

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной
Азии»

Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

ОГНЕВА Злата Владимировна

**ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТИЛЬБЕН СИНТАЗ НА
УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ**

1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Киселёв Константин Вадимович

ВЛАДИВОСТОК – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 9 |
| 1.1. Абиотические стрессы и защитный ответ растений..... | 9 |
| 1.1.1. Влияние повышенной температуры на растения..... | 10 |
| 1.1.2. Влияние пониженной температуры на растения | 14 |
| 1.1.3. Защитный ответ растений на засуху | 18 |
| 1.1.4. Влияние солевого стресса на растения | 25 |
| 1.1.5. Влияние ультрафиолетового излучения на растения..... | 28 |
| 1.2. Механизмы устойчивости растений к абиотическим стрессам | 34 |
| 1.3. Роль стильбенов в устойчивости растений к абиотическим стрессам | 38 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 44 |
| 2.1. Растительный материал и условия выращивания..... | 44 |
| 2.2. Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК... | 45 |
| 2.3. Получение полных последовательностей генов <i>STS</i> | 45 |
| 2.4. Бисульфитное секвенирование | 46 |
| 2.5. Количественная оценка экспрессии генов <i>STS</i> | 47 |
| 2.6. Получение трансгенных клеток <i>V. amurensis</i> и растений <i>A. thaliana</i> , сверхэкспрессирующих гены винограда <i>VaSTS1</i> , <i>VaSTS17</i> и ели <i>PjSTS1</i> , <i>PjSTS2</i> , <i>PjSTS3</i> | 49 |
| 2.7. Воздействие абиотических стрессов на растения <i>A. thaliana</i> и <i>V. amurensis</i> | 54 |
| 2.8. Анализ содержания вторичных метаболитов..... | 56 |
| 2.9. Обработка растений <i>A. thaliana</i> растворами предшественников фенольных соединений и стильбенами | 57 |

| | |
|---|----|
| 2.10. Статистическая обработка полученных результатов | 58 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ..... | 59 |
| 3.1. Биосинтез стильбенов в растениях <i>V. amurensis</i> и <i>P. jezoensis</i> при обработке кумаровой и кофейной кислотами после облучения УФ-С | 59 |
| 3.2. Получение <i>STS</i> -трансгенных культур клеток винограда <i>V. amurensis</i> и растений <i>A. thaliana</i> | 68 |
| 3.3. Содержание стильбенов в <i>PjSTS</i> -трансгенных культурах клеток винограда <i>V. amurensis</i> и <i>VaSTS</i> -трансгенных растениях <i>A. thaliana</i> | 73 |
| 3.4. Устойчивость к абиотическому стрессу <i>VaSTS1</i> - и <i>VaSTS7</i> -трансгенных растений <i>A. thaliana</i> | 79 |
| 3.5. Устойчивость растений <i>A. thaliana</i> при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами | 82 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ..... | 85 |
| ВЫВОДЫ..... | 91 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 92 |

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|---------|--|
| АБК | – Абсцизовая кислота |
| АНУ | – α -нафтилуксусная кислота |
| АФК | – Активные формы кислорода |
| БАП | – 6-бензиламинопурин |
| ВЭЖХ | – высокоэффективная жидкостная хроматография |
| ДНК | – Дезоксирибонуклеиновая кислота |
| кДНК | – комплиментарная ДНК |
| мРНК | – матричная рибонуклеиновая кислота |
| НАДФ | – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат |
| ОТ-ПЦР | – обратнo-транскрипционная полимеразная цепная реакция |
| ПЦР | – полимеразная цепная реакция |
| ПЦР РВ | – полимеразная цепная реакция в реальном времени |
| РНК | – Рибонуклеиновая кислота |
| Рубиско | – рибулозо 1,5- бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа |
| УФ | – ультрафиолет |
| 4CL | – 4-кумарат СоА-лигаза |
| 5А | – 5-Азациитидин |
| С4Н | – циннамат-4-гидроксилаза |
| СиА | – коричная кислота |
| СА | – кумаровая кислота |
| СаА | – кофейная кислота |
| Сf | – цефотаксим |
| CHS | – халконсинтаза |
| СоА | – коэнзим-А |
| Кm | – канамицин |
| LB | – среда Луриа-Бертани |
| nptII | – неомицин фосфотренсфераза |
| PAL | – фенилаланин аммиак-лигаза |
| STS | – стильбенсинтаза |

ВВЕДЕНИЕ

Климатические условия, вызывающие абиотические стрессы, являются одними из основных факторов снижения продуктивности сельскохозяйственных культур (Grayson, 2013). Согласно отчету Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций, за 2007 г. только 3.5% площади суши в мире осталось незатронутым негативными воздействиями внешней среды. К преобладающим абиотическим стрессам относятся засуха, низкая и высокая температура, соленость и закисление почв, интенсивный свет, дефицит воздуха и недостаток питательных веществ (Bailey-Serres et al., 2008). Дефицит воды был причиной засухи 64% площади суши в мире, наводнения, причиной аноксии – 13% площади суши, засоленность – 6%, дефицит минералов – 9%, закисление почв – 15%, низкие температуры – 57% (Cramer et al., 2011).

Из 5.2 миллиарда гектаров сельскохозяйственных угодий, возделываемых на засушливых участках Земли, 3.6 миллиарда поражены эрозией, деградацией и засолением почв (Riadh et al., 2010). Пагубное влияние засоления на растения связано с орошением почв, площадь которого достигает почти 34 миллионов гектаров. Оценить масштабы сельскохозяйственных потерь из-за абиотических стрессов, а именно снижение урожайности сельскохозяйственных культур и здоровья почв достаточно сложно. Очевидно, что абиотические стрессы влияют на большие площади земель и значительно снижают качественные и количественные показатели урожая (Cramer et al., 2011). Поэтому изучение молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости растений к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды актуально на сегодняшний день.

Растения, в свою очередь, выработали молекулярные механизмы, позволяющие справляться с неблагоприятными условиями окружающей среды, такие как дифференциальная экспрессия защитных генов и биосинтез

вторичных метаболитов, таких как полифенолы, к которым относятся флавонолы, антоцианы и стильбены. У растений стильбены действуют как фитоалексины, то есть как защитные средства от различных биотических стрессов. Стильбены растений – это фенольные соединения, которые по своей природе являются вторичными метаболитами, обладающие сильными биологически активными свойствами: кардиопротекторной, антибактериальной и противоопухолевой. В природе стильбены встречаются у нескольких семейств растений, таких как виноградовые (Vitaceae), бобовые (Fabaceae), гречишные (Polygonaceae), сосновые (Pinaceae) и др. Стильбены играют важную роль в устойчивости растений к некоторым биотическим и абиотическим стрессовым факторам, в том числе к ультрафиолету.

В течение последних десятилетий огромное количество исследований было направлено на выделение, определение структуры и биологической активности стильбенов. Тем не менее, подробные молекулярно-биологические пути регулирования биосинтеза стильбенов изучены слабо, так что поиск соответствующих ферментов, генов, а также влияние абиотических и биотических стрессовых факторов на молекулярно-биологические механизмы биосинтеза стильбенов имеют большое значение для понимания регуляции метаболизма стильбенов.

Цель и задачи исследования

Цель работы – анализ участия стильбен синтаз и стильбенов в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессам и создание альтернативных источников стильбенов.

Задачи:

1. Изучить влияние внешней обработки растений ели *Picea jezoensis* и винограда *Vitis amurensis* предшественниками стильбенов на биосинтез стильбенов и устойчивость к ультрафиолету (УФ);
2. Исследовать влияние сверхэкспрессии генов стильбен синтаз (*STS*) из ели и винограда на содержание стильбенов в культуре клеток винограда *V. amurensis* и растениях *Arabidopsis thaliana*;

3. Проанализировать устойчивость *STS*-трансгенных растений *A. thaliana* к абиотическим стрессам;
4. Изучить влияние прямой обработки растений *A. thaliana* стильбенами и их предшественниками на устойчивость растений к УФ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При обработке УФ-С растений *P. jezoensis* и *V. amurensis* и добавлении предшественников (*пара*-кумаровой (СА) и кофейной (СаА) кислот) наблюдается увеличение общего содержания стильбенов по сравнению с необработанными растениями. Обработка СА снижает количество повреждений листьев после УФ-С-облучения черенков *P. jezoensis* и *V. amurensis*, что указывает на важную роль стильбенов в ответе растений на УФ.
2. Сверхэкспрессия генов *PjSTS1*, *PjSTS2* и *PjSTS3* в культурах клеток *V. amurensis* достоверно увеличивает общее содержание и продукцию стильбенов, и, в частности, *транс*-резвератрола по сравнению с контрольной линией, что свидетельствует о вовлеченности этих генов в биосинтез именно *транс*-резвератрола.
3. Наибольшее общее содержание стильбенов наблюдается в *VaSTS1*-трансгенных растениях *A. thaliana*. Растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*, продуцируют два стильбена, *транс*-пицеид и *транс*-резвератрол, в то время как *VaSTS7*-трансгенные растения продуцируют только *транс*-резвератрол, это означает, что выбор трансгена играет ключевую роль в биосинтезе стильбенов у трансгенных растений.
4. Сверхэкспрессия генов *VaSTS1* и *VaSTS7* не влияет на устойчивость растений *A. thaliana* к засухе, солевому, высоко- и низкотемпературному стрессам, но увеличивает устойчивость листьев к УФ-В и -С, что указывает на вовлеченность этих генов в защитный ответ растений на УФ.

5. Обработка растений *A. thaliana* стильбенами и их предшественниками (СА и коричной кислотой) снижает уровень повреждений растений при облучении УФ, наибольшим защитным действием обладает *транс*-резвератрол. Таким образом, стильбены и их предшественники выполняют защитную функцию при воздействии УФ на растения.

Научная новизна и практическая значимость.

Впервые было показано, что сверхэкспрессия генов стильбен синтаз достоверно увеличивает общее содержание и продукцию стильбенов в культуре клеток винограда, увеличивает устойчивость растений *A. thaliana* к ультрафиолетовому излучению за счет биосинтеза стильбенов. Показано защитное действие *транс*-резвератрола против ультрафиолета при обработке листьев растений *A. thaliana*. Полученные результаты могут быть использованы для создания методик защиты важных сельскохозяйственных культур от повышенного ультрафиолетового излучения, а также создания генетических конструкций и методологических подходов коммерческими компаниями для устойчивости растений к ультрафиолету и биосинтеза стильбенов в них. Также результаты диссертационной работы можно использовать для проведения теоретических и практических занятий в высших образовательных учреждениях на биологических и сельскохозяйственных факультетах.

Апробация работы и публикации.

Результаты работы представлены на научной конференции с международным участием «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», 21-24 июня 2016 г., г. Санкт-Петербург; на Всероссийской конференции «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты», 18-24 сентября 2017 г., Крым, г. Судак; на Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды», 10-15 июля 2018 г., г. Иркутск; на Конференции-конкурсе

молодых ученых ФНЦ «Биоразнообразие» ДВО РАН 13-15 ноября 2018 г.; 18-19 ноября 2019 г.; 17-18 ноября 2020 г., г. Владивосток

Материалы диссертации изложены в 10 публикациях, из них 7 в журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах, иллюстрирована 16 рисунками и содержит 7 таблиц. Список литературы насчитывает 232 наименования.

Благодарности.

Автор искренне благодарит научного руководителя к.б.н. Киселёва К.В. за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор признателен к.б.н. Дубровиной А.С. и к.б.н. Алейновой О.А. за помощь в получении трансгенных растений, подготовке диссертации и работе с культурами клеток растений. Также автор выражает глубокую признательность Супруну А.Р. за проведение ВЭЖХ анализов, и всем сотрудникам лаборатории биотехнологии ФНЦ «Биоразнообразие» ДВО РАН за поддержку на всех этапах работы. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского фонда фундаментальных исследований (№19-04-00063, 19-316-90004) и Российского научного фонда (№14-14-00366).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Абиотические стрессы и защитный ответ растений

Стресс – это состояние повышенного напряжения организма в ответ на действие неблагоприятных факторов, к которым относится недостаток или избыток воды, низкие и высокие температуры, недостаток кислорода, засоление, ионизирующее излучение, патогены и др.

Самыми распространенными неблагоприятными факторами для растений являются водный дефицит, экстремально высокие и низкие температуры, избыток воды и солей в почве, дефицит кислорода (гипоксия),

высокая или низкая освещенность, присутствие в атмосфере вредных веществ, ультрафиолетовая (УФ) радиация, ионы тяжелых металлов.

Таким образом, стресс у растения – это интегральный (т.е. суммарный) ответ растительного организма на повреждающее действие, направленный на его выживание за счет мобилизации и формирования защитных систем.

1.1.1. Влияние повышенной температуры на растения

Высокотемпературный стресс – это серьезный экологический фактор, ограничивающий рост, метаболизм и продуктивность растений. Рост и развитие растений тесно связаны с многочисленными биохимическими реакциями, чувствительными к температуре. Реакция растений на повышение температуры варьируется в зависимости от типа растения, степени и продолжительности воздействия.

Важная роль температуры во взаимоотношениях организма и среды проявляется на всех уровнях его структурной и функциональной организации. Температурные сдвиги вызывают изменение структуры биополимеров, следовательно, и скоростей биохимических реакций и физиологических процессов. От температуры, в конечном счете, зависит выживаемость организма в целом.

Растения обладают рядом механизмов адаптации и акклиматизации для того, чтобы справиться с повышенными температурами. Кроме того, активируются основные механизмы устойчивости, в которых участвуют белки переносчики ионов, осмопротекторы, антиоксиданты и другие факторы, участвующие в сигнальных каскадах и контроле транскрипции, чтобы компенсировать вызванные стрессом биохимические и физиологические изменения ([Hasanuzzaman et al., 2013](#)). Выживание растений в условиях высокотемпературного стресса зависит от способности воспринимать стимул повышенной температуры, генерировать и передавать сигнал, а так же инициировать соответствующие физиологические и биохимические изменения. Экспрессия генов, индуцированная высокими

температурами, и дифференциальный синтез вторичных метаболитов также существенно увеличивают устойчивость растений к стрессу.

Тепловой стресс часто угнетает рост, развитие, физиологические процессы и урожайность растений. Одно из основных последствий высокотемпературного стресса – это избыточная генерация активных форм кислорода (АФК), это в свою очередь приводит к другому стрессу – окислительному ([Hasanuzzaman et al., 2013](#)).

Растение в небольшой степени способно переносить тепловой стресс за счет физических изменений организма, и зачастую переносит стресс путем создания сигналов для изменения метаболизма. Все растения по-разному изменяют свой метаболизм в ответ на тепловое воздействие, в частности, они производят различные совместимые растворенные вещества – осмолиты, которые способны организовывать белки и клеточные структуры, поддерживать тургор клеток за счет осмотической регулировки и изменять антиоксидантную систему для восстановления клеточного окислительно-восстановительного баланса и гомеостаза ([Valliyodan et al., 2006](#)). На молекулярном уровне тепловой стресс вызывает изменения в экспрессии генов, участвующих в прямой защите от высокотемпературного стресса ([Chinnusamy et al., 2007](#)). К ним относятся гены, ответственные за экспрессию осмопротекторов, детоксифицирующих ферментов, транспортеров и регуляторных белков ([Krasensky et al., 2012](#)). В условиях теплового стресса, модификация физиологических и биохимических процессов путем изменения экспрессии генов постепенно приводит к развитию термической устойчивости в форме акклиматизации или, в идеальном случае, адаптации ([Moreno et al., 2011](#)). В последнее время, экзогенные применение осмопротекторов, фитогормонов, различных сигнальных молекул, микроэлементов, а также питательных веществ оказалось эффективным для снижения индуцированного высокими температурами повреждений растений ([Waraich et al., 2012](#)).

Тепловой стресс оказывает негативное влияние на различные культуры во время прорастания семян, не смотря различные диапазоны температур для разных видов сельскохозяйственных культур (Johkan et al., 2011). Пониженная всхожесть, аномальные проростки, уменьшение длины корешка, замедление роста растяжением – это основные характеристики воздействия теплового стресса (Piramila et al., 2012).

Высокая температура вызывает потерю содержания воды в клетках, из-за чего уменьшается их размер (Rodríguez et al., 2005). Морфологические повреждения теплового стресса проявляются в тепловых и солнечных ожогах листьев, ветвей и стеблей, в раннем старении и опадании листьев, некрозе, задержке роста побегов и корней, обесцвечивании и повреждении плодов (Rodríguez et al., 2005). Высокие температуры могут изменить длительность различных этапов вегетации растения, таких как бутонизация, цветение и плодоношение, за счет сокращения периода жизни. Повышение температуры на 1-2 °C приводит к сокращению сроков формирования зерна и отрицательно сказывается на урожае зерновых культур (Nahar et al., 2010). При экстремальном тепловом стрессе запрограммированная гибель клеток в определенных тканях может происходить в течение нескольких минут или даже секунд из-за денатурации или агрегации белков, однако, с другой стороны, при умеренном тепловом воздействии в течение длительного периода происходит постепенная гибель тканей растения; оба типа высокотемпературного стресса могут привести к опаданию листьев, прерыванию цветения и формирования плодов или даже гибели всего растения (Rodríguez et al., 2005).

Рост и развитие растения сильно сдерживается от изменения температуры. (Porter et al., 1998). Температуры выше 35°C, значительно снижают активность рибулозо 1,5- бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (Рубиско), тем самым ограничивая фотосинтез (Crafts-Brandner et al., 2000). Высшие растения, подвергаясь воздействию избыточного тепла на 5°C выше их оптимальных условий выращивания, демонстрируют характерный набор

клеточных и метаболических реакций, необходимый для выживания в условиях высоких температур. Эти эффекты включают снижение синтеза белков первичного метаболизма и ускорение транскрипции и трансляции белков теплового шока (Bray et al., 2000), производство фитогормонов и антиоксидантов (Maestri et al., 2002), и изменения в организации клеточных структур, в том числе органелл, цитоскелета и функций мембраны (Weis et al., 1988). Тепловой стресс во время вегетативного роста вызывает изменения в гормональном гомеостазе.

Повышенные температуры могут сократить деятельность антиоксидантных ферментов (Gong et al., 1997). Высокая температура вызывает изменения в мембране за счет увеличения текучести мембран. В растительных клетках мембрана важна в таких процессах как фотосинтез и дыхание. В хлоропластах тепло снижает фотохимическую эффективность фотосистемы II, наиболее термочувствительного компонента в процессе фотосинтеза (Al-Khatib et al., 1999). Тепловой стресс приводит к неправильной компактизации вновь синтезированных белков, а также к денатурации существующих белков (Ellis, 1990).

В условиях высоких температур растения демонстрируют различные механизмы выживания, которые включают долгосрочные эволюционные и морфологические адаптации и краткосрочные механизмы акклиматизации. К ним относят изменение ориентации листьев, транспирационное охлаждение или изменение липидного состава мембран, закрытие устьиц и уменьшение потери воды, увеличение плотности устьиц, а также увеличение радиуса ксилемных сосудов (Srivastava et al., 2012).

Растения, растущие в жарком климате, избегают теплового стресса за счет уменьшения поглощения солнечного излучения. Эта способность выражается в наличии мелких волосков, образующих толстый слой на поверхности листа, а также кутикулы и защитного воскового покрытия. У таких растений листовые пластинки часто отворачиваются от света и ориентируются параллельно солнечным лучам (парагелиотропизм). Также

растения избегают солнечного излучения путем скручивания листовых пластинок. Из-за тесной связи между засухой и высокотемпературным стрессом, воздействие каждого стрессора на выращиваемые в поле растения может быть трудно различимо, и адаптация к засушливой среде может быть эффективной только в том случае, если она ведет к устойчивости к обоим стрессам сразу (Fitter et al., 2002).

Термостойкость обычно определяется, как способность растения выживать и давать урожай при высоких температурах. Близкородственные виды растений, и даже разные органы и ткани одного и того же растения, могут значительно различаться в защитных реакциях на тепловой стресс (Rodríguez et al., 2005).

В случае внезапного теплового стресса, возникающая краткосрочная реакция, которая включает изменение ориентации листа, транспирационное охлаждение и изменения липидного состава мембран, более важна для выживания, чем долгосрочная реакция (Rodríguez et al., 2005).

1.1.2. Влияние пониженной температуры на растения

Каждое растение имеет свой оптимум температуры для нормального роста и развития. Для одного растения этот оптимум является нормой, для другого – это стресс. Многие растения, произрастающие в теплом климате, при контакте с низкими температурами могут погибнуть. Такие растения как кукуруза (*Zea mays* L., Merr), соя (*Glycine max* L.), хлопок (*Gossypium hirsutum* L.), томат (*Lycopersicon esculentum* Mill.) и банан (*Musa sp.* L.) чувствительны к температуре ниже 10-15 °C (Lynch, 1990). Симптомы стресса появляются после 48-72 ч. воздействия пониженных температур, однако этот период времени зависит от вида растения, а также от индивидуальной чувствительности растения к холодовому стрессу. Различные фенотипические симптомы в ответ на охлаждение включают снижение скорости роста, увядание, хлороз (пожелтение листьев) и некроз (отмирание ткани) листьев. Охлаждение также серьезно затрудняет

репродукцию растений ([Jiang et al., 2002](#)). Низкая температура окружающей среды – это стресс не только влияющий на рост и развитие растения, но и существенно ограничивающий географическое распространение растений ([Mickelbart et al., 2015](#)).

Последствия глобального изменения климата, такие как более мягкие зимы и более высокие колебания температуры весной в северных широтах, сильно влияют на выживание растений из-за поздних холодов. Холодная акклиматизация, повышающая морозостойкость растений при воздействии низких, но незамерзающих температур, увеличивает зимнюю выживаемость ([Levitt et al., 1980](#)). Большинство растений, произрастающих в умеренном и бореальном климате, проходят годовой цикл акклиматизации и дезакклиматизации для повышения устойчивости к морозам осенью и снижения устойчивости весной ([Vyse et al., 2019](#)).

Сильно колеблющиеся температуры приводят к частым циклам замораживания-оттаивания, вызывая повреждения мембран из-за их сжатия и расширения ([Uemura et al., 2006](#)), что в свою очередь влияет на продуктивность растений и приводит к экономическим потерям для сельского хозяйства ([Warmund et al., 2008](#)).

Поскольку ткани повреждаются как в результате обезвоживания, вызванного замораживанием, так и регидратации во время оттаивания ([Levitt et al., 1980](#)), термин «устойчивость к стрессу замораживания-оттаивания» был определен для описания способности растения выживать в цикле замораживания-оттаивания и восстанавливаться от нелетальных повреждений после оттаивания ([Chen et al., 2013](#)). Повреждение от замораживания-оттаивания в основном вызвано образованием внеклеточного льда, провоцирующим замораживание-обезвоживание, что приводит к дестабилизации мембран ([Uemura et al., 2006](#)). Хотя плазматическая мембрана считается основным местом повреждения ([Takahashi et al., 2013](#)), во время замораживания широко подвергаются повреждениям оболочки хлоропластов и тилакоидных мембран, что приводит к снижению

фотосинтетической активности растений (Ehlert et al., 2008). Кроме того, некоторые ферменты стромы хлоропластов, такие как Рубиско, инактивируются во время замораживания (Thalhammer et al., 2014).

Осмолиты, такие как сахар или пролин, стабилизируют мембраны во время замораживания, накапливаются в клетках растений во время акклиматизации к холоду и уменьшаются во время дезакклиматизации (Pagter et al., 2017). Осмолиты имеют большое значение в процессах замораживания-оттаивания и восстановления после оттаивания. Кроме того, осмолиты увеличивают осмотический потенциал клеток, стабилизируют белки во время замораживания (Hinch et al., 2012) и связывают АФК (Tarkowski et al., 2015).

Низкотемпературный стресс подразделяется на холодовой стресс ($< 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) и стресс замораживания ($< 0\text{ }^{\circ}\text{C}$), в зависимости от температуры окружающей среды. Тропические и субтропические растения особо чувствительны к переохлаждению и неспособны адаптироваться к холоду. Однако растения, обитающие в умеренных широтах, обладают способностью переносить отрицательные температуры после периода воздействия низко-положительных температур, этот процесс называется акклиматизацией к холоду (Chinnusamy et al., 2007). Растения умеренного климата устойчивы к сезонным изменениям температуры и могут переносить холод в течение ранней весны и зимы. Многие важные культуры, такие как рис, кукуруза, соя, картофель, хлопок и томат, чувствительны к холоду и неспособны к акклиматизации. Некоторые культуры, такие как овес, устойчивы к холоду, но чувствительны к замерзанию, а ячмень, пшеница и рожь хорошо адаптировались и к отрицательным температурам (Zhang et al., 2011). Однако некоторые растения, такие как резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana* L.), озимая пшеница (*Triticum aestivum* L.) и ячмень (*Hordeum vulgare* L.) без акклиматизации к холоду не переносят незамерзающие температуры (Zhao et al., 2015). Каждое растение имеет разные механизмы устойчивости в разные периоды холодового стресса, такие как синтез и

накопление веществ, обладающих осмопротекторными свойствами – сахара, аминокислоты, белки, стероиды и т.д.

В условиях низкотемпературного стресса растениям необходимо поддерживать метаболизм клеток, в частности, стабилизацию клеточных мембран, а так же структуру белков с ферментативной активностью, для выживания в неблагоприятных условиях окружающей среды ([Chen et al., 2018](#)). Липиды мембран, содержащие насыщенные жирные кислоты, затвердевают при более высоких температурах по сравнению с липидами, содержащими ненасыщенные жирные кислоты ([Steponkus et al., 1979](#)). При очень низких температурах в апопласте может образовываться лед, что вызывает механическую нагрузку на клеточную стенку, и мембрана может разорваться. В результате происходит обезвоживание из-за многочисленных повреждений мембраны ([Uemura et al., 1997](#)). Поэтому стресс от переохлаждения на клеточном уровне часто сопровождается стрессом от обезвоживания.

Самая широко распространенная стратегия растений, используемая при низких температурах – это акклиматизация к холоду, при которой в клетках растений происходит активное накопление криозащитных полипептидов (например, COR15a) и осмолитов (например, растворимых сахаров и пролина). Адаптированные к холоду растения всегда запасают больше сахаров (D-глюкозы, D-глюкозо-6-фосфата, амилозы, крахмала и мальтозы) в своих подземных тканях ([Londo et al., 2018](#)).

Однако не только систематическое положение растений и акклиматизация играют важную роль в устойчивости растений к стрессам, но и циркадные часы влияют на адаптацию растений к холодному стрессу. Известно, что растения могут воспринимать несколько параметров световых сигналов, таких как качество света (длина волны и интенсивность облучения), количество и продолжительность (фотопериод день/ночь) и даже направление света. Продолжительность суточного фотопериода и умеренная температура ниже нуля значительно влияют на процесс высыхания сосны

обыкновенной *Pinus sylvestris* L. (Beck et al., 2008), что в свою очередь способствует защите растений от образования кристаллического льда в клетках, и как следствие устойчивости к холодам.

Подобно свету, гормоны также играют роль в процессе активации транскрипционных факторов, отвечающих на холодовой стресс (Yang et al., 2018). Основные гормоны, такие как абсцизовая кислота (АБК), гибберелины, брассиностероиды, жасмонаты, ауксины, цитокинины, мелатонин и полиамины, влияют на пути передачи холодового сигнала.

Холодоустойчивость растений – сложный процесс. Низкие или экстремально низкие температуры могут вызвать образование льда в тканях растений, что вызывает клеточную дегидратацию. С другой стороны, у растений существуют защитные механизмы, которые предотвращают образование льда. Как любой сложный процесс, механизм защиты от холодового стресса у растений контролируется не только генами из пути передачи холодового сигнала, но и другими факторами, такими как фитогормоны, циркадные часы и свет.

1.1.3. Защитный ответ растений на засуху

Изменение климата представляет собой серьезную угрозу для большинства сельскохозяйственных культур, выращиваемых в тропических и субтропических регионах во всем мире. Стресс из-за засухи – одно из последствий изменения климата, которое отрицательно сказывается на росте и урожайности сельскохозяйственных культур. Ранее было предложено множество имитационных моделей для прогнозирования изменения климата и возникновения засухи в будущем. В настоящее время важно модернизировать основные сельскохозяйственные культуры растений, для адаптации к засухе, которая в будущем может снизить урожайность растений (Sallam et al., 2019).

Стресс из-за засухи можно определить просто как нехватку воды, которая вызывает негативные морфологические, биохимические,

физиологические и молекулярные изменения. Засуха может возникать на любой стадии роста и зависит от местных условий. Когда растения подвергаются засухе, они изменяются физиологически, чтобы выдержать этот стресс (Vinocur et al., 2005). Устойчивые к засухе растения стараются сохранить содержание воды, увеличить стабильность мембран и фотосинтетическую активность, накопить растворимые сахара, пролин, аминокислоты, а также активизировать ферментативную и неферментативную антиоксидантную активность (Abid et al., 2016). Ранее были выявлены различные физиологические и биохимические реакции в ответ на засуху. Существует много важных физиологических ответов растений, которые смягчают неблагоприятное воздействие засухи на растения.

Дефицит воды в мембранах нарушает структуру билипидного слоя, перемещение мембранных белков, что приводит к потере целостности мембраны, нарушается ионный баланс и теряется активность ферментов мембран. Также повреждения в мембране приводят к тому, что белки органелл и цитозоля теряют свою активность или даже могут полностью денатурировать. Другие физиологические воздействия засухи на растения включают сокращение вегетативного роста, в частности роста побегов. Снижается активность киназ, происходит медленное деление клеток, тем самым подавляется рост (Schuppler et al., 1998). Рост листьев, как правило, более чувствителен к засухе, чем рост корней. Например, у хлопка при засухе ускоряется процесс старения и происходит раннее опадание листьев. Этот процесс также известен как регулировка листовой поверхности. Что касается корня, то его рост может увеличиться, чтобы извлечь больше воды из глубоких слоев почвы.

Фотосинтез — главный фактор урожайности и роста растений. Следовательно, его роль в понимании физиологической основы реакции растений на засуху имеет решающее значение. Разница в содержании фотосинтетических пигментов является ключевым показателем для

определения степени фотосинтеза у растений, выращенных в условиях воддефицита. Хорошо известно, что засуха снижает скорость фотосинтеза злаков (Dawood et al., 2019). Основные компоненты, ограничивающие скорость фотосинтеза это – ограничение диффузии CO_2 из-за раннего закрытия устьиц в ответ на вызванную засухой потерю тургора, потеря активности фотосинтетических ферментов, снижение фотохимической эффективности фотосистемы II, а так же различные биохимические компоненты, связанные с образованием триозофосфата (Pandey et al., 2015). Метаболические нарушения фотосинтетической активности могут быть связаны с дисбалансом между захватом света и его использованием, снижением активности Рубиско, нарушением целостности хлоропластных мембран (Amirjani et al., 2013), деградацией структуры хлоропластов и фотосинтетического аппарата, фотоокислением хлорофилла, подавлением биосинтеза хлорофилла и повышением активности хлорофиллазы (Kabiri et al., 2014). Однако вызванные засухой нарушения фотосинтеза из-за метаболических изменений более сложны, чем устьичные ограничения, которые в основном возникают из-за снижения синтеза фотосинтетических пигментов (Rama et al., 2014). Проводимость CO_2 устьиц и мезофилла часто снижается в ответ на засуху (Centritto et al., 2009). Закрытие устьиц ограничивает транспирационную потерю воды и помогает растениям сохранять водный баланс в условиях засухи. Тем не менее, закрытие устьиц, в свою очередь, приводит к снижению доступности CO_2 для фотосинтетического метаболизма углерода, снижает чистую скорость ассимиляции CO_2 и препятствует способности растений накапливать сухую массу (Chaves et al., 2013). Хлорофилл играет решающую роль в производстве энергии растениями, поэтому чувствительные растения страдают от недостатка энергии, необходимой для нормального роста.

Уровень повреждений от засухи зависит от продолжительности и интенсивности воддефицита. Как и в реакциях на другие абиотические стрессы, во время дефицита воды в клетках растения накапливаются

различные АФК, что приводит к окислительным повреждениям клеток и тканей растений. АФК могут быть представлены в виде синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), супероксидного радикала (O_2^-), пероксида водорода (H_2O_2) и гидроксильного радикала (OH^\cdot). Присутствие АФК вызывает изменение окислительно-восстановительного потенциала клетки, что приводит к окислению фотосинтетических пигментов, мембранных липидов, белков и нуклеиновых кислот, тем самым вызывая гибель клеток, замедляя рост и урожайность растений (Havlin, 1999). Производство АФК линейно зависит от тяжести водodefицита, который вызвал перекисное окисление мембран, органелл и активацию или инактивацию ферментов и распад нуклеиновых кислот (Outoukarte et al., 2019). Повышение содержания малонового диальдегида (МДА) считается подходящим маркером повреждения мембраны. Предыдущие исследования показали, что снижение стабильности мембран отражает степень перекисного окисления липидов, вызванного АФК (Sharma et al., 2017). Например, низкие уровни МДА были связаны с устойчивостью пшеницы к засухе (Zhang et al., 2011). Следует отметить, что повышенная активность фермента липоксигеназы (LOX) отвечает за окисление полиненасыщенных жирных кислот и, таким образом, усиливает перекисное окисление липидов в стрессовых условиях (Sánchez-Rodríguez et al., 2010). При засухе происходит дифференциальное накопление активности LOX по сравнению с растениями без стресса (Alam et al., 2013). Усиленное перекисное окисление липидов и АФК нарушают функции клеточных мембран, что приводит к потере способности мембран контролировать скорость движения ионов. Большая утечка метаболитов или ионов приводит к более значительным повреждениям мембраны (Corpas et al., 2007). Кроме того, образование АФК вызывает окисление аминокислот и может разрушить структуру белка при засухе. Нарушение синтеза белков сопровождается снижением роста растений и урожайности в условиях водного стресса, что связано с уменьшением количества полисомальных комплексов в тканях с пониженным содержанием воды (Kabiri et al., 2014). Белки, экспрессия

которых увеличивается в ответ на засуху, вносят биохимические и структурные изменения, которые позволяют растениям справляться со стрессом ([Al-jebory et al., 2012](#)).

В свою очередь в ответ на выработку огромного количества АФК, во время засухи происходит выработка антиоксидантных ферментов, таких как каталаза (CAT), супероксиддисмутаза (SOD), пероксидаза (POD), аскорбатпероксидаза (APX), монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR), дегидроаскорбатредуктаза (DHAR) и глутатионредуктаза (GPX). Антиоксидантная система является хорошо известным адаптивным механизмом растений в ответе на вододефицитный стресс.

Адаптация растений к дефициту воды подразделяется на: предотвращение засухи, предотвращение обезвоживания и устойчивость к обезвоживанию, или их сочетание. Накопление осмолитов является одним из механизмов засухоустойчивости, который позволяет клеткам управлять распределением воды и структурной целостностью мембраны для того, чтобы обеспечить устойчивость к засухе и клеточной дегидратации ([Loutfy et al., 2012](#)). Осмотическое регулирование у растений обычно связано с высвобождением из запасов осмолитов.

Растения пшеницы накапливают несколько неорганических и органических растворенных в цитозоле веществ, чтобы уменьшить свой осмотический потенциал для поддержания тургора клеток ([Loutfy et al., 2012](#)). При засухе растения производят и накапливают совместимые растворенные вещества, такие как углеводы, полиолы и аминокислоты, для облегчения осмотического баланса, а также поглощения и удержания воды ([Hussain et al., 2018](#)). Углеводы выполняют множество функций по осмозащите, осмотической регулировке, хранению углерода, детоксикации АФК, защите целостности мембран, они обеспечивают защиту макромолекул и структур ДНК, а также стабилизацию ферментов / белков. При сильном обезвоживании клетки, углеводы становятся важной заменой воды, даже в

большей степени, чем пролин, обеспечивая гидратную оболочку вокруг белков ([Bowne et al., 2012](#)).

Присутствие пролина является одним из общих признаков большинства зерновых культур в условиях засухи ([Gurumurthy et al., 2019](#)). Проллин осмотически активен, контролирует хранение полезного азота и играет важную роль в стабильности мембраны. Как молекула-регулятор передачи сигналов, пролин запускает множество механизмов, помогающих адаптироваться к засухе ([Marcinińska et al., 2013](#)). Стресс засухи регулирует внутриклеточный осмотический потенциал, контролирует pH цитоплазмы и стабилизирует структуру клеточной мембраны пшеницы при стрессе засухи ([Huseynova et al., 2016](#)).

Производство АБК может влиять на адаптацию к засухе, как за счет предотвращения обезвоживания, так и за счет устойчивости к обезвоживанию ([Thompson et al., 2007](#)). АБК является наиболее важным гормоном, участвующим в регуляции устойчивости к абиотическим стрессам, таким как засуха, соленость, холод, жара и поранения ([Lata et al., 2011](#)). АБК давно признана основным химическим сигналом стресса от корней до побегов ([Schachtman et al., 2018](#)), вызывающим ингибирование разрастания листьев и краткосрочных реакций, таких как закрытие устьиц. АБК участвует в регуляции системных ответов на абиотический стресс до того, как появятся какие-либо заметные изменения в количестве воды или статусе питательных веществ в листьях ([Suzuki et al., 2013](#)). Более того, было обнаружено, что в пшенице АБК действует как стимулятор роста корней, что имеет значительную корреляцию с урожайностью в условиях засухи ([Xu et al., 2013](#)). Осмотический стресс приводит к синтезу или катаболизму ряда других регуляторов роста, таких как ауксины, цитокинины, этилен, гиббереллины, брассиностероиды, жасмоновая кислота и другие факторы (например, азот, pH), которые участвуют в регуляции физиологических процессов, благодаря их действию в качестве сигнальных молекул в сигнальных сетях ([Lamaoui et al., 2018](#)). АБК контролирует рост растений,

увеличивая рост корней и листьев во время дефицита воды (Reddy et al., 2004). АБК регулирует содержание воды в тканях посредством устьичных колебаний и индуцирует экспрессию генов, кодирующих белки, которые контролируют толерантность к клеточной дегидратации (Zhu, 2002).

Известно, что засуха приводит к снижению поглощения и перемещения макроэлементов (азот, фосфор и калий) в растениях, предположительно из-за уменьшения объема корней, и нерастворенного состояния макроэлементов в сухих почвах. Дефицит воды, обычно сопровождается низким содержанием азота, что влияет на флуоресценцию хлорофилла и фотосинтетические процессы, приводит к снижению скорости роста растений, раннему старению и сокращению урожайности сельскохозяйственных культур (Mobasser et al., 2014). По мере уменьшения содержания воды в почве радиус заполненных водой пор уменьшается, извилистость увеличивается, а подвижность фосфора уменьшается (Faye et al., 2006). Кроме того, засуха снижает активный транспорт и проницаемость мембран катионов (K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}), что приводит к снижению поглощения этих катионов корнями (Farooq et al., 2012).

При вододефиците снижается концентрация ионов Ca^{2+} в надземной части растений, поскольку уменьшается транспирационный поток (Sardans et al., 2008). Засуха может вызвать дефицит некоторых питательных микроэлементов, например Mn^{2+} , Fe^{3+} и Mo^{6+} (Hu et al., 2005). Так как эти питательные микроэлементы являются доступными в условиях хорошо увлажненной почвы, из-за их преобразования в растворимые и восстановленные формы для усвоения растениями (Havlin, 1999). Таким образом, дефицит питательных веществ является сопутствующим последствием от засухи. Поэтому, поддержание достаточного уровня макро- и микронутриентов для нормального функционирования клеток растений является важным условием для устойчивых сортов при недостаточном орошении сельскохозяйственных угодий.

1.1.4. Влияние солевого стресса на растения

Засолению почвы подвержены миллионы гектаров земли во всем мире, что ежегодно является причиной потери миллиардов долларов ([Shabala et al., 2008](#)). Высокая соленость затрагивает более 6% общей площади суши в мире. Большая часть площади засоленных почв возникла в результате естественных причин, таких как ливни, уносимая ветром соль из океана, цунами и выветривание горных пород. Помимо естественных причин, засоление почвы так же связано с человеческой деятельностью – с расчисткой земель путем удаления глубокой корневой растительности, что приводит к накоплению большего количества воды и, как следствие, повышению уровня соленых грунтовых вод. Другая причина связана с методами орошения, такими как: использование воды с высокой концентрацией соли, плохой дренажной системой, разливом соленой воды вблизи прибрежных территорий и аккумуляции соли на сухих почвах. В настоящее время считается, что 20% всех орошаемых земель засолены. Учитывая, что орошаемые земли производят, по крайней мере, в два раза больше урожая, чем неорошаемые земли, и на них приходится треть мирового производства продуктов питания, это повышает заинтересованность к засолению как к серьезной проблеме для урожайности сельскохозяйственных культур ([Munns et al., 2008](#)).

Высокая засоленность почвы – это состояние, характеризующееся высокой концентрацией растворимых солей, в которых NaCl является наиболее растворимой и широко распространенной солью. Почвы классифицируются как засоленные, если электрическая проводимость составляет 4 дСм/м (≈ 40 mM NaCl) или выше. При такой концентрации соли в почве рост и урожай большинства сельскохозяйственных культур значительно снижаются. Рис, как и большинство сельскохозяйственных культур, является гликофитом (растение, растущее на незасоленных почвах и пресных водоёмах) и поэтому может переносить только относительно низкие

концентрации соли. Среди зерновых культур рис является наиболее чувствительным к соли, проявляя симптомы солевого стресса и снижая урожайность даже при электрической проводимости ниже 4.0 дСм/м (Munns et al, 2008). Пороговое значение солености для риса составляет 3.0 дСм/м с 12% снижением урожайности на каждый дСм/м после этого порога (Gao et al., 2007).

Высокая засоленность влияет на растения в двух различных фазах. Первая фаза – это осмотический эффект, который не зависит от накопления солей в побеге. Растворенные в почвенном растворе соли снижают водный потенциал почвы. Это затрудняет поступление воды из корней и вызывает дефицит воды (Roy et al., 2014). Сигнал о дефиците воды быстро (в течение нескольких минут) передается от корней к побегам и вызывает снижение внутриклеточного тургора и деления клеток (Munns et al., 2008). Этот сигнал также способствует биосинтезу АБК, что приводит к более низкой устьичной проводимости (Roy et al., 2014). Низкая устьичная проводимость вызывает уменьшение ассимиляции углерода, накопления биомассы и снижение урожайности. Вторая фаза засоления является ионно-специфической; она связана с накоплением токсичных концентраций ионов натрия (Na^+) и / или хлорида (Cl^-), особенно в старых листьях, вызывая некроз тканей и раннее старение листьев (Roy et al., 2014). Для большинства видов растений Na^+ достигает токсичной концентрации раньше, чем Cl^- (Tester et al., 2003). И осмотические, и ионные эффекты нарушают аэробный метаболизм и вызывают накопление концентраций АФК, превышающих способность растения к детоксикации, что, в свою очередь, отрицательно влияет на клеточные структуры и метаболизм растительной клетки (Chaves et al., 2009).

Ионный дисбаланс – это эффект, вызываемый солевым стрессом во время второй фазы (Munns et al., 2008). Калий (K^+) является неотъемлемым макроэлементом растительной клетки, он играет важные функции, связанные с активацией ферментов, осмотической регуляцией и генерацией тургора, а так же регулированием мембранного потенциала и гомеостазом рН

цитоплазмы (Barragan et al., 2012). Из-за сходства физико-химических свойств между Na^+ и K^+ (ионного радиуса и энергии гидратации иона) натрий конкурирует с калием для основных сайтов связывания в ключевых метаболических процессах в цитоплазме, таких как ферментативные реакции, синтез белка и работа рибосом (Marschner, 1995). Na^+ подавляет ферментативную активность многих ферментов, которым для функционирования необходим K^+ . Поскольку более 50 различных цитоплазматических ферментов активируются именно ионами K^+ , нарушение гомеостаза K^+ приводит к серьезным нарушениям метаболизма, как в тканях корня, так и в тканях листа (Marschner, 1995). Было высказано предположение, что для выживания растений в условиях солевого стресса требуется высокое соотношение цитозольного K^+/Na^+ в цитоплазме растительной клетки. Снижение концентрации Na^+ в побегах при солевом стрессе коррелирует с устойчивостью к солевому стрессу у риса (Lutts et al., 1996) и кукурузы *Z. mays* (Tester et al., 2003).

Очень низкий мембранный потенциал клеток корня (более отрицательный внутри) способствует пассивному переносу Na^+ в клетки, особенно когда концентрация натрия в почвенном растворе увеличивается. Напротив, отток Na^+ , т.е. его удаление из клетки, не является пассивным и требует затрат энергии (Maathuis et al., 2014). Пассивное поглощение Na^+ клетками корня при высокой засоленности почвы в основном опосредовано семейством неселективных катионных каналов (Kronzucker et al., 2011). Натрий также оказывает сильное ингибирующее действие на поглощение ионов K^+ клетками, вероятно, за счет ингибирования транспортеров K^+ (Fuchs et al., 2005), присутствующих в плазматической мембране клеток корня. Кроме того, деполяризация мембраны, вызванная большим притоком цитозольного Na^+ , приводит к увеличению оттока K^+ , который возможен через активируемые деполяризацией K^+ -каналы (Adams et al., 2014).

В клетках растений Ca^{2+} действует как вторичный мессенджер, связывающий широкий спектр внеклеточных стимулов с различными

внутриклеточными ответами (Conde et al., 2011). Солевой стресс вызывает быстрое и временное увеличение свободного цитозольного Ca^{2+} , который декодируется сенсорами Ca^{2+} , такими как кальмодулин (CaM). Цитозольные датчики Ca^{2+} , в свою очередь, запускают множество путей передачи сигналов, участвующих в регуляции активности ионных каналов, ферментативной активности и транскрипции генов, что в конечном итоге приводит к ионному гомеостазу (Adams et al., 2014).

Солевой стресс часто влияет на среду обитания растений и многие виды выработали различные механизмы, чтобы справиться с ним. Механизмы солеустойчивости можно разделить на три основные категории. Первый механизм – это устойчивость к осмотическому стрессу, которая регулируется сигналами на большом расстоянии, снижает рост побегов (Roy et al., 2014) и включает биосинтез и накопление осмолитов для поддержания осмотического баланса и поглощения воды (Peleg et al., 2011). Вторым механизмом – это исключение ионов, при котором переносчики ионов Na^+ снижают их накопление в корнях и листьях. Эта система работает, контролируя поступление Na^+ в ксилему и его транспорта из ксилемы до фотосинтетических тканей побега. Наконец, третий механизм – это тканевая устойчивость, при которой высокая концентрация соли обнаруживается в листьях, но Na^+ нейтрализуется на клеточном и внутриклеточном уровне (особенно в вакуоли), уменьшая вредное воздействие Na^+ в цитозоле и стимулируя поглощение воды в клетку (Munns et al., 2008). В большинстве случаев устойчивость растений к солевому стрессу зависит от трех механизмов вместе, а не от каждого в частности (Pires et al., 2015).

1.1.5. Влияние ультрафиолетового излучения на растения

Все живые организмы биосферы Земли подвергаются воздействию УФ излучения, интенсивность которого зависит от угла Солнца и толщины стратосферного озонового слоя. Сила УФ излучения зависит главным образом от широты, поэтому наибольшие значения приходятся для

арктические и антарктические регионы. Растения – это фотосинтезирующие организмы, жизнедеятельность которых зависит от солнечного света. Световая энергия Солнца и способность фотоавтотрофов фиксировать эту энергию с помощью хлорофилла способствовали развитию жизни на Земле. Помимо того, что свет является источником энергии, он служит важным сигналом для растений, чтобы приспособиться к окружающим условиям. В природе солнечное излучение состоит из электромагнитного излучения различной длины и в целом подразделяется на УФ (<400 нм), фотосинтетически активное (~400–700 нм) и дальнейшее красное излучение (~700–780 нм). Примерно 7–9% всего солнечного излучения, которое достигает поверхности Земли, приходится на УФ-диапазон (~200–400 нм) (Frohnmeier et al., 2003).

УФ излучение в широком смысле классифицируется по длине волны на УФ-С излучение (200–280 нм), которое является наиболее опасным, но физиологически незначительным, поскольку эти длины волн полностью поглощаются атмосферой; УФ-В излучение (280–320 нм), которое фильтруется через стратосферный озоновый слой и поэтому лишь небольшая часть достигает поверхности земли; и УФ-А излучение (320–400 нм), которое не может поглощаться озоновым слоем и полностью передается на поверхность Земли. Среди этих трех типов УФ излучения УФ-В имеет первостепенное значение, несмотря на его небольшую долю (1.5% от общего УФ-излучения), из-за его серьезного повреждающего воздействия на рост и развитие растений. УФ-А излучение составляет 6.3% от общего излучения, является менее вредным, чем другие длины волн УФ-излучения (Holloosy et al., 2002).

Поток солнечной радиации сильно изменяется при прохождении через атмосферу Земли из-за различных факторов, таких как солнечный угол (время дня, сезон, широта), высота, стратосферный озон, облачный покров и затенение (McKenzie et al., 2003). Озоновый слой действует как ключевой компонент, защищающий живые существа от разрушительного УФ-

излучения. Антропогенные факторы, такие как выброс хлорфторуглеродов в атмосферу, могут привести к истощению озонового слоя на $\sim 5\%$ (Chipperfield et al., 2015). В целом уменьшение озонового слоя на 1% приводит к увеличению на 1.3–1.8% количества биологически активного УФ-В излучения (Holloosy et al., 2002). В период с 1979 по 2008 год наблюдалось значительное увеличение УФ-В излучения, достигающего поверхности Земли, на всех широтах, кроме экваториальной зоны, причем наибольшее увеличение имело место в средних и высоких широтах в Южном полушарии (Ballare et al., 2011). Таким образом, этот сценарий изменения климата предполагает, что жизнь на Земле будет постоянно подвергаться более высоким дозам УФ излучения, поэтому так важно детально изучить влияние УФ стресса на растения.

Установлено, что растения по-разному реагируют на интенсивность, а также на длину волны УФ излучения (Ulm et al., 2004). Более низкие дозы УФ-В стимулируют фотоморфогенез у растений, выросших при недостатке света, в то время как более высокие дозы УФ-В или УФ-С приводят к повреждению клеток (Suesslin et al., 2003). Сообщалось, что чрезмерное воздействие УФ-С может вызывать запрограммированную смерть клеток за счет активации каспазоподобных протеаз, фрагментации олигонуклеосомной ДНК и появления апоптотической морфологии ядра у *A. thaliana* (Gao et al., 2008).

Свет регулирует различные стадии роста и жизненно важные физиологические процессы на протяжении всего жизненного цикла растений (Heijde et al., 2012). Растения развили сложные транскрипционные сети, которые опосредуют изменения в развитии в ответ на свет. Эти изменения в развитии включают прорастание семян, деэтиоляцию, гравитропную ориентацию, движение устьиц и репродуктивное развитие во время цветения (Gyula et al., 2003).

Различные исследования показали, что УФ-В излучение вызывает различные фенотипические реакции, включающие ингибирование роста

гипокотилей, расширение семядолей, фототропное искривление и индукцию УФ-В защитных пигментов у растений (Suesslin et al., 2003). Сообщалось, что эти пигменты также обладают активностью улавливания свободных радикалов, что может обеспечить дополнительную защиту клеток (Rice-Evans et al., 1997). Помимо индукции УФ-поглощающих пигментов, существует активация механизмов репарации ДНК, таких как гены фотореактивации.

Растения, в ответ на УФ стресс, могут активировать путь гибели клеток, независимо от УФ-фоторецептора. Запрограммированная смерть клеток также известна как апоптоз и хорошо изучена на животных. Развитие апоптоза у растений происходит намного медленнее, но, что интересно, имеет много общих консервативных компонентов с апоптозом животных (Danon et al., 2000). Апоптотическая запрограммированная клеточная смерть у растений в настоящее время считается фундаментальным процессом, поскольку он играет важную роль во время развития, в условиях разного рода стрессов и в процессе старения растений. Помимо обычных стимулов развития, биотические и абиотические стрессовые факторы, такие как инфицирование патогеном или УФ излучение вызывают запрограммированную клеточную смерть у растений (Lam et al., 2000).

ДНК является одной из ключевых мишеней УФ-индуцированного повреждения как прокариотических, так и эукариотических клеток. Неблагоприятное воздействие солнечной радиации на живые организмы в основном связано с небольшим количеством УФ-В, достигающего поверхности земли и поглощаемого клеточной ДНК. Длины волн УФ-А менее эффективны для индукции повреждения ДНК, поскольку они не поглощаются природной ДНК. Документально подтверждено, что увеличение солнечного УФ-В излучения из-за длительного истощения стратосферного озонового слоя может влиять на стабильность генома популяций растений. Различные типы повреждений ДНК в ответ на УФ-В или УФ-С излучение включают образование димеров

циклобутилпиримидина, (6-4) фотопродуктов, внутри- и межмолекулярного сшивания, окисления гуанина до 8-оксогуанина или даже образование двухцепочечных разрывов ДНК (Molinier et al., 2008). Образование димеров циклобутилпиримидина составляет примерно 75% от общего повреждения ДНК при УФ-излучении.

Растения применяют три различных стратегии для минимизации повреждения ДНК, а именно: путь фотореактивации, специфичный для растений, путь глобальной репарации генома – эксцизионная репарация нуклеотидов, и гомологичная рекомбинация (Molinier et al., 2008). Путь фотореактивации заключается в биосинтезе различных фотолиаз, например, у *A. thaliana*, ген *UVR2* кодирует фотолиазу (PHR1), которая действует только на димеры циклобутилпиримидина (Ahmad et al., 1997), тогда как ген *UVR3* кодирует фотолиазу, специфичную для 6-4 фотопродуктов (Nakajima et al., 1998). Как димеры циклобутилпиримидина, так и 6-4 фотопродукты могут быть удалены в темноте посредством эксцизионной репарации нуклеотидов, эндонуклеолитического расщепления, высвобождения поврежденных нуклеотидов и повторного синтеза цепи ДНК (Liu et al., 2000).

Белки и липиды так же являются прямыми мишенями УФ-В излучения. Поскольку белки сильно поглощают излучения с длиной волны ~280 нм и более, УФ-В может влиять на ароматические аминокислоты, такие как тирозин, фенилаланин и триптофан (Khoroshilova et al., 1990). Белки могут подвергаться фотомодификации, непосредственно через реакции фотоокисления или опосредованно с помощью фоточувствительного производства АФК и свободных радикалов. Воздействие УФ-В приводит к повреждению фотосинтетического аппарата, включая Рубиско (Caldwell, 1993). Эти прямые эффекты часто наблюдаются при высокой плотности энергии УФ-В и низком сопутствующем фотосинтетически активном излучении (Fiscus et al., 1995). УФ-В повреждает рибосомы, индуцируя межмолекулярное сшивание между цитозольными рибосомными белками, рибосомными белками хлоропластов и рРНК, тем самым временно

ингибируя трансляцию *in vivo*. Несмотря на снижение скорости фотосинтеза, восстановление завершается к следующему дню, а также не наблюдается изменений в уровнях хлорофиллов а и b, каротиноидов или общих белков (Casati et al., 2004).

АФК индуцируются в ответ на различные биотические и абиотические стрессы, также АФК признаны как вторичные сигнальные молекулы (Mittler et al., 2011). Передача сигналов, опосредованная АФК, представляет собой сложный механизм, который зависит от природы отдельных видов АФК, баланса между ферментами, продуцирующими АФК, и окислительно-восстановительного состояния различных антиоксидантов (De Tullio, 2010). Растения демонстрируют повышенный уровень АФК из-за нарушения метаболической активности и повышенной активности мембранно-локализованной НАДФН-оксидазы в ответ на УФ-излучение. Высокое воздействие УФ-В-излучения на растения вызывает условия, подобные окислительному стрессу, возникающему в результате действия АФК, и характер экспрессии генов, проявляемый в обоих условиях, аналогичен (Kalbina et al., 2006).

Лучшим изученным прямым защитным механизмом растений в ответ на УФ, является дифференциальный синтез соединений, поглощающих УФ, таких как фенолы, флавоноиды и гидроксидинаминовые эфиры в листьях (Frohnmeier et al., 1999). Фитохимические исследования реакции растений на УФ-стресс выявили индукцию различных фенольных веществ, таких как стильбеноиды, которые могут защищать клетки от УФ-индуцированного окислительного повреждения (Kostyuk et al., 2008). Наибольшая концентрация этих веществ находится в эпидермальных и субэпидермальных слоях клеток, которые эффективно поглощают и снижают проникновение УФ глубже в мезофильные клетки листа (Fedina et al., 2010). Таким образом, эпидермис блокирует проникновение от 95 до 99% попадающего ультрафиолетового излучения (Robberecht et al., 1986).

1.2. Механизмы устойчивости растений к абиотическим стрессам

Для оптимального роста, развития и размножения растениям необходимы свет, вода, углерод и минеральные вещества. Экстремальные условия (ниже или выше оптимального уровня) снижают рост и развитие растений. Неблагоприятная среда, включающая экстремально высокие или низкие температуры, соленость и засуху, создает сложный набор стрессовых условий. Растения могут ощущать стрессы и реагировать на них разными способами, вырабатывая устойчивость ([Ahmad et al., 2015](#)). Они «помнят» прошлое воздействие абиотических стрессов и даже механизмы их преодоления таким образом, что реакции на повторяющиеся стрессы могут быть соответствующим образом скорректированы ([Hilker et al., 2015](#)). Однако основные молекулярные механизмы в целом остаются неизвестными. Наиболее очевидные последствия неблагоприятных условий сначала проявляются на клеточном уровне, после чего наблюдаются физиологические симптомы. Хотя последствия жары, засухи, засоления и холода различны, биохимические реакции кажутся более или менее похожими. Так же высокая интенсивность света и токсичность тяжелых металлов оказывают аналогичное воздействие. Таким образом, очевидно, что адаптивные стратегии растений против разнообразных абиотических стрессов аналогичны по своей природе. Это может стать важным ключом к повышению стратегической устойчивости сельскохозяйственных культур к комбинированным абиотическим стрессам.

Растения часто справляются с быстрыми колебаниями и неблагоприятными условиями окружающей среды благодаря своим внутренним метаболическим возможностям ([Simontacchi et al., 2015](#)). Изменения во внешней среде могут вывести метаболизм растений из гомеостаза и создать необходимость для растения применять некоторые передовые генетические и метаболические механизмы в своей клеточной системе ([Gill et al., 2010](#)). Растения обладают множеством защитных механизмов, приобретенных в ходе эволюции для борьбы с

неблагоприятными экологическими ситуациями (Yolcu et al., 2016). Эти механизмы вызывают перепрограммирование метаболизма в клетках (Bolton, 2009) для облегчения рутинных био-физико-химических процессов, независимо от внешнего воздействия (Mickelbart et al., 2015).

После восприятия стрессовых стимулов растения проявляют мгновенную и эффективную реакцию, чтобы инициировать сложный стресс-специфический сигнальный каскад (Chinnusamy et al., 2004). Защита, восстановление, акклиматизация и адаптация - основные компоненты реакции растения на стрессы. Синтез фитогормонов, таких как АБК, жасмоновая кислота, салициловая кислота и этилен (Todaka et al., 2012), накопление фенольных кислот и флавоноидов (Tiwari et al., 2013), а так же выработка различных антиоксидантов и осмолитов, активация факторов транскрипции инициируются вместе с экспрессией стресс-специфичных генов для создания соответствующей системы защиты (Atkinson et al., 2013).

Растения тонко чувствуют, адаптируются или стараются избегать меняющихся условий окружающей среды. Их восприятие стимулов окружающей среды и реакция на абиотические стрессы включают метаболические перекрестные взаимодействия в различных биосинтетических сетях и путях. Это сложное явление, которое включает в себя динамические изменения в реальном времени на генетическом, транскриптомном, клеточном, метаболическом и физиологическом уровнях (Atkinson et al., 2012). Главным и прямым воздействием стресса засухи, холода, солености и жары является создание условий дефицита воды в клетках с последующим параллельным развитием биохимических, молекулярных и фенотипических реакций на стрессы (Almoguera et al., 1995). Устойчивость, защита или восприимчивость к стрессам – это динамическое событие, включающее несколько стадий развития растения.

Повышенный уровень солей, присутствующих в почве, вреден для растительных клеток и клетки разных тканей по-разному реагируют на стрессы, вызванные засолением (Voeselek et al., 2008). Подверженные

стрессу клетки, независимо от их местоположения, будь то на поверхности корня или внутри глубоких тканей, влияют на своих соседей и вызывают изменение в паттерне экспрессии их генов в течение всей продолжительности стресса (Dinney et al., 2008). Засоление вызывает снижение уровня ароматических аминокислот, таких как цистеин, аргинин и метионин. Накопление пролина в клетках – хорошо известная стратегия борьбы с солевым стрессом (Matysik et al., 2002). Точно так же образование оксида азота (NO), активация антиоксидантных ферментов и соединений, модуляция гормонов, накопление глицин бетаина и полиолов – это только некоторые изменения в растениях из-за стресса засоления (Gupta et al., 2014).

Что касается теплового стресса, он становится важной сельскохозяйственной проблемой, поскольку он плохо влияет на урожайность. Повышение температуры отрицательно сказывается на морфо-анатомических, физиологических, биохимических и генетических изменениях растений. Понимание физиологических реакций растений и механизмов устойчивости к высокотемпературному стрессу позволит улучшить подходы и дальнейшие разработки в растениеводстве (Wahid et al., 2007). Стратегии снижения последствий теплового стресса у растений включают активацию механизмов, которые поддерживают стабильность мембран и индукцию каскадов митоген-активируемой протеинкиназы и кальций-зависимой протеинкиназы (Wang et al., 2006). Кроме того, утилизация АФК, накопление антиоксидантов и осмолитов, передача сигналов шаперонов и модуляция транскрипции – это определенные параллельные действия, которые помогают клеткам выдерживать тепловой стресс (Wahid et al., 2007).

Фитогормоны, имеющие решающее значение для роста и развития растений, так же играют важную роль в устойчивости к абиотическому стрессу (Wani et al., 2016). Профили экспрессии генов показали, что передача сигналов, таких как киназы, транскрипционные факторы и G-белки, в основном регулируется гормонами (Depuydt et al., 2011). Преобладающими

считаются пути реакции на абиотический стресс, основанные на АБК. Другие защитные пути, основанные на салициловой кислоте, жасмоновой кислоте или этилене, также вызывают у растений реакцию на абиотический стресс. Например, запуск продукции АФК для минимизации потерь во время абиотического стресса может предотвратить атаку растений биотрофными патогенами, но делает растения более уязвимыми для некротрофных патогенов. Другой фитогормон, жасмоновая кислота, эффективна для защитных реакций на некротрофные патогены ([Matilla et al., 2010](#)).

В условиях абиотического стресса растения демонстрируют повышенный синтез вторичных метаболитов, таких как полифенолы, что помогает растениям справляться с изменениями окружающей среды. Фенольные соединения действительно придают растениям более высокую устойчивость к различным стрессовым условиям, таким как тяжелые металлы, засоление, засуха, температура, пестициды и УФ-излучение ([Ancillotti et al., 2015](#)). Растения, растущие в стрессовых условиях, обладают способностью синтезировать больше фенольных соединений по сравнению с растениями, растущими в нормальных условиях ([Selmar, 2008](#)).

Обработка растений абиотическим стрессом приводит к накоплению различных фенольных соединений, которые, помимо прочего, могут улавливать АФК, что приводит к снижению перекисного окисления клеточных мембран ([Schroeter et al., 2002](#)), тем самым защищая клетки растений от вредного воздействия окислительного стресса. Большой группой фенольных соединений являются фенилпропаноиды, их путь биосинтеза активируется в условиях абиотического стресса (засуха, тяжелые металлы, засоление, высокая/низкая температура и УФ излучение), и регулируется с помощью изменения активности различных ключевых ферментов, таких как фенилаланин аммиак-лигаза (PAL, EC 4.3.1.24) и халконсинтаза (CHS, EC 2.3.1.74). Повышенная производительность ферментов также сопровождается повышением уровня транскриптов генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза фенилпропаноидов, такие как *PAL*, *C4H* (циннамат-4-

гидроксилаза), *4CL* (4-кумарат CoA-лигаза), *CHS*, *CHI* (халкон-изомеразы), *F3H* (флаванон-3-гидроксилаза), *F3'H* (флавоноид-3'-гидроксилаза), *F3'5'H* (флавоноид-3'5'-гидроксилаза), *DFR* (дигидрофлавонол-4-редуктаза), *FLS* (флавонолсинтаза), *IFS* (изофлавонол-синтаза), *IFR* (изофлавонол-редуктаза) и *UGT* (UDP-флавоноид-гликозилтрансфераза) (Gharibi et al., 2019).

Фенилпропаноидный путь является наиболее изученным путем вторичного метаболизма у растений. Растения, находящиеся в экстремальных условиях окружающей среды увеличивают устойчивость к стрессам за счет накопления фенольных соединений. Абиотические стрессы активируют клеточные сигнальные процессы, что приводит к активации фенилпропаноидного пути. Повышение устойчивости растений коррелирует с множественной функцией полифенолов в растениях, в основном состоящей в их способности поглощать АФК и/или способности некоторых классов полифенолов защищать растения от чрезмерного света, такого как УФ (флавоноиды) и видимый свет (антоцианы) (Sharma et al., 2019).

1.3. Роль стильбенов в устойчивости растений к абиотическим стрессам

Полифенолы играют важную роль в устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. В частности, антоцианы, флавонолы и стильбены играют важную роль в метаболизме растений благодаря своим особенностям (Šamec et al., 2021). Антоцианы являются натуральными красителями, обладают антиоксидантным, противомикробным и антиканцерогенным действием, оказывают защитное действие на сердечнососудистую систему человека и используются в пищевой и фармацевтической промышленности (Šamec et al., 2021). Флавонолы – это повсеместный класс флавоноидов с функциями фотозащиты и копигментации (вместе с антоцианами). Стильбены – это фитоалексины, которые содержатся во многих видах растений несвязанных семейств. Основной стильбен, резвератрол, обладает антиоксидантными и

противоопухолевыми свойствами, а также противовоспалительной и кардиопротекторной активностью (Šamec et al., 2021).

Все фенольные соединения синтезируются из аминокислоты фенилаланина по фенилпропаноидному пути (Sparvoli et al., 1994), где PAL является первым ферментом в этом пути. Фенилаланин, в свою очередь, является продуктом метаболизма шикимовой кислоты, которая связывает углеводный обмен с биосинтезом ароматических аминокислот и вторичных метаболитов. Общий путь фенилпропаноидов показан на рис. 1. В результате этого пути могут быть получены два основных класса соединений: флавоноиды (с помощью CHS) и стильбены (с помощью STS, EC 2.3.1.95). Путь флавоноидов приводит к синтезу различных классов метаболитов, таких как флавонолы, флаван-3-олы, проантоцианидины и антоцианы.

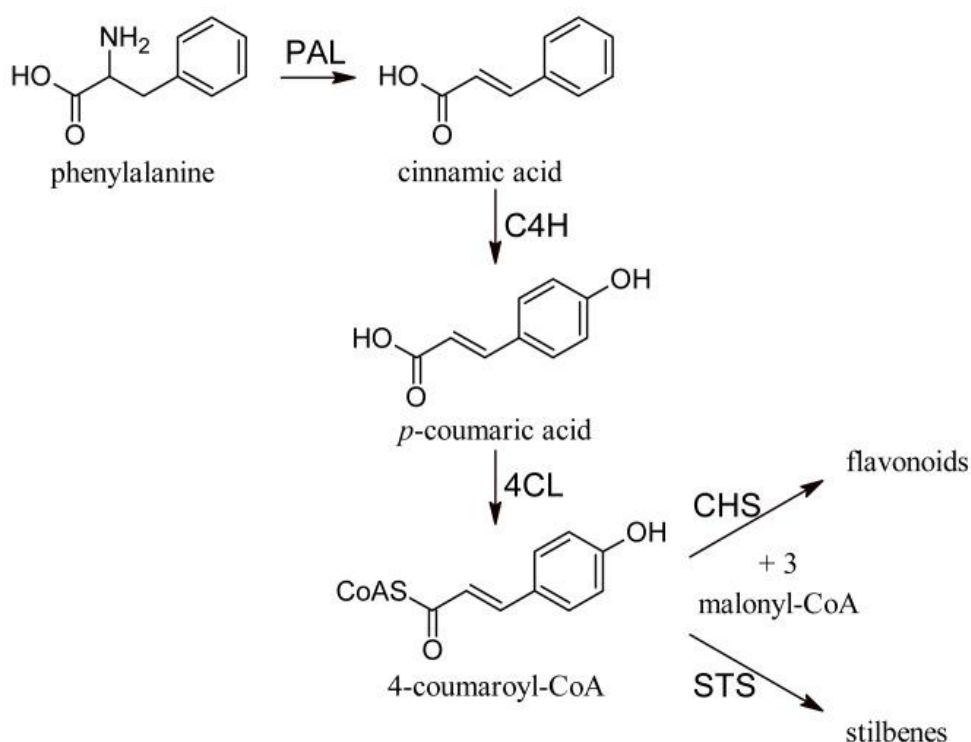


Рисунок 1 – Фенилпропаноидный путь. PAL, фенилаланин аммиак-лиаза; C4H, циннамат-4-гидроксилаза; 4CL, 4-кумарил: КоА-лигаза; CHS, халкон-синтаза; STS, стильбенсинтаза (Flamini et al., 2013).

Флавоноиды содержатся во всех высших растениях, а стильбены вырабатываются лишь некоторыми видами. Стильбены – это вторичные метаболиты растений, состоящие из двух фенольных фрагментов, связанных мостиком C_2 . Эти соединения продуцируются видами из ряда неродственных семейств голосеменных и покрытосеменных растений, включая Pinaceae, Cyperaceae, Vitaceae, Polygonaceae, Betulaceae, Fabaceae, Poaceae и др. (Dubrovina et al., 2017).

STS и CHS являются близкородственными ферментами, которые специфически контролируют биосинтез флавоноидов и стильбенов соответственно. STS эволюционировал у высших растений из CHS в результате нескольких замен аминокислот, в результате чего синтез переключился с халконов на синтез стильбенов (Braidot et al., 2008). Подобно CHS, STS осуществляет три реакции конденсации, в результате которых образуется резвератрол или пиносильвин, в зависимости от субстрата. В реакции STS концевая карбоксильная группа удаляется до замыкания кольца А, что вызывает другое сворачивание кольца в резвератроле по сравнению с тетрагидрохалконом, продуктом CHS. Таким образом, CHS и STS конкурируют за одни и те же субстраты и контролируют точки входа в пути флавоноидов и стильбенов соответственно (Schmidlin et al., 2008).

STS непосредственно катализирует реакцию образования резвератрола или пиносильвина, конденсируя три молекулы малонил-КоА и одну молекулу кумароил-КоА (для резвератрола) или одну молекулу циннамоил-КоА (для пиносильвина) с образованием основной структуры для стильбенов (Austin et al., 2004). Стильбены, например *транс*-резвератрол, могут в дальнейшем метаболизироваться с образованием других стильбенов, таких как птеростильбен, путем метилирования резвератрола резвератрол-О-метилтрансферазой; пицеид посредством гликозилирования резвератрола гликозилтрансферазами (Hall et al., 2007); или виниферины путем окисления резвератрола полифенолоксидазой (Dry et al., 1994).

У растений стильбены действуют как фитоалексины, то есть как защитные средства от различных биотических стрессов. Например, их роль в качестве конститутивных или индуцируемых противогрибковых защитных соединений была показана для растений, таких как виноград *Vitis vinifera* L. (Wiese et al., 1994), сорго *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (Yu et al., 2005) или арахис *Arachis hypogaea* L. (Sobolev, 2008). Основными стильбенами винограда являются *цис*- и *транс*-резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильтбен), резвератрол-3-*O*- β -D-гликопиранозид (пицеид), пицеатаннол (3,4,3',5'-тетрагидрокси-*транс*-стильтбен) и олигомеры резвератрола (виниферины) (Bavaresco, 2003). Изомерные и гликозилированные формы резвератрола и пицеатаннола, такие как резвератролозид, резвератрол-4'-*O*- β -D-гликопиранозид и производные резвератрола ди- и тригликозида, также были обнаружены в следовых количествах в винограде (Castellarin et al., 2012). Гликозилирование стильбенов способствует хранению, перемещению, модуляции противогрибковой активности и защите от окислительной деградации.

Виниферины синтезируются путем окисления резвератрола 4-гидроксистильтбенпероксидазами. Наиболее часто встречающимися из них являются α -виниферин (циклический дегидротример резвератрола), β -виниферин (циклический дегидротетрамер резвератрола), γ -виниферин (высокополимеризованный олигомер резвератрола), δ -виниферин (изомер дегидродимера резвератрола) и ϵ -виниферин (циклический дегидродимер резвератрола). Синтез ϵ -виниферина и δ -виниферина также может быть индуцирован различными патогенами и УФ-облучением (Pezet et al., 2003). Димеры и олигомеры резвератрола образуются путем олигомеризации *транс*-резвератрола, и используются в качестве активной защиты от экзогенной атаки или вырабатываются внеклеточными ферментами, высвобождаемыми патогенными микроорганизмами в попытке устранить нежелательные токсичные соединения (Cichewicz et al., 2000).

Гены *STS* обычно представлены небольшими семействами генов, но в *V. vinifera* *STS* представлены мультигенным семейством из 48 генов, из 32 из них являются функциональными, однако функции этих генов до конца остаются неизвестными. *STS* имеют различия в аминокислотных последовательностях, а также различаются уровнем экспрессии генов, что предполагает функциональные различия и возможные вариации ферментативной активности среди разных представителей *STS* (Parage et al., 2012).

Пути биосинтеза стильбенов в растениях активируются только в ответ на микробные инфекции и другие экологические индукторы. Генотип и онтогенез растений, факторы окружающей среды, в том числе биотической и абиотической природы, а так же баланс питания контролируют и регулируют биосинтез вторичных метаболитов в растениях (Lerdau et al., 2011). Регулирование биосинтеза вторичных метаболитов растений достигается за счет специфических факторов транскрипции, кодируемых несвязанными биосинтетическими кластерами генов, которые регулируют различные физиологические процессы, и в целом реагируют на сигналы окружающей среды, такие как pH, температура, питание. Активность факторов транскрипции регулируется внутренними сигналами, например, растительными гормонами, или внешними сигналами, такими как микробные воздействия или УФ излучение.

Стильбены обладают широким спектром биологически активных свойств. Несколько исследований *in vitro* показали, что резвератрол обладает противораковой, антиоксидантной, противовоспалительной, кардио- и нейропротекторной активностью, а так же подавляет агрегацию тромбоцитов, что снижает риск тромбообразования (Bavaresco et al., 2012). Птеростильбен (3,5-диметокси-4'-гидроксистильтбен) – это диметилированное производное резвератрола с повышенной фунгитоксической активностью по отношению к его предшественнику (Castellarin et al., 2012). Пицеатаннол блокирует LMP2A, вирусную протеин-тирозинкиназу, участвующую в

различных заболеваниях, связанных с вирусом Эпштейна-Барра (Geahlen et al., 1989), а также показывает положительный эффект при терапии меланомы человека (Larrosa et al., 2004). Существует огромный интерес к их потенциальной пользе для здоровья, а так же для повышения устойчивости растений к болезням. В течение последних десятилетий огромное количество исследований было направлено на выделение, определение структуры и определение биологической активности стильбенов. Тем не менее, подробные пути и регулирование биосинтеза этих соединений, и особенно сложный механизм регуляции и экспрессии генов неизвестны. Так что поиск соответствующих ферментов, генов, а также влияние абиотических и биотических стрессов, имеет большое значение для определения подробных путей биосинтеза стильбенов и понимания регуляции их метаболизма.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал и условия выращивания

Для экспериментов была отобрана хвоя 15-20-летней ели *Picea jezoensis* (Lindl. et Gord.) Fisch ex Carr., растущей в естественных условиях в Ботаническом саду-институте ДВО РАН (Россия, Владивосток, 43°13'27.6" с.ш. 131°59'29.4" в.д.).

Побеги с листьями дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. (Vitaceae) были отобраны в природной популяции близ города Владивосток, Россия. Молодые побеги *V. amurensis* были собраны в октябре 2016 г. и разделены на отдельные молодые черенки длиной 7–8 см с одним здоровым листом, которые в последующем были использованы для стрессовой обработки.

Культура клеток винограда *V. amurensis* V2 и клеточная линия КА0, которая была трансформирована только геном неомицин фосфотренсферазы II (*nptII* – ген устойчивости к канамицину (Km)), были ранее получены сотрудниками лаборатории биотехнологии ([Kiselev et al., 2013a](#); [Aleynova-Shumakova et al., 2014](#)). Клеточные линии винограда культивировали с 35-дневными интервалами субкультивирования в темноте при 24 ± 1 °C в пробирках (высота 150 мм, внутренний диаметр 15 мм) с 8 мл раствора твердой среды Мурасиге и Скуга (MS, [Murashige et al., 1962](#)), модифицированной с добавлением 0.5 мг 6-бензиламинопурина (БАП) на литр, 2 мг α -нафталуксусной кислоты (АНУ) и 5.5 г на литр агара (W B/A, [Dubrovina et al., 2010](#)).

Для получения трансгенных растений использовали резуховидку Таля *A. thaliana* экотипа Columbia. Семена дикого типа и трансгенных растений выращивали на среде MS без фитогормонов, с 50%-содержанием макро/микросолей, хелатов и сахарозы. Среда была разлита по чашкам Петри, также среда для трансгенных растений содержала антибиотик Km в концентрации 50 мг на литр среды. Через неделю растения переносили в

грунт и выращивали при температуре 22 °C с фотопериодом 16 ч день и 8 ч ночь, при интенсивности освещения $\sim 100 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

2.2. Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК

Выделение ДНК из клеток *V. amurensis*, *P. jezoensis* и *A. thaliana* проводили с использованием протокола экстракции, разработанным Эхтом и др. (Echt et al., 1992) с небольшими модификациями (Kiselev et al., 2015).

РНК выделяли из тканей *V. amurensis*, *P. jezoensis* и *A. thaliana* методом экстракции с использованием цетилтриметиламмоний бромида (СТАВ) и хлорида лития LiCl, разработанным Bekesiova и др. (Bekesiova et al., 1999) с небольшими модификациями (Dubrovina et al., 2013).

кДНК была получена с помощью набора для обратной транскрипции (MMLV RT набор с олиго(dT)15 праймером) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя Евроген (Москва, Россия), как описано ранее (Dubrovina et al., 2014).

2.3. Получение полных последовательностей генов *STS*

Гены ели *P. jezoensis* *PjSTS1a* (GenBank: LT158484), *PjSTS1b* (GenBank: LT158485), *PjSTS2* (GenBank: LT158486) и *PjSTS3* (GenBank: LT158487) амплифицировали с использованием пары праймеров, дизайн которых был выполнен на основе известных последовательностей мРНК *P. abies*: *PaSTS1* (GenBank: JN400048) и *PaSTS2* (GenBank: JN400047); *P. glauca*: *PgSTS1* (GenBank: JN400069) и *PgSTS2* (GenBank: JN400070); *P. sitchensis*: *PsSTS1* (GenBank: JN400059) и *PsSTS2* (GenBank: JN400058). Праймеры, использованные для получения полной последовательности генов *PjSTS* представлены в таблице 1. Полноразмерные кДНК транскриптов *V. amurensis* *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) из кДНК культуры клеток винограда V2 с использованием праймеров (табл. 1), подобранных к известным последовательностям генов *VaSTS* *V. amurensis* (GenBank: GQ167204, EU659863, EU659868, JQ780328). Реакцию амплификации проводили с

использованием полимеразы Pfu Plus (Silex М, Москва, Россия), как описано в работе [Kiselev et al., 2016b](#).

ПЦР продукты были изолированы из агарозного геля с использованием набора Cleanup Mini ([Евроген, Москва, Россия](#)) и были клонированы в вектор pJET1.2/blunt согласно протоколу фирмы-производителя ([Fermentas, Вильнюс, Литва](#)). Полученным вектором трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамм XL1 методом теплового шока. После трансформации, клетки *E. coli* высаживали на чашки Петри со средой Лурия-Бертани (LB, NaCl 10 г., пептон 10 г., дрожжевой экстракт 5 г., агар 10 г. на литр) с добавлением селективного маркера ампициллина (50 мг/л). Выросшие колонии *E. coli* использовали в ПЦР с праймерами pJet ([табл.1](#)). Полученные с помощью pJet праймеров ПЦР продукты секвенировали с использованием секвенатора ABI 3130 Genetic Analyzer ([Applied Biosystems, Foster City, США](#)) в соответствии с протоколом и рекомендациями изготовителя, как описано ранее ([Kiselev et al., 2013a](#)). Программа поиска BLAST была использована для анализа полученных последовательностей. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Множественное выравнивание полученных последовательностей и их анализ проводили с помощью программы ClustalX ([Altschul et al., 1990](#)). Множественное выравнивание последовательностей было выполнено с помощью программы BioEdit 7.0.8 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Аминокислотные последовательности были предсказаны с помощью программы Gene Runner 3.05.

2.4. Бисульфитное секвенирование

Недельные проростки *A. thaliana* были обработаны 5-Азациитидином (5A) как описано ранее ([Ogneva et al., 2019](#)). Тотальную ДНК выделяли из 20 мг сухой ткани у восьминедельных растений *A. thaliana* (были смешаны все типы тканей надземных частей растений) с использованием набора Zymo Research EZ DNA Methylation-Gold Kit ([Irvine, США](#)), как описано в работе

Kiselev et al., 2015. Уровень цитозинового метилирования участков генов *VaSTS1*, *VaSTS7* был проанализирован с использованием бисульфитного секвенирования, как описано у Kiselev et al., 2013b и Tyunin et al., 2013.

После бисульфитной обработки ДНК фрагменты белок-кодирующих последовательностей генов *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали с использованием праймеров для бисульфитного секвенирования (табл. 1). Праймеры были разработаны в соответствии с рекомендациями для набора DNA Methylation-Gold Kit (Irvine, США). ПЦР и клонирование ПЦР-продуктов проводили, как описано ранее (Kiselev et al., 2013b). Было секвенировано 16 клонов для каждой области ДНК из 2 биологических повторов (8 клонов на каждое отдельное растение). Программа поиска BLAST была использована для анализа последовательностей. Множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием программы ClustalX (Altschul et al., 1990).

2.5. Количественная оценка экспрессии генов *STS*

Для количественного анализа экспрессии генов *STS* использовали ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ) согласно рекомендациям (Giulietti et al., 2001) с помощью разных сочетаний праймеров (табл. 1). кДНК амплифицировали в присутствии флуоресцентного красителя EvaGreen (Biotium, Хейвард, США), используя набор реагентов «ПЦР-комплект» для ПЦР в реальном времени (Синтол, Москва, Россия). Для амплификации использовали амплификатор DTrprime с функцией детекции результатов в реальном времени (ДНК Технология, Москва, Россия). Обсчет измерений проводили в программном обеспечении фирмы «ДНК технология» RealTime_PCR v.7.3. При анализе оптических измерений использовали «количественный метод со стандартами», в качестве стандартов использовали разведения полученной кДНК (1:1; 1:5; 1:25; 1:125). Экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001), где значение 1 в расчете относительного количества мРНК в каждой реакции

ПЦР-РВ присваивалось для контрольных проб (КА0, клетки или растения без обработки).

Полученные значения транскрипции исследуемых генов нормализовали на полученное количество фрагментов ДНК для гена актина *AtActin* (GenBank: NM_112764) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *AtGAPDH* (GenBank: NM_111283) для анализа экспрессии в *A. thaliana*; *VvGAPDH* (GenBank: GU585870) и *VaActin* (GenBank: DQ517935) для винограда *V. amurensis*; *PjActin* (GenBank: LT158488) и *PjGAPDH* (GenBank: LT158489) в еле аянской *P. jezoensis* (табл. 1).

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

| | |
|---|--|
| Для амплификации клонированного участка ДНК в pJET плазмиду | 5'ACTCACTATAGGGAGAGCGGC3' 5'AAGAACATCGATTTTCCATGGC3' |
| Для генов <i>VaSTS1</i> и <i>VaSTS7</i> для бисульфитного секвенирования | 5'TAYTTTGATTTYGAGAAATAGAG3' 5'CTACRCARCACAACARTTTCRAT3' |
| Для анализа уровней транскриптов <i>VaSTS1</i> и <i>VaSTS7</i> в трансгенных растениях <i>Arabidopsis</i> | 5'TAGCATTCCTACAATTACAAAT3' 5'GAGAGACTGGTGATTTTTCGCG3' |
| Для получения полноразмерной кДНК | |
| <i>P. jezoensis</i> <i>PjSTS1</i> , <i>PjSTS2</i> , <i>PjSTS3</i> | 5'ATGTCTGCAGRAATGACTGTTG3' 5'TGGAAGRAGAACGCTCTTAAGA3' |
| <i>V. amurensis</i> <i>VaSTS1</i> и <i>VaSTS7</i> | 5'ATGGCKTCWGTKGAGGAA3' 5'ATTTGTAAYTGTAGGAATG3' |
| Для анализа уровней мРНК экзогенного трансгена | |
| <i>VaSTS1</i> в культуре клеток V2 | 5'CTGTTGTGCTGCATAGCATTC3' 5'GAGAGACTGGTGATTTTTCGCG3' |
| <i>VaSTS7</i> в культуре клеток V2 | 5'GGATTGGGGAGTATTATTTGG3' 5'GAGAGACTGGTGATTTTTCGCG3' |
| Для анализа уровня экспрессии генов | |
| <i>AtActin</i> | 5'GATTCAGATGCCCAGAAGTC3' 5'TACCGTACAGATCCTTCCTG3' |
| <i>AtGapdh</i> | 5'TTGGTGACAACAGGTCAAGCA3' 5'AAACTTGTCGCTCAATGCAAT3' |
| <i>VaActin</i> | 5'GTATTGTGCTGGATTCTGGTGAT3' 5'AGCAAGGTCAAGACGAAGGATAG3' |
| <i>VaGapdh</i> | 5'CACTGAAGATGATGTTGTTTCC3' 5'GCTATTCCAGCCTTGGCAT3' |
| <i>PjSTS1a</i> | 5'CGGAGCCGACTGTGAGC3' 5'GATTTCACTGCAGACGACCAA3' |
| <i>PjSTS1b</i> | 5'CGGAGCCGACTGTGAGG3' 5'GATTTCACTGCAGACGACCAG3' |
| <i>PjSTS2</i> | 5'TACTGAAGGAGAATCCCAATC3' 5'TCCCAGCCGGGGCACTG3' |
| <i>PjSTS3</i> | 5'GTACCATCCCTGGACGC3' |

| | |
|---|--|
| | 5'GTAATCTTAGACTTCGGCTGT3' |
| <i>PjActin</i> | 5'CTGGTATTGTGCTAGATTCTG3' 5'TCCTGTTCATAGTCCAGTGC3' |
| <i>PjGapdh</i> | 5'CTGATGAAGATGTCGTCTCG3' 5'AGTCCACCACTCGGTTGCTG3' |
| Для создания конструкций для трансформации растительных клеток генами | |
| <i>VaSTS1</i> и <i>VaSTS7</i> | 5'GCTCGAGCTCATGGCKTCWGTKGAGGAA3' 5'TCGAGGATCCATTTGTAAYTGTAGGAATGA3' |
| <i>PjSTS1, 2, 3</i> | 5'GCTCAGATCTATGTCTGCAGGAATGACTGT3' 5'TCGAAAGCTTTTATGGAAGAAGAACGCTCT3' |

2.6. Получение трансгенных клеток *V. amurensis* и растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены винограда *VaSTS1*, *VaSTS17* и ели *PjSTS1*, *PjSTS2*, *PjSTS3*

Для агробактериальной трансформации использовали бинарную векторную систему (Рис. 2) на основе плазмид pSAT1 и pZP (Tzfira et al., 2005). Штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 использовали для получения трансгенных линий растений *A. thaliana* и клеток винограда *V. amurensis*, который содержал бинарный вектор с генами *STS* и *nptII*. Бинарный вектор состоял из двух бактериальных плазмид, одна из которых «хелпер» – несет *vir* гены, кодирующие белки, ответственные за перенос т-ДНК (pMP90), вторая плазмида содержала т-ДНК (pZP). Ген *nptII* – ген устойчивости к антибиотику Km. Km – антибиотик, который связывается с одной из субъединиц рибосомы и препятствует синтезу белков. Ген *nptII* кодирует фермент неомецин-фосфотрансферазу, которая переносит остаток фосфорной кислоты на Km и, тем самым, препятствует связыванию Km с субъединицей рибосомы, в связи с чем, трансляция белков продолжается. Поэтому ген *nptII* активно используют в молекулярной биологии растений как селективный маркер для отбора трансгенных клеток.

В используемом бинарном векторе гены *STS* и *nptII* были под контролем двойного CaMV 35S промотора (Рис. 2). Двойной промотор CaMV 35S – это промотор из вирусной мозаики цветной капусты (необходим для обеспечения постоянной сверхэкспрессии генов *STS* и *nptII*).

Для создания конструкций для трансформации растительных клеток, полноразмерные кДНК вариантов транскриптов *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров, представленных в [таблице 1](#). Прямой праймер содержал сайт рестрикции *SacI*, а обратный – *BamHI*. Для создания конструкций с использованием генов *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3*, кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров, представленных в [таблице 1](#). Прямой праймер содержал сайт рестрикции *BglII*, а обратный – *HindIII*.

Полноразмерные кДНК генов *VaSTS1* и *VaSTS7* были клонированы в промежуточный вектор pSAT1 ([Tzfira et al., 2005](#)) по сайтам *SacI* и *BamHI*, *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3* по сайтам *BglII* и *HindIII*. Затем экспрессионные кассеты из pSAT1a клонировали в вектор pZP-RCS2-*nptII* по сайтам *PstI* и *AluI*. Конструкция pZP-RCS2-*nptII* также несла ген *nptII* под контролем двойного промотора 35S CaMV. Все гены *STS* в полученных плазмидах секвенировали с использованием праймеров, описанных выше ([таблица 1](#)).

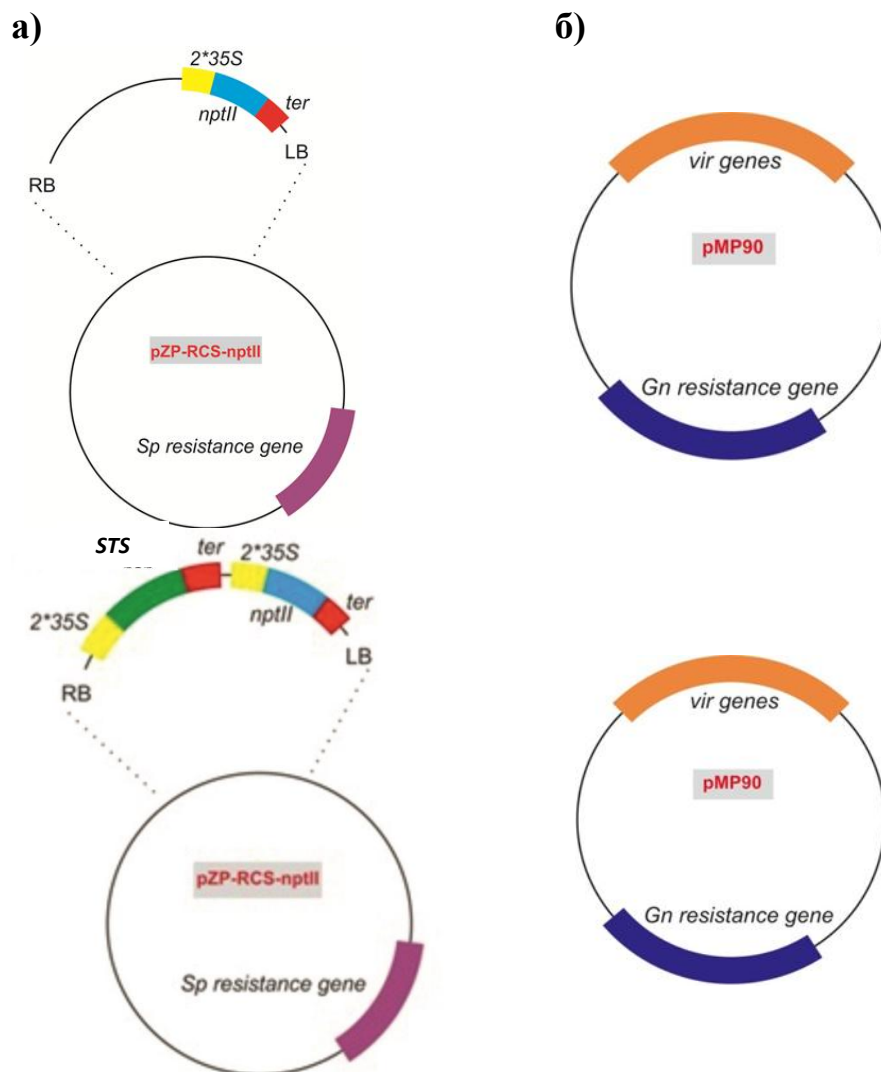


Рисунок 2 – Векторы для агробактериальной трансформации. Бинарный вектор для получения контрольных линий культур клеток и растений KA0 (а), бинарный вектор для получения культур клеток и растений, сверхэкспрессирующих гены *STS* (б). В состав векторов входит плаزمида *pZP-RCS-nptII*, содержащая *RB* и *LB* – правая и левая граница т-ДНК, *2*35S* – двойной конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты, *nptII* – ген неомицин-фосфотрансферазы, *ter* – терминатор, *Sp resistance gene* – ген устойчивости к спектиномицину; плазмида *pMP90*, содержащая *vir* гены и ген устойчивости к гентамицину (*Gn resistance gene*). Гены *STS* переносили в состав т-ДНК плазмиды

Трансгенные линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие гены *VaSTS1* и *VaSTS7* были получены методом цветочного погружения, как описано ранее (Dubrovina et al., 2015). Для трансформации *A. thaliana*, полученный штамм агробактерий инокулировали в жидкую среду LB, содержащую необходимые антибиотики. Агробактерии культивировали на

шейкере в течение 12 часов при температуре +28 °С, 150 об/мин. Затем суспензию агробактерий центрифугировали при 4600 об/мин (Центрифуга 5424 R, Eppendorf, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сливали большую часть супернатанта и ресуспендировали осадок агробактерий в 1 мл 5 % раствора сахарозы с 0.07 % Tween-20 (в данном случае Tween-20 использовали в качестве поверхностно активного вещества). Используя полученный раствор, далее производилась обработка нераскрывшихся соцветий *A. thaliana*, путем погружения бутонов в пробирку с раствором агробактерий на 30 секунд или нанесением суспензии на соцветия с помощью пипетки.

Растения, непосредственно обработанные агробактериями, обозначали – T_0 . Наследование трансгена у *A. thaliana* происходит в соответствии с законом Менделя (расщепление при моногибридном скрещивании в первом поколении дало 25 % нетрансгенных, 25 % гомозиготных, и 50% гетерозиготных по введенному трансгену семян) (Рис. 3). Сбор семян от растений T_0 (семена T_1) осуществляли через 2 месяца, когда стручки приобретали жёлтый цвет.

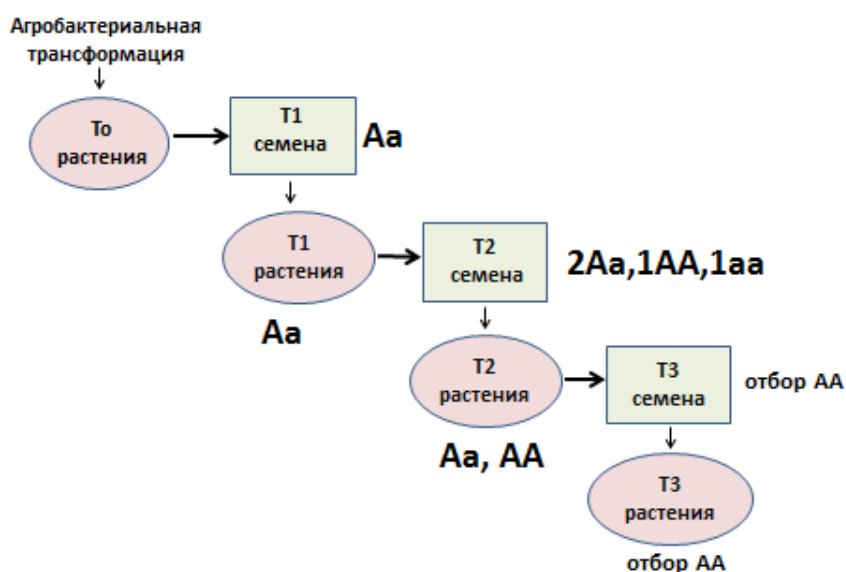


Рисунок 3 – Схема получения и отбора гомозиготных по введенному трансгену растений *A. thaliana*.

После сбора семена *A. thaliana* находились в течение двух недель при комнатной температуре для дозревания и высыхания. После чего полученные семена T_1 высевали на среду MS с 50% содержанием макро/микросолей, хелатов и сахарозы. Для отбора трансгенных растений после автоклавирования был добавлен Km в концентрации 50 мг/л. Трансгенные растения имели более темную, зеленую окраску и более длинный, крупный корень (Рис. 4). Для предотвращения микробного инфицирования, перед высевом на чашки Петри полученные семена были стерилизованы, для этого семена T_1 в были помещены в эксикатор с парами хлора на 30 минут. Источником паров хлора был раствор, содержащий 100 мл гипохлорита натрия и 3 мл концентрированной соляной кислоты.



Рисунок 4 – Селекция семян T_1 гетерозиготных по введенному трансгену.

Проростки T_1 культивировали на чашках Петри с Km в течение одной недели (растения T_1). Затем растения T_1 высаживали в грунт и определяли трансгенность методом ПЦР, а через полтора месяца собирали семена T_2 . Семена T_2 высевали на чашки Петри со средой MS, содержащей Km. Проросшие семена T_2 (растения T_2) высаживали в грунт, а через полтора месяца собирали семена T_3 . T_3 семена высевали на чашки Петри со средой MS, содержащей Km. Далее растения T_3 , гомозиготные по введенному трансгену, переносили в грунт (рис. 4).

Таким образом, используя селекцию на Km, был произведен отбор гомозиготных по введенному гену растений *A. thaliana* T₃ (гомозиготы были идентифицированы в третьем поколении растений, полученных от трансформированных растений T₀).

Для получения трансгенных культур клеток винограда *V. amurensis* суспензионную культуру клеток V2 обрабатывали соответствующими штаммами агробактерий *A. tumefaciens*. После 2-3 дней совместного культивирования бактериальных клеток с клетками винограда добавляли цефотаксима (Cf, 250 мг/л), для избавления от агробактерий. После трансформации клетки винограда *V. amurensis* культивировали в течение 4 месяцев в присутствии 10-15 мг/л Km для отбора трансгенных клеток и Cf для подавления бактерий.

2.7. Воздействие абиотических стрессов на растения *A. thaliana* и *V. amurensis*

Для изучения устойчивости растений *A. thaliana* к абиотическим стрессам растения выращивали в горшках в климатических камерах (КС-200 СПУ, Смоленск, Россия) при температуре +22°C, 16 ч день/8 ч ночь, освещенность ~100 мкмоль м⁻²с⁻¹. Абиотические стрессы индуцировали, используя 4х-недельные растения, которые представляли собой оформленную розетку с 8-10 листьями. Перед началом проведения экспериментов, производился подсчет растений и фотографирование.

Для имитации высокотемпературного стресса, растения помещались в термостат (ES-20/60 BioSan, Рига, Латвия), при температуре + 45°C в течение 2 ч, после чего, растения еще неделю акклиматизировались в климатической камере.

Для имитации засухи растения не поливали в течение 4.5-5 недель после высадки в грунт. После обнаружения видимого эффекта высыхания, растения поливали водой.

Низкотемпературный стресс был индуцирован температурой -10°C в морозильной камере в течение 1.5 ч. После чего растения перемещались в холодильную камеру с температурой $+4^{\circ}\text{C}$ на 1 ч, для избежания влияния резкого перепада температур.

Солевой стресс индуцировали с помощью однократного полива растений раствором NaCl в концентрации 350 мМ до полного пропитывания земли, и спустя неделю проводили высаливание путем выравнивания осмотического баланса с фильтрованной водой.

Для имитации УФ стресса, растения облучали УФ-С или УФ-В, как описано ранее (Tyunin et al., 2016). Обработку УФ-С (254 нм) или УФ-В (312 нм) проводили в темноте в течение 10 мин, установив УФ-излучатель на 15 см выше горшков. Использовали УФ-лампу VL-215.МС компании Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, Франция). В соответствии с данными производителя, была использована интенсивность облучения $1800\text{ }\mu\text{W cm}^{-2}$ (для УФ-В) или $930\text{ }\mu\text{W cm}^{-2}$ (для УФ-С).

Эффект воздействия тестируемых абиотических стрессовых факторов определяли путем подсчета живых растений через 7 дней после воздействия стрессовых факторов. Эффект воздействия УФ излучения определяли путем подсчета зеленых листьев через 7 дней после воздействия стресса.

Черенки *P. jezoensis* были размещены в индивидуальных стаканах с 50 мл жидкой среды W_0 без фитогормонов в течение 24 ч. Черенки ели выращивали при фотопериоде 11 ч свет / 13 ч темнота: интенсивность света $\sim 100\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ при температуре $+12^{\circ}\text{C}$ в светлый период суток и $+9^{\circ}\text{C}$ в темный. Этанольные растворы кумаровой (CA) и кофейной кислот (CaA) (Sigma, St. Louis, USA) добавляли к автоклавированной среде W_0 в асептических условиях.

Черенки *V. amurensis* были размещены в индивидуальных стаканах с 50 мл жидкой среды W_0 (Dubrovina et al., 2016) без фитогормонов в течение 24 ч. Черенки *V. amurensis* выращивали в условиях 11/13 ч фотопериод свет / темнота: интенсивность света $\sim 70\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ при температуре $+11^{\circ}\text{C}$ в

светлый период суток и +8 °С в темный. Обработка УФ-С проводилась один раз в течение 20 минут, при длине волны 254 нм, в темноте, как описано (Kiselev et al., 2017). Этанольные растворы СА добавляли к стерилизованной среде W_0 в асептических условиях.

2.8. Анализ содержания вторичных метаболитов

Высушенные, порошкообразные образцы культуры клеток винограда и трансгенных растений *A. thaliana* (100 мг) экстрагировали 95 % этанолом (2 мл) в течение 2 ч при 60 °С, затем очищали с помощью нейлоновых шприц-фильтров OlimPeak, размер пор 0.45 мкм, диаметр 13 мм («Teknokroma», Испания), и далее использовали для анализа ВЭЖХ. Измерение для каждого образца повторяли 3 раза.

Идентификацию и количественную оценку всех стильбенов проводили с использованием аналитической системы ВЭЖХ LC-20AD XR («Shimadzu», Япония) и коммерчески доступных стандартов. Данные ВЭЖХ с диодно-матричной детекцией были записаны в диапазоне 200-500 нм, хроматограммы для количественного определения были получены при 310 нм. Хроматографическое разделение проводили на колонке Shimpack GIST C18 (150 мм, 2.1 мм i.d., размер детали 3 мкм, «Shimadzu», Япония). Экстракты из культур клеток разделяли с использованием 0.1%-ной муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила (В) в качестве подвижных фаз, со следующим профилем элюирования: от 0 до 35 мин 0 % В; от 35 до 40 мин, 40 % В; от 40 до 50 мин, 50% В; от 50 до 65 мин 100% В. Экстракт образца (3 мкл) вводили при постоянной температуре колонки 40°С, и скорости потока, поддерживаемой на уровне 0.2 мл/мин.

Содержание стильбенов определяли с помощью внешних стандартов с использованием калибровочных кривых пятиточечной регрессии, построенных с использованием доступных стандартов. Аналитические стандарты *транс*-ресвератрол, *транс*-пицеид, *транс*-пицеатаннол – фирмы «Sigma-Aldrich» (США), *дельта*-виниферин - фирмы «Panreac AppliChem»

(Германия). *Цис*-изомеры резвератрола и пицеида были получены под воздействием солнечного света соответствующего стандартного раствора, содержащего *транс*-изомер, как сообщалось ранее [Aleynova et al., 2016](#).

2.9. Обработка растений *A. thaliana* растворами предшественников фенольных соединений и стильбенами

Для изучения устойчивости растений *A. thaliana* к УФ, растения выращивали в горшках в климатических камерах (КС-200 СПУ, Смоленск, Россия) при температуре +22 °C, 16 ч день / 8 ч ночь.

Растения *A. thaliana* были обработаны растворами стильбенов – *транс*-резвератролом и *транс*-пицеидом в концентрации 1 mM и 5 mM. Так же обрабатывали растения предшественниками фенольных соединений растений: СА и *транс*-коричной (CiA) кислоты в концентрации 1 mM и 5 mM. В качестве негативного контроля были использованы растения *A. thaliana*, обработанные водой. Для проверки наблюдаемых эффектов, растения были обработаны октокриленом – веществом, которое используется в качестве ингредиента в разнообразных солнцезащитных продуктах. Октокрилен (2-этилгексил-2-циано-3,3-дифенил-2-пропеноат; 2-этилгексил-2-циано-3,3-дифенилакрилат или 2-этилгексиловый эфир 2-циано-3,3-дифенилакриловой кислоты) нейтрализует УФ излучение в наиболее повреждающем диапазоне (приблизительно 280-300 нм), демонстрируя пики наиболее активной адсорбции на протяжении длины волны 280 и 295 нм ([Berardesca et al., 2019](#)).

УФ стресс индуцировали, как описано у [Tyunin et al., 2016](#), используя 4х-недельные растения. Обработку УФ-С (254 нм) проводили в темноте в течение 10 мин, установив УФ-излучатель на 15 см выше горшков. Использовали УФ-лампу VL-215.MC компании Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, Франция). В соответствии с данными производителя, мы использовали интенсивность облучения 930 $\mu\text{W cm}^{-2}$ (для УФ-С) и 1800 $\mu\text{W cm}^{-2}$ (для УФ-В). Эффект воздействия ультрафиолетового излучения

определяли путем подсчета зеленых листьев через 7 дней после воздействия стресса.

2.10. Статистическая обработка полученных результатов

Результаты были обработаны при помощи программы Statistica, версия 10.0. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента, для попарных сравнений и критерию Тьюки с использованием ANOVA для выполнения множественных сравнений групповых значений. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Биосинтез стильбенов в растениях *V. amurensis* и *P. jezoensis* при обработке кумаровой и кофейной кислотами после облучения УФ-С

Собранные ветви ели были поделены на четыре черенка длиной 10 см и использовали для последующей обработки (рис. 5). Черенки содержали молодые светло-зеленые хвоинки (рис. 5). Обработка УФ-С приводила к гибели молодых хвоинок через 24 часа после обработки, поэтому количество желтых хвоинок достоверно увеличилось до 95% (УФ-С, рис. 5).

Ранее было показано (Tyunin et al., 2018), что 0.5 мМ СоА и СаА оказали наибольшее влияние на содержание *транс*-резвератрола в культурах клеток винограда, поэтому в данной работе использовали растворы предложенных выше концентрациях. Было показано, что обработка СА предотвращала этот эффект, снижая количество желтых хвоинок после УФ-С облучения черенков, обработанных СА. Количество желтых хвоинок у черенков, обработанных УФ-С и СоА, существенно не отличалось от количества желтых хвоинок, инкубированных в контрольных условиях (УФ-С + СоА, рис. 5). Добавление СаА снизило количество желтых хвоинок до 85% (УФ-С + СаА, рис. 5), но это значение существенно не отличалось от уровня желтых хвоинок после облучения УФ-С (рис. 5).

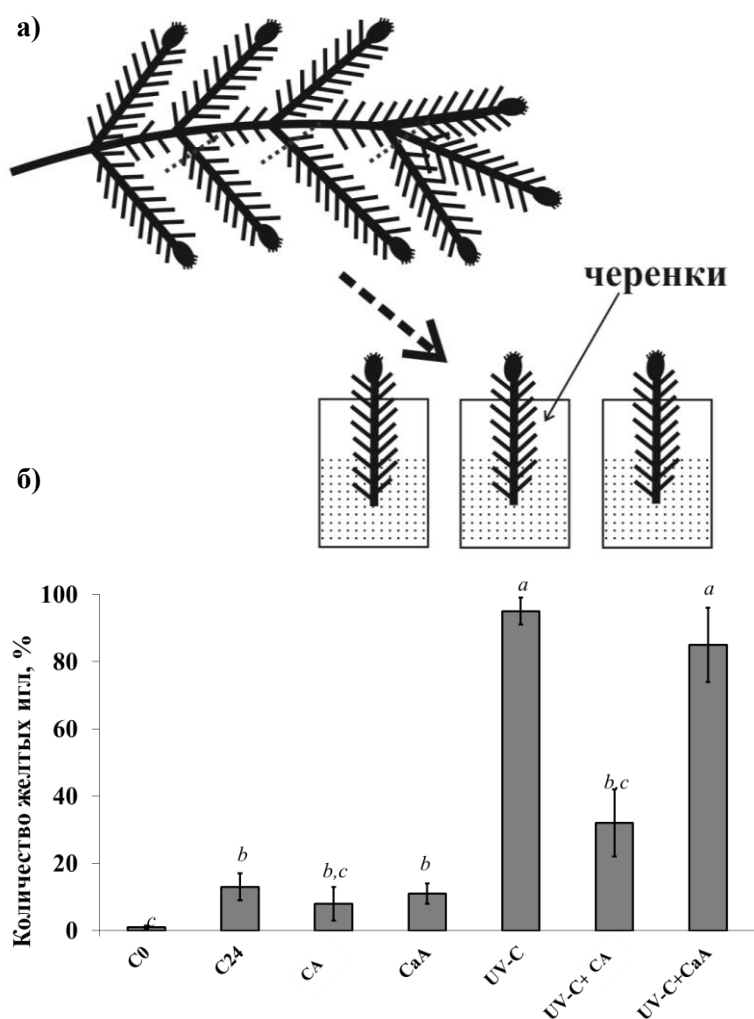


Рисунок 5 – Обработка черенков *Picea jezoensis* УФ-С, пара-кумаровой кислотой (СА) и кофейной кислотой (СаА). Схема эксперимента (а). Жизнеспособность черенков *P. jezoensis* через 24 часа после обработки СА, СаА и УФ-С (б). C0 – количество желтых хвоинок до эксперимента; C-24 – количество желтых хвоинок у черенков, спустя 24 часа в 11/13 часовом фотоцикле, культивируемых в стакане с 50 мл жидкой среды Мурасиге и Скуга (MS). СА – добавляли 0.5 мМ СА; СаА – добавляли 0.5 мМ СаА; УФ-С – черенки сразу обрабатывали УФ-С в течение 10 мин, как описано (Kiselev et al., 2017); УФ-С+СаА – сразу добавляли 0.5 мМ СА и обрабатывали УФ-С; УФ-С+СаА – сразу добавляли 0.5 мМ СаА и обрабатывали УФ-С. Средние значения на каждом графике, за которыми следует одна и та же буква, не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки.

Затем были проанализированы содержание и состав стильбенов в годовалой хвое дерева *P. jezoensis*. В данной работе было проанализировано содержание шести стильбенов: включая *транс*-астрингин, *транс*-пицеид,

цис-астрингин, *транс*-изорапонтин, *транс*-пицеатаннол и *цис*-пицеид (табл. 2). Ранее нами было показано, что хвоя *P. jezoensis* помимо шести проанализированных в данной работе стильбенов, содержит еще три стильбена: *цис*-изорапонтин, *транс*-резвератрол и *транс*-изорапонтигенин (Kiselev et al., 2016a). Дополнительные три стильбена присутствовали в небольших количествах: *цис*-изорапонтин (0.01-0.03 мг/г сухого веса); *транс*-резвератрол (0.04-0.1 мкг/г сухого веса); *транс*-изорапонтигенин (0.12-0.31 мкг/г сухого веса) (Kiselev et al., 2016a). В настоящем исследовании также были обнаружены эти стильбены, но в следовых количествах (Kiselev et al., 2019a).

Таблица 2. Содержание стильбенов в хвое *P. jezoensis* без обработки и после обработки УФ-С, СА и СаА

| | C0 | C24 | СА | СаА | УФ-С | УФ-С + СА | УФ-С + СаА |
|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>транс</i> -астрингин, мг/г | 5.26 ± 0.45 ^d | 5.26 ± 0.32 ^d | 6.87 ± 0.13 ^{b,c} | 6.17 ± 0.23 ^{c,d} | 5.74 ± 0.30 ^d | 7.58 ± 0.24 ^a | 5.93 ± 0.16 ^d |
| <i>транс</i> -пицеид, мг/г | 0.17 ± 0.04 ^a | 0.17 ± 0.07 ^a | 0.24 ± 0.02 ^a | 0.22 ± 0.02 ^a | 0.21 ± 0.03 ^a | 0.25 ± 0.07 ^a | 0.20 ± 0.06 ^a |
| <i>цис</i> -астрингин, мг/г | 0.83 ± 0.06 ^b | 0.87 ± 0.07 ^b | 0.83 ± 0.03 ^b | 1.11 ± 0.11 ^a | 0.83 ± 0.05 ^b | 0.83 ± 0.09 ^b | 0.88 ± 0.10 ^{a,b} |
| <i>транс</i> -изорапонтин, мг/г | 0.25 ± 0.03 ^b | 0.26 ± 0.03 ^b | 0.35 ± 0.05 ^{a,b} | 0.28 ± 0.03 ^b | 0.26 ± 0.04 ^b | 0.38 ± 0.06 ^a | 0.34 ± 0.08 ^{a,b} |
| <i>транс</i> -пицеатаннол, мг/г | 0.09 ± 0.02 ^a | 0.09 ± 0.02 ^a | 0.14 ± 0.02 ^a | 0.11 ± 0.02 ^a | 0.13 ± 0.02 ^a | 0.13 ± 0.04 ^a | 0.11 ± 0.03 ^a |
| <i>цис</i> -пицеид, мг/г | 0.01 ± 0.01 ^a | 0.01 ± 0.01 ^a | 0.02 ± 0.01 ^a | 0.02 ± 0.01 ^a | 0.01 ± 0.01 ^a | 0.01 ± 0.01 ^a | 0.02 ± 0.01 ^a |
| Общее содержание стильбенов | 6.61 ± 0.56 ^d | 6.65 ± 0.42 ^d | 8.44 ± 0.29 ^{b,c} | 7.89 ± 0.28 ^{c,d} | 7.17 ± 0.35 ^{c,d} | 9.18 ± 0.26 ^a | 7.48 ± 0.19 ^{c,d} |

Примечание. C0, C24 – хвоя без обработки; УФ-С – хвоя после обработки ультрафиолетом С; СА – хвоя после обработки р-кумаровой кислотой; СаА – хвоя после обработки кофейной кислотой; УФ-С+СА – хвоя после обработки УФ-С и СА; УФ-С+СаА – хвоя после обработки УФ-С и СаА. Стильбены из использованных образцов были экстрагированы через 24 ч после обработки, кроме C0 (до обработки). Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Средние значения на каждом графике, за которыми следует одна и та же буква, не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки.

Полученные данные показали, что культивирование черенков ели в течение 24 ч в индивидуальных стаканах с жидкой питательной средой (образцы С0 и С24) не оказало существенного влияния на содержание стильбенов (табл. 2). Обработка УФ-С незначительно (в 1.1 раза) увеличивала общее содержание стильбенов, а добавление СА и СаА увеличивала общее содержание стильбенов в 1.2–1.3 раза, по сравнению с необработанной хвоей (табл. 2). Статистически значимым увеличение было в образцах, обработанных СА. Наибольшее содержание стильбенов (9.18 ± 0.26 мг/г сухой массы) было обнаружено после обработки УФ-С черенка, к который находился в стакане с раствором СА. УФ обработка и насыщение черенков СаА не оказали существенного влияния на содержание стильбенов (Kiselev et al., 2019a).

Повышение содержания стильбенов после обработки СА было связано с увеличением содержания *транс*-астрингина (1.3-1.4 раза), *транс*-пицеида (1.4-1.5 раза), *транс*-изорапонтина (1.4-1.5 раза), *транс*-пицеатаннола (1.4–1.6 раза) и *цис*-пицеида (2 раза). Таким образом, содержание всех основных стильбенов после обработки СА было повышено в одинаковой степени (табл. 2).

Используя метод ПЦР РВ, были проанализированы уровни транскрипции четырех генов *STS P. jezoensis*: *PjSTS1a*, *PjSTS1b*, *PjSTS2* и *PjSTS3* (Kiselev et al., 2016a). Наибольшая экспрессия *PjSTS1a* была обнаружена в хвое через 1 час после обработки СА, СаА и/или обработки УФ-С (рис. 6 д, г). Уровень экспрессии *STS* во всех образцах вернулся к контрольному значению через 24 часа после обработки, за исключением экспрессии *STS1a* и *STS1b* в образцах СА + УФ. Уровень экспрессии гена *PjSTS1a* был повышен через 24 часа после обработки по сравнению с необработанной хвоей. Только обработка УФ-С в сочетании с применением СА оказала значительное влияние на экспрессию *PjSTS1b* (рис. 6 е). Обработка СА, СаА и УФ-С не оказывала влияния на уровень транскрипции *PjSTS2* и *PjSTS3* (рис. 6). СаА вместе с УФ-С увеличивал экспрессию гена

PjSTS3 в 2.3–2.6 раза через 24 ч после обработки (рис. 6 г), но эта активация не коррелировала с увеличением содержания стильбенов (Kiselev et al., 2019a).

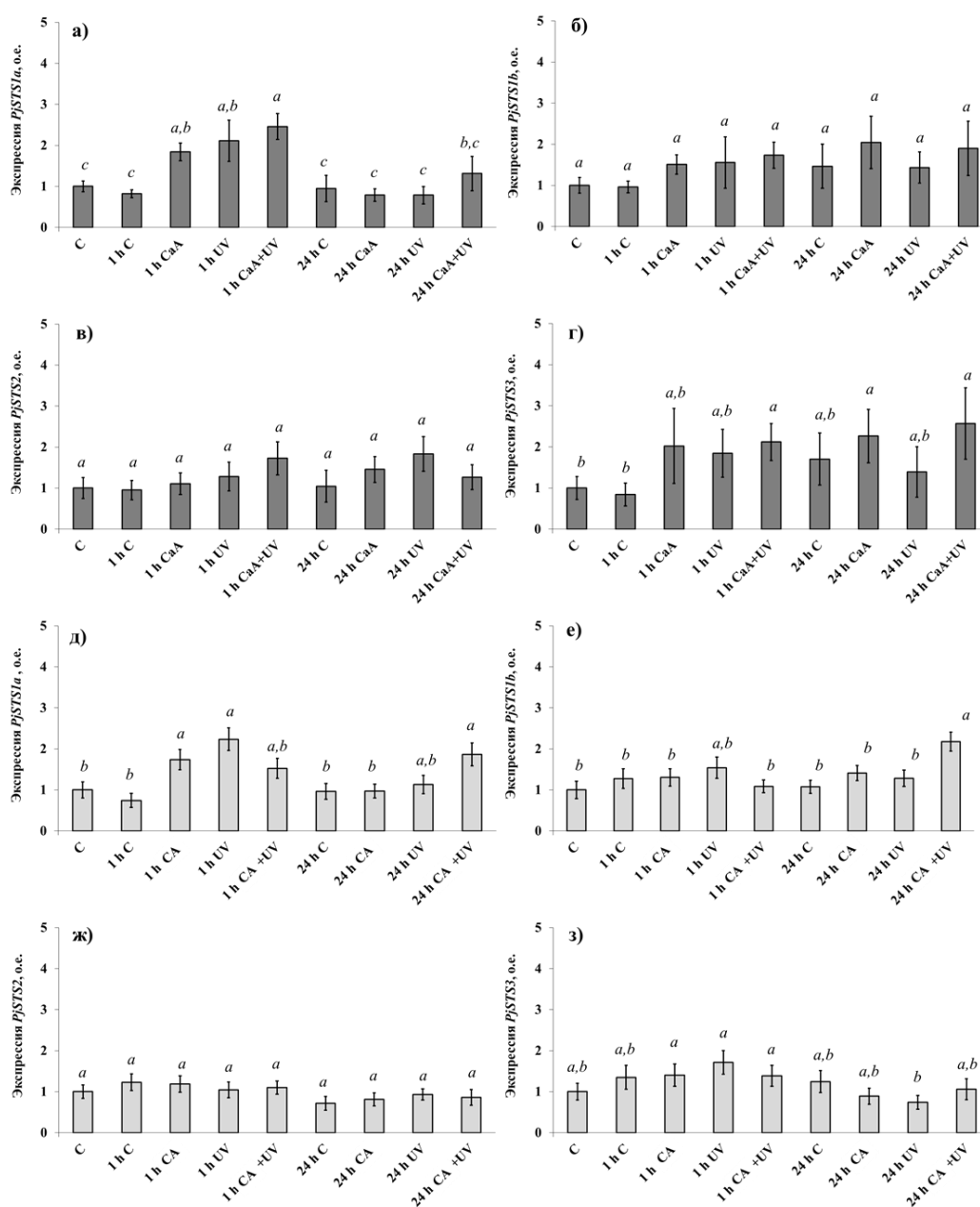


Рисунок 6 – Уровень транскрипции *PjSTS* в годовалой хвое *P. jezoensis* после обработки кофейной кислотой CaA: *PjSTS1a* (а); *PjSTS1b* (б); *PjSTS2* (в); *PjSTS3* (г) и кумаровой кислотой CA: *PjSTS1a* (д); *PjSTS1b* (е); *PjSTS2* (ж); *PjSTS3* (з) с/без облучения ультрафиолетом-С (UV-C). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Средние значения на каждом графике, за которыми следует одна и та же буква, не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки.

P. jezoensis обладает постоянной высокой экспрессией генов стильбен синтаз и биосинтезом стильбенов, в тоже время *V. amurensis* произрастающий в точно таких же экстремальных климатических условиях обладает индуцированной экспрессией стильбен синтаз и качественный и количественный состав стильбенов варьируется в зависимости от времени года и воздействия стресса. Поэтому следующим шагом в данной работе было определить как обработка ультрафиолетом и предшественниками стильбенов влияет на биосинтез стильбенов в *V. amurensis*.

Молодые побеги *V. amurensis* были собраны в октябре 2016 г. и разделены на молодые стебли длиной 7–8 см с одним здоровым листом, и эти черенки использовались для обработки УФ-С. Жизнеспособность черенков определяли через 24 ч после начала эксперимента. Черенки с нормальным зеленым эластичным фенотипом листьев считались «жизнеспособными», а с желто-зелеными увядшими листьями - «нежизнеспособными». На [рисунке 7а](#) представлен процент черенков с жизнеспособными листьями от всех черенков. Всего опыты по оценке жизнеспособности листьев повторяли 12 раз.

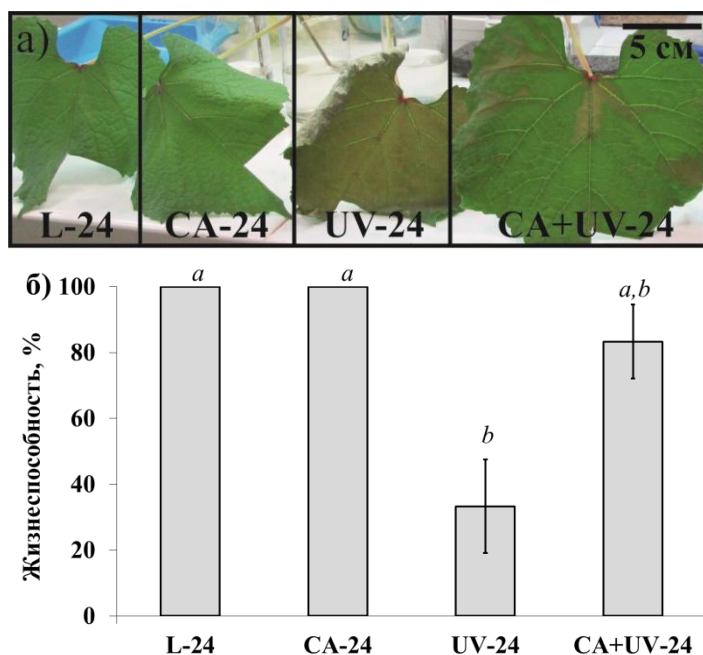


Рисунок 7 – Жизнеспособность черенков *V. amurensis* представлена в виде фотографии (а) и гистограммы (б) через 24 часа после обработки кумаровой кислотой (CA) и/или UV-С. L-24 – 24 часа в жидкой питательной среде W0; CA-24 – 24 часа с 0.5 mM CA; UV-24 – 20

мин с UV-C; UV+CA-24 – 0.5 mM CA и UV-C в течение 20 мин. Средние значения на каждом графике, за которым следует одна и та же буква, не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки.

Воздействие УФ-С более 20 минут привело к гибели листьев *V. amurensis* через 24 часа после обработки. Было протестировано более короткое время облучения УФ-С, но не было явного влияния на жизнеспособность (все листья были живыми). Поэтому листья виноградной лозы облучали УФ-С в течение 20 мин (рис. 7). Данные показали, что только 33.3% листьев *V. amurensis* оставались жизнеспособными через 24 часа после облучения УФ-С, тогда как все листья были жизнеспособными в контрольных условиях или в присутствии СА (рис. 7 а, б). Примечательно, что количество жизнеспособных листьев увеличилось почти вдвое, до 83.3%, после обработки УФ-С в сочетании с обработкой СА (рис. 7 б).

Листья *V. amurensis* с разных секций виноградной лозы содержали примерно одинаковое количество и спектр стильбенов в контрольных условиях. Анализ ранее опубликованных работ (Duan et al., 2015; Xi et al., 2014) показал, что наибольшее влияние на содержание стильбенов наблюдалось через 24 часа после обработки УФ-С. Таким образом, содержание и состав стильбенов были проанализированы через 24 часа после обработки.

В стандартных условиях культивирования мы определили, что листья *V. amurensis* содержат шесть стильбенов (*транс*-, *цис*-пицеид, *транс*-резвератрол, *цис*-ε-виниферин, *транс*-ε- и δ-виниферин), общее содержание стильбенов составляло 0.2 мг/г сухой массы (табл. 3). *Транс*-птеростильбен был обнаружен в очень малых количествах, менее 0.01 мкг/г сухой массы. Кроме того, использованные индукторы биосинтеза стильбенов не влияли на содержание *транс*-птеростильбена (Kiselev et al., 2019b).

Таблица 3. Содержание стильбенов (мг/г сухого веса) в листьях черенков винограда амурского, культивируемых в контрольных условиях, в присутствии кумаровой кислоты (СА) и / или ультрафиолетового (УФ-С) облучения

| | L-24 (контроль) | СА-24 | УФ-24 | УФ + СА- 24 |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <i>транс</i> -пицеид, мг/г | 0.027 ± 0.011 ^c | 0.110 ± 0.049 ^b | 0.234 ± 0.100 ^{a, b} | 0.299 ± 0.096 |
| <i>цис</i> -пицеид, мг/г | 0.061 ± 0.018 ^c | 0.132 ± 0.006 ^a | 0.100 ± 0.005 ^b | 0.120 ± 0.009 ^a |
| <i>транс</i> -Резвератрол, мг/г | 0.040 ± 0.007 ^d | 0.062 ± 0.005 ^c | 0.101 ± 0.015 ^b | 0.137 ± 0.014 ^a |
| <i>цис</i> -ε-виниферин, мг/г | 0.003 ± 0.002 ^b | 0.013 ± 0.011 ^{a, b} | 0.023 ± 0.012 ^a | 0.026 ± 0.015 ^a |
| <i>т</i> -ε-виниферин, мг/г | 0.049 ± 0.009 ^c | 0.127 ± 0.004 ^a | 0.096 ± 0.010 ^{a, b} | 0.078 ± 0.009 ^b |
| <i>т</i> -δ-виниферин, мг/г | 0.021 ± 0.002 ^b | 0.030 ± 0.002 ^a | 0.033 ± 0.005 ^a | 0.031 ± 0.003 ^a |
| <i>транс</i> -птеростильбен, мг/г | - | - | - | - |
| Общее содержание стильбенов | 0.201 ± 0.046 ^b | 0.474 ± 0.077 ^a | 0.587 ± 0.146 ^a | 0.691 ± 0.146 ^a |

Обработка СА увеличивала общее содержание стильбенов в 2.4 раза (табл. 3), это происходило за счет достоверного увеличения содержания *транс*-пицеида (в 4.1 раза), ε-виниферина (в 2.6 раза), *цис*-пицеида (в 2.2 раза), *транс*-резвератрола (в 1.6 раза) и δ-виниферина (в 1.4 раза). После воздействия УФ-С общее содержание стильбенов увеличивалось в 2.9 раза. Это увеличение произошло в основном за счет повышения уровня *транс*-пицеида (в 8.7 раза), *цис*-ε-виниферина (в 7.7 раза), *транс*-резвератрола (в 2.5 раза), ε-виниферина (в 2 раза), *цис*-пицеида (в 1.6 раза) и δ-виниферина (в 1.6 раза). Совместное действие УФ-С облучения и СА сильнее всего повлияло на содержание стильбенов, увеличив в 3.4 раза (табл. 3). Значительное увеличение содержания *транс*-пицеида (в 11.1 раза), *цис*- и ε-виниферина (в 8.7 раза), *транс*-резвератрола (в 3.4 раза), *цис*-пицеида (в 2 раза), ε-виниферина (в 1.6 раза), δ-виниферина (в 1.5 раза) способствовало стимулирующему действию УФ-С в сочетании с СА на содержание стильбенов. Обработка как СА, так и УФ-С не изменила спектр образующихся стильбенов (Kiselev et al., 2019b).

Было показано, что обработка СА и/или УФ-С увеличивала уровень экспрессии *STS* как через 1 час, так и через 24 часа после начала эксперимента (рис. 8). Насыщение СА в сочетании с воздействием УФ-С приводило к наиболее значительной активации уровней транскрипции *STS*. Такая обработка активировала экспрессию девяти генов *VaSTS* (*VaSTS1-9*) в 1.8–7 раз по сравнению с L-1 и L-24 (рис. 8 а, б). При насыщении СА экспрессия *VaSTS5* и *VaSTS6* значительно повышалась по сравнению с необработанными листьями (24 ч, рис. 8 а, б). Так же наблюдалось увеличение экспрессии *VaSTS3*, 5 и 9 через 1 ч после воздействия УФ-С (рис. 8 а, б) и в экспрессии *VaSTS1*, 2, 4, 5 и 7 через 24 ч после облучения УФ-С (Kiselev et al., 2019b; рис. 8 а, б).

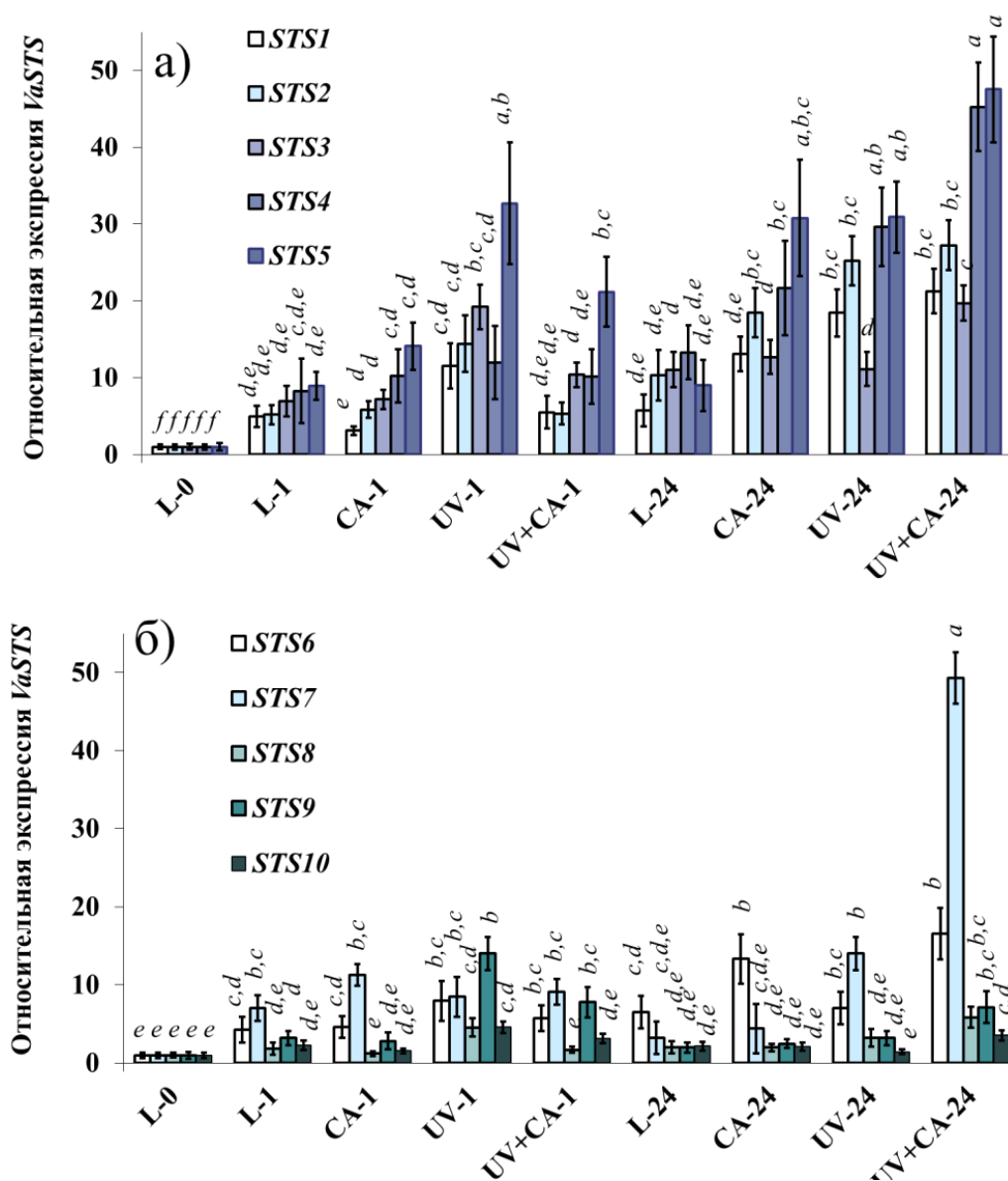


Рисунок 8 – Анализ экспрессии генов биосинтеза стильбенов в листьях *Vitis amurensis* с использованием ПЦР РВ. Уровни транскрипции стильбенсинтаз *STS1-5* (**а**); уровни транскрипции генов *STS6-10* (**б**). L-0 – РНК экстрагировали сразу после разделения лианы виноградной лозы на черенки; L-1 – 1 час в контрольных условиях; CA-1 – 1 час в присутствии 0,5 мМ СА; UV-1 – 1 час после УФ-С в течение 20 минут; UV+CA-1 – через 1 час после обработки УФ-С и СА (УФ-С 20 минут; 0.5 мМ СА в течение 1 часа); L-24 – 24 часа в контрольных условиях; CA-24 – 24 часа в присутствии 0,5 мМ СА; UV-24 – 24 часа после УФ-С в течение 20 минут; UV+CA-24 – 24 часа после обработки УФ-С и СА (УФ-С 20 мин; 0.5 мМ СА в течение 24 ч). Средние значения на каждом графике, за которым следует одна и та же буква, не различались при использовании ANOVA с попарными сравнениями Тьюки.

3.2. Получение *STS*-трансгенных культур клеток винограда *V. amurensis* и растений *A. thaliana*

В предыдущей главе было показано, что в диком винограде *V. amurensis*, который является близким видом к *V. vinifera*, экспрессируется 10 генов *VaSTS*. Гены *VaSTS* кодируют белки, которые различаются друг от друга аминокислотными последовательностями, и уровнем экспрессии в каллусах винограда *V. amurensis* (Dubrovina et al., 2010; Kiselev et al., 2012). Ранее было показано, что сверхэкспрессия различных генов *STS* *V. amurensis*, а именно *VaSTS1* и *VaSTS7*, увеличивает продукцию стильбенов в культуре клеток *V. amurensis* (Aleynova et al., 2016). Сверхэкспрессия *VaSTS1* и *VaSTS7* увеличила общее содержание стильбенов до 3.5 раз (до 0.6 мг/г сухого веса) по сравнению с контрольной линией клеток КА0.

В продолжение вышеперечисленных исследований, следующим шагом был поиск корреляций между экспрессией генов *VaSTS1* и *VaSTS7* и продукцией резвератрола, а также защитных реакций на абиотические стрессы растений, которые в норме не содержат гены *STS*. Для этого нами были получены гомозиготные по введенным трансгенам (*VaSTS1* и *VaSTS7*) растения *A. thaliana*. Всего было получено по три трансгенные линии

растений *A. thaliana*, которые сверхэкспрессировали ген *VaSTS1* (линии ST1) и ген *VaSTS7* (линии ST7). Кроме того, была получена контрольная линия КА-0, трансформированная «пустым» вектором – вектор содержал только ген *nptII*, ответственный за устойчивость к Km. Все линии были получены в результате независимых трансформаций. Далее была проанализирована экспрессия перенесенных трансгенов *VaSTS1* и *VaSTS7*. В данной работе были использованы одни и те же праймеры для анализа транскрипции генов *VaSTS1* и *VaSTS7*, и, было произведено сравнение экспрессии генов между исследуемыми линиями и трансгенными растениями *A. thaliana* КА0 (рис. 9).

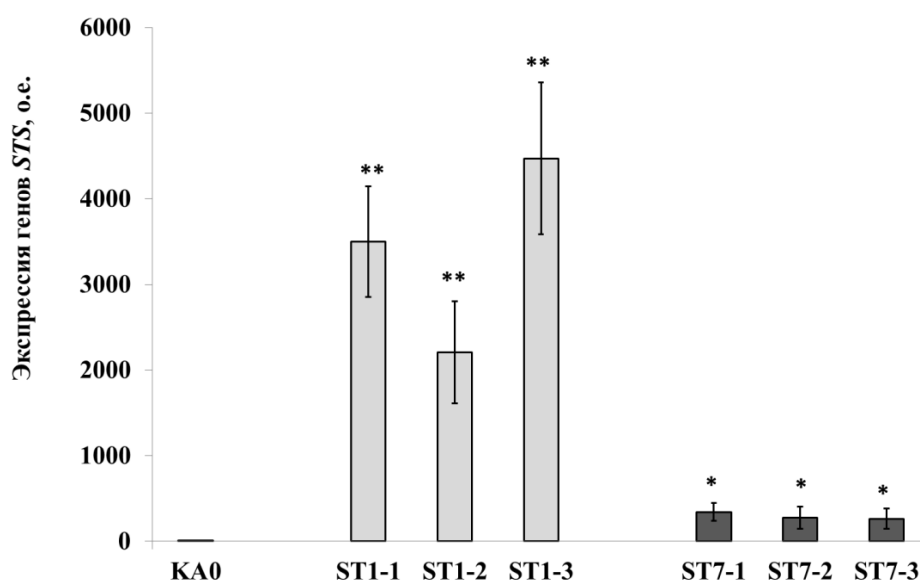


Рисунок 9 – Количественная оценка экспрессии генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в трансгенных растениях *A. thaliana*. КА0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1, 2 или 3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; ST7-1, 2 или 3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7*. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка ($n = 8$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ в зависимости от значения флуоресценции у растений КА0 (парный t -критерий Стьюдента).

У всех трансгенных растений уровень экспрессии гена *VaSTS* был значительно выше по сравнению с фоновым значением в контрольных растениях *A. thaliana* КА0 (рис. 9). Таким образом, все *VaSTS*-трансгенные растения *A. thaliana* экспрессировали гены *VaSTS*. Более того, было показано,

что экспрессия гена *VaSTS1* во всех линиях ST1 была в 6.5–13.3 раза выше, чем уровень транскрипции гена *VaSTS7* во всех линиях ST7 (рис. 9). Эти результаты были неожиданными, поскольку гены *VaSTS1* и *VaSTS7* находятся под контролем одного и того же сильного конститутивного промотора вируса мозаики цветной капусты 35S и, следовательно, должны иметь примерно одинаковый уровень экспрессии (Ogneva et al., 2021a).

Известно, что трансгены в растениях подавляются с помощью цитозинового метилирования ДНК (Rajeevkumar et al., 2015). Возможно, в нашем случае последовательности генов *VaSTS1* и *VaSTS7* подвергались разным уровням метилирования. Поэтому в данной работе был проанализирован уровень метилирования цитозина последовательности генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в линиях ST1-1 и ST7-1, используя бисульфитное секвенирование (Rajeevkumar et al., 2015). Было показано, что уровень цитозинового метилирования 3'-конца белок-кодирующей области гена *VaSTS1* у линии ST1-1 составляет $33.3 \pm 9.0\%$, а метилирование гена *VaSTS7* у линии ST7-1 – в 2.1 раза выше ($70.1 \pm 9.4\%$, рис. 10a). Таким образом, ген *VaSTS7* был гиперметилирован и это, возможно, является основной причиной низкой экспрессии гена *VaSTS7* в трансгенных линиях ST7 (Ogneva et al., 2021a).

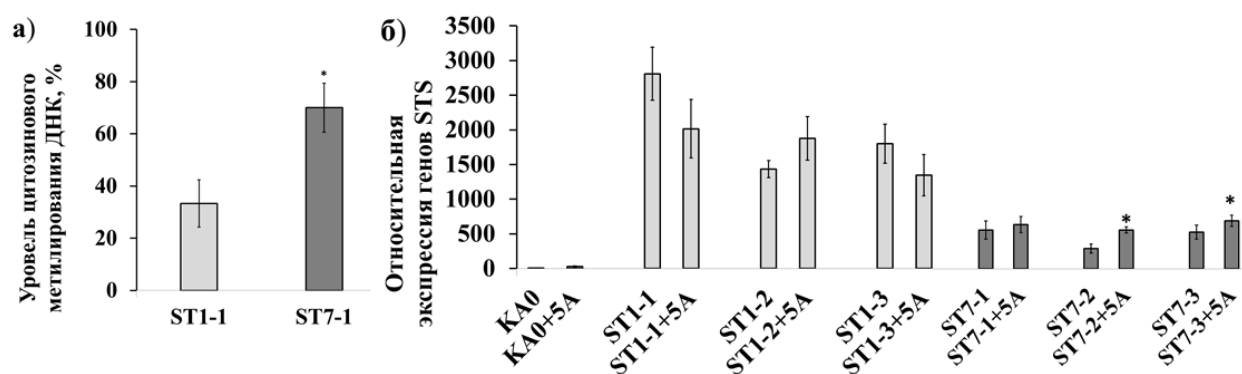


Рисунок 10 – Количественная оценка метилирования *VaSTS*-трансгенных растений *A. thaliana* (а) и влияние обработки 5-азациитидином (5A) на экспрессию генов *VaSTS1* и *VaSTS7* (б); KA0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1 – *A. thaliana*, сверхэкспрессирующая ген *VaSTS1*; ST7-1 – линия растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующая ген *VaSTS7*. Данные

представлены как средние значения \pm стандартная ошибка ($n = 8$). * $p < 0.05$ по сравнению со значениями метилирования ДНК в растениях STS1-1 или экспрессии *VaSTS* в необработанных растениях (парный *t*-критерий Стьюдента).

Для того, чтобы убедиться в том что именно метилирование трансгена является причиной относительно низкой экспрессии *VaSTS7*, мы решили проанализировать влияние деметилирующего агента на экспрессию трансгенов в полученных растениях *A. thaliana*. 5-Азациитидин (5A), химический аналог нуклеозида цитидина, является ингибитором метилирования ДНК (Kiselev et al., 2019a). В ходе экспериментов было показано, что обработка 5A увеличивала экспрессию трансгена *VaSTS1* только в линии ST1-2 в 1.3 раза (рис. 10 б), однако это повышение экспрессии гена *VaSTS1* не было статистически достоверным. В то же время 5A достоверно увеличивал экспрессию гиперметилированного трансгена *VaSTS7* в 1.2–1.9 раза во всех линиях ST7 (рис. 10 б). Таким образом, 5A снижает общее метилирование ДНК, что ведет к усилению экспрессии более метилированных трансгенов – *VaSTS7* (рис. 10 б). Экспрессия менее метилированного трансгена *VaSTS1* после обработки 5A существенно не изменилась (Ogneva et al., 2021a; рис. 10 б).

Ранее было показано, что сверхэкспрессия генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в каллусных культурах *V. amurensis* (Aleynova et al., 2016) приводила к увеличению продукции стильбенов в 3.5 раза. В природе экспрессия *VaSTS* и продукция стильбенов в *V. amurensis* индуцированная, то есть увеличивается в ответ на стресс, в то время как в *P. jezoensis* экспрессия *PjSTS* и продукция стильбенов стабильно высокая, а так же *P. jezoensis* производит отличный от винограда набор стильбенов. Сверхэкспрессия *PjSTS* или аянской в клетках винограда предположительно должна повлиять на рост клеток, продукцию и набор стильбенов, поэтому следующим этапом работ было получение трансгенных клеточных культур, сверхэкспрессирующих *PjSTS*. Для этого культура V2 *V. amurensis* была трансформирована методом

агробактериальной трансформации. Были получены клеточные линии zST1, сверхэкспрессирующие *PjSTS1a*, клеточные линии zST2, сверхэкспрессирующие *PjSTS2*, клеточные линии, сверхэкспрессирующие *PjSTS3*, и линия КА0, содержащая пустой вектор (Kiselev et al., 2013a). Эти каллусы представляли собой рыхлые, интенсивно растущие гомогенные ткани, которые не подвергались дифференцировке в темноте на среде MS с добавлением БАП и АНУ.

Затем была проанализирована экспрессия трансгенов *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3* в полученных линиях клеток винограда (рис. 11). Все линии *PjSTS*-трансгенных клеток винограда активно экспрессировали экзогенные *PjSTS1a*, *PjSTS2* или *PjSTS3*. Среди линий клеток zST1 наибольшая экспрессия трансгена *PjSTS1* была в линии zST1-3, тогда как экспрессия трансгенов *PjSTS1* в линиях zST1-1 и zST1-2 была ниже в 3-10 раз (рис. 11а). Для клеточных линий zST2 наибольшая экспрессия трансгена *PjSTS2* была показана в клеточной линии zST2-3, тогда как экспрессия трансгенов *PjSTS2* в zST2-1 и zST2-2 была ниже в 1.4–2.3 раза (рис. 11б). Что касается клеточных линий zST3, самая высокая экспрессия трансгена *PjSTS3* была в клеточной линии zST3-2, транскрипция в которой была в 1.8-2 раза активнее, чем в клеточных линиях zST3-1 и zST3-3 (Suprun et al., 2020; рис. 11в).

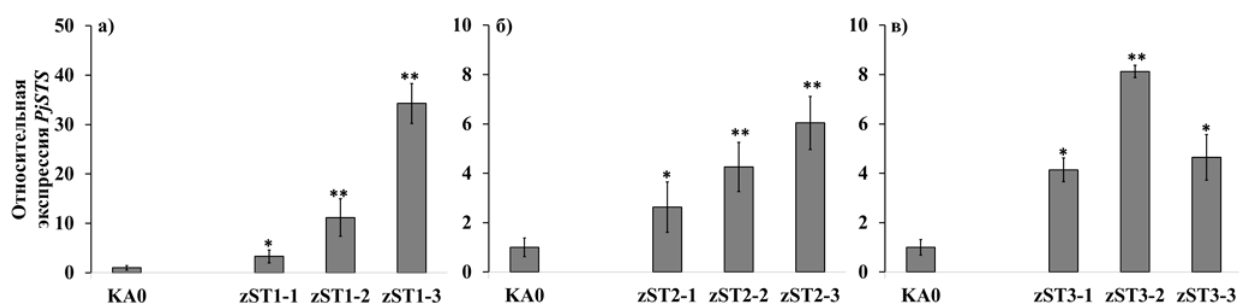


Рисунок 11 – Количественная оценка экспрессии гена *PjSTS* в культурах трансгенных клеток *V. amurensis* была выполнена с помощью количественной ПЦР. РНК была выделена из векторного контроля (КА0), (а) *PjSTS1a*- (zSTS1-1, -2 и -3), (б) *PjSTS2*- (zSTS2-1, -2 и -3) и (в) *PjSTS3* - трансформированных (zSTS3-1, -2 и -3) клеточных линий *V. amurensis*. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями флуоресценции в культуре клеток КА0, трансформированных пустым вектором.

3.3. Содержание стильбенов в *PjSTS*-трансгенных культурах клеток винограда *V. amurensis* и *VaSTS*-трансгенных растениях *A. thaliana*

С помощью ВЭЖХ в клетках *V. amurensis* было определено шесть стильбенов: *транс*-резвератрол дигликозид (1), *транс*-пицеид или *транс*-резвератрол гликозид (2), *транс*-резвератрол (3), ϵ - виниферин (4), δ -виниферин (5) и *цис*-пицеид или *транс*-резвератрол гликозид (6). Ранее было идентифицировано пять стильбенов в культурах каллусных клеток *V. amurensis* (Kiselev et al., 2016b; Aleynova et al., 2016). В этом исследовании было также идентифицировано и определено количество *цис*-пицеида, стереоизомера *транс*-пицеида, но в очень незначительном количестве, достигающее 0,01–0,02 мг/г сухого веса или 0,001–0,002% сухого веса (Suprun et al., 2020; таблица 4). Известно, что ель производит отличный от винограда набор стильбенов, к примеру, в тканях *P. jezoensis* был обнаружен мономер стильбена *транс*-пицеатаннол (3,4,3',5'-тетрагидрокси-*транс*-стильбен) (Kiselev et al., 2016b). Таким образом, можно было ожидать появления новых стильбенов в клетках винограда, сверхэкспрессирующих гены *PjSTS* или. Тем не менее, не было обнаружено никаких новых стильбенов, и, следовательно, на используемых генах *PjSTS* или возможно было получить только *транс*-резвератрол в качестве мономерного стильбена в клетках винограда.

Для дальнейшей работы было необходимо определить в какой момент клеточная культура производит максимальное количество стильбенов, для этого была проведена оценка параметров сухого роста (мг/л питательной среды), общего содержания стильбенов (мг/г сухого веса) и общей продукции стильбенов (мг/л питательной среды) через 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 недель культивирования. Были показаны динамические изменения параметров для контрольной линии клеток, трансформированных пустым вектором (КА0), и линии клеток с экспрессией *PjSTS3* (zSTS3-2). Была отобрана только клеточная линия zSTS3-2, так как в ней было наибольшее содержание

стильбенов (табл. 4). Более того, динамика накопления биомассы в других линиях трансгенных клеток была аналогичной. Как показано на рисунке 12, наибольшая общая продукция стильбена для КА0 и zST3-2 была обнаружена на 35-42 день культивирования, именно поэтому каллусы были собраны на 35-е сутки культивирования.

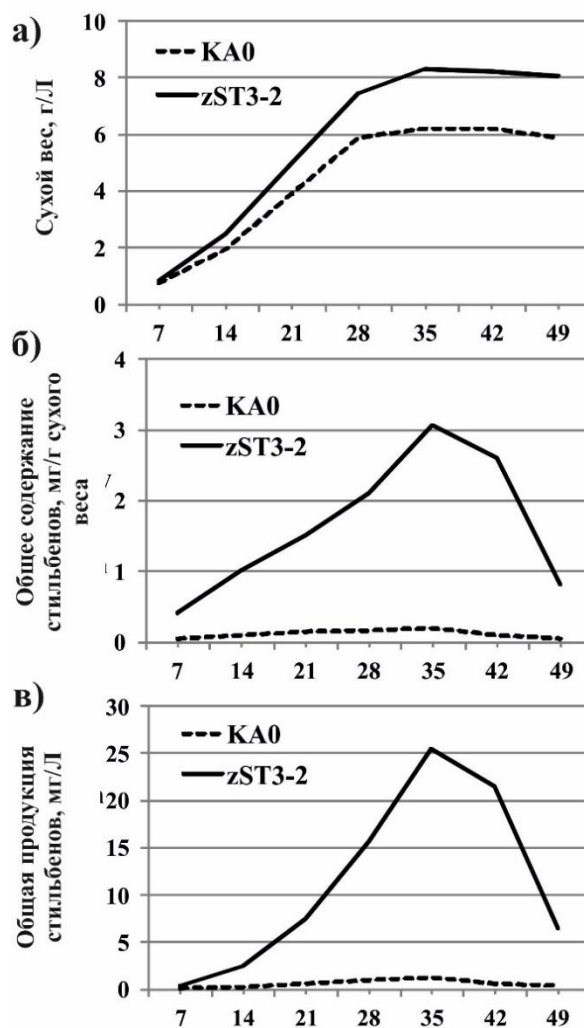


Рисунок 12 – Сухой рост (а, мг/л питательной среды), общее содержание стильбенов (б, мг/г сухой массы) и общая продукция стильбенов (в, мг/л питательной среды) на 7, 14, 21, 28, 35, 42 и 49 день культивирования (т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 недель) контрольной клеточной линии КА0 и линии, сверхэкспрессирующей *PjSTS3* (zST3-2).

В таблице 4, представлены сырой и сухой вес клеток (г/л питательной среды), общее содержание стильбенов (мг/г сухого веса) и продукция стильбенов (мг/л питательной среды) КА0, zST1, zST2 и zST3 клеточные

линии, сверхэкспрессирующие различные гены *PjSTS1*, *PjSTS2* и *PjSTS3* соответственно. Трансформация генами *PjSTS1a* и *PjSTS2* снижала накопление сырой и сухой биомассы полученных трансгенных линий клеток винограда в 1.1–1.4 раза, тогда как трансформация геном *PjSTS3* немного увеличивала эти показатели (Suprun et al., 2020; табл. 4).

Таблица 4. Накопление сырой и сухой биомассы, общее содержание и продукция стильбенов в КА0, zST1-1, -2, -3; zST2-1, -2, -3; zST3-1, -2 и -3 линиях клеток, сверхэкспрессирующих гены *PjSTS1a*, *PjSTS2* или *PjSTS3*

| Клеточная линия (ген) | Сырой вес (г/л) | Сухой вес (г/л) | Общее содержание стильбенов (мг/г) | Общая продукция стильбенов (мг/л) |
|---------------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| КА 0 | 159.1 ± 12.2 | 6.2 ± 0.5 | 0.19 ± 0.07 | 1.18 ± 0.63 |
| zST1-1 (<i>PjSTS1a</i>) | 141.7 ± 8.9 | 5.0 ± 0.3 | 1.14 ± 0.71* | 5.70 ± 3.71* |
| zST1-2 (<i>PjSTS1a</i>) | 123.1 ± 8.4* | 4.9 ± 0.2* | 0.92 ± 0.31* | 4.51 ± 1.64* |
| zST1-3 (<i>PjSTS1a</i>) | 135.4 ± 8.2 | 5.1 ± 0.2 | 0.68 ± 0.19* | 3.47 ± 1.07 |
| zST2-1 (<i>PjSTS2</i>) | 130.1 ± 8.7* | 4.9 ± 0.3* | 0.50 ± 0.11* | 2.45 ± 0.56 |
| zST2-2 (<i>PjSTS2</i>) | 137.6 ± 5.8 | 5.1 ± 0.2 | 0.55 ± 0.21* | 2.81 ± 1.12 |
| zST2-3 (<i>PjSTS2</i>) | 111.2 ± 6.6* | 4.3 ± 0.3* | 0.48 ± 0.13* | 2.07 ± 0.58 |
| zST3-1 (<i>PjSTS3</i>) | 173.8 ± 6.3 | 6.3 ± 0.5 | 1.01 ± 0.40* | 6.36 ± 2.59* |
| zST3-2 (<i>PjSTS3</i>) | 200.7 ± 9.1 | 8.3 ± 0.8 | 3.06 ± 2.01** | 25.40 ± 16.73** |
| zST3-3 (<i>PjSTS3</i>) | 159.5 ± 9.9 | 7.2 ± 0.3 | 0.77 ± 0.22* | 5.54 ± 1.64* |

Примечание. Каллусная ткань была собрана на 35 день. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями накопления свежей биомассы, накопления сухой биомассы или общего уровня стильбенов в трансформированной пустым вектором клеточной линии КА0.

Более существенные различия были обнаружены во время анализа общего содержания и продукции стильбенов (табл. 4). Трансформация клеток винограда генами *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3* достоверно увеличивала общее

содержание и продукцию стильбенов в 3.6–6 и 2.9–4.8 раза, в 2.5–2.9 и 1.7–2.4 раза, в 4.1–16.1 и 4.7–21.6 раза, соответственно, (табл. 4) по сравнению с линией КА0. Затем было проанализировано содержание отдельных стильбенов в клеточных линиях КА0, zST1, zST2 и zST3. Трансформация каллусов *V. amurensis* генами *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3* существенно увеличивала содержание *транс*-резвератрола в 4-26.3, 2-3.3, и 3.3-81.3 раза по сравнению с контрольной линией КА0 соответственно (табл. 5), в тоже время увеличение содержания других стильбенов было не таким сильным (Suprun et al., 2020). Сверхэкспрессия STS непосредственно катализирует реакцию образования *транс*-резвератрола (Langcake et al., 1977), а появление других стильбенов требует гликозилирования, метилирования или окисления под действием специфических ферментов (Dubrovina et al., 2017), но эти ферменты не были активированы после трансформации генами *PjSTS*.

Таблица 5. Содержание отдельных стильбенов (% сухой массы) в КА0, zST1-1, 2, 3; zST2-1, -2, -3; zST3-1, -2 и -3 линиях клеток, сверхэкспрессирующих гены *PjSTS1a*, *PjSTS2* или *PjSTS3*

| Клеточная линия (ген) | <i>транс</i> -резвератрол дигликозид (мг/г) | <i>транс</i> -пицеид (мг/г) | <i>транс</i> -резвератрол (мг/г) | ϵ – виниферин (мг/г) | δ – виниферин (мг/г) | <i>цис</i> -пицеид (мг/г) |
|---------------------------|---|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| КА0 | 0.10 ± 0.03 | 0.02 ± 0.01 | 0.03 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.02 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 |
| zST1-1 (<i>PjSTS1a</i>) | 0.12 ± 0.03 | 0.06 ± 0.02 | 0.79 ± 0.56** | 0.04 ± 0.02 | 0.12 ± 0.03* | 0.01 ± 0.01 |
| zST1-2 (<i>PjSTS1a</i>) | 0.28 ± 0.09* | 0.23 ± 0.11* | 0.13 ± 0.05* | 0.08 ± 0.03 | 0.18 ± 0.05* | 0.02 ± 0.01 |
| zST1-3 (<i>PjSTS1a</i>) | 0.25 ± 0.07* | 0.12 ± 0.04 | 0.12 ± 0.04* | 0.07 ± 0.03 | 0.11 ± 0.01** | 0.01 ± 0.01 |
| zST2-1 (<i>PjSTS2</i>) | 0.15 ± 0.03 | 0.14 ± 0.03* | 0.06 ± 0.01 | 0.04 ± 0.01 | 0.10 ± 0.03* | 0.01 ± 0.01 |
| zST2-2 (<i>PjSTS2</i>) | 0.19 ± 0.07 | 0.11 ± 0.05 | 0.10 ± 0.03* | 0.03 ± 0.02 | 0.11 ± 0.03* | 0.01 ± 0.01 |
| zST2-3 (<i>PjSTS2</i>) | 0.19 ± 0.06 | 0.04 ± 0.01 | 0.08 ± 0.02 | 0.04 ± 0.02 | 0.12 ± 0.03* | 0.01 ± 0.01 |
| zST3-1 (<i>PjSTS3</i>) | 0.09 ± 0.06 | 0.09 ± 0.03 | 0.53 ± 0.15** | 0.09 ± 0.04 | 0.20 ± 0.05* | 0.01 ± 0.01 |

| | | | | | | |
|-----------------------------|--------------|--------------|---------------|-------------|--------------|-------------|
| zST3-2 (<i>PjSTS3</i>) | 0.26 ± 0.09* | 0.09 ± 0.01* | 2.44 ± 1.35** | 0.06 ± 0.02 | 0.20 ± 0.09* | 0.01 ± 0.01 |
| zST3-3 (<i>PjSTS3</i>) | 0.34 ± 0.15* | 0.08 ± 0.03 | 0.10 ± 0.04 | 0.08 ± 0.02 | 0.15 ± 0.04* | 0.01 ± 0.01 |

Примечание. Образцы каллусной ткани получали из 35-дневных культур. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями содержания отдельных стильбенов в трансформированной пустым вектором клеточной линии КА0.

Наибольший положительный эффект на содержание стильбенов наблюдался в *PjSTS3*-трансгенных клеточных линиях винограда. В каллусах zST3-2 общее содержание стильбенов увеличилось до 3.1 мг/г сухого веса, а продукция стильбенов до 25.4 мг/л по сравнению с каллусной линией КА0 (табл. 4). Таким образом, сверхэкспрессия генов *PjSTS* в клеточных культурах винограда привела к большей аккумуляции стильбенов в клетках, чем сверхэкспрессия генов винограда *VaSTS* (Kiselev et al., 2016b; Aleynova et al., 2016; Ogneva et al., 2021a). Вероятно, это было связано с известным фактом, что многочисленные вставки трансгенов в геном растения могут приводить к гиперметилованию и подавлению трансгенных последовательностей, особенно в случае, если перенесенные гены были очень похожи или идентичны эндогенным (Rajeevkumar et al., 2015). Эндогенные последовательности генов *STS* культуры клеток винограда идентичны перенесенным генам *VaSTS* *V. amurensis*. В свою очередь перенесенные гены ели аянской *PjSTS* сильно отличались от эндогенных *STS* винограда (гомология только 60–63%; табл. 6).

Таблица 6. Сравнение последовательности нуклеиновых кислот генов *STS* ели и винограда, NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), blast-n (нуклеотидно-нуклеотидный BLAST)

| | <i>PjSTS1a</i> (%) | <i>PjSTS2</i> (%) | <i>PjSTS3</i> (%) | <i>VaSTS1</i> (%) | <i>VaSTS10</i> (%) | <i>VINTST1</i> (%) |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>PjSTS1a</i> (LT158484) | – | 99 | 96 | 63 | 63 | 63 |
| <i>PjSTS2</i> (LT158486) | 99 | – | 95 | 63 | 63 | 63 |

| | | | | | | |
|------------------------------|----|----|----|----|----|----|
| <i>PjSTS3</i> (LT158487) | 96 | 95 | – | 60 | 61 | 61 |
| <i>VaSTS1</i> (GQ167204) | 63 | 63 | 60 | – | 87 | 97 |
| <i>VaSTS10</i> (JQ780328) | 63 | 63 | 61 | 87 | – | 87 |
| <i>VINTST1</i> (NM001281010) | 63 | 63 | 61 | 97 | 87 | – |

Ранее нами было показано, что в контрольной линии *A. thaliana* KA0, стильбенов не было (рис. 13а, табл. 7), в то время как *VaSTS1*-трансгенные растения *A. thaliana*, продуцировали два стильбена: *транс*-пицеид и *транс*-резвератрол (рис. 13б, табл. 7).

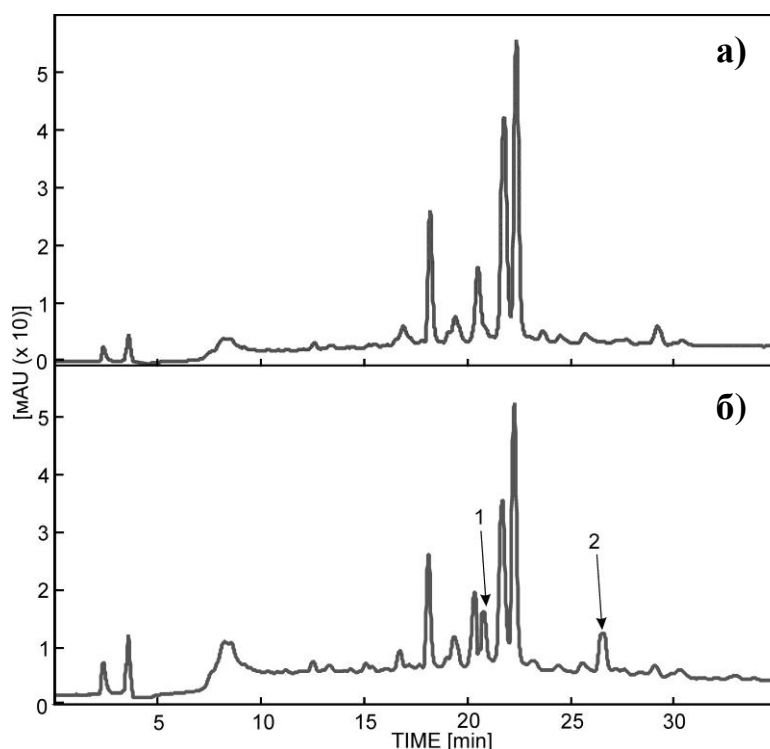


Рисунок 13 – Хроматограмма ВЭЖХ – УФ (310 нм) для экстрактов трансгенных растений *A. thaliana*. (а) KA0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; (б) ST1-3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессировавшие ген *VaSTS1*; *транс*-пицеид (1) и *транс*-резвератрол (2).

Растения, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7* продуцировали только *транс*-резвератрол (табл. 7). Наибольшее содержание *транс*-пицеида и *транс*-резвератрола было обнаружено в растениях *A. thaliana*, которые сверхэкспрессировали ген *VaSTS1*: 8.28–22.66 мкг/г свежей массы (табл. 7). Самый высокий уровень стильбенов среди трансгенных линий растений *VaSTS1* был зарегистрирован для линии ST1-3, а самый низкий для ST1-2

(табл. 7). Полученный уровень содержания стильбенов положительно коррелировал с экспрессией гена *VaSTS1* (коэффициент корреляции $r = 0.96$ рис. 9). Общее содержание стильбенов в растениях линий ST7, было в 103–1133 раз ниже, чем содержание стильбена в линиях ST1. Важно отметить, что из всех стильбенов для данных линий был обнаружен только *транс-резвератрол*: 0.02–0.08 мкг/г свежей массы (табл. 7), и этот результат также коррелировал ($r = 0.98$) с низкой экспрессией трансгена *VaSTS7* (Ogneva et al., 2021a; рис. 9).

Таблица 7. Содержание *транс-пицеида* и *транс-резвератрола* (% от сырой массы) в линиях растений *A. thaliana* KA0, ST1-1, 2, 3; ST7-1, 2, 3, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS1* или *VaSTS7*

| Линия растений (ген) | <i>транс-пицеид</i> , мкг/г | <i>транс-резвератрол</i> , мкг/г | Общее содержание стильбенов, мкг/г |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| KA0 | 0 | 0 | 0 |
| ST1-1 (<i>VaSTS1</i>) | 12.42 ± 4.11* | 0.32 ± 0.23 | 12.73 ± 4.34* |
| ST1-2 (<i>VaSTS1</i>) | 8.01 ± 2.02** | 0.28 ± 0.19 | 8.28 ± 2.19* |
| ST1-3 (<i>VaSTS1</i>) | 21.43 ± 4.98** | 1.24 ± 0.55* | 22.66 ± 5.56** |
| ST7-1 (<i>VaSTS7</i>) | 0 | 0.08 ± 0.03* | 0.08 ± 0.03* |
| ST7-2 (<i>VaSTS7</i>) | 0 | 0.02 ± 0.02 | 0.02 ± 0.02 |
| ST7-3 (<i>VaSTS7</i>) | 0 | 0.02 ± 0.02 | 0.02 ± 0.02 |

Примечание. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями содержания *транс-пицеида* или *транс-резвератрола* в 8-недельных растениях *A. thaliana*, трансформированных пустым вектором KA0.

3.4. Устойчивость к абиотическому стрессу *VaSTS1*- и *VaSTS7*-трансгенных растений *A. thaliana*

Для определения степени участия генов винограда *VaSTS1* и *VaSTS7* в ответ на различные абиотические стрессы были использованы *VaSTS1*- и *VaSTS7*-трансгенные линии растений *A. thaliana*. Всего было проведено 5 серий экспериментов по индукции солевого, высоко- и низкотемпературного, УФ стресса (УФ-В, 312 нм и УФ-С, 254 нм), а также засухи. Результаты

показали, что сверхэкспрессия генов *VaSTS1* и *VaSTS7* не увеличивала устойчивость к засолению, засухе и низким температурам (рис. 14а, в, г). Устойчивость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих *VaSTS1* и *VaSTS7*, после тепловой обработки была на 1–14% выше по сравнению с растениями КА0, но это увеличение не было статистически значимым (рис. 14б).

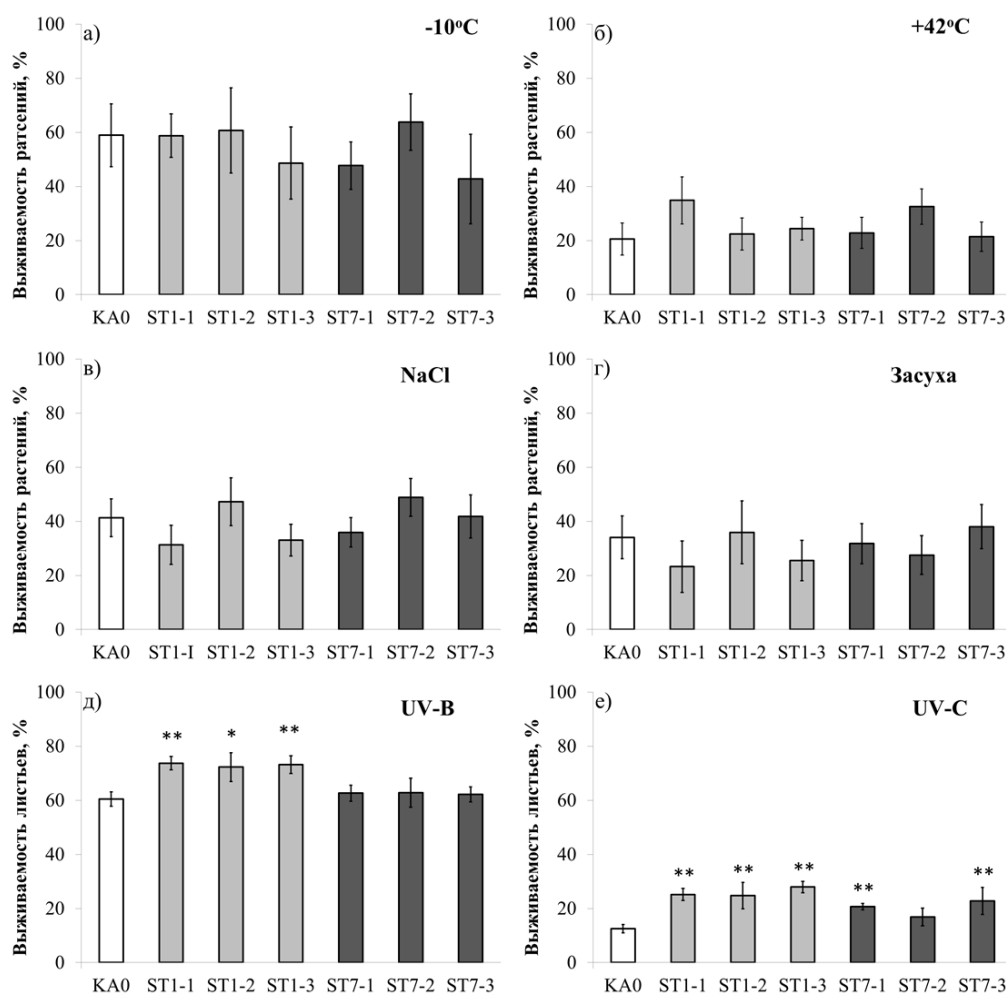


Рисунок 14 – Выживаемость растений (а,г) и листьев (д,е) после стрессов: холода (а), тепла (б), засоления (в), засухи (г), ультрафиолетового облучения В (UV-B, д), и ультрафиолетового облучения С (UV-C, е). КА0 - трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1, 2 и 3 - линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; ST7-1, 2 и 3 - линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7*. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка ($n = 160$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями выживаемости растений или листьев у растений КА0 (парный t -критерий Стьюдента).

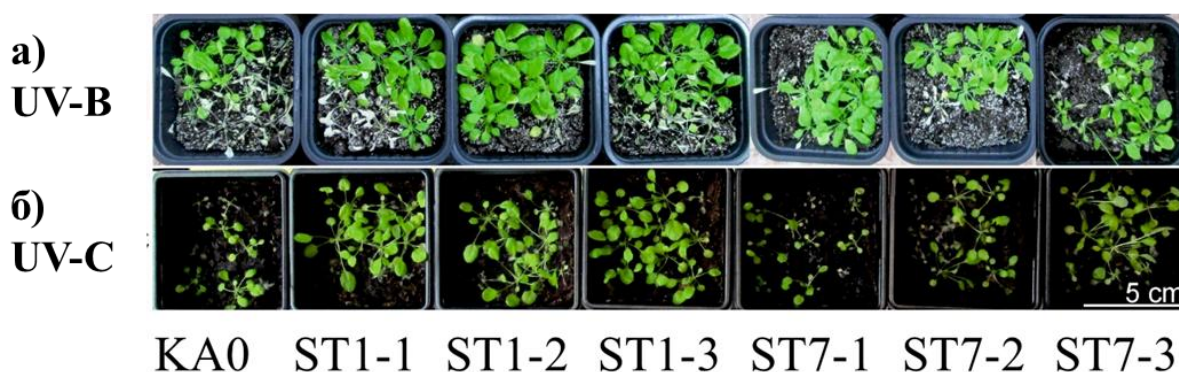


Рисунок 15 – Внешний вид растений *Arabidopsis thaliana* при облучении ультрафиолетом В (UV-B, 312 нм, **а**) и ультрафиолетом С (UV-C, 254 нм, **б**). 4-недельные растения облучали в течение 10 мин на расстоянии 15 см над горшками с максимальной мощностью, как описано ранее (Tyunin et al., 2016). Согласно инструкции производителя, мы использовали 1800 мкВт/см^2 УФ-В и 930 мкВт/см^2 интенсивности УФ-излучения. Выживаемость листьев определяли как количество явно зеленых листьев через неделю после прекращения воздействия стресса.

Наиболее интересный результат был обнаружен при обработке растений УФ: сверхэкспрессия гена *VaSTS1* увеличивала выживаемость зеленых листьев после обработки УФ-В в 1.2–1.3 раза (рис. 14д, 15). Это увеличение было статистически значимым для всех *VaSTS1*-трансгенных растений (рис. 14д). Сверхэкспрессия гена *VaSTS7* также увеличивала жизнеспособность листьев, облученных УФ-В, но эта устойчивость не была статистически значимой (Ogneva et al., 2021a; рис. 14д).

Аналогичные результаты были получены при применении УФ-С, однако отрицательное влияние на выживаемость листьев было намного сильнее (рис. 14е, 15), не смотря на то, что интенсивность УФ-С излучения была почти в 2 раза меньше (1800 мкВт/см^2 УФ-В против 930 мкВт/см^2 УФ-С). Это подтверждает ранее сделанные выводы о том, что воздействие УФ-С более опасно для растений, чем воздействие УФ-В (Nawkar et al., 2013). В более жестких условиях облучения УФ-С защитный эффект сверхэкспрессии гена *VaSTS* проявлялся сильнее. Так, сверхэкспрессия гена *VaSTS1* достоверно увеличивала количество зеленых листьев после обработки УФ-С в 2.0–2.3 раза по сравнению с растениями KA0 *A. thaliana* (рис. 14е). Сверхэкспрессия

гена *VaSTS7* также увеличивала жизнеспособность листьев, облученных УФ-С в 1.3–1.8 раза, но это повышение было статистически значимым только для двух из трех линий растений *A. thaliana* ST7, которые использовались в экспериментах (для ST7-1 и ST7-3, [Ogneva et al., 2021a](#); [рис. 14е](#)).

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

В предыдущих работах нами было показано, что появление стильбенов в растениях резуховидки Таля *A. thaliana* увеличивало устойчивость этих растений к УФ излучению, поэтому нами было решено проверить, является ли это прямым следствием воздействия именно стильбенов или сверхэкспрессия генов *STS* могла приводить к другим последствиям, что и вызывало наблюдаемую устойчивость. Поэтому мы провели ряд экспериментов по обработке растений *A. thaliana* растворами стильбенов. Для сравнения мы так же обрабатывали растения предшественниками фенольных соединений растений: СА ([рис. 16в](#)) и СiА ([рис. 16г](#)). Для проверки наблюдаемых эффектов, растения обрабатывали октокриленом – веществом, которое используется в качестве ингредиента в разнообразных солнцезащитных продуктах.

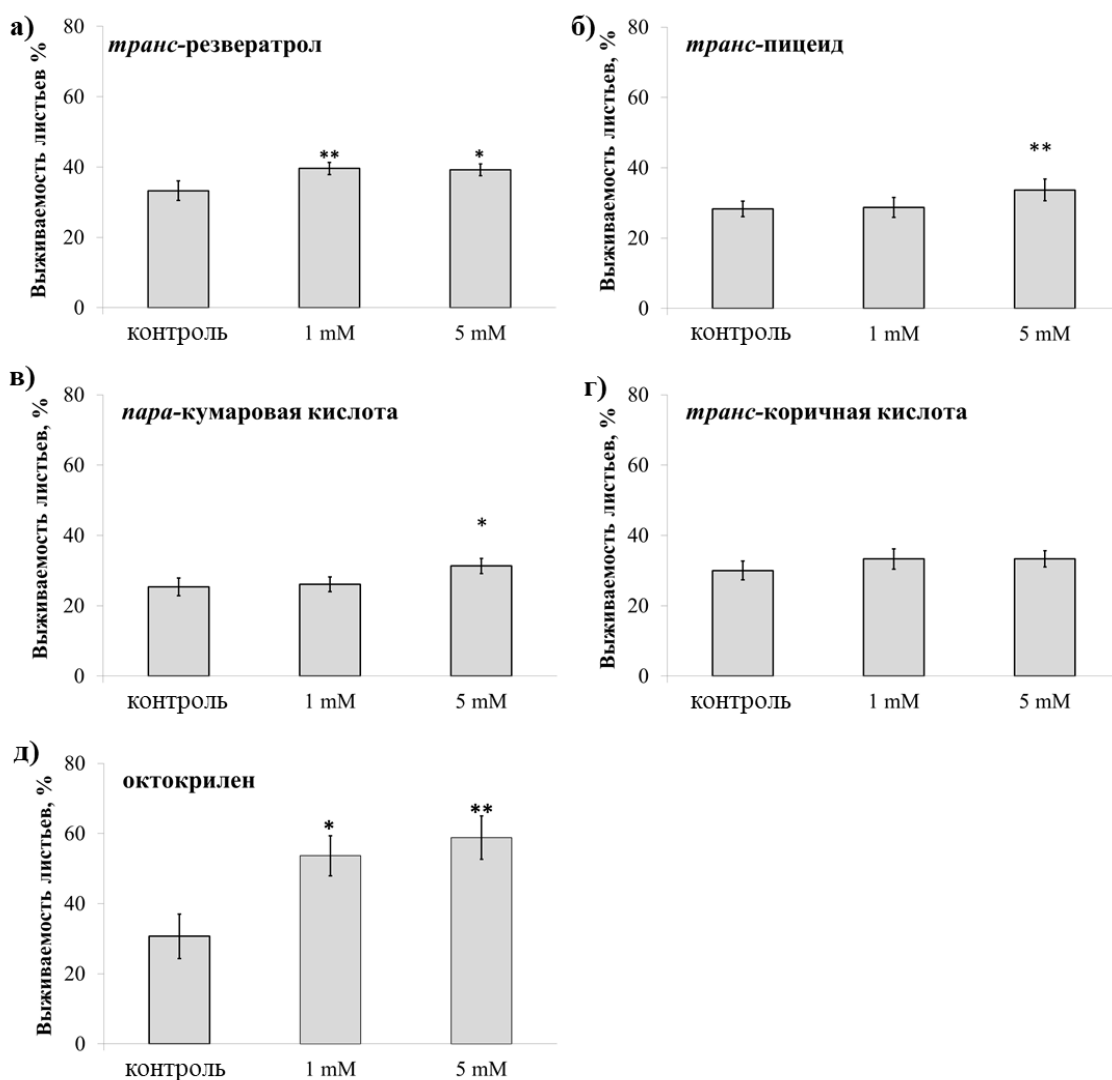


Рисунок 16 – Выживаемость листьев растений *A. thaliana* после ультрафиолетового облучения С (УФ-С), обработанных *транс-резвератролом* (а), *транс-пицеидом* (б), *пара-кумаровой кислотой* (в), *транс-коричной кислотой* (г) и *октокриленом* (д) в концентрации 1 mM и 5 mM, в качестве контроля растения были обработаны водой. Данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка ($n = 160$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению со значениями выживаемости растений или листьев у растений КА0 (парный t -критерий Стьюдента).

Стильбены, в первую очередь *транс-резвератрол*, оказывали достоверное защитное действие от УФ-С облучения во всех используемых дозах (1 и 5 mM; [рис. 16а](#)). Количество живых зеленых листьев было на 5.4-6.3% больше при обработке *транс-резвератролом*, чем в листьях, обработанных просто водой. Но в тоже время защитное действие *транс-*

резвератрола было в 2-3 раза меньше, чем у октокрилена – вещества, который наиболее часто используется как защитное средство от УФ (рис. 16д).

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

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Виноград амурский *V. amurensis* известен как вид, устойчивый к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. Более того на сегодняшний день *V. amurensis* успешно культивируется в коммерческих целях (Liu et al., 2013). Виноград *V. amurensis* активно используют для создания новых сортов и для производства красных вин высокого качества. Так же известно, что виноград – богатый источник биологически активных веществ, таких как стильбены, которые обладают кардиопротекторной, противоопухолевой и антибактериальной активностями (Delaunois et al., 2009; Lin et al., 1999). Стильбены обладают огромным потенциалом для использования в качестве лекарств и биологически-активных добавок, а также для повышения устойчивости растений к различным болезням (Shui-Lin et al., 2004).

Многочисленные исследования указывают на то, что стильбены играют важную роль в защите растений от повреждающего действия УФ излучения (Tang et al., 2010; Suzuki et al., 2015). Индукция биосинтеза этого полифенольного фитоалексина в ответ на УФ облучение наблюдалась у многих растений (Li et al., 2020; Ma et al., 2019). Более того, существует ряд исследований, где показано, что на биосинтез стильбенов влияет широкий спектр других абиотических факторов (Ismail et al., 2012; Hochberg et al., 2015; Herrera et al., 2017; Valletta et al., 2021).

Ключевыми ферментами в биосинтезе стильбенов являются STS, которые непосредственно катализируют реакцию образования резвератрола или пиносильвина, конденсируя три молекулы малонил-СoА и одну молекулу кумароил-СoА (для резвератрола) или одну молекулу циннамоил-СoА (для пиносильвина) с образованием основной структуры, характерной для стильбенов (Austin et al., 2004). В геноме растений гены *STS* представлены целыми семействами, отличающимися аминокислотными последовательностями и набором регуляторных элементов. Поэтому

изучение работы стильбен синтез является актуальной задачей для биотехнологии растений.

Известно, что ель производит отличный от винограда набор стильбенов. Например, в тканях *P. jezoensis* был обнаружен мономер стильбена *транс*-пицеатаннол (Kiselev et al., 2016b). Можно было ожидать появления новых стильбенов в клетках винограда, сверхэкспрессирующих гены *PjSTS* или (*PjSTS1*, *PjSTS2*, *PjSTS3*). Тем не менее, в данной работе не было обнаружено никаких новых стильбенов, и, следовательно, на используемых генах *STS* или, возможно было получить только *транс*-резвератрол в качестве мономерного стильбена в клетках винограда. Эти данные подтвердили предыдущие исследования, в которых показано, что *STS* или способны синтезировать только *транс*-резвератрол (Hammerbacher et al., 2011). Появление других стильбенов требует гликозилирования, метилирования или окисления под действием специфических ферментов, но эти ферменты не были активированы после трансформации.

Наибольший положительный эффект накопления стильбенов наблюдался для *PjSTS3* трансгенных каллусов, где общее содержание стильбенов увеличилось до 3.1 мг/г сухого веса, а продукция стильбенов до 25.4 мг/л по сравнению с линией КА0. Сравнение с ранее известным содержанием стильбенов в других источниках (Dubrovina et al., 2017) показало, что содержание стильбенов в полученных нами трансгенных клетках винограда, несущих гены *STS* или, достигло более высокого уровня накопления стильбенов, чем в нетрансгенных клеточных линиях, полученных из тканей винограда с низким содержанием (0.001-0.5 мг/г сухого веса; Tyunin et al., 2019) или в листьях винограда без обработки УФ (0,064-0,39 мг/г сухой массы; Kiselev et al., 2017). Кроме того, в *PjSTS3*-трансгенных каллусах уровень стильбенов был выше по сравнению с линиями клеток винограда, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS1* и *VaSTS7* – 0.36 мг/г и 0.60 мг/г сухой массы, соответственно (Aleynova et al., 2016). Достигнутый уровень содержания стильбенов в клетках, сверхэкспрессирующих ген *PjSTS*

был близок к содержанию стильбенов в линиях клеток винограда, полученных из тканей с высоким содержанием стильбенов (2.1-11.1 мг/г сухого веса; [Tyunin et al., 2019](#)) и листьев винограда после УФ-С обработки (0.69 мг/г сухой массы; [Kiselev et al., 2017](#)). В то же время уровень стильбенов в клетках, сверхэкспрессирующих *PjSTS* был значительно ниже, чем в каллусах винограда после трансформации генами *rol* из *Agrobacterium risogines* в культурах клеток винограда (31.5 мг/г сухой массы; [Kiselev et al., 2007](#)) или по сравнению с содержанием стильбенов в стеблях винограда ([Kiselev et al., 2007](#)).

Таким образом, избыточная экспрессия генов или *PjSTS* в клеточных культурах винограда привели к большей аккумуляции стильбенов в клетках, чем сверхэкспрессия генов винограда *VaSTS* ([Aleynova et al., 2016](#)). Вероятно, это было связано с тем, что многочисленные вставки трансгенов в геном растения могут приводить к гиперметилированию и подавлению трансгенных последовательностей, особенно в случае, если перенесенные гены были похожи или идентичны эндогенным ([Rajeevkumar et al., 2015](#)). Эндогенные последовательности *STS* идентичны перенесенным *VaSTS* в клетках *V. amurensis*. Следовательно, гиперметилирование и сайленсинг переданных последовательностей *VaSTS* могли увеличиться. В свою очередь перенесенные гены или *PjSTS* по нуклеотидной последовательности сильно отличались от эндогенных *STS* винограда. Вероятно, нуклеотидные последовательности перенесенных генов *PjSTS* могли быть метилированы на более низком уровне, после генетической трансформации, по сравнению с перенесенными *STS* винограда.

В настоящей работе были получены трансгенные линии растений *A. thaliana*, которые сверхэкспрессировали ген *VaSTS1* (линии ST1) и *VaSTS7* (линии ST7). Было показано, что экспрессия гена *VaSTS1* была в 6.5–13.3 раза выше, чем уровень транскрипции гена *VaSTS7*. Эти результаты были неожиданными, поскольку гены *VaSTS1* и *VaSTS7* находятся под контролем одного и того же сильного конститутивного промотора вируса мозаики

цветной капусты 35S и, следовательно, должны иметь примерно одинаковый уровень экспрессии.

Известно, что трансгены в растениях подавляются с помощью активного цитозинового метилирования ДНК ([Rajeevkumar et al., 2015](#)). Возможно, в нашем случае последовательности гена *STS* подвергаются разным уровням метилирования. Поэтому был проанализирован уровень метилирования цитозина последовательностей генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в линиях ST1-1 и ST7-1, используя бисульфитное секвенирование ([Rajeevkumar et al., 2015](#)). Было показано, что ген *VaSTS7* был гиперметилован и это, возможно, является основной причиной низкой экспрессии гена *VaSTS7* в трансгенных линиях ST7 *Arabidopsis*.

В литературе существует ряд данных, в которых были получены разные трансгенные растения, сверхэкспрессирующие разные гены *STS*. Таким образом, было показано, что содержание стильбенов в растениях *A. thaliana* линии ST1-3 (максимальное содержание стильбенов среди полученных трансгенных растений) было в 50.4 раза выше по сравнению с *Ziziphus jujuba* Mill. (0.45 мкг/г свежей массы), который сверхэкспрессировал ген *PcPKS5* из *Polygonum cuspidatum* ([Luo et al., 2015](#)). Однако содержание стильбенов у трансгенного тополя белого *Populus alba* L., сверхэкспрессирующего ген *STS* из *V. vinifera*, было в 27.1 раза выше (до 615 мкг/г свежей массы листа, [Giorcelli et al., 2004](#)) по сравнению с содержанием стильбенов в растениях ST1-3 *Arabidopsis*. Также не было стильбенов в трансгенной клубнике, сверхэкспрессирующей ген *NS-Vitis3*, кодирующий *STS* из винограда *Vitis riparia* Michx. ([Hanhineva et al., 2009](#)). К сожалению, сравнить содержание стильбенов в линии ST1-3 с другими трансгенными растениями *A. thaliana*, невозможно, в связи с отсутствием данных в литературе, однако гены *STS* были перенесены в мутантные растения *A. thaliana* tt4(2YY6), которые не могли синтезировать флавоноиды ([Buer et al., 2004](#)). Флавоноиды являются конкурентами стильбенов в пути биосинтеза, потому что флавоноиды и стильбены используют одни и те же предшественники ([Shumakova et al.,](#)

2011), именно поэтому в биосинтезе стильбенов были использованы предшественники фенольных соединений. В этих растениях содержание стильбенов достигло 600 мкг/г свежей массы (*цис*-пицеид, резвератрол диглюкозид, *транс*- и *цис*-резвератрол ацетилгексозиды), что является одним из самых высоких значений и это может быть связано с избытком предшественников стильбенов в этих растениях (Yu et al., 2006; Lo et al., 2007). Таким образом, линии ST1 по продукции стильбенов были ближе к среднему уровню среди известных трансгенных растений, а линии ST7 имели один из самых низких уровней содержания стильбенов.

Стильбены обладают огромным потенциалом для повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, поэтому дальнейшим важным этапом в нашей работе стало исследование устойчивости полученных *STS*-трансгенных растений *A. thaliana* к различным абиотическим стрессам, таким как: засоление почвы, засуха, повышенные и пониженные температуры. Так как известно, что стильбены обладают антиоксидантной активностью (Šamec et al., 2021), то можно было ожидать что при используемых стрессах полученные растения могут быть более устойчивы, чем контрольные растения, трансформированные пустым вектором. Но в нашем случае, устойчивость *STS*-трансгенных растений была примерно такой же, как и у контрольных растений.

Известно, что содержание стильбенов резко возрастает в ответ на УФ облучение (Pezet et al., 2003). Более того, мы показали, что прямое нанесение растворов стильбенов на листья растений *A. thaliana* оказывает достоверный защитный эффект от избыточного УФ излучения (Ogneva et al., 2021b). Поэтому мы проверили устойчивость *STS*-трансгенных растений *A. thaliana* к УФ облучению (УФ-В и УФ-С). Растения *A. thaliana* с наибольшей экспрессией стильбен синтаз и содержанием стильбенов (трансформированные геном *VaSTS1*) во всех экспериментах были более устойчивы к УФ облучению. В то же время только некоторые линии

растений *A. thaliana*, экспрессирующие ген *VaSTS7*, были устойчивы к УФ обработке.

В итоге, результаты, полученные в настоящей работе, говорят о том, что *STS*-трансгенные растения *A. thaliana* были более устойчивыми для воздействия УФ из-за сверхэкспрессии *STS* и последующим синтезом стильбенов. В ходе работы возникли новые вопросы, требующие дальнейшего исследования, например, почему наблюдается значительная разница в продукции стильбенов и устойчивости к стрессам у растений экспрессирующих близкие по нуклеотидной последовательности гены *VaSTS1* и *VaSTS7* (91% идентичности). Возможно, использование новых генов *STS* может привести к появлению других стильбенов и устойчивости к стрессам, но это требуют дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Обработка растений кумаровой кислотой (СА) в сочетании с кратковременным воздействием УФ-С является сильным стимулом, повышающим продукцию стильбенов в 1.4-3.4 раза, а также снижающим количество повреждений листьев после УФ-С облучения в черенках винограда *V. amurensis* и ели *P. jezoensis*. Это говорит об УФ-защитных свойствах стильбенов и их предшественников.
2. Трансформация культур клеток винограда генами *PjSTS1*, *PjSTS2* и *PjSTS3* ели *P. jezoensis* является эффективной стратегией увеличения биосинтеза стильбенов в культуре клеток. Получен альтернативный источник стильбенов – клеточная линия винограда ZST3-2, где содержание стильбенов доходило до 3.1 мг/г от сухой массы клеток, что в 5 раз больше, чем при сверхэкспрессии генов *VaSTS1* и *VaSTS7* винограда.
3. Выбор трансгена играет ключевую роль в дальнейшем метаболизме стильбенов в растениях, так транскрипция гена *VaSTS1* в растениях *A. thaliana* была в 6.5–13.3 раза больше, чем экспрессия гена *VaSTS7*. Это приводило к тому, что в *VaSTS1*-трансгенных растениях *A. thaliana* накапливалось больше стильбенов (в 103–1133 раз) и как следствие они были более устойчивы к воздействию УФ (в 1.2-1.3 раза).
4. Сверхэкспрессия *VaSTS* является оптимальным решением для получения устойчивых к УФ излучению растений. Устойчивость трансгенных растений *A. thaliana* к УФ-В и УФ-С облучению положительно коррелировала с экспрессией трансгенов *VaSTS* и общим содержанием стильбенов.
5. Транс-резвератрол – ключевой УФ протектор растений. Растения *A. thaliana*, обработанные стильбенами и их предшественниками (СА и коричной кислотами), были более устойчивы к УФ облучению. Наиболее устойчивыми были растения, обработанные транс-резвератролом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abid M. Nitrogen nutrition improves the potential of wheat (*Triticum aestivum* L.) to alleviate the effects of drought stress during vegetative growth periods / M. Abid, Z. Tian, S.T. Ata-Ul-Karim, Y. Cui, Y. Liu, R. Zahoor, D. Jiang, T. Dai // *Front. Plant Sci.* — 2016. — V. 7. — P. 981.
2. Adams E. Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants / E. Adams, R. Shin // *J. Integr. Plant Biol.* — 2014. — V. 56. — P. 231–249.
3. Ahmad M. An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis* / M. Ahmad, J.A. Jarillo, L.J. Klimczak, L.G. Landry, T. Peng, R.L. Last, A.R. Cashmore // *Plant Cell.* — 1997. — V. 9. — No. 2. — P. 199–207.
4. Ahmad M. Report: antioxidant and nutraceutical value of wild medicinal Rubus berries / M. Ahmad, S. Masood, S. Sultana, T. B. Hadda, A. Bader, M. Zafar // *Pakistan J. Pharm. Sci.* — 2015. — V. 28. — No. 1. — P. 241–247.
5. Ahuja I. Plant molecular stress responses face climate change / I. Ahuja, R.C.H. de Vos, A.M. Bones, R.D. Hall // *Trends Plant Sci.* — 2010. — V. 15. — P. 664–674.
6. Alam M. Exogenous salicylic acid ameliorates short-term drought stress in mustard (*Brassica juncea* L.) seedlings by up-regulating the antioxidant defense and glyoxalase system / M. Alam, M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Fujita, J. Aust // *Crop Sci.* — 2013. — V. 7. — P. 1053–1063.
7. Aleynova O.A. Stilbene accumulation in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. overexpressing *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS7* genes / O.A. Aleynova, V.P. Grigorchuk, A.S. Dubrovina, V.G. Rybin, K.V. Kiselev // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* — 2016. — V. 125. — P. 329–339.
8. Aleynova-Shumakova O.A. *VaCPK20* gene overexpression significantly increased resveratrol content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / O.A. Aleynova-Shumakova, A.S. Dubrovina, A.Y. Manyakhin, Y.A. Karetin, K.V. Kiselev // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2014. — V. 98. — No. 12. — P. 5541–5549.
9. Al-jebory E.I. Effect of water stress on carbohydrate metabolism during *Pisum sativum* seedlings growth. Euphrates / E.I. Al-jebory // *J. Agric. Sci.* — 2012. — V. 4. — P. 1–12.
10. Al-Khatib K. High- temperature effects on photosynthesis processes in temperate and tropical cereals / K. Al-Khatib, G.M. Paulsen // *Crop Science.* — 1999. — V. 39. — P. 119–125.
11. Almoguera C. Differential Accumulation of Sunflower Tetraubiquitin mRNAs during Zygotic Embryogenesis and Developmental Regulation of Their Heat-Shock Response / C. Almoguera, M.A. Coca, J. Jordano // *Plant Physiol.* — 1995. — V. 107. — No. 3. — P. 765–773.

12. Altschul S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // J. Mol Biol. — 1990. — V. 215. — No. 3. — P.403–410.
13. Amirjani, M.R. Antioxidative and biochemical responses of wheat / M.R. Amirjani, M. Mahdihyeh // J. Agric. Biol. Sci. — 2013. — V. 8. — P. 291–301.
14. Ancillotti C. Changes in polyphenol and sugar concentrations in wild type and genetically modified *Nicotiana langsdorffii* Weinmann in response to water and heat stress / C. Ancillotti, P. Bogani, S. Biricolti, E. Calistri, L. Checchini, L. Ciofi, C. Gonnelli, M. Del Bubba // Plant Physiol Biochem. — 2015. — V. 97. — P. 52–61.
15. Atkinson N.J. Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses / N.J. Atkinson, C.J. Lilley, P.E. Urwin // Plant Physiol. — 2013. — V. 162. — No. 4. — P. 2028–2041.
16. Atkinson N.J. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field / N.J. Atkinson, P.E. Urwin // J. Exp. Bot. — 2012. — V. 63. — No. 10. — P. 3523–3543.
17. Austin M.B. An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases / M.B. Austin, M.E. Bowman, J.L. Ferrer, J. Schröder, J.P. Noel // Chem Biol. — 2004. — V. 11. — No. 9. — P. 1179–1194.
18. Bailey-Serres J. Flooding stress: acclimations and genetic diversity / J. Bailey-Serres, L.A. Voesenek // Annu Rev Plant Biol. — 2008. — V. 59. — P. 313–339.
19. Ballaré C.L. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change / C.L. Ballaré, M.M. Caldwell, S.D. Flint, S.A. Robinson, J.F. Bornman // Photochem. Photobiol. Sci. — 2011. — V. 10. — No. 2. — P. 226–241.
20. Barragán, V. Ion exchangers *NHX1* and *NHX2* mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in *Arabidopsis* / V. Barragán, E.O. Leidi, Z. Andrés, L. Rubio, A. De Luca, J.A. Fernández, B. Cubero, J.M. Pardo // The Plant cell. — 2012. — V. 24. — No. 3. — P. 1127–1142.
21. Bavaresco L. Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine / L. Bavaresco, F. Mattivi, M. De Rosso, R. Flamini, // Mini Rev. Med. Chem. — 2012. — V. 12. — No.13. — P. 1366–1381.
22. Bavaresco L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine / L. Bavaresco // Drugs Exp. Clin. Res. — 2003. — V. 29. — No. 5–6. — P. 181–187.
23. Beck E.H. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening / E.H. Beck, R. Heim, J. Hansen // J. Biosci. — 2004. — V. 29. — P. 449–459.

24. Bekesiova I. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* / I. Bekesiova, J.P. Nap, L. Mlynarova // Plant Mol. Biol. Rep. — 1999. — V. 17. — P. 269–277.
25. Berardesca E. Review of the safety of octocrylene used as an ultraviolet filter in cosmetics / E. Berardesca, T. Zuberbier, M. Sanchez Viera, M. Marinovich // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. — 2019. — V. 33. — P. 25–33.
26. Bolton M.D. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire / M.D. Bolton // Mol. Plant Microbe Interact. — 2009. — V. 22. — No. 5. — P. 487–497.
27. Bowne J.B. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level / J.B. Bowne, T.A. Erwin, J. Juttner, T. Schnurbusch, P. Langridge, A. Bacic, U. Roessner, Alia, P. Saradhi, P. Mohanty // Mol. Plant. — 2012. — V. 5. — P. 418–429.
28. Braidot E. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.) / E. Braidot, M. Zancani, E. Petrucci, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui, F. Macri, A. Vianello // Plant Signal. Behav. — 2008. — V. 3. — No. 9. — P. 626–632.
29. Bray E.A. Responses to abiotic stresses / E.A. Bray, J. Bailey-Serres, E. Weretilnyk, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones // Biochem. Mol. Biol. Plant. ASPB, Rockville, MD, USA. — 2000. — P. 1158–1203.
30. Buer C.S. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light / C.S. Buer, G.K. Muday // The Plant cell. — 2004. — V. 16. — No. 5. — P. 1191–1205.
31. Caldwell C.R. Ultraviolet-induced photodegradation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) microsomal and soluble protein tryptophanyl residues *in vitro* / C.R. Caldwell // Plant physiology. — 1993. — V. 101. — No. 3. — P. 947–953.
32. Casati P. Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues / P. Casati, V. Walbot // Genome Biol. — 2003. — V. 5. — No. 3. — P. 16.
33. Castellarin M. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma / M. Castellarin, R. L. Warren, J. D. Freeman, L. Dreolini, M. Krzywinski, J. Strauss, R. Barnes, P. Watson, E. Allen-Vercoe, R.A. Moore, R.A. Holt // Genome research. — 2012. — V. 22. — No. 2. — P. 299–306.
34. Centritto M. Leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, and grain yield in contrasting rice genotypes subjected to water deficits during the reproductive stage / M. Centritto, M. Lauteri, M.C. Monteverdi, R. Serraj // J. Exp. Bot. — 2009. — V. 60. — P. 2325–2339.

35. Chaves M.M. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell / M.M. Chaves, J. Flexas, C. Pinheiro // *Ann. Bot.* — 2009. — V. 103. — P. 551–560.
36. Chaves O. S. Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone / O.S. Chaves, R.A. Gomes, A.C. Tomaz, M.G. Fernandes, L. das Graças Mendes, M. de Fátima Agra, V. Braga // *Molecules* (Basel, Switzerland). — 2013. — V. 18. — No. 3. — P. 2769–2777.
37. Chen K. Proteomic changes associated with freeze-thaw injury and post-thaw recovery in onion (*Allium cepa* L.) scales / K. Chen, J. Renaut, K. Sergeant, H. Wei, R. Arora // *Plant Cell Environ.* — 2013. — V. 36. — No. 4. — P. 892–905.
38. Chen L. OsMADS57 together with OsTB1 coordinates transcription of its target *OsWRKY94* and *D14* to switch its organogenesis to defense for cold adaptation in rice / L. Chen, Y. Zhao, S. Xu, Z. Zhang, Y. Xu, J. Zhang, K. Chong // *New Phytol.* — 2018. — V. 218. — P. 219–231.
39. Chinnusamy V. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants / V. Chinnusamy, K. Schumaker, J.K. Zhu // *J. Exp. Bot.* — 2004. — V. 55. — No. 395. — P. 225–236.
40. Chinnusamy V. Small RNAs: Big role in abiotic stress tolerance of plants. In: Jenks M.A., Hasegawa P.M., Jain S.M., editors. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops* / V. Chinnusamy, J. Zhu, T. Zhou, J.K. Zhu // Springer; Dordrecht, The Netherlands. — 2007. — P. 223–260.
41. Chipperfield M. P. Quantifying the ozone and ultraviolet benefits already achieved by the Montreal Protocol / M. P. Chipperfield, S. S. Dhomse, W. Feng, R. L. McKenzie, G. Velders, J. A. Pyle // *Nature Comm.* — 2015. — V. 6. — P. 7233.
42. Cichewicz R.H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners / R.H. Cichewicz // *Nat. Prod. Rep.* — 2010. — V. 27. — No. 1. — P. 11–22.
43. Conde A. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress / A. Conde, M.M. Chaves, H. Gerós // *Plant Cell Physiol.* — 2011. — V. 52. — P. 1583–1602.
44. Corpas F.J. Need of biomarkers of nitrosative stress in plants / F.J. Corpas, L.A. del Río, J.B. Barroso // *Trends. Plant. Sci.* — 2007. — V. 12. — P. 436–438.
45. Crafts- Brandner S.J. Effect of heat stress on the inhibition and the recovery of the ribulose- 1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase activation state / S.J. Crafts- Brandner, R.D. Law // *Planta.* — 2000. — V. 212. — P. 67– 74.

46. Cramer G. R. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective / G.R. Cramer, K. Urano, S. Delrot, M. Pezzotti, K. Shinozaki // BMC Plant Biology. — 2011. — V. 11. — P. 163.
47. Danon A. Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death / A. Danon, V.I. Rotari, A. Gordon, N. Mailhac, P. Gallois // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279. — No. 1. — P. 779–787.
48. Dawood M.F.A. Titanium dioxide nanoparticles model growth kinetic traits of some wheat cultivars under different water regimes / M. F. A. Dawood, A. H. A. Abeed, E. E. S. Aldaby // Indian J. Plant Physiol. — 2019. — V. 24. — P. 129–140.
49. De Tullio M.C. Antioxidants and redox regulation: changing notions in a changing world / M.C. De Tullio // Plant Physiol. Biochem. — 2010. — V. 48. — No. 5. — P. 289–291.
50. Delaunoy B. Molecular engineering of resveratrol in plants / B. Delaunoy, S. Cordelier, A. Conreux1, C. Clément, P. Jeandet // Plant Biotechnol. J. — 2009. — V. 7. — P. 2–12.
51. Depuydt S. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation / S. Depuydt, C.S. Hardtke // Curr. Biol. — 2011. — V. 21. — No. 9. — P. 365–373.
52. Dinneny J. R. Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress / J.R. Dinneny, T.A. Long, J.Y. Wang, J.W. Jung, D. Mace, S. Pointer, C. Barron, S.M. Brady, J. Schiefelbein, P.N. Benfey // Science. — 2008. — V. 320. — No. 5878. — P. 942–945.
53. Dry I.B. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase / I.B. Dry, S.P. Robinson // Plant Mol. Boil. — 1994. — V. 26. — No. 1. — P. 495–502.
54. Duan L. Salt-stress regulation of root system growth and architecture in *Arabidopsis* seedlings / L. Duan, J. Sebastian, J.R. Dinneny // Meth. Mol. Biol. — 2015. — V. 1242. — P. 105–122.
55. Dubrovina A.S. Age-associated alterations in the somatic mutation and DNA methylation levels in plants / A.S. Dubrovina, K.V. Kiselev // Plant Biol. — 2016. — V. 18. — No. 2. — P. 185–196.
56. Dubrovina A.S. Expression of calcium-dependent protein kinase (*CDPK*) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* / A.S. Dubrovina, K.V. Kiselev, V.S. Khristenko // J. Plant Physiol. — 2013. — V. 170. — No. 17. — P. 1491–1500.
57. Dubrovina A.S. Regulation of stilbene biosynthesis in plants / A.S. Dubrovina, K.V. Kiselev // Planta. — 2017. — V. 246. — No. 4. — P. 597–623.
58. Dubrovina A.S. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* / A.S. Dubrovina, A.Y.

- Manyakhin, Y.N. Zhuravlev, K.V. Kiselev // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 88. — No. 3. — P. 727–736.
59. Dubrovina A.S. True and false alternative transcripts of calcium-dependent protein kinase *CPK9* and *CPK3a* genes in *Vitis amurensis* / A.S. Dubrovina, O.A. Aleynova, K.V. Kiselev // Acta. Physiol. Plant. — 2014. — V. 36. — P. 1727–1737.
60. Dubrovina A.S. *VaCPK20*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., mediates cold and drought stress tolerance / A.S. Dubrovina, K.V. Kiselev, V.S. Khristenko, A.O. Aleynova // J. Plant Physiol. — 2015. — V. 185. — P. 1–12.
61. Echt C. S. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa / C. S. Echt, L. A. Erdahl, T. J. McCoy // Genome. — 1992. — V. 3. — No. 1. — P. 84–87.
62. Ehlert B. Chlorophyll fluorescence imaging accurately quantifies freezing damage and cold acclimation responses in *Arabidopsis* leaves / B. Ehlert, D. K. Hinch // Plant Methods. — 2008. — V. 4. — No. 1. — P. 12.
63. Ellis R. J. The molecular chaperone concept / R. J. Ellis // Seminars in cell Biology. — 1990. — V. 1. — P. 1–9.
64. Farooq M. Plant responses to drought stress / M. Farooq, M. Hussain, A. Wahid, K. H. M. Siddique // Springer, Berlin, Heidelberg. — 2012. — P. 1–6.
65. Faye I. Characterizing root responses to low phosphorus in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) / I. Faye, O. Diouf, A. Guisse, M. Sene, N. Diallo // J. Agron. — 2006. — V. 98. — P. 1187–1194.
66. Fedina I. UV-B induced stress responses in three rice cultivars / I. Fedina, J. Hidema, M. Velitchkova, K. Georgieva, D. Nedeva // Biol. Plant. — 2010. — V. 54. — No. 3. — P. 571–574.
67. Fiscus E. L. Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? / E. L. Fiscus, F. L. Booker // Photosynth. Res. — 1995. — V. 43. — No. 2. — P. 81–92.
68. Fitter A. Root system architecture determines fitness in an *Arabidopsis* mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions / A. Fitter, L. Williamson, B. Linkohr, O. Leyser // Proc. Biol. Sci. — 2002 — V. 269. — No. 1504. — P. 2017–2022.
69. Flamini R. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols / R. Flamini, F. Mattivi, M. De Rosso, P. Arapitsas, L. Bavaresco // Int. J. Mol. Sci. — 2013. — V. 14. — No. 10. — P. 19651–19669.
70. Flamini R. Study of grape polyphenols by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (UHPLC/QTOF) and suspect screening analysis / R. Flamini, M. De Rosso, L. Bavaresco // J. Anal. Methods Chem. — 2015. — P. 350259.

71. Frohnmeyer H. Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca^{2+} and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures / H. Frohnmeyer, L. Loyall, M. R. Blatt, A. Grabov // *Plant J.* — 1999. — V. 20. — No. 1. — P. 109–117.
72. Frohnmeyer H. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection / H. Frohnmeyer, D. Staiger // *Plant Physiol.* — 2003. — V. 133. — P. 1420–1428.
73. Fuchs I. Rice K^{+} uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress / I. Fuchs, S. Stölzle, N. Ivashikina, R. Hedrich // *Planta.* — 2005. — V. 221. — P. 212–221.
74. Gao J.P. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms: Recent studies on stress response in rice / J. P. Gao, D. Y. Chao, H. X. Lin // *J. Integr. Plant. Biol.* — 2007. — V. 49. — P. 742–750.
75. Gao S. Expression of *TERF1* in rice regulates expression of stress-responsive genes and enhances tolerance to drought and high-salinity / S. Gao, H. Zhang, Y. Tian, F. Li, Z. Zhang, X. Lu, X. Chen, R. Huang // *Plant Cell Rep.* — 2008. — V. 27. — P. 1787–1795.
76. Geahlen R. L. Inhibition of protein-tyrosine kinase activity by flavanoids and related compounds / R. L. Geahlen, N. M. Koonchanok, J. L. McLaughlin, D. E. Pratt // *J. Nat. Prod.* — 1989. — V. 52. — No. 5. — P. 982–986.
77. Gharibi S. The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech.f. / S. Gharibi., B. E. Sayed Tabatabaei, G. Saeidi, M. Talebi, A. Matkowski // *Phytochem.* — 2019. — V. 162. — P. 90–98.
78. Gill S. S. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants / S. S. Gill, N. Tuteja // *Plant signal. Behav.* — 2010. — V. 5. — No. 1. — P. 26–33.
79. Giorcelli A. Expression of the stilbene synthase (*StSy*) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides / A. Giorcelli, F. Sparvoli, F. Mattivi, A. Tava, A. Balestrazzi, U. Vrhovsek, P. Calligari, R. Bollini, M. Confalonieri // *Transgenic Res.* — 2004. — V. 13. — No. 3. — P. 203–214.
80. Giulietti A. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression / A. Giulietti, L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, B., R. Bouillon, C. Mathieu // *Methods.* — 2001. — V. 25. — No. 4. — P. 386–401.
81. Gong M. Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings / M. Gong, S. N. Chen, Y. Q. Song, Z.G. Li // *Aust. J. Plant Physiol.* — 1997. — V. 24. — P. 371–379.
82. Grayson M. Agriculture and drought / M. Grayson // *Nature.* — 2013. — V. 501. — P. 7468.
83. Gupta B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization / B. Gupta, B. Huang // *Int. J. Genom.* — 2014. — V. 70. — P. 1596.

84. Gurumurthy S. Morpho-physiological and biochemical changes in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) genotypes under drought stress at flowering stage / S. Gurumurthy, B. Sarkar, M. Vanaja, J. Lakshmi, S.K. Yadav, M. Maheswari. *Acta Physiol. Plant.* — 2019. — V. 41. — P. 42.
85. Gyula P. Light perception and signalling in higher plants / P. Gyula, E. Schäfer, F. Nagy // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2003. — V. 6. — No. 5. — P. 446–452.
86. Hall D. Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*) / D. Hall, V. De Luca // *Plant J.* — 2007. — V. 49. — No. 4. — P. 579–591.
87. Hammerbacher A. Biosynthesis of the major tetrahydroxystilbenes in spruce, astringin and isorhapontin, proceeds via resveratrol and is enhanced by fungal infection / A. Hammerbacher, S.G. Ralph, J. Bohlmann, T.M. Fenning, J. Gershenzon, A. Schmidt // *Plant Physiol.* — 2011. — V. 157. — No. 2. — P. 876–890.
88. Hanhineva K. Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*) / K. Hanhineva, H. Kokko, H. Siljanen, I. Rogachev, A. Aharoni, S.O. Kärenlampi // *J. Exp. Bot.* — 2009. — V. 60. — No. 7. — P. 2093–2106.
89. Hasanuzzaman M. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages / M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M. Fujita // *Springer.* — 2013. — P. 25–87.
90. Havlin J. *Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management*, 6th ed.; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, USA. — 1999. — P. 499; ISBN 0136268064.
91. Heijde M. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants / M. Heijde, R. Ulm // *Trends Plant Sci.* — 2012. — V. 17. — No. 4. — P. 230–237.
92. Herrera J. C. Grape metabolic response to postveraison water deficit is affected by interseason weather variability / J. C. Herrera, U. Hochberg, A. Degu, P. Sabbatini, N. Lazarovitch, S. D. Castellarin, A. Fait // *J. Agric. Food Chem.* — 2017. — V. 65. — P. 5868–5878.
93. Hilker M. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system / M. Hilker, J. Schwachtje, M. Baier, S. Balazadeh, I. Bäurle, S. Geiselhardt, D.K. Hinch, R. Kunze, B. Mueller-Roeber, M. C. Rillig, J. Rolff, T. Romeis, T. Schmölling, A. Steppuhn, J. van Dongen, S. J. Whitcomb, S. Wurst, E. Zuther, J. Kopka // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* — 2016. — V. 91. — No. 4. — P. 1118–1133.
94. Hinch D.K. Transcriptomic and metabolomic approaches to the analysis of plant freezing tolerance and cold acclimation. In: *Improving crop resistance to abiotic stress* / D.K.

- Hincha, C. Espinoza, E. Zuther // Weinheim: Wiley—VCH Verlag GmbH & Co. KG — 2012. — P. 255–87.
95. Hochberg U. Cultivar specific metabolic changes in grapevines berry skins in relation to deficit irrigation and hydraulic behavior / U. Hochberg, A. Degu, G. R. Cramer, S. Rachmilevitch, A. Fait // *Plant Physiol. Biochem.* — 2015. — V. 88. — P. 42–52.
 96. Hollósy F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells / F. Hollósy // *Micron.* — 2002. — V. 33. — No. 2. — P. 179–197.
 97. Hu Y. Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants / Y. Hu, U. Schmidhalter // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* — 2005. — V. 168. — P. 541–549.
 98. Huseynova I. M. Drought-induced changes in photosynthetic apparatus and antioxidant components of wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties / I. M. Huseynova, S. M. Rustamova, S. Y. Suleymanov, D. R. Aliyeva, A. C. Mammadov, J.A. Aliyev // *Photosynth. Res.* — 2016. — V. 130. — P. 215–223.
 99. Hussain H. A. Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities / H. A. Hussain, S. Hussain, A. Khaliq, U. Ashraf, S. A. Anjum, S. Men, L. Wang // *Front. Plant Sci.* — 2018. — V. 9. — P. 393.
 100. Ismail A. The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines / A. Ismail, M. Riemann, P. Nick // *J. Exp. Bot.* — 2012. — V. 63. — P. 2127–2139.
 101. Jiang Q. W. Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in Rice / Q. W. Jiang, O. Kiyoharu, I. Ryozyo // *Plant Physiol.* — 2002. — V. 129. — P. 1880–1891.
 102. Johkan M. Crop production and global warming. In: Casalegno S., editor. *Global Warming Impacts — Case Studies on the Economy, Human Health, and on Urban and Natural Environments* / M. Johkan, M. Oda, T. Maruo, Y. Shinohara // InTech; Rijeka, Croatia. — 2011. — P. 139–152.
 103. Kabiri R. Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *Nigella sativa* plant under hydroponic culture / R. Kabiri, F. Nasibi, H. Farahbakhsh // *Plant Prot.* — 2014. — V. 50. — P. 43–51.
 104. Kalbina I. Supplementary ultraviolet-B irradiation reveals differences in stress responses between *Arabidopsis thaliana* ecotypes / I. Kalbina, A. Strid // *Plant Cell Environ.* — 2006. — V. 29. — No. 5. — P. 754–763.
 105. Khoroshilova E. V. Photochemistry of uridine on high intensity laser UV irradiation / E. V. Khoroshilova, D. N. Nikogosyan // *J. Photochem. Photobiol. B.* — 1990. — V. 5. — No. 3–4. — P. 413–427.

106. Kiselev K. V. Effect of plant stilbene precursors on the biosynthesis of resveratrol in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures / K. V. Kiselev, O. A. Shumakova, A. Y. Maniakhin // Appl. Biochem. Microbiol. — 2013b. — V. 49. — No. 1. — P. 61–66.
107. Kiselev K. V. Involvement of DNA methylation in the regulation of *STS10* gene expression in *Vitis amurensis* / K.V. Kiselev, A. P. Tyunin, Y. N. Zhuravlev // Planta. — 2013a. — V. 237. — No. 4. — P. 933–941.
108. Kiselev K. V. Salicylic acid induces alterations in the methylation pattern of the *VaSTS1*, *VaSTS2*, and *VaSTS10* genes in *Vitis amurensis* Rupr. cell cultures / K. V. Kiselev, A. P. Tyunin, Y. A. Karetnin // Plant Cell Rep. — 2015. — V. 34. — No. 2. — P. 311–320.
109. Kiselev K. V. Stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis pathway genes in wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr. / K. V. Kiselev, O. A. Aleynova, V. P. Grigorchuk, A. S. Dubrovina // Planta. — 2017. — V. 245. — No. 1. — P. 151–159.
110. Kiselev K. V. Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis* / K. V. Kiselev, V. P. Grigorchuk, Z. V. Ogneva, A. R. Suprun, A. S. Dubrovina // Phytochem. — 2016b. — V. 131. — P. 57–67.
111. Kiselev K. V. The effect of ultraviolet-C and precursor feeding on stilbene biosynthesis in spruce *Picea jezoensis* / K. V. Kiselev, V. P. Grigorchuk, Z. V. Ogneva, A. R. Suprun, A. S. Dubrovina // J. Plant Physiol. — 2019a. — V. 234–235. — P. 133–137.
112. Kiselev K. V. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / K. V. Kiselev, A. S. Dubrovina, M. V. Veselova, V. P. Bulgakov, S. A. Fedoreyev, Y. N. Zhuravlev // J. Biotech. — 2007. — V. 128. — No. 3. — P. 681–692.
113. Kiselev K. V. Action of ultraviolet-C radiation and *p*-coumaric acid on stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis-related genes in the grapevine *Vitis amurensis* Rupr. / K. V. Kiselev, Z. V. Ogneva, A. R. Suprun // Acta Physiol. Plant. — 2019b. — V. 41. — P. 28.
114. Kiselev K. V. Expression of the stilbene synthase genes in the needles of spruce *Picea jezoensis* / K. V. Kiselev, Z. V. Ogneva, A. R. Suprun, Y. N. Zhuravlev // Russ. J. Genet. — 2016a. — V. 52. — P. 1157–1163.
115. Kostyuk V. Plant polyphenols against UV-C-induced cellular death / V. Kostyuk, A. Potapovich, T. Suhan, C. de Luca, G. Pressi, R. Dal Toso, L. Korkina // Planta Med. — 2008. — V. 74. — P. 509–514.
116. Krasensky J. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks / J. Krasensky, C. J. Jonak // Exp. Bot. — 2012. — V. 23. — No. 1. — P. 1–12.

117. Kronzucker H. J. Sodium transport in plants: A critical review / H. J. Kronzucker, D. T. Britto // *New Phytol.* — 2011. — V. 189. — P. 54–81.
118. Lam E. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death / E. Lam, O. del Pozo // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — V. 44. — No. 3. — P. 417–428.
119. Lamaoui M. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation / M. Lamaoui, M. Jemo, R. Datla, F. Bekkaoui // *Front. Chem.* — 2018. — V. 6. — P. 26.
120. Langcake P. A new class of phytoalexins from grapevines / P. Langcake, R.J. Pryce // *Experientia.* — 1977. — V. 33. — P. 151–152.
121. Larrosa M. The grape and wine polyphenol piceatannol is a potent inducer of apoptosis in human SK-Mel-28 melanoma cells / M. Larrosa, F. A. Tomás-Barberán, J. C. Espín // *Eur. J. Nutr.* — 2004. — V. 43. — No. 5. — P. 275–284.
122. Lata C. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants / C. Lata, M. J. Prasad // *Exp. Bot.* — 2011. — V. 62. — P. 4731–4748.
123. Lerda M. Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis / M. Lerda, P. D. Coley // *OIKOS.* — 2011. — V. 98. — P. 534–546.
124. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. Volume I: Chilling, freezing, and high temperature stresses / J. Levitt // *Physiological ecology.* New York: Academic Press; — 1980. — P. 497.
125. Lin J. K. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol / J. K. Lin, S. H. Tsai // *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.* — 1999. — V. 23. — P. 99–106.
126. Liu C. Resveratrols in Vitis berry skins and leaves: their extraction and analysis by HPLC / C. Liu, L. Wang, J. Wang, B. Wu, W. Liu, P. Fan, Z. Liang, S. Li // *Food Chem.* — 2013. — V. 136. — No. 2. — P. 643–649.
127. Liu Z. Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: *Arabidopsis UVH1* DNA repair gene is a homolog of *Saccharomyces cerevisiae Rad1* / Z. Liu, G. S. Hossain, M. A. Islas-Osuna, D. L. Mitchell, D. W. Mount // *Plant J. Plant Mol. Biol.* — 2000. — V. 21. — No. 6. — P. 519–528.
128. Livak K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods.* — 2001. — V. 25. — No. 4. — P. 402–408.
129. Lo C. Detection, characterization, and quantification of resveratrol glycosides in transgenic *Arabidopsis* over-expressing a sorghum stilbene synthase gene by liquid chromatography/tandem mass spectrometry / C. Lo, J. C. Le Blanc, C. K. Yu, K. H. Sze, D. C. Ng, I. K. Chu // *Rapid communications in mass spectrometry6: RCM.* — 2007. — V. 21. — No. 24. — P. 4101–4108.

130. Londo J. P. Divergence in the transcriptional landscape between low temperature and freeze shock in cultivated grapevine (*Vitis vinifera*) / J. P. Londo, A. P. Kovaleski, J. A. Lillis // Hort. Res. — 2018. — V. 5. — P. 10.
131. Loutfy N. Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*) / N. Loutfy, M. A. El-Tayeb, A. M. Hassanen, M. F. M. Moustafa, Y. Sakuma, M. J. Inouhe // Plant Res. — 2012. — V. 125. — P. 173–184.
132. Luo Y. Y. Dynamic accumulation analysis on bioactive constituents of *Polygonum multiflorum* in different collection periods / Y. Y. Luo, J. X. Liu, X. H. Liu, C. W. Lan, Y. Hou, Y. Ma, S. N. Wang, B. C. Cai // China J. Chin. Materia Medica. — 2015. — V. 40. — No. 13. — P. 2565–2570.
133. Lutts S. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance / S. Lutts, J. M. Kinet, J. Bouharmont // Plant Growth Regul. — 1996. — V. 19. — P. 207–218.
134. Lynch J. M. Beneficial interactions between micro-organisms and roots / J. M. Lynch // Biotechnol. Adv. — 1990. — V. 8. — No. 2. — P. 335–346.
135. Ma F. Dynamic translocation of stilbene synthase *VpSTS29* from a Chinese wild *Vitis* species upon UV irradiation / F. Ma, W. Yao, L. Wang, Y. Wang // Phytochemistry. — 2019. — V. 159. — P. 137–147.
136. Maathuis F. J. Regulation of Na⁺ fluxes in plants / F. J. Maathuis, I. Ahmad, J. Patishtan // Front. Plant Sci. — 2014. — V. 5. — P. 467–467.
137. Maestri E. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals / E. Maestri, N. Klueva, C. Perrotta, M. Gulli, T. Nguyen, N. Marmioli // J. Plant Mol. Biol. — 2002. — V. 48. — P. 667–681.
138. Marcińska I. Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics in drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes / I. Marcińska, I. Czyżyło-Mysza, E. Skrzypek, M. Filek, S. Grzesiak, M. T. Grzesiak, F. Janowiak, T. Hura, K. Dziurka, M. Dziurka, M. Nowakowska // Acta Physiol. Plant. — 2013. — V. 35. — P. 451–461.
139. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants / H. Marschner // Ann Bot. — 1995. — V. 78. — P. 527–528.
140. Matilla M. A. Complete genome of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1 / M. A. Matilla, P. Pizarro-Tobias, A. Roca, M. Fernández, E. Duque, L. Molina, X. Wu, D. van der Lelie, M. J. Gómez, A. Segura, J. L. Ramos // J. bacteriol. — 2011. — V. 193. — No. 5. — P. 1290.

141. Matysik F. M. Special aspects of detection methodology in nonaqueous capillary electrophoresis / F. M. Matysik // *Electrophoresis*. — 2002. — V. 23. — No. 3. — P. 400–407.
142. McKenzie R. L. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface / R. L. McKenzie, L. O. Björn, A. Bais, M. Ilyasad // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2003. — V. 2. — No. 1. — P. 5–15.
143. Mickelbart M. V. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability / M. V. Mickelbart, P. M. Hasegawa, J. Bailey-Serres // *J. Nat. Rev. Genet.* — 2015. — V. 16. — P. 237–251.
144. Mittler R. ROS signaling: the new wave? / R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V. B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, F. Van Breusegem // *Trends Plant Sci.* — 2011. — V. 16. — No. 6. — P. 300–309.
145. Mobasser H. R. Effect of application elements, water stress and variety on nutrients of grain wheat in Zahak region, Iran / H. R. Mobasser, G. N. Mohammadi, H. H. S. Abad, K. Rigi // *JBES*. — 2014. — V. 5. — P. 105–110.
146. Molinier J. Regulation and role of *Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2* in maintaining genome integrity upon UV stress / J. Molinier, E. Lechner, E. Dumbliauskas, P. Genschik // *PLoS Genet.* — 2008. — V. 4. — No. 6.
147. Moreno A. A. The physiological role of the unfolded protein response in plants / A. A. Moreno, A. Orellana // *Biol. Res.* — 2011. — V. 44. — P. 75–80.
148. Munns R. Mechanisms of salinity tolerance / R. Munns, M. Tester // *Ann. Rev. Plant Biol.* — 2008. — V. 59. — P. 651–681.
149. Murashige T. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F.A. Skoog // *Physiol. Plantarum*. — 1962. — V. 15. — P. 473–497.
150. Nahar K. Phenological variation and its relation with yield in several wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under normal and late sowing mediated heat stress condition / K. Nahar, K. U. Ahamed, M. Fujita // *Not. Sci. Biol.* — 2010. — V. 2. — P. 51–56.
151. Nakajima S. Cloning and characterization of a gene (*UVR3*) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana* / S. Nakajima, M. Sugiyama, S. Iwai, K. Hitomi, E. Otsoshi, S.T. Kim, C. Z. Jiang, T. Todo, A. B. Britt, K. Yamamoto // *Nucleic Acids Res. Spec. Publ.* — 1998. — V. 26. — No. 2. — P. 638–644.
152. Nawkar G. M. UV-induced cell death in plants / G. M. Nawkar, P. Maibam, J. H. Park, V. P. Sahi, S. Y. Lee, C. H. Kang // *Int. J. Mol. Sci.* — 2013. — V. 14. — No. 1. — P. 1608–1628.
153. Ogneva Z. V. Effect of 5-azacytidine induced DNA demethylation on abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* / Z. V. Ogneva, A. R. Suprun, A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // *Plant Protect. Sci.* — 2019. — V. 55. — P. 73–80.

154. Ogneva Z. V. Exogenous stilbenes improved tolerance of *Arabidopsis thaliana* to a shock of ultraviolet B radiation / Z. V. Ogneva, V. V. Volkonskaia, A. S. Dubrovina, A. R. Suprun, O. A. Aleynova, K. V. Kiselev // Plants. — 2021b. — V. 10. — P. 1282.
155. Ogneva Z. V. Tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing grapevine *VaSTS1* or *VaSTS7* genes to cold, heat, drought, salinity, and ultraviolet irradiation / Z. V. Ogneva, O. A. Aleynova, A. R. Suprun, Y. A. Karetin, A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // Biol. Plant. — 2021a. — V. 65. — P. 111-117.
156. Outoukarte I. Use of morpho-physiological parameters and biochemical markers to select drought tolerant genotypes of durum wheat // I. Outoukarte, A. El Keroumi, A. Dihazi, K. Naamani // J. Plant Stress Phys. — 2019. — P. 1-7.
157. Pagter M. Rapid transcriptional and metabolic regulation of the deacclimation process in cold acclimated *Arabidopsis thaliana* / M. Pagter, J. Alpers, A. Erban, J. Kopka, E. Zuther, D. K. Hincha // BMC Genom. — 2017. — V. 18. — No. 1. — P. 731.
158. Pandey V. Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress / V. Pandey, A. Shukla // Rice Sci. — 2015. — V. 22. — P. 147-161.
159. Parage C. Structural, functional, and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine / C. Parage, R. Tavares, S. Réty, R. Baltenweck-Guyot, A. Poutaraud, L. Renault, D. Heintz, R. Lugan, G. A. Marais, S. Aubourg, P. Hugueney // Plant Physiol. — 2012. — V. 160. — No. 3. — P. 1407-1419.
160. Peleg Z. Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: Getting closer to the field / Z. Peleg, M. P. Apse, E. Blumwald // Adv. Bot. Res. — 2011. — V. 57. — P. 405-443.
161. Pezet R. Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves / R. Pezet, C. Perret, J. B. Jean-Denis, R. Tabacchi, K. Gindro, O. Viret // J. Agric. Food Chem. — 2003. — V. 51. — P. 5488-5492.
162. Piramila B. H. M. Effect of heat treatment on germination, seedling growth and some biochemical parameters of dry seeds of black gram / B.H.M. Piramila, A.L. Prabha, V. Nandagopalan, A.L. Stanley // Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res. — 2012. — V. 1. — P. 194-202.
163. Pires I. S. Comprehensive phenotypic analysis of rice (*Oryza sativa*) response to salinity stress / I. S. Pires, S. Negrão, M. M. Oliveira, M. D. Purugganan // Physiol. Plant. — 2015. — V. 155. — No. 1. — P. 43-54.
164. Porter J. R. Research beyond the means: climatic variability and plant growth / J. R. Porter, D. J. Moot // In International Symposium on Applied Agrometeorology and Agroclimatology (ed. N.R. Dalezios). — 1998. — P. 13-23.

165. Rajeevkumar S. Epigenetic silencing in transgenic plants / S. Rajeevkumar, P. Anunanthini, R. Sathishkumar // *Front. Plant Sci.* — 2015. — V. 6. — P. 693.
166. Rama R. Detection and validation of stay-green QTL in post-rainy sorghum involving widely adapted cultivar, M35-1 and a popular stay-green genotype B35 / R. Rama, R. Nagaraja, M. Ragimasalawada, M. M. Sabbavarapu, S. Nadoor, J.V. Patil // *BMC Genomic.* — 2014. — V. 15. — P. 909.
167. Reddy A. R. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants / A. R. Reddy, K. V. Chaitanya, M. Vivekanandan // *Plant Physiol.* — 2004. — V. 161. — P. 1189–1202.
168. Riadh H. Pediatric case of ophthalmoplegic migraine with recurrent oculomotor nerve palsy / H. Riadh, G. Mohamed, Y. Salah, T. Fehmi, B. H. Fafani // *Can. J. Ophthalmol.* — 2010. — V. 45. — No. 6. — P. 643.
169. Rice-Evans C. A. Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? / C. A. Rice-Evans, J. Sampson, P. M. Bramley, D. E. Holloway // *Free Radic. Res.* — 1997. — V. 26. — No. 4. — P. 381–398.
170. Robberecht R. Leaf UV optical properties of *Rumex patertia* L. in regard to a protective mechanism against solar UV-B radiation injury / R. Robberecht, M.M. Caldwell // *NATO ASI Series.* — 1986. — V. 8. — P. 251–259.
171. Rodríguez M. Molecular aspects of abiotic stress in plants / M. Rodríguez, E. Canales, O. Borrás-Hidalgo // *Biotechnol. Appl.* — 2005. — V. 22. — P. 1–10.
172. Roy S. J. Salt resistant crop plants / S. J. Roy, S. Negrão, M. Tester // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2014. — V. 26. — P. 115–124.
173. Sallam A. drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research / A. Sallam, A. M. Alqudah, M. Dawood, P. S. Baenziger, A. Börner // *Int. J. Mol. Sci.* — 2019. — V. 20. — No. 13. — P. 3137.
174. Šamec D. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure / E. Karalija, I. Šola, V.Vujčić Bok, B. Salopek-Sondi // *Plants.* — 2021. — V. 10. — No. 1. — P. 118.
175. Sánchez-Rodríguez E. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants / E. Sánchez-Rodríguez, M. Rubio-Wilhelmi, L. M. Cervilla, B. Blasco, J. J. Rios, M. A. Rosales, J. M. Ruiz // *Plant Sci.* — 2010. — V. 178. — P. 30–40.
176. Sardans J. Drought's impact on Ca, Fe, Mg, Mo and S concentration and accumulation patterns in the plants and soil of a Mediterranean evergreen *Quercus ilex* forest / J. Sardans, J. Peñuelas, R. Ogaya // *Biogeochem.* — 2008. — V. 87. — P. 49–69.

177. Schachtman D. P. Chemical root to shoot signaling under drought / D. P. Schachtman, J. Q. Goodger // Trends Plant Sci. — 2018. — V. 13. — P. 281–287.
178. Schmidlin L. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine / L. Schmidlin, A. Poutaraud, P. Claudel, P. Mestre, E. Prado, M. Santos-Rosa, S. Wiedemann-Merdinoglu, F. Karst, D. Merdinoglu, P. Hugueney // Plant Physiol. — 2008. — V. 148. — No. 3. — P. 1630–1639.
179. Schroeter H. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide / H. Schroeter, C. Boyd, J.P. Spencer, R.J. Williams, E. Cadenas, C. Rice-Evans // Neurobiol. Aging. — 2002. — V. 23. — No. 5. — P. 861–880.
180. Schuppler U. Effects of water stress on cell division and cell-division-cycle-2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves / U. Schuppler, P. H. He, P. C. L. John, R. Munns // Plant Physiol. — 1998. — V. 117. — P. 667–678.
181. Selmar D. The storage of green coffee (*Coffea arabica*): decrease of viability and changes of potential aroma precursors / D. Selmar, G. Bytof, S. E. Knopp // Ann. Bot. — 2008. — V. 101. — No. 1. — P. 31–38.
182. Shabala S. Potassium transport and plant salt tolerance / S. Shabala, T. A. Cuin // Physiol. Plant. — 2008. — V. 133. — P. 651–669.
183. Sharma A. *UVR8* disrupts stabilisation of *PIF5* by *COPI* to inhibit plant stem elongation in sunlight / A. Sharma, B. Sharma, S. Hayes, K. Kerner, U. Hoecker, G. I. Jenkins, K. A. Franklin // Nature Comm. — 2019. — V. 10. — No. 1. — P. 4417.
184. Sharma P. Assessing genetic variation for heat stress tolerance in Indian bread wheat genotypes using morpho-physiological traits and molecular markers / P. Sharma, S. Sareen, M. Saini // Shefali Plant Genet. Resour. — 2017. — V. 15. — P. 539–547.
185. Shui-Lin H. E. Advances of biological function, regulatory mechanism of biosynthesis and genetic engineering of in stilbenes plant / H. E. Shui-Lin, J. C. Zheng, M. Lin, Y. H. Wang // J. Agr. Biotechnol. — 2004. — V. 12. — P. 102–108.
186. Shumakova O. A. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with coumaric acid / O. A. Shumakova, A. Y. Manyakhin, K. V. Kiselev // App. Biochem. Biotechnol. — 2011. — V. 165. — No. 5–6. — P. 1427–1436.
187. Simontacchi M. Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress / M. Simontacchi, A. Galatro, F. Ramos-Artuso, G. E. Santa-María // Front. Plant Sci. — 2015. — V. 6. — P. 977.

188. Sobolev V. S. Spermidine and flavonoid conjugates from peanut (*Arachis hypogaea*) flowers / V. S. Sobolev, A. A. Sy, J. Gloer // J. Agric. Food Chem. — 2008. — V. 56. — No. 9. — P. 2960–2969.
189. Sparvoli F. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.) / F. Sparvoli, C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi, C. Tonelli // Plant Mol. Biol. — 1994. — V. 24. — No. 5. — P. 743–755.
190. Srivastava S. Hydrogen peroxide-scavenging enzymes impart tolerance to high temperature induced oxidative stress in sugarcane / S. Srivastava, A.D. Pathak, P.S. Gupta, A.K. Shrivastava, A.K. Srivastava // J. Environ. Biol. — 2012. — V. 33. — P. 657–661.
191. Steponkus P. L. A unified concept of stress in plants? / P. L. Steponkus // Basic Life Sci. — 1979. — V. 14. — P. 235–255.
192. Suesslin C. An *Arabidopsis* mutant defective in UV-B light-mediated responses / C. Suesslin, H. Frohnmeyer // Plant J. Plant Mol. Biol. — 2003. — V. 33. — No. 3. — P. 591–601.
193. Suprun A. R. Effect of spruce *PjSTS1a*, *PjSTS2*, or *PjSTS3* gene overexpression on stilbene biosynthesis in callus cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / A. R. Suprun, Z. V. Ogneva, A. S. Dubrovina, K. V. Kiselev // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2020. — V. 67. — P. 234–239.
194. Suzuki M. Multiomics in grape berry skin revealed specific induction of the stilbene synthetic pathway by ultraviolet-C irradiation / M. Suzuki, R. Nakabayashi, Y. Ogata, N. Sakurai, T. Tokimatsu, S. Goto // Plant Physiol. — 2015. — V. 168. — No. 47. — P. 47–59.
195. Suzuki N. Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants / N. Suzuki, G. Miller, C. Salazar, H. A. Mondal, E. Shulaev, D. F. Cortes, J. L. Shuman, X. Luo, J. Shah, K. Schlauch // Plant Cell. — 2013. — V. 25. — P. 3553–3569.
196. Takahashi D. Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance / D. Takahashi, L. Bin, T. Nakayama, Y. Kawamura, M. Uemura // Front Plant Sci. — 2013. — V. 4. — P. 1–5.
197. Tang K. Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings / K. Tang, J. C. Zhan, H. R. Yang, W. D. Huang // J. Plant Physiol. — 2010. — V. 167. — No. 95. — P. 95–102.
198. Tarkowski L. P. Cold tolerance triggered by soluble sugars: a multifaceted countermeasure / L. P. Tarkowski, W. van den Ende // Front Plant Sci. — 2015. — V. 6. — P. 203.
199. Tester M. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants / M. Tester, R. Davenport // Ann Bot. — 2003. — V. 91. — P. 503–527.
200. Thalhammer A. Disordered cold regulated15 proteins protect chloroplast membranes during freezing through binding and folding, but do not stabilize chloroplast enzymes in vivo /

- A. Thalhammer, G. Bryant, R. Sulpice, D. K. Hinch / *Plant Physiol.* — 2014. — V. 166. — No. 1. — P. 190–201.
201. Thompson A. J. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion / A. J. Thompson, J. Andrews, B. J. Mulholland, J. M. McKee, H. W. Hilton, J. S. Horridge, G. D. Farquhar, R. C. Smeeton, I. R. Smillie, C. R. Black, I. B. Taylor // *Plant Physiol.* — 2007. — V. 143. — No. 4. — P. 1905–1917.
202. Tiwari V. The transcriptional regulatory mechanism of the peroxisomal ascorbate peroxidase (*pAPX*) gene cloned from an extreme halophyte, *Salicornia brachiata* / V. Tiwari, A. K. Chaturvedi, A. Mishra, B. Jha // *Plant Cell Physiol.* — 2014. — V. 55. — No. 1. — P. 201–217.
203. Todaka D. Toward understanding transcriptional regulatory networks in abiotic stress responses and tolerance in rice / D. Todaka, K. Nakashima, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // *Rice.* — 2012. — V. 5. — No. 1. — P. 6.
204. Tyunin A. P. Alternations in *VaSTS* gene cytosine methylation and *t*-resveratrol production in response to UV-C irradiation in *Vitis amurensis* Rupr. Cells / A. P. Tyunin, K. V. Kiselev // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* — 2016. — V. 124. — P. 33–45.
205. Tyunin A. P. Differences in the methylation patterns of the *VaSTS1* and *VaSTS10* genes of *Vitis amurensis* Rupr. / A. P. Tyunin, K. V. Kiselev, Y. A. Karetn // *Biotechnol. Lett.* — 2013. — V. 35. — P. 1525–1532.
206. Tyunin A. P. Stilbene content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with cinnamic and caffeic acids / A. P. Tyunin, N. N. Nityagovsky, V. P. Grigorchuk, K. V. Kiselev // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2018. — V. 65. — No. 2. — P. 150–155
207. Tyunin A. P. The effect of explant origin and collection season on stilbene biosynthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. / A. P. Tyunin, A. R. Suprun, N. N. Nityagovsky // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* — 2019. — V. 136. — P. 189–196.
208. 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, S. Vyas, J. Li, Y. Leitner-Dagan, A. Krichevsky, T. Taylor, A. Vainstein, V. Citovsky // *Plant Mol. Biol.* — 2005. — V. 57. — No. 4. — P. 503–516.
209. Uemura M. Effect of cold acclimation on membrane lipid composition and freeze induced membrane destabilization, plant cold hardiness / M. Uemura, P.L. Steponkus // *Mol. Biol., Biochem. Physiol.* — 1997. — P. 171–179.

210. Uemura M. Responses of the plasma membrane to low temperatures / M. Uemura, Y. Tominaga, C. Nakagawara, S. Shigematsu, A. Minami, Y. Kawamura // *Physiol Plant.* — 2006. — V. 126. — No. 1. — P. 81–89.
211. Ulm R. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the *bZIP* transcription factor *HY5* in the UV-B response of *Arabidopsis* / R. Ulm, A. Baumann, A. Oravecz, Z. Máté, E. Adám, E. J. Oakeley, E. Schäfer, F. Nagy // *PNAS.* — 2004. — V. 101. — No. 5. — P. 1397–1402.
212. Valletta A. Impact of environmental factors on stilbene biosynthesis / A. Valletta, L. M. Iozia, F. Leonelli // *Plants.* — 2021. — V. 2010. — No. 1. — P. 90.
213. Valliyodan B. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants / B. Valliyodan, H. T. Nguyen // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2006. — V. 9. — P. 189–195.
214. Vinocur B. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations / B. Vinocur, A. Altman // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2005. — V. 16. — P. 123–132.
215. Voesenek L. A. Plant science. Plant stress profiles / L. A. Voesenek, R. Pierik // *Science.* — 2008. — V. 320. — No. 5878. — P. 880–881.
216. Vyse K. Deacclimation after cold acclimation – a crucial, but widely neglected part of plant winter survival / K. Vyse, M. Pagter, E. Zuther, D. Hinch // *J. Exp. Bot.* — 2019. — V. 70. — No. 18. — P. 4595–4604.
217. Wahid A. Heat tolerance in plants: An overview / A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf, M.R. Foolad // *Environ. Exp. Bot.* — 2007. — V. 61. — P. 199–223.
218. Wang Y. Genes controlling plant architecture / Y. Wang, J. Li // *J. Curr. Opin. Biotechnol.* — 2006. — V. 17. — No. 2. — P. 123–129.
219. Wani Z. A. Molecular phylogeny, diversity, community structure, and plant growth promoting properties of fungal endophytes associated with the corms of saffron plant: An insight into the microbiome of *Crocus sativus* Linn. / Z. A. Wani, D. N. Mirza, P. Arora, S. Riyaz-Ul-Hassan // *Fungal biol.* — 2016. — V. 120. — No. 12. — P. 1509–1524.
220. Waraich E. A. Alleviation of temperature stress by nutrient management in crop plants: A review / E. A. Waraich, R. Ahmad, A. Halim, T. Aziz // *J. Soil Sci. Plant Nutr.* — 2012. — V. 12. — P. 221–244.
221. Warmund M.R. Temperatures and cold damage to small fruit crops across the Eastern United States associated with the April 2007 freeze / M. R. Warmund, P. Guinan, G. Fernandez // *Hortic Sci.* — 2008. — V. 43. — No. 6. — P. 1643–1647.

222. Weis E. Plants and high temperature stress / E. Weis, J. A. Berry // Symp. Soc. Exp. Biol. — 1998. — V. 42. — P. 329-346.
223. Wiese W. Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment / W. Wiese, B. Vornam, E. Krause, H. Kindl // Plant Mol.Biol. — 1994. — V. 26. — No. 2. — P. 667-677.
224. Xi H. Transcriptomic analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves after exposure to ultraviolet C irradiation / H. Xi, L. Ma, G. Liu, N. Wang, J. Wang, L. Wang, Z. Dai, S. Li, L. Wang // PloS one. — 2015. — V. 9. — No. 12. e113772.
225. Xu W. Absciscic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress / W. Xu, L. Jia, W. Shi, J. Liang, F. Zhou, Q. Li, J. Zhang // New Phytol. — 2013. — V. 197. — P. 139-150.
226. Yang T. Deep sequencing-based characterization of transcriptome of *Pyrus ussuriensis* in response to cold stress / T. Yang, X. S. Huang // Gene. — 2018. — V. 661. — P. 109-118.
227. Yolcu S. Histone acetylation influences the transcriptional activation of *POX* in *Beta vulgaris* L. and *Beta maritima* L. under salt stress / S. Yolcu, F. Ozdemir, A. Güler, M. Bor // Plant Physiol. Biochem. — 2016. — V. 100. — P. 37-46.
228. Yu C. K. A stilbene synthase gene (*SbSTS1*) is involved in host and nonhost defense responses in sorghum / C. K. Yu, K. Springob, J. Schmidt, R. L. Nicholson, I. K. Chu, W. Yip, C. Lo // Plant Physiol. — 2005. — V. 38. — No. 1. — P. 393-401.
229. Yu C. K. Constitutive accumulation of cis-piceid in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a sorghum stilbene synthase gene / C. K. Yu, C. N. Lam, K. Springob, J. Schmidt, I. K. Chu, C. Lo // Plant Cell Physiol. — 2006. — V. 47. — No. 7. — P. 1017-1021.
230. Zhang F. The *ICE-CBF-COR* pathway in cold acclimation and AFPs in plants / F. Zhang, Y. Jiang, L. Bai, L. Zhang, L. Chen, H. G. Li, Y. Yin, W. Yan // Middle-East J. Sci. Res. — 2011. — V. 8. — P. 493-498.
231. Zhao C. Cold responsive gene transcription becomes more complex / C. Zhao, Z. Lang, J. K. Zhu // Trends Plant Sci. — 2015. — V. 20. — P. 466-468.
232. Zhu J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants / J. K. Zhu // Annu. Rev. Plant Biol. — 2002. — V. 53. — P. 247-273