

На правах рукописи

ОГНЕВА ЗЛАТА ВЛАДИМИРОВНА

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

1.5.6 – биотехнология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, flowing letters, likely representing the author's name.

ВЛАДИВОСТОК – 2021

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Киселев Константин Вадимович

Официальные оппоненты: **Кулуев Булат Разяпович**, доктор биологических наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, в.н.с. лаборатории геномики растений

Кипрюшина Юлия Олеговна, кандидат биологических наук, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского» ДВО РАН, н.с. лаборатории клеточных технологий

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» СО РАН, г. Новосибирск

Защита состоится «18» февраля 2022 г. в «10» часов на заседании диссертационного совета Д 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423)2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

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

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

Автореферат разослан « » декабря 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Тюнин А.П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Неблагоприятные климатические условия, вызывающие абиотические стрессы, являются одними из основных факторов снижения продуктивности сельского хозяйства (Grayson 2013). 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). Показано, что эти стрессы влияют на большие площади земель и значительно влияют на качественные и количественные потери в растениеводстве (Cramer et al., 2011). Именно 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, которые играют важную роль в устойчивости растений к некоторым биотическим и абиотическим стрессовым факторам, в том числе к ультрафиолету. 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 и поиска эффективных биотехнологических подходов для защиты растений.

Степень разработанности темы

В течение последних десятилетий огромное количество исследований было направлено на выделение, определение структуры и биологической активности стильбенов. Тем не менее, подробные пути и регулирование биосинтеза этих соединений изучены слабо, так что поиск соответствующих ферментов, генов, а так же абиотических и биотических стрессовых факторов имеет большое значение для определения их подробных путей биосинтеза и понимания регуляции метаболизма.

Цели 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.

Научная новизна

Впервые было показано положительное влияние сверхэкспрессии генов стильбен синтаз на устойчивость растений арабидопсиса *A. thaliana* к ультрафиолетовому облучению. Так же в данной работе впервые с помощью прямого нанесения стильбенов (*транс*-резвератрола или *транс*-ресвератрола) на листья растений было показано их защитное действие против ультрафиолета.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты могут быть использованы для создания генетических конструкций и методологических подходов коммерческими компаниями для регуляции клеточного роста и биосинтеза вторичных метаболитов растений. Также результаты диссертационной работы можно использовать для проведения теоретических и практических занятий в университете на биологических факультетах.

Методология и методы диссертационного исследования

Для проведения исследований в рамках данной диссертационной работы были применены традиционные и современные методы биотехнологии, биохимии и молекулярной биологии. Выделение ДНК проводили с использованием протокола экстракции, разработанным Эхтом и др. (Echt et al., 1992) с небольшими модификациями (Kiselev et al., 2015). Выделение РНК проводили с использованием протокола экстракции с использованием цетилтриметиламмоний бромида и хлорида лития, разработанным Bekesiova и др. (Bekesiova et al., 1999) с небольшими модификациями (Dubrovina et al., 2013). Статус цитозинового метилирования был проанализирован с использованием бисульфитного секвенирования, как описано у Kiselev et al., 2013b. Для количественного анализа экспрессии генов *STS* использовали ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ). Экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Для агробактериальной трансформации использовали бинарную векторную систему на основе плазмид pZP и pMP90 (Tzfira et al., 2005) и штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90. Трансгенные растения *A. thaliana* были получены методом цветочного погружения, как описано ранее (Dubrovina et al., 2015). Для анализа содержания вторичных метаболитов была проведена ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрией высокого

разрешения как описано у Aleynova et al., 2016. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

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.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обеспечивается за счет использования апробированных методик, взаимодополняющих друг друга, статистической обработки результатов и воспроизводимости экспериментов. Полученные результаты полностью соответствуют записям в рабочих журналах и протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы подкрепляются экспериментальными данными, приведенными в виде рисунков и таблиц.

Апробация работы

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

Публикации

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

Структура и объём 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 наименований.

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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрено пагубное влияние и механизмы устойчивости растений к различным абиотическим стрессам, а также роль стильбенов в ответе на различные стрессовые воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал и условия выращивания. Для экстракции стильбенов и анализа экспрессии генов *PjSTS* была выделена РНК из хвои 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.). Дикорастущие растения *Vitis amurensis* Rupr. (Vitaceae) были взяты из незащищенной природной популяции близ города Владивосток, Россия. Молодые побеги *V. amurensis* были собраны в октябре 2016 г. 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 (Aleynova-Shumakova et al., 2014). Для получения трансгенных растений использовали *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экотипа Columbia.

Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК (кДНК). 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). Выделение РНК из клеток *V. amurensis*, *P. jezoensis* и *A. thaliana* проводили с использованием протокола экстракции с использованием цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) и хлорида лития, 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 Евrogen (Москва, Россия), как описано ранее (Dubrovina et al., 2014).

Получение полных последовательностей генов STS. Полноразмерную кДНК *P. jezoensis* *PjSTS1a* (GenBank: LT158484), *PjSTS1b* (GenBank: LT158485), *PjSTS2* (GenBank: LT158486) и *PjSTS3* (GenBank: LT158487) амплифицировали на основе известных последовательностей мРНК *P. abies*: *PaSTS1* (JN400048) и *PaSTS2* (JN400047); *P. glauca*: *PgSTS1* (JN400069) и *PgSTS2* (JN400070); *P. sitchensis*: *PsSTS1* (JN400059) и *PsSTS2* (JN400058). Полноразмерные кДНК транскриптов *V. amurensis* *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали из кДНК культуры клеток винограда V2 с использованием праймеров, 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 ранее (Kiselev et al., 2016b). 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 с добавлением селективного маркера ампициллина (50 мг/л). Выросшие колонии *E. coli* использовали в ПЦР с праймерами pJet. 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) и BioEdit 7.0.8 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Аминокислотные последовательности были предсказаны с помощью программы Gene Runner 3.05.

Бисульфитное секвенирование. Недельные проростки *A. thaliana* были обработаны 5-Азациитидином (5A) как описано ранее (Ogneva et al., 2019). Тотальную ДНК выделяли из 20 мг высушенных смешанных тканей (были смешаны все типы тканей надземных частей растений) у восьминедельных растений *A. thaliana*, как описано ранее (Kiselev et al., 2015). Статус цитозинового метилирования участков генов *VaSTS1* и *VaSTS7* *V. amurensis* были проанализированы с использованием бисульфитного секвенирования, как описано ранее (Tyunin et al., 2013). После бисульфитной обработки ДНК фрагменты белок-кодирующих последовательностей генов *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали с использованием праймеров для генов *STS* для бисульфитного секвенирования, разработанных для белок-кодирующих последовательностей генов *VaSTS1* и *VaSTS7*. Праймеры были разработаны в соответствии с рекомендациями для набора DNA Methylation-Gold Kit (Irvine, CA, USA). Реакцию амплификации и клонирование проводили, как описано ранее (Kiselev et al., 2013b). Было секвенировано 16 клонов для каждой области ДНК из 2 биологических повторов (8 клонов на каждое отдельное растение). Множественное выравнивание последовательностей проводили с использованием программы ClustalX (Altschul et al., 1990).

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). 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 DTrime 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». Экспрессию генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001). Полученные значения транскрипции исследуемых генов нормализовали на полученное количество фрагментов кДНК для гена *AtActin* (GenBank: NM_112764) и *AtGAPDH* (NM_111283) для анализа экспрессии в *A. thaliana*; *VvGAPDH* (GU585870) и *VaActin* (DQ517935) для винограда *V. amurensis*; *PjActin* (LT158488) и *PjGAPDH* (LT158489) в ел аянской *P. jezoensis*.

Получение трансгенных клеток *V. amurensis* и растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS1*, 7, *PjSTS1*, 2, 3. Для агробактериальной трансформации использовали бинарную векторную систему 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*. В используемом бинарном векторе гены *STS1* и *nptII* были под контролем двойного CaMV 35S промотора. Для создания конструкций для трансформации растительных

клеток, полноразмерные кДНК вариантов транскриптов *VaSTS1* и *VaSTS7* амплифицировали с помощью ПЦР. Полноразмерные кДНК генов *VaSTS1* и *VaSTS7* были клонированы в промежуточный вектор pSAT1 (Tzfira et al., 2005). Затем экспрессионные кассеты из pSAT1a клонировали в вектор pZP-RCS2-*nptII*. Конструкция pZP-RCS2-*nptII* также несла ген *nptII*. Трансгенные линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие гены *VaSTS1* и *VaSTS7* были получены методом агробактериальной трансформации, как описано ранее (Dubrovina et al., 2015). 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 *V. amurensis* обрабатывали соответствующими штаммами агробактерий *A. tumefaciens*. 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.

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. Для имитации высокотемпературного стресса, растения помещались в термостат (ES-20/60 BioSan, Рига, Латвия), при температуре +45 °C в течение 2 ч; для имитации засухи растения не поливали в течение 4.5-5 недель после высадки в грунт; 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 °C, для избегания влияния резкого перепада температур; солевой стресс индуцировали с помощью однократного полива растений раствором NaCl в концентрации 350 мМ до полного промокания земли; для имитации УФ стресса, растения облучали УФ-С или УФ-В, как описано ранее (Tyunin et al., 2016), используя УФ-лампу VL-215.МС компании Vilber Lourmat (Marne-la-Vallee, Франция). В соответствии с данными производителя, была использована интенсивность облучения 1800 μW см⁻² (для УФ-В) или 930 μW см⁻² (для УФ-С). Эффект воздействия тестируемых абиотических стрессовых факторов определяли путем подсчета живых растений через 7 дней после воздействия стрессовых факторов. Эффект воздействия ультрафиолетового излучения определяли путем подсчета зеленых листьев через 7 дней после воздействия стресса. Для оценки действия предшественников стильбенов и УФ черенки *P. jezoensis* были размещены в индивидуальных стаканах с 50 мл жидкой среды W₀ без фитогормонов в течение 24 ч. Черенки *V. amurensis* были размещены в индивидуальных стаканах с 50 мл жидкой среды W₀ (Dubrovina et al., 2016) без фитогормонов в течение 24 ч. 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 кумаровой (CA) и кофейной кислот (CaA) (Sigma, St. Louis, USA) добавляли к автоклавированной среде W_0 в асептических условиях.

Анализ содержания вторичных метаболитов. ВЭЖХ с УФ и масс-спектрометрией высокого разрешения (HPLC–UV–HRMS) выполняли с использованием тандемного масс-спектрометра LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Япония), в том числе с жидкостным хроматографом LC-20AD Prominence (Shimadzu, Япония), детектором с фотодиодной матрицей SPD-M20A и масс-спектрометром с ионной ловушкой как описано подробно ранее (Aleynova et al., 2016).

Внешняя обработка растений A. thaliana растворами предшественников фенольных соединений и стильбенами. Для изучения устойчивости к УФ, растения *A. thaliana* были обработаны растворами стильбенов – *транс*-резвератролом и *транс*-пицеидом в концентрации 1 mM и 5 mM. Для сравнения мы так же обрабатывали растения предшественниками фенольных соединений растений: CA и CaA 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) нейтрализует ультрафиолетовое 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). Ультрафиолетовый стресс индуцировали, как описано у Tyunin et al., 2016, используя 4х-недельные растения. Эффект воздействия ультрафиолетового излучения определяли путем подсчета зеленых листьев через 7 дней после воздействия стресса.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Биосинтез стильбенов V. amurensis и P. jezoensis при обработке CA и CaA, после облучения УФ-С. Собранные ветви ели были поделены на четыре черенка длиной 10 см и использованы для последующей обработки. Черенки содержали молодые светло-зеленые хвоинки. Обработка УФ-С приводила к гибели молодых хвоинок через 24 часа после обработки, количество желтых хвоинок достоверно увеличилось до 95%. Было показано, что обработка CA

предотвращала этот эффект, снижая количество желтых хвоинок после УФ-С облучения черенков, обработанных СА. Количество желтых хвоинок у черенков, обработанных УФ-С и СА, существенно не отличалось от количества желтых хвоинок, инкубированных в контрольных условиях. Добавление СаА снизило количество желтых хвоинок до 85%, но это значение существенно не отличалось от уровня желтых хвоинок после облучения УФ-С. Для подтверждения вовлеченности стильбенов в процесс устойчивости растений к УФ был проведен анализ содержания и состава стильбенов в годовалой хвое дерева *P. jezoensis*. Было проанализировано содержание шести стильбенов: *транс*-астрингин, *транс*-пицеид, *цис*-астрингин, *транс*-изорапонтин, *транс*-пицеатаннол и *цис*-пицеид. 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. 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. 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). 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. 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*. Обработка СА, СаА и УФ-С не оказывала влияния на уровень транскрипции *PjSTS2* и *PjSTS3*. СаА вместе с УФ-С увеличивал экспрессию гена *PjSTS3* в 2.3–2.6 раза через 24 ч после обработки, но эта активация не коррелировала с увеличением содержания стильбенов (Kiselev et al., 2019a). 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. 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. 1 а, б). Примечательно, что количество жизнеспособных листьев увеличилось почти вдвое, до 83.3%, после обработки УФ-С в сочетании с обработкой СА (рис. 1 б).

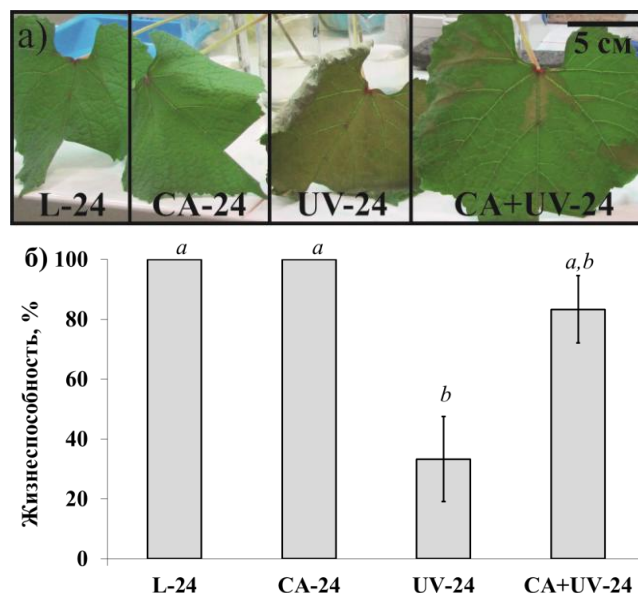


Рисунок 1 – Жизнеспособность черенков *V. amurensis* представлена в виде фотографии (а) и гистограммы (б) через 24 часа после обработки кумаровой кислотой (СА) и/или УФ-С. L-24 – 24 часа в жидкой питательной среде W0; CoA-24 – 24 часа с 0.5 мМ CoA; UV-24 – 20 мин с UV-С; UV+CA-24 – 0.5 мМ СА и UV-С в 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.

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). Обработка СА увеличивала общее содержание стильбенов в 2.4 раза. После воздействия УФ-С общее содержание стильбенов увеличивалось в 2.9 раза. Совместное действие УФ-С-облучения и СА сильнее всего повлияло на содержание стильбенов, увеличив в 3.4 раза. 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. 2). 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. 2 а, б). Транскрипция двух – пяти генов *STS* также повышалась при использовании СА или УФ-С (рис. 2 а, б). При насыщении СА экспрессия *VaSTS5* и *VaSTS6* значительно повышалась по сравнению с необработанными листьями (24 ч, рис. 2 а, б). Так же наблюдалось увеличение экспрессии *VaSTS3*, 5 и 9 через 1 ч после воздействия УФ-С (рис. 2 а, б) и в экспрессии *VaSTS1*, 2, 4, 5 и 7 через 24 ч после облучения УФ-С (рис. 2 а, б).

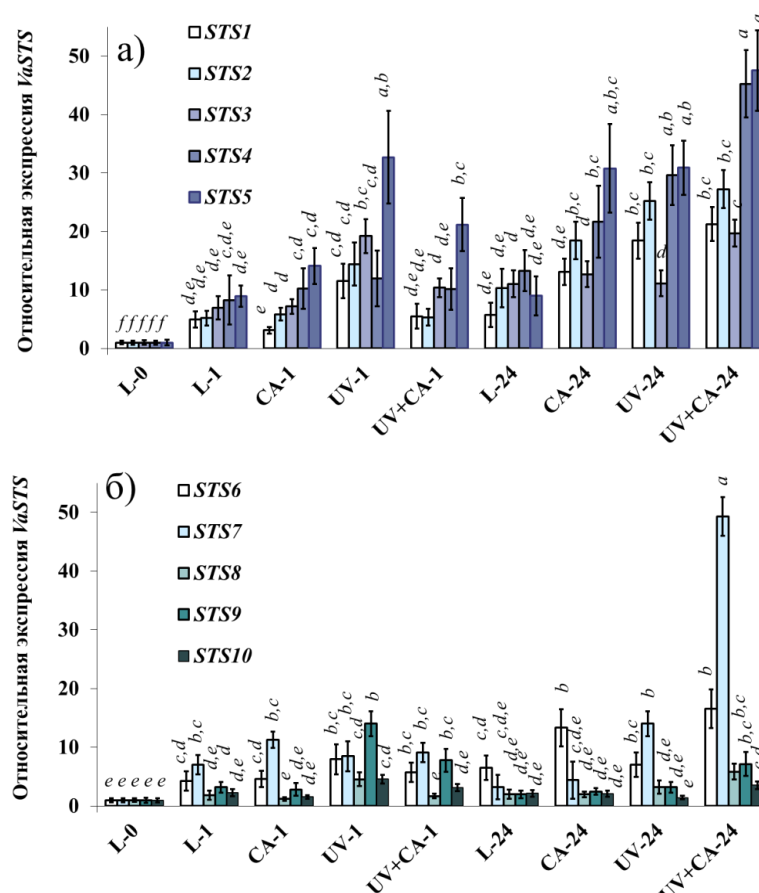


Рисунок 2 – Анализ экспрессии генов биосинтеза стильбенов в листьях *Vitis amurensis* с использованием ПЦР РВ. Уровни транскрипции стильбенсинтаз *STS1-5* (а); уровни транскрипции генов *STS6-10* (б). L-0 – РНК экстрагировали сразу после разделения лианы виноградной лозы на черенки; L-1 – 1 час в контрольных 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.

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

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. У всех трансгенных растений

уровень амплификации гена *VaSTS* был значительно выше по сравнению с фоновым уровнем у контрольных растений арабидопсиса KA0. 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. 3). Известно, что трансгены в растениях подавляются с помощью цитозинового метилирования ДНК (Rajeevkumar et al., 2015). Поэтому в данной работе был проанализирован уровень метилирования цитозина последовательности генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в линиях ST1-1 и ST7-1, используя бисульфитное секвенирование. Было показано, что ген *VaSTS7* был гиперметилирован и это, возможно, является основной причиной низкой экспрессии гена *VaSTS7* в трансгенных линиях ST7 *A. thaliana*. Для того чтобы убедиться в том, что именно метилирование трансгена является причиной относительно низкой экспрессии *VaSTS7*, *VaSTS*-трансгенные растения были обработаны деметилирующим агентом 5-Азациитидином (5A). Было показано, что 5A снижает общее метилирование ДНК, что ведет к усилению экспрессии более метилированных генов *VaSTS7*. Экспрессия менее метилированного гена *VaSTS1* после обработки 5A существенно не изменилась.

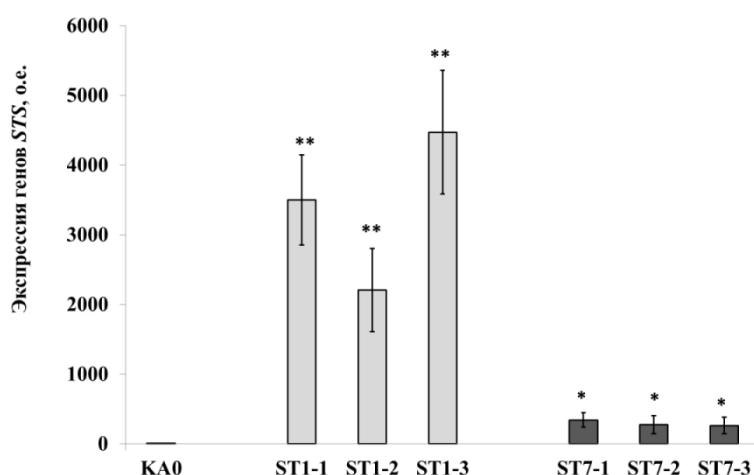


Рисунок 3 – Количественная оценка экспрессии генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в трансгенных растениях *A. thaliana*. KA0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1, 2 или 3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*; ST7-1, 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 KA0 (парный t -критерий Стьюдента).

Для получения клеточных культур винограда, сверхэкспрессирующих полноразмерные гены *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3*, культура V2 *V. amurensis* была трансформирована методом агробактериальной трансформации. Были получены клеточные линии zST1, zST2 и zST3. Затем была проанализирована экспрессия трансгенов *PjSTS1a*, *PjSTS2* и *PjSTS3* в полученных линиях клеток винограда (рис. 4). Все линии *PjSTS*-трансгенных клеток экспрессировали экзогенные *PjSTS1a*, *PjSTS2* или *PjSTS3*. Среди всех линий клеток наибольшая экспрессия *STS* была показана в линии клеток zST1-3,

тогда как экспрессия *STS* в линиях zST1-1 и zST1-2 была ниже в 3-10 раз (рис. 4).

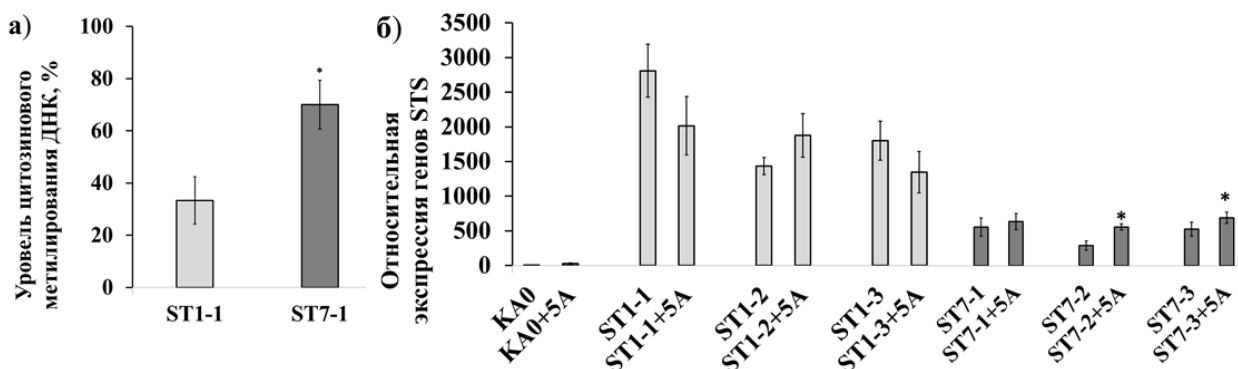


Рисунок 4 – Количественная оценка метилирования *VaSTS* -трансгенных растениях *A. thaliana* (а) и влияние обработки 5-азациитидином (5A) на экспрессию генов *VaSTS1* и *VaSTS7* (б); KA0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1 – *A. thaliana*, 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).

Содержание стильбенов в PjSTS-трансгенных культурах клеток винограда V. amurensis и VaSTS-трансгенных растениях A. thaliana. 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 (KA0), и линии клеток с экспрессией *PjSTS3* (zST3-2). Наибольшая общая продукция стильбена для KA0 и zST3-2 была обнаружена на 35-42 день, именно поэтому каллусы были собраны на 35-е сутки культивирования. Было показано, что 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, по сравнению с линией KA0. Затем было проанализировано содержание отдельных стильбенов в клеточных линиях KA0, 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 KA0, соответственно, в тоже время увеличение содержания других стильбенов было не таким сильным. 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. Таким образом, сверхэкспрессия генов *PjSTS* в клеточных культурах винограда привела к большей аккумуляции стильбенов в клетках, чем сверхэкспрессия генов винограда *VaSTS*. Вероятно, это было связано с известным фактом, что многочисленные вставки трансгенов в геном растения могут приводить к гиперметилированию и подавлению трансгенных последовательностей, особенно в случае, если перенесенные гены были очень похожи или идентичны эндогенным.

С помощью ВЭЖХ, было обнаружено, что в трансгенных растениях *A. thaliana* линии КА0, которые не экспрессировали гены *STS* винограда, стильбенов не было (рис. 5а), в то время как трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS1*, продуцировали два стильбена: *транс*-пицеид и *транс*-резвератрол (рис. 5б). Растения, сверхэкспрессирующие ген *VaSTS7* продуцировали только *транс*-резвератрол. 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. Полученный уровень содержания стильбенов положительно коррелировал с экспрессией гена *VaSTS1* ($r = 0.96$ рис. 3). 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, и этот результат также коррелировал ($r = 0.98$) с низкой экспрессией трансгена *VaSTS7* (рис. 3).

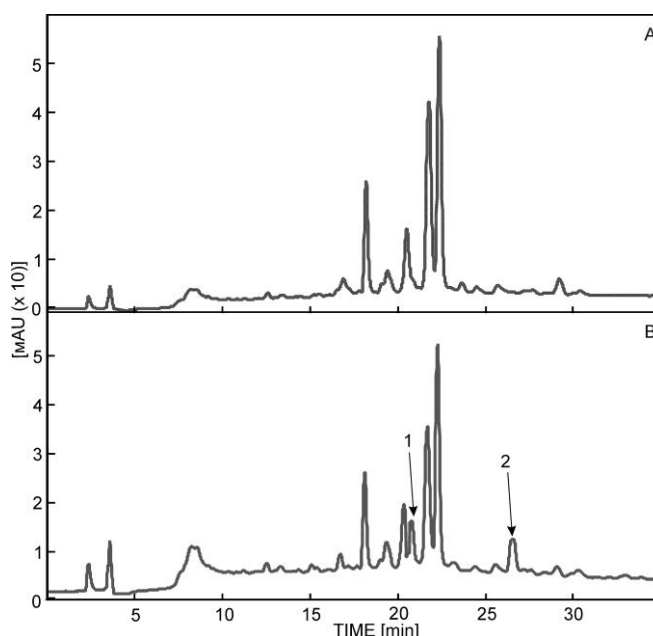


Рисунок 5 – Хроматограмма ВЭЖХ – УФ (310 нм) для экстрактов трансгенных растений *A. thaliana*. (а) КА0 – трансгенные растения *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; (б) ST1-3 – линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессировавшие ген *VaSTS1*; *транс*-пицеид (1) и *транс*-резвератрол (2).

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. 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. 6а, 7). Это увеличение было статистически значимым для всех *VaSTS1*-трансгенных растений (рис. 6б). Сверхэкспрессия гена *VaSTS7* также увеличивала жизнеспособность листьев, облученных УФ-В, но эта устойчивость не была статистически значимой (рис. 6а). Аналогичные результаты были получены при применении УФ-С, однако отрицательное влияние на выживаемость листьев было намного сильнее (рис. 6б, 7), не смотря на то, что интенсивность УФ-С излучения была почти в 2 раза меньше. В более жестких условиях облучения УФ-С защитный эффект сверхэкспрессии гена *VaSTS* проявлялся сильнее. Так, сверхэкспрессия гена *VaSTS1* достоверно увеличивала количество зеленых листьев после обработки УФ-С в 2.0–2.3 раза по сравнению с растениями КА0 *A. thaliana* (рис. 6б). 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; рис. 6б).

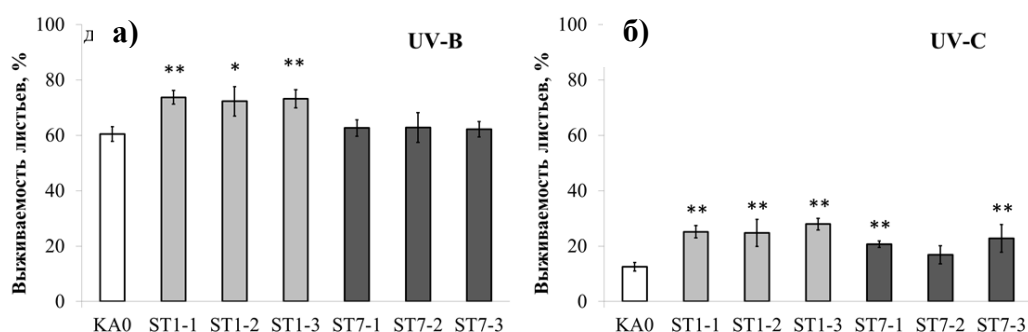


Рисунок 6 – Выживаемость листьев после ультрафиолетового облучения В (UV-B, а), и ультрафиолетового облучения С (UV-C, б). КА0 - трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующие только селективный маркерный ген *nptII*; ST1-1, 2 и 3 - линии растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующие 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).

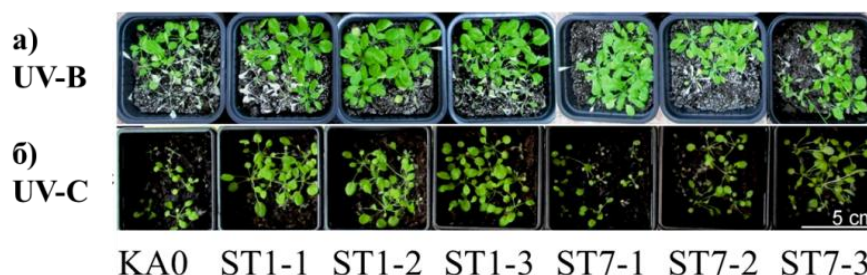


Рисунок 7 – Внешний вид растений *Arabidopsis thaliana* при облучении ультрафиолетом В (UV-B, 312 нм, **а**) и ультрафиолетом С (UV-C, 254 нм, **б**). 4-недельные растения облучали в течение 10 мин на расстоянии 15 см над горшками с максимальной мощностью, как описано ранее (Tyunin et al., 2016). Согласно инструкции производителя, мы использовали 1800 мкВт/см² УФ-В и 930 мкВт/см² интенсивности УФ-излучения. Выживаемость листьев определяли как количество явно зеленых листьев через неделю после прекращения воздействия стресса.

Устойчивость растений A. thaliana при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами. В предыдущих работах нами было показано, что появление стильбенов в растениях *A. thaliana* увеличивало устойчивость этих растений к УФ излучению, поэтому нами было решено проверить, является ли это прямым следствием воздействия именно стильбенов или сверхэкспрессия генов *STS* могла приводить к другим последствиям, что и вызывало наблюдаемую устойчивость. Поэтому мы провели ряд экспериментов по обработке растений *A. thaliana* растворами стильбенов. Для сравнения мы так же обрабатывали растения предшественниками фенольных соединений растений: СА (рис. 8в) и СiА (рис. 8г). Для проверки наблюдаемых эффектов, растения обрабатывали октокриленом. Стильбены, в первую очередь *транс*-резвератрол, оказывали достоверное защитное действие от УФ-С облучения во всех используемых дозах (1 и 5 mM; рис. 8а). 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. 8д). 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.

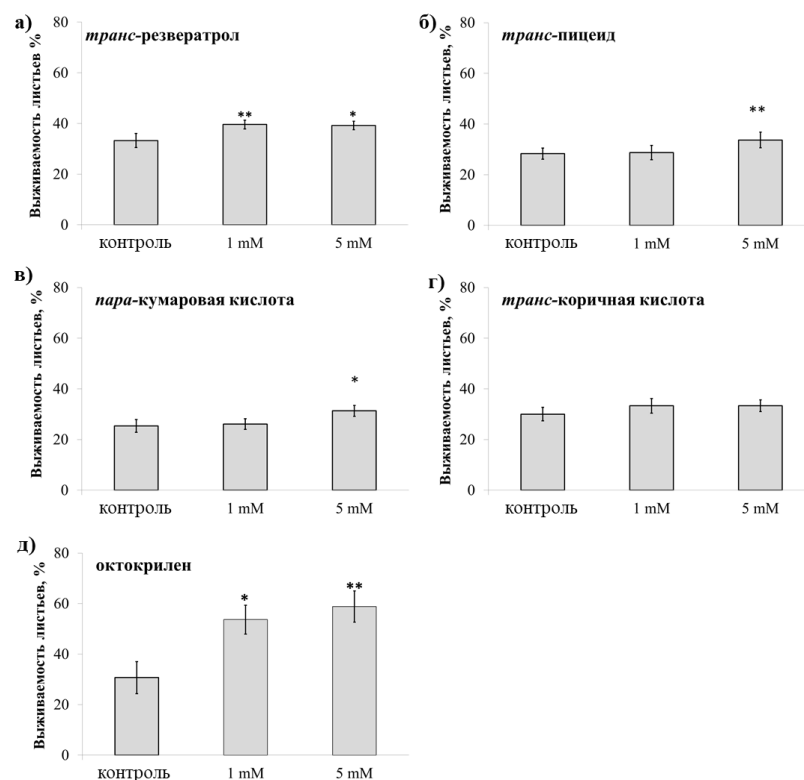


Рисунок 8 – Выживаемость листьев растений *A. thaliana* после ультрафиолетового облучения С (УФ-С), обработанных *транс-резвератролом* (а), *транс-пицеидом* (б), *пара-кумаровой кислотой* (в), *транс-коричной кислотой* (г) и *октокриленом* (д) в концентрации 1 mM и 5 mM, в качестве контроля растения 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).

ОБСУЖДЕНИЕ

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).

Известно, что ель производит отличный от винограда набор стильбенов. Например, в тканях *P. jezoensis* был обнаружен мономер стильбена *транс-пицеатаннол* (Kiselev et al., 2016b). Несмотря на это, в данной работе не было обнаружено никаких новых стильбенов у трансгенных клеток винограда, и, следовательно, на используемых генах *STS* ели, возможно было получить только *транс-резвератрол*. Эти данные подтвердили предыдущие исследования, в которых показано, что *STS* ели способны синтезировать только *транс-резвератрол* (Hammerbacher et al., 2011). Появление других

стильбенов требует гликозилирования, метилирования или окисления под действием специфических ферментов.

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 содержанием стильбенов в других источниках (Dubrovina et al., 2017) показало, что содержание стильбенов в полученных нами трансгенных клетках винограда, несущих гены *STS* ели, достигло более высокого уровня накопления стильбенов, чем в нетрансгенных клеточных линиях. 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). 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). Таким образом, избыточная экспрессия генов ели *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). В свою очередь перенесенные гены ели *PjSTS* по нуклеотидной последовательности сильно отличались от эндогенных *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). После бисульфитного секвенирования последовательностей генов *VaSTS1* и *VaSTS7* в линиях ST1-1 и ST7-1, было показано, что ген *VaSTS7* был гиперметилирован и это, возможно, является основной причиной низкой экспрессии гена *VaSTS7* в трансгенных линиях ST7 *A. thaliana*.

В литературе существует ряд данных, в которых были получены разные трансгенные растения, сверхэкспрессирующие разные гены *STS*. Было

показано, что содержание стильбенов в растениях *A. thaliana* линии ST1-3 было в 50.4 раза выше по сравнению с *Ziziphus jujuba* Mill., 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 (Giorcelli et al., 2004) по сравнению с содержанием стильбенов в растениях ST1-3 *A. thaliana*. 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). 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, однако, 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*, так же 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, например, почему наблюдается значительная разница в продукции стильбенов и устойчивости к стрессам у растений экспрессирующих близкие по нуклеотидной последовательности гены *VaSTS1* и *VaSTS7*. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Kiselev K.V., **Ogneva Z.V.**, Suprun A.R., Zhuravlev Y.N. Expression of the stilbene synthase genes in the needles of spruce *Picea jezoensis* // Russ. J. Genet. — 2016a. — V. 52. — P. 1157–1163.
2. Kiselev K.V., Grigorchuk V.P., **Ogneva Z.V.**, Suprun A.R., Dubrovina A.S. Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis* // Phytochem. — 2016b. — V. 131. — P. 57–67.

3. Kiselev K.V., Grigorchuk V.P., **Ogneva Z.V.**, Suprun A.R., Dubrovina A.S. The effect of ultraviolet-C and precursor feeding on stilbene biosynthesis in spruce *Picea jezoensis* // J. Plant Physiol. — 2019a. — V. 234–235. — P. 133–137.
4. Kiselev K.V., **Ogneva Z.V.**, Suprun A.R. Action of ultraviolet-C radiation and *p*-coumaric acid on stilbene accumulation and expression of stilbene biosynthesis-related genes in the grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // Acta Physiol. Plant. — 2019b. — V. 41. — P. 28.
5. **Ogneva Z.V.**, Aleynova O.A., Suprun A.R., Karetin Y.A., Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing grapevine *VaSTS1* or *VaSTS7* genes to cold, heat, drought, salinity, and ultraviolet irradiation // Biol. Plant. — 2021a. — V. 65. — P. 111–117.
6. Suprun, A.R., **Ogneva Z.V.**, Dubrovina A.S., Kiselev K.V. Effect of spruce *PjSTS1a*, *PjSTS2*, or *PjSTS3* gene overexpression on stilbene biosynthesis in callus cultures of *Vitis amurensis* Rupr. // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2020. — V. 67. — P. 234–239.
7. **Ogneva Z.V.**, Volkonskaia V.V., Dubrovina A.S., Suprun A.R., Aleynova O.A., Kiselev K.V. Exogenous stilbenes improved tolerance of *Arabidopsis thaliana* to a shock of ultraviolet B radiation // Plants. — 2021b. — V. 10. — P. 1282.

Работы, опубликованные в материалах региональных и международных научных конференций:

8. Супрун А.Р., Огнева З.В., Киселев К.В. 2016. Структура и экспрессия генов стильбен синтаз у ели аянской *Picea jezoensis* (Sieb. et Zucc.) // Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма: тезисы докладов Научной конференции с международным участием, 21-24 июня, Санкт-Петербург, С. 252-253.
9. Супрун А.Р., **Огнева З.В.**, Дубровина А.С., Киселев К.В. 2017. Совместное действие ультрафиолета с и *p*-кумаровой кислоты на накопление стильбенов и экспрессию генов, участвующих в биосинтезе стильбенов в лианах дикорастущего винограда *Vitis amurensis* Rupr. // Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы Научной конференции и школы для молодых ученых, Т.1. С.64. Судак.
10. Супрун А.Р., **Огнева З.В.**, Дубровина А.С., Киселев К.В. 2018. Действие *p*-кумаровой и кофейной кислоты, а также ультрафиолета-С на накопление стильбенов и экспрессию генов, участвующих в биосинтезе стильбенов в хвое ели аянской *Picea jezoensis*. // Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды: труды Всероссийской научной конференции с международным участием и Школы молодых ученых. С.742-743. Иркутск.

ОГНЕВА ЗЛАТА ВЛАДИМИРОВНА

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук