, J. Crovadore, S. Ghaffari, F. Lefort // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 9. – P. e0222854.
160. Roberts S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture / S. C. Roberts // *Nature Chemical Biology*. – 2007. – Vol. 3. – № 7. – P. 387-395.
161. Rosa C. RNA Interference mechanisms and applications in plant pathology / C. Rosa, Y.-W. Kuo, H. Wuriyangan, B. W. Falk // *Annual Review of Phytopathology*. – 2018. – Vol. 56. – № 1. – P. 581-610.
162. Rose P. Beta-phenylethyl and 8-methylsulphonyloctyl isothiocyanates, constituents of watercress, suppress LPS induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages / P. Rose, Y. K. Won, C. N. Ong, M. Whiteman // *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. – 2005. – Vol. 12. – № 4. – P. 237-243.

163. Ruan J. Jasmonic acid signaling pathway in plants / J. Ruan, Y. Zhou, M. Zhou [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – № 10. – P. 2479.
164. Saga H. Identification and characterization of ANAC042, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis* / H. Saga, T. Ogawa, K. Kai [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2012. – Vol. 25. – № 5. – P. 684-696.
165. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. / N. Saitou, M. Nei. // Molecular Biology and Evolution. –1987. – V. 4. – №. 4. – P. 406-425.
166. Salzano S. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal / S. Salzano, P. Checconi, E.-M. Hanschmann [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Vol. 111. – № 33. – P. 12157-12162.
167. Sanchez-Vallet A. Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi: Arabidopsis non-host resistance to necrotrophic fungi / A. Sanchez-Vallet, B. Ramos, P. Bednarek [et al.] // The Plant Journal. – 2010. – V. 63. – №. 1. – P. 115-127.
168. Santos-Sánchez N. Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In: Plant physiological aspects of phenolic compounds. M. Soto-Hernández [et al.] eds. / N. Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, B. Hernández-Carlos, C. Villanueva-Cañongo // IntechOpen, 2019. – P. 1-19.
169. Schlaeppli K. Disease resistance of *Arabidopsis* to *Phytophthora brassicae* is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin: Glucosinolates and camalexin in disease resistance / K. Schlaeppli, E. Abou-Mansour, A. Buchala, F. Mauch // The Plant Journal. – 2010. – Vol. 62. – № 5. – P. 840-851.

170. Schwab R. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis* / R. Schwab, S. Ossowski, M. Riester [et al.] // *The Plant Cell*. – 2006. – Vol. 18. – № 5. – P. 1121-1133.
171. Schweizer F. *Arabidopsis* basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior / F. Schweizer, P. Fernández-Calvo, M. Zander [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 8. – P. 3117-3132.
172. Selivanova O. M. Analysis of insulin analogs and the strategy of their further development / O. M. Selivanova, S. Yu. Grishin, A. V. Glyakina [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2018. – Vol. 83. – № S1. – P. S146-S162.
173. Seppänen S.-K. Antifungal activity of stilbenes in *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase / S.-K. Seppänen, L. Syrjälä, K. von Weissenberg [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2004. – Vol. 22. – № 8. – P. 584-593.
174. Sheard L. B. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor / L. B. Sheard, X. Tan, H. Mao [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 468. – № 7322. – P. 400-405.
175. Shkryl Y. N. Increase of anthraquinone content in *Rubia cordifolia* cells transformed by native and constitutively active forms of the *AtCPK1* gene / Y. N. Shkryl, G. N. Veremeichik, D. S. Makhazen [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 2016. – Vol. 35. – № 9. – P. 1907-1916.
176. Šikuten I. Grapevine as a rich Source of polyphenolic compounds / I. Šikuten, P. Štambuk, Ž. Andabaka [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 23. – P. 5604.
177. Singh S. K. Explorations of plant's chemodiversity: Role of nitrogen-containing secondary metabolites in plant defense. In: *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*. A. Singh, I. K. Singh eds. / S. K. Singh // Singapore : Springer Singapore, 2018. – P. 309-332.

178. Sinha S. The omics of cold stress responses in plants. In: Elucidation of abiotic Stress signaling in plants. G. K. Pandey ed. / S. Sinha, B. Kukreja, P. Arora [et al.] // New York : Springer New York, 2015. – P. 143-194.
179. Smith B. A. The phytoalexin camalexin mediates cytotoxicity towards aggressive prostate cancer cells via reactive oxygen species / B. A. Smith, C. L. Neal, M. Chetram [et al.] // Journal of Natural Medicines. – 2013. – Vol. 67. – № 3. – P. 607-618.
180. Smith E. F. A plant-tumor of bacterial origin / E. F. Smith, C. O. Townsend // Science. – 1907. – Vol. 25. – № 643. – P. 671-673.
181. Song S. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis* / S. Song, T. Qi, H. Huang [et al.] // The Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – № 3. – P. 1000-1013.
182. Song S. The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development / S. Song, T. Qi, M. Fan [et al.] // PLOS Genetics. – 2013. – Vol. 9. – № 7. – P. e1003653.
183. Song S. Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis* / S. Song, H. Huang, H. Gao [et al.] // The Plant Cell. – 2014. – Vol. 26. – № 1. – P. 263-279.
184. Spoel S. H. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles / S. H. Spoel, J. S. Johnson, X. Dong // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 104. – № 47. – P. 18842-18847.
185. Stitz M. Diverting the flux of the JA pathway in *Nicotiana attenuata* compromises the plant's defense metabolism and fitness in nature and glasshouse / M. Stitz, I. T. Baldwin, E. Gaquerel // PLOS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 10. – P. e25925.
186. Su T. Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* / T. Su, J. Xu, Y. Li [et al.] // The Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – № 1. – P. 364-380.

187. Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation / M. Sugiyama // *Journal of Plant Research*. – 2015. – Vol. 128. – № 3. – P. 349-359.
188. Talalay P. Chemoprotection against cancer by isothiocyanates and glucosinolates / P. Talalay, Y. Zhang // *Biochemical Society Transactions*. – 1996. – Vol. 24. – № 3. – P. 806-810.
189. Talalay P. Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism / P. Talalay, J. W. Fahey // *The Journal of Nutrition*. – 2001. – Vol. 131. – № 11. – P. 3027S-3033S.
190. Tamura K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. – 2021. – Vol. 38. – MEGA11. – № 7. – P. 3022-3027.
191. Tewksbury J. J. Directed deterrence by capsaicin in chillies / J. J. Tewksbury, G. P. Nabhan // *Nature*. – 2001. – Vol. 412. – № 6845. – P. 403-404.
192. Thireault C. Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in *Arabidopsis* / C. Thireault, C. Shyu, Y. Yoshida [et al.] // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 82. – № 4. – P. 669-679.
193. Thorpe T. A. History of plant tissue culture / T. A. Thorpe // *Molecular Biotechnology*. – 2007. – Vol. 37. – № 2. – P. 169-180.
194. Tischer S. V. Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana* / S. V. Tischer, C. Wunschel, M. Papacek [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 38. – P. 10280-10285.
195. Tiwari M. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives / M. Tiwari, D. Sharma, P. K. Trivedi // *Plant Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 86. – № 1-2. – P. 1-18.
196. Toda Y. RICE SALT SENSITIVE3 forms a ternary complex with JAZ and class-C bHLH factors and regulates jasmonate-induced gene expression and root cell elongation / Y. Toda, M. Tanaka, D. Ogawa [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 5. – P. 1709-1725.

197. Tolia N. H. Slicer and the argonauts / N. H. Tolia, L. Joshua-Tor // *Nature Chemical Biology*. – 2007. – Vol. 3. – № 1. – P. 36-43.
198. Tzfira T. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants / T. Tzfira, G.-W. Tian, B. Lacroix [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 57. – № 4. – P. 503-516.
199. Valenzuela C. E. Salt stress response triggers activation of the jasmonate signaling pathway leading to inhibition of cell elongation in *Arabidopsis* primary root / C. E. Valenzuela, O. Acevedo-Acevedo, G. S. Miranda [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2016. – Vol. 67. – № 14. – P. 4209-4220.
200. van der Krol A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression / A. R. van der Krol, L. A. Mur, M. Beld [et al.] // *The Plant Cell*. – 1990. – Vol. 2. – № 4. – P. 291-299.
201. Vanholme B. The tify family previously known as ZIM / B. Vanholme, W. Grunewald, A. Bateman [et al.] // *Trends in Plant Science*. – 2007. – Vol. 12. – № 6. – P. 239-244.
202. 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. – № 1. – P. 130.
203. Velderrain-Rodríguez G. R. Phenolic compounds: their journey after intake / G. R. Velderrain-Rodríguez, H. Palafox-Carlos, A. Wall-Medrano [et al.] // *Food Funct.* – 2014. – Vol. 5. – Phenolic compounds. – № 2. – P. 189-197.
204. Vercammen J. Monitoring of isothiocyanates emanating from *Arabidopsis thaliana* upon paraquat spraying / J. Vercammen, H. Pham-Tuan, I. Arickx [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – Vol. 912. – № 1. – P. 127-134.
205. Veremeichik G. N. Induction of resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* cells by heterologous expression of the *Arabidopsis* constitutively active, Ca²⁺-independent form of the *AtCPK1* gene / G. N. Veremeichik, V. P. Grigorchuk, Y. N. Shkryl [et al.] // *Process Biochemistry*. – 2017. – Vol. 54. – P. 144-155.

206. Veremeichik G. N. Activation of anthraquinone biosynthesis in long-cultured callus culture of *Rubia cordifolia* transformed with the *rolA* plant oncogene / G. N. Veremeichik, V. P. Bulgakov, Y. N. Shkryl [et al.] // Journal of Biotechnology. – 2019. – Vol. 306. – P. 38-46.
207. Wang X.-B. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative Argonautes in *Arabidopsis thaliana* / X.-B. Wang, J. Jovel, P. Udomporn [et al.] // The Plant Cell. – 2011. – Vol. 23. – № 4. – P. 1625-1638.
208. Wang Y. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses / Y. Wang, S. Mostafa, W. Zeng, B. Jin // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 16. – P. 8568.
209. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development / C. Wasternack // Annals of Botany. – 2007. – Vol. 100. – Jasmonates. – № 4. – P. 681-697.
210. Wasternack C. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany / C. Wasternack, B. Hause // Annals of Botany. – 2013. – Vol. 111. – № 6. – P. 1021-1058.
211. Wierinckx A. Detoxication enzyme inducers modify cytokine production in rat mixed glial cells / A. Wierinckx, J. Brevé, D. Mercier [et al.] // Journal of Neuroimmunology. – 2005. – Vol. 166. – № 1-2. – P. 132-143.
212. Wikandari R. Application of cell culture technology and genetic engineering for production of future foods and crop improvement to strengthen food security / R. Wikandari, Manikharda, S. Baldermann [et al.] // Bioengineered. – 2021. – P. 11305-11330.
213. Withers S. T. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules / S. T. Withers, J. D. Keasling // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – Vol. 73. – № 5. – P. 980-990.

214. Wu L. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system / L. Wu, M. H. Noyan Ashraf, M. Facci [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – № 18. – P. 7094-7099.
215. Xie F. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs / F. Xie, P. Xiao, D. Chen [et al.] // *Plant Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 80. – № 1. – P. 75-84.
216. Xie Y. DELLA proteins promote anthocyanin biosynthesis via sequestering MYBL2 and JAZ suppressors of the MYB/bHLH/WD40 complex in *Arabidopsis thaliana* / Y. Xie, H. Tan, Z. Ma, J. Huang // *Molecular Plant*. – 2016. – Vol. 9. – № 5. – P. 711-721.
217. Xie Z. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants / Z. Xie, L. K. Johansen, A. M. Gustafson [et al.] // *PLoS Biology*. – 2004. – Vol. 2. – № 5. – P. e104.
218. Xu C. Suppression of NF- κ B and NF- κ B-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through I κ B α , IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells / C. Xu, G. Shen, C. Chen [et al.] // *Oncogene*. – 2005. – Vol. 24. – № 28. – P. 4486-4495.
219. Yahfoufi N. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols / N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10. – № 11. – P. 1618.
220. Yan F. A virus-based miRNA suppression (VbMS) system for miRNA loss-of-function analysis in plants / F. Yan, W. Guo, G. Wu [et al.] // *Biotechnology Journal*. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. 702-708.
221. Yan J. The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor / J. Yan, C. Zhang, M. Gu [et al.] // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – № 8. – P. 2220-2236.

222. Yan J. The Arabidopsis F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 is stabilized by SCFCO11 and degraded via the 26S proteasome pathway / J. Yan, H. Li, S. Li [et al.] // *The Plant Cell*. – 2013. – Vol. 25. – № 2. – P. 486-498.
223. Yan T. HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua* / T. Yan, M. Chen, Q. Shen [et al.] // *The New Phytologist*. – 2017. – Vol. 213. – № 3. – P. 1145-1155.
224. Yang J. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses / J. Yang, G. Duan, C. Li [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1349.
225. Yang W. Advances in pharmacological activities of terpenoids / W. Yang, X. Chen, Y. Li [et al.] // *Natural Product Communications*. – 2020. – Vol. 15. – № 3. – P. 1934578X2090355.
226. Yang Y. Camalexin induces apoptosis via the ROS-ER stress-mitochondrial apoptosis pathway in AML cells / Y. Yang, G. Wang, W. Wu [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1-14.
227. Zhang F. Structural basis of JAZ repression of MYC transcription factors in jasmonate signalling / F. Zhang, J. Yao, J. Ke [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 525. – № 7568. – P. 269-273.
228. Zhang G. The jasmonate-ZIM domain gene VqJAZ4 from the Chinese wild grape *Vitis quinquangularis* improves resistance to powdery mildew in *Arabidopsis thaliana* / G. Zhang, X. Yan, S. Zhang [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2019. – Vol. 143. – P. 329-339.
229. Zhang H. Evolution, functions, and mysteries of plant ARGONAUTE proteins / H. Zhang, R. Xia, B. C. Meyers, V. Walbot // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2015. – Vol. 27. – P. 84-90.
230. Zhang Y. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grape / Y. Zhang, M. Gao, S. D. Singer [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 9. – P. e44465.

231. Zhao D. A critical review on grape polyphenols for neuroprotection: Strategies to enhance bioefficacy / D. Zhao, J. E. Simon, Q. Wu // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 2020. – Vol. 60. – № 4. – P. 597-625.
232. Żwawiak J. A brief history of taxol / J. Żwawiak, L. Zaprutko // *Journal of Medical Science*. – 2014. – Vol. 83. – № 1. – P. 47-52.