

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ
ФЕНИЛАЛАНИНАММИАК-ЛИАЗ И СТИЛЬБЕНСИНТАЗ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *Vitis amurensis*

© 2010 г. К. В. Киселев*, А. С. Дубровина*, Г. А. Исаева**, Ю. Н. Журавлев*

*Биологический институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток

**Дальневосточный государственный университет, Владивосток

Поступила в редакцию 30.09.2009 г.

Резвератрол – это фитоалексин, обладающий противоопухолевым, антибактериальным и противовирусным действием. Целью работы было выявить гены *PAL* и *STS*, кодирующие фенилаланинаммиак-лиазы (*PAL*) и стильбенсингазы (*STS*), ключевые ферменты биосинтеза резвератрола. В качестве модельного объекта была выбрана культура клеток *Vitis amurensis* Rupr. с низким содержанием резвератрола. Салициловую кислоту (СК), известный индуктор вторичного метаболизма растений, использовали для увеличения продукции резвератрола исследованной культурой клеток. Экспрессию генов *PAL* и *STS* изучали с помощью ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени. Впервые показано, что добавление СК активирует экспрессию только определенных генов мультигенных семейств *VaPAL* и *VaSTS*: *VaPAL3*, *VaSTS2*, *VaSTS3*, *VaSTS4*, *VaSTS5*, *VaSTS6* и *VaSTS8*. Полученные результаты сравнивали с ранее опубликованными данными об экспрессии генов *PAL* и *STS* в *rolB* трансформированных культурах клеток *V. amurensis* с высоким содержанием резвератрола. Установлено, что влияние СК и трансформации геном *rolB* на экспрессию генов *VaPAL* и *VaSTS* значительно различается.

Ключевые слова: *Vitis amurensis* – *rolB* – резвератрол – салициловая кислота – стильбенсингаза – фенилаланинаммиак-лиаза

ВВЕДЕНИЕ

Резвератрол (3,5,4-тригидростилбен) – это фитоалексин, который синтезируется в некоторых растениях (например, в растениях сосны, винограда, арахиса). Виноград, в том числе дикий виноград *Vitis amurensis* Rupr., является основным источником этого вещества. Одно из самых ценных фармакологических свойств резвератрола – разностороннее противоопухолевое действие [1]; кроме того, этот известный антиоксидант обладает антибактериальным и противовирусным действием [2, 3]. Многочисленные исследования свидетельствуют о способности резвератрола положительно влиять на сердечно-сосудистую, нервную систему человека, а также о гепатопротекторных свойствах этого вещества [4].

Биосинтез стильбенов, в том числе и резвератрола, идет по фенилпропаноидному пути [5]. Фенилаланинаммиак-лиаза (*PAL*) – первый фермент на этом пути, катализирует дезамина-

ние фенилаланина, превращая его в коричную кислоту. Стильбенсингаза (*STS*) конденсирует три молекулы малонил-КоА с одной молекулой кумарил-КоА, конечным продуктом этой реакции является резвератрол [6]. Известно, что гены, кодирующие ферменты *PAL* и *STS*, представлены мультигенными семействами. Так, у близкого к *V. amurensis* вида *V. vinifera* насчитывается около 13 генов *PAL* и 21–43 гена *STS* [7, 8]. Большое число генов биосинтеза стильбенов вызывает интерес исследователей. Полиморфизм генов вторичного метаболизма связывают с особенностями функционирования белковых продуктов этих генов и разнообразием стимулов, в ответ на которые эти гены экспрессируются [9–13]. Так, известно, что кроме участия в биосинтезе вторичных метаболитов, белки *PAL* могут участвовать в процессах одревеснения [10, 12], в биосинтезе стрессовых гормонов [11]. Также установлено, что скорость дезаминации фенилаланина белком *Arabidopsis thaliana* AtPAL3 более, чем в 10 раз уступает активности AtPAL1, AtPAL2, AtPAL4 [13].

Ранее была изучена экспрессия генов *PAL* и *STS* в *rolB* трансгенных культурах клеток *V. amurensis* [14]. Трансгенные клеточные культуры *rolB* *V. amurensis* различаются уровнем экспрессии трансгена, а также содержанием резвератрола [15]. Установлено, что трансформация геном *rolB*

Сокращения: ПЦР–РВ – количественная ПЦР в реальном времени; СК – салициловая кислота; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктазы; *PAL* – фенилаланинаммиак-лиаза, *STS* – стильбенсингаза.

Адрес для корреспонденции: Киселев Константин Вадимович. 690022 Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159. Биологический институт ДВО РАН. Электронная почта: kiselev@biosoil.ru

Agrobacterium rhizogenes, при условии достаточной экспрессии трансгена, приводит к значительному повышению содержания резвератрола в трансформированных клеточных культурах [15]. При этом суммарная экспрессия генов семейств *VaPAL* и *VaSTS* возрастила в *rolB* трансгенных культурах клеток по сравнению с контролем, однако не более, чем в 3.8 раза [14]. Суммарная экспрессия генов *VaPAL* возрастила за счет увеличения экспрессии двух из трех экспрессирующихся генов *PAL*, в то время как суммарная экспрессия генов *VaSTS* нарастала за счет увеличения экспрессии шести из семи экспрессирующихся генов *VaSTS* [14]. На основе полученных данных, а также анализа литературы было высказано предположение о том, что *rolB* значительно увеличивает содержание резвератрола в культуре клеток *V. amurensis* за счет увеличения экспрессии тех генов *PAL* и *STS*, что необходимы для активной продукции этого вещества исследуемыми культурами.

Несмотря на интенсивные исследования, не раскрыт механизм работы онкогенов *rol*, инициирующих процесс неопластической трансформации клеток растений и активирующих биосинтез вторичных метаболитов. Ранее предполагали, что гены *rol* влияют на протекание физиологических процессов в растительных клетках, изменения их гормональный баланс. Считалось, что ген *rolB* кодирует фермент, расщепляющий гликозиды ИУК [16]. Однако позже выяснилось, что уровни свободной и связанной ИУК не изменялись в растениях, экспрессирующих ген *rolB* [17]. Позднее было показано, что белок RolB обладает тирозинфосфатазной активностью [18]. Важным открытием последних лет явилось то, что RolB способен взаимодействовать с белком 14-3-3 и модулировать его активность [19].

Целью настоящей работы является анализ экспрессии генов *VaPAL* и *VaSTS* при культивировании каллусной культуры *V. amurensis* на питательных средах с добавлением стрессового фитогормона салициловой кислоты (СК) и сравнение полученных результатов с ранее опубликованными данными об экспрессии *VaPAL* и *VaSTS* в *rolB* трансгенных культурах клеток *V. amurensis* [14]. Известно, что СК является одним из наиболее сильных индукторов продукции резвератрола в этой клеточной культуре [15]. Сравнивая влияние СК и трансформации геном *rolB* на экспрессию ключевых генов биосинтеза резвератрола в клетках *V. amurensis*, мы хотим показать, действует ли RolB на биосинтез резвератрола аналогично СК, стрессовому фитогормону растений, или же иным образом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Каллусная культура клеток *V. amurensis*. Для исследования влияния СК на экспрессию генов *PAL*

и *STS* использовали культуру клеток *VV*, которая была получена в результате заражения культуры клеток *V2 V. amurensis* штаммом *A. tumefaciens* GV3101/pPCV002 [15]. Каллусная культура *V2* была получена сотрудниками лаборатории биотехнологии Биологического-почвенного института ДВО РАН в 2004 г. из молодых стеблей лианы *V. amurensis* [15]. В составе Т-ДНК вышеназванного бинарного вектора локализован только селективный маркер (ген устойчивости к канамицину). В настоящей работе культивация культуры клеток *VV* осуществлялась в стандартных химических пробирках объемом 15 мл на твердой среде $W_{B/A}$ [14], содержащей 2 мг/л БАП и 0.5 мг/л АНУ, в темноте при 24°C с периодом субкультивации 35 дней, как было описано ранее [14, 15].

Компоненты питательных сред. Компоненты питательных сред и салициловая кислота получены из “ICN Biomedicals” (США). Водные растворы СК добавляли в питательные среды в необходимых концентрациях, как было описано ранее [15].

Выделение РНК и проведение ОТ–ПЦР. Тотальную РНК экстрагировали из клеточных культур при помощи методики [20]. Получение кДНК проводили по описанной ранее методике [15]. Для изучения суммарной экспрессии генов *VaPAL* и *VaSTS* использовали описанные ранее вырожденные праймеры [14]: 5'-GARGCYGCYGCYATGGA и 5'-GGRGTGCCYTGRAARTT для *VaPAL* и 5'-GARATYATYACHGCHGA и 5'-TTDGGRATTRAADGTYTG для *VaSTS*. Условия проведения ПЦР реакций подробно описаны ранее [14]. Экспрессию генов *VaPAL* и *VaSTS* нормализовали относительно экспрессии гена актина *V. amurensis* [15]. Для амплификации гена актина (*VaActin1*, номер доступа в Генбанке AY680701) использовали праймеры 5'-TTGCCATTCAAGCTGTTCTTCT и 5'-AGGAGCTGCTCTTGCAGTTCC. При проведении ОТ–ПЦР реакций ПЦР продукты были отобраны после 25, 30, 35, 40 и 45 циклов, и линейность реакций ПЦР была определена с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”, Германия). Для генов *VaPAL* линейный участок был найден между 30 и 35 циклами, для генов *VaSTS* – между 40 и 45 циклами. Количественный анализ суммарной экспрессии генов *PAL* и *STS* был выполнен с помощью технологии микрочипов с использованием DNA 1000 LabChip® kit и Agilent 2100 Bioanalyzer по методике, описанной производителем. Даные представлены, как относительные единицы флуоресценции, нормализованные к экспрессии *VaActin1*. Полученные ампликоны были выделены из геля при помощи набора Glass Milk (“Силекс”, Россия) и клонированы в вектор pTZ57R/T, согласно протоколу фирмы-производителя (“Fermentas”, Литва).

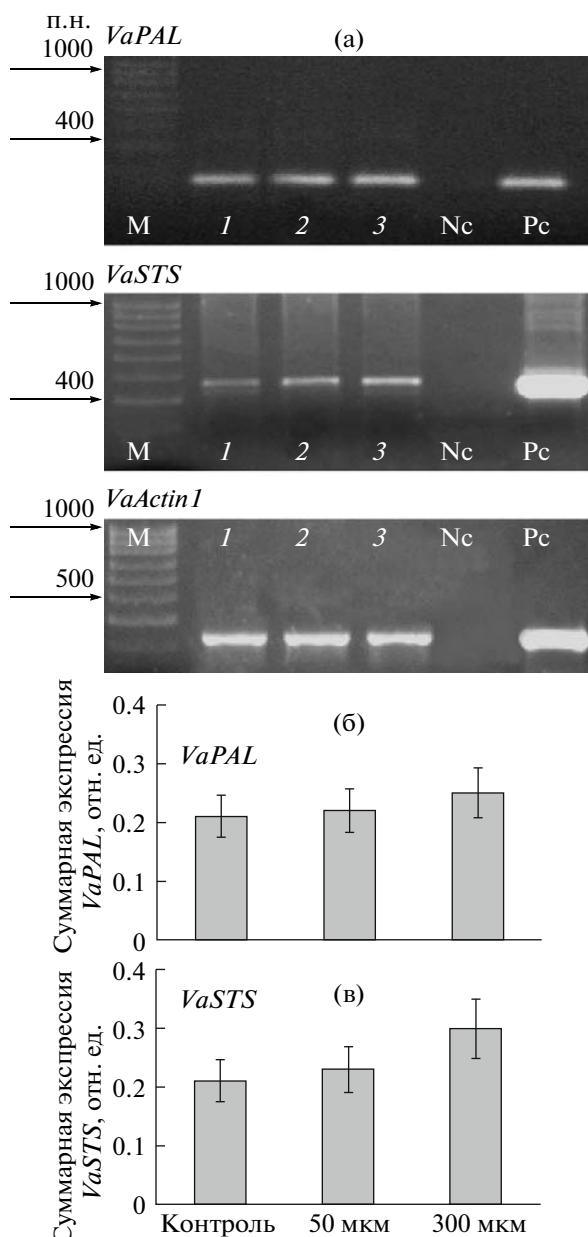


Рис. 1. Суммарная экспрессия генов *PAL* и *STS* в культуре клеток *VV V. amurensis* при добавлении в питательные среды 50 и 300 мкМ СК.

а – электрофоретическое разделение ОТ–ПЦР продуктов генов *VaPAL*, *VaSTS* и *VaActin1*. Линии 1, 2 и 3: образцы из контроля и при добавлении СК 50 и 300 мкМ соответственно, разбавленные водой 1 : 4. Рс – положительный контроль (плазмидные ДНК, содержащие кДНК генов *VaPAL*, *VaSTS* и *VaActin1*); Nc – отрицательный контроль (ПЦР смесь без кДНК); M – синтетический маркер; б и в – количественный анализ, соответственно, суммарной экспрессии генов *VaPAL* и *VaSTS* с помощью технологии микрочипов. Данные получены в двух независимых экспериментах и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка.

Секвенирование. Секвенирование продуктов ОТ–ПЦР проводили с использованием набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (“Applied Biosystems”, США) по методике производителя с небольшими изменениями [21], используя секвенатор ABI 310 Genetic Analyser (“Applied Biosystems”) на базе

БПИ ДВО РАН. Секвенирование каждого транскрипта было проведено не менее трех раз. Секвенированные фрагменты генов *VaPAL* и *VaSTS* депонированы в Генбанк: *VaPAL1* (EU659859), *VaPAL2* (EU659860), *VaPAL3* (EU659861), *VaPAL4* (GQ443744), *VaPAL5* (GQ443745), *VaSTS1* (EU659862), *VaSTS2*

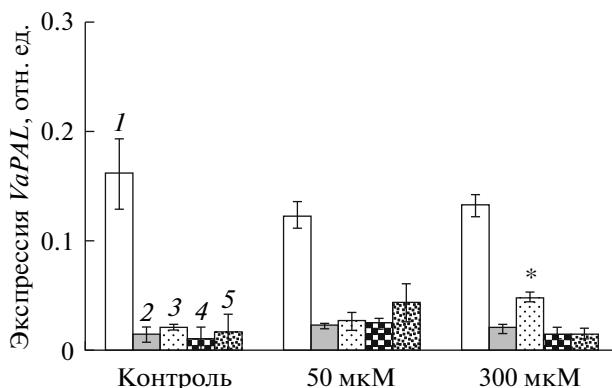


Рис. 2. Количественный анализ экспрессии отдельных генов *PAL* в культуре клеток VV *V. amurensis* при добавлении 50 и 300 мкМ СК.

1 – *VaPAL1*, 2 – *VaPAL2*, 3 – *VaPAL3*, 4 – *VaPAL4*, 5 – *VaPAL5*.

Данные получены в двух независимых экспериментах и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. * $P < 0.05$.

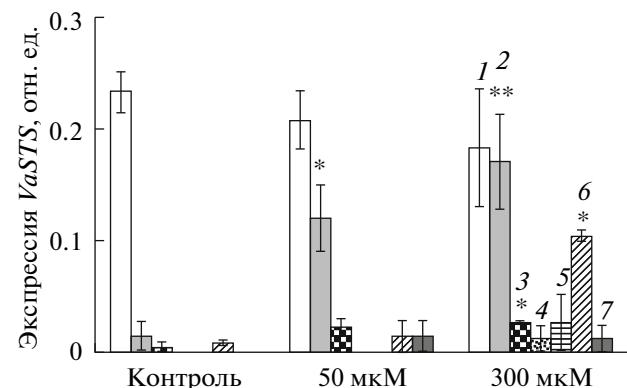


Рис. 3. Количественный анализ экспрессии отдельных генов *STS* в культуре клеток VV *V. amurensis* при добавлении 50 и 300 мкМ СК.

1 – *VaSTS1*, 2 – *VaSTS2*, 3 – *VaSTS3*, 4 – *VaSTS4*, 5 – *VaSTS5*, 6 – *VaSTS6*, 7 – *VaSTS8*.

Данные получены в двух независимых экспериментах и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

(EU659863), *VaSTS3* (EU659864), *VaSTS4* (EU659865), *VaSTS5* (EU659866), *VaSTS6* (EU659867), *VaSTS8* (GQ443746).

Производные аминокислотные последовательности фрагментов *VaPAL* и *VaSTS* для участка гена, ограниченного вырожденными праймерами, определяли с помощью программы Gene runner 3.05 и сравнивали с известными последовательностями *PAL* и *STS* других растений в программе BioEdit 7.0.8 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) и NCBI BLAST.

Скрининг кДНК клонов генов *VaPAL* и *VaSTS*. Для кДНК проб каждого варианта опыта (контроль, 50 и 300 мкМ СК) было секвенировано, соответственно, 43, 38 и 39 клонов *VaPAL* и 28, 38 и 41 клонов *VaSTS*. Основываясь на анализе числа секвенированных клонов для каждого транскрипта и данных о суммарной экспрессии *VaPAL* и *VaSTS* (рис. 1), рассчитывали относительную экспрессию каждого гена *VaPAL* и *VaSTS* (рис. 2 и 3), используя формулу: суммарная экспрессия генов *VaPAL* и *VaSTS*, нормализованная относительно экспрессии гена *VaActin1* *V. amurensis*, умноженная на % клонов каждого транскрипта и деленная на 100 [14, 22–24].

Количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ). ПЦР–РВ проводили в соответствии с ранее описанными условиями, включая нуклеотидные последовательности праймеров и Тац-Ман-зондов [14]. Данные об экспрессии генов *VaPAL* и *VaSTS* были получены в трех независимых экспериментах.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica, версия 8.0. Все данные пред-

ставлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Полученные данные проверены по парному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистически значимой разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культура клеток VV не отличается от V2, как по морфологическим, так и по биосинтетическим признакам, и содержала 0.017% резвератрола от сухой биомассы клеток [15]. СК в концентрации 50 мкМ увеличивала содержание резвератрола в клетках *V. amurensis* в 2.6 раза (до 0.045% от сухой массы клеток) [15]. Культура клеток VV являлась контрольной при изучении экспрессии *VaPAL* и *VaSTS* в *rolB* трансгенных клеточных культурах VB1 и VB2 [14] и поэтому использовалась для изучения влияния СК на экспрессию этих генов в клетках *V. amurensis*.

При добавлении 50 и 300 мкМ СК в питательные среды суммарная экспрессия генов *VaPAL* значительно не изменялась (рис. 1). Экспрессию отдельных генов *VaPAL* исследовали с помощью частотного анализа ОТ–ПЦР продуктов (рис. 2). В культуре клеток VV наблюдали экспрессию пяти генов *VaPAL*, как в контроле, так и в образцах, подвергавшихся воздействию СК. Доля транскриптов *VaPAL1* была наибольшей во всех исследованных образцах ткани. Экспрессия *VaPAL3* достоверно возрастала под воздействием СК, в то время как экспрессия *VaPAL1*, *VaPAL2*, *VaPAL4* и *VaPAL5* значительно не изменялась. Анализ с помощью ПЦР–РВ подтвердил эти данные (таблица).

Экспрессия генов *VaPAL* и *VaSTS* в культуре клеток VV *V. amurensis*, полученных с помощью ПЦР–ПВ и ОТ–ПЦР с вырожденными праймерами

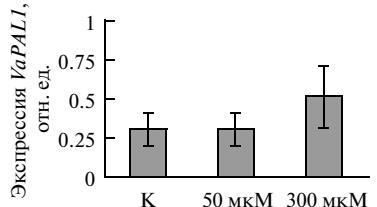
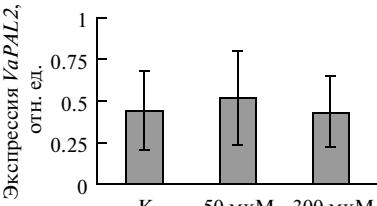
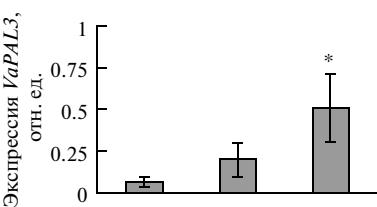
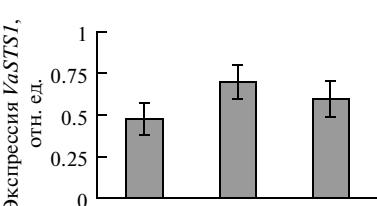
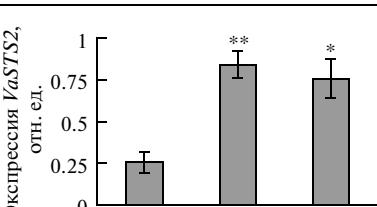
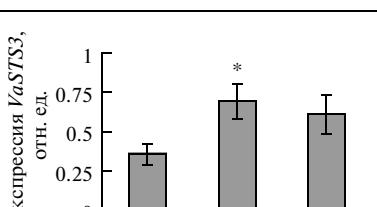
Гены	Экспрессия генов <i>VaPAL</i> или <i>VaSTS</i> при добавлении СК (50 или 300 мкМ) в питательные среды, ПЦР–ПВ	Сравнение двух методов анализа экспрессии генов <i>VaPAL</i> или <i>VaSTS</i> при добавлении СК (50/300 мкМ) в питательные среды, % от контроля ^a	
		ПЦР–ПВ	ОТ–ПЦР
<i>VaPAL1</i>	Экспрессия <i>VaPAL1</i> , отн. ед. 	102/169	76/82
<i>VaPAL2</i>	Экспрессия <i>VaPAL2</i> , отн. ед. 	115/95	133/127
<i>VaPAL3</i>	Экспрессия <i>VaPAL3</i> , отн. ед. 	326/822	125/230
<i>VaSTS1</i>	Экспрессия <i>VaSTS1</i> , отн. ед. 	144/124	98/84
<i>VaSTS2</i>	Экспрессия <i>VaSTS2</i> , отн. ед. 	330/293	857/1221
<i>VaSTS3</i>	Экспрессия <i>VaSTS3</i> , отн. ед. 	197/173	440/520

Таблица. Окончание

Гены	Экспрессия генов <i>VaPAL</i> или <i>VaSTS</i> при добавлении СК (50 или 300 мкМ) в питательные среды, ПЦР–РВ	Сравнение двух методов анализа экспрессии генов <i>VaPAL</i> или <i>VaSTS</i> при добавлении СК (50/300 мкМ) в питательные среды, % от контроля ^a									
		ПЦР–РВ	ОТ–ПЦР								
<i>VaSTS5</i>	<table border="1"> <caption>Data for VaSTS5 expression</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (μM)</th> <th>Relative Expression (approx.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>K</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>0.75*</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>0.75*</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (μM)	Relative Expression (approx.)	K	0.4	50	0.75*	300	0.75*	185/175	~/↑
Concentration (μM)	Relative Expression (approx.)										
K	0.4										
50	0.75*										
300	0.75*										
<i>VaSTS6</i>	<table border="1"> <caption>Data for VaSTS6 expression</caption> <thead> <tr> <th>Concentration (μM)</th> <th>Relative Expression (approx.)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>K</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>0.65*</td> </tr> <tr> <td>300</td> <td>0.75*</td> </tr> </tbody> </table>	Concentration (μM)	Relative Expression (approx.)	K	0.3	50	0.65*	300	0.75*	237/280	166/1166
Concentration (μM)	Relative Expression (approx.)										
K	0.3										
50	0.65*										
300	0.75*										

Примечание. Экспрессия генов *VaPAL* или *VaSTS* в культуре клеток VV при добавлении СК в питательные среды была выше (↑) или на том же уровне (~) по сравнению с контролем. отн. ед. – относительные единицы; ^a – процент от экспрессии в контрольной культуре клеток VV. Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

При добавлении 50 и 300 мкМ СК в питательные среды суммарная экспрессия генов *VaSTS* значимо не увеличивалась. Экспрессию отдельных генов *VaSTS* исследовали с помощью частотного анализа ОТ–ПЦР продуктов (рис. 3). При добавлении СК в питательные среды экспрессия генов *VaSTS2*, *VaSTS3* и *VaSTS6* значительно увеличивалась; кроме того, мы наблюдали экспрессию трех генов *VaSTS* (*VaSTS4*, *VaSTS5* и *VaSTS8*), транскрипты которых не были обнаружены в контроле. Анализ с помощью ПЦР–РВ подтвердил полученные данные (таблица).

Ни воздействие СК, ни трансформация геном *rolB* не привели к многократному возрастанию суммарной экспрессии генов *VaPAL*, соизмеримому с увеличением общего содержания резвератрола в клетках *V. amurensis*. Однако достоверное возрастание суммарной экспрессии генов *VaPAL* наблюдалось в культуре клеток VB2, обладающей самым высоким уровнем экспрессии трансгена [14]. В этом случае суммарная экспрессия *VaPAL* возрастила за счет значительного повышения уровня экспрессии генов *VaPAL1* и *VaPAL2* [14]. Доля этих транскриптов была наибольшей. Экспрессия *VaPAL3* значительно не изменялась. Однако при воздействии СК на клетки культуры VV значимо увеличивалась только экспрессия *VaPAL3*, доля транскриптов которого невелика. Таким образом, влияние СК и трансформации геном *rolB* на экспрессию генов *PAL* прямо противоположно.

Мы предполагаем, что для значительного повышения продукции резвератрола клетками *V. amurensis* необходимо увеличение экспрессии генов *VaPAL1* и *VaPAL2*.

Суммарная экспрессия генов *VaSTS* значимо не увеличивалась ни при добавлении СК в питательные среды, ни в *rolB* трансформированных клетках *V. amurensis*. Однако СК и трансформация геном *rolB* действовали на экспрессию генов *VaSTS* по-разному. Повышение экспрессии *VaSTS1* наблюдали при трансформации геном *rolB*, в то время как при воздействии СК экспрессия этого гена не изменялась. При добавлении СК в питательные среды значительно увеличивалась экспрессия *VaSTS2*, *VaSTS3* и *VaSTS6*. При этом доля транскриптов *VaSTS2* и *VaSTS6* была высокой и сравнимой с долей транскриптов *VaSTS1*, в то время как в *rolB* трансформированных клетках экспрессия *VaSTS6* не изменялась, а экспрессия *VaSTS2* значительно увеличивалась только в VB2 культуре клеток [14]. Необходимо отметить, что увеличение экспрессии *VaSTS3* было более резким в образцах из *rolB* трансформированных культур по сравнению с СК.

В контексте полученных результатов интересна работа [25], посвященная ферментам биосинтеза антоцианов, дигидрофлавонол-4-редуктазам (DFR). Оказалось, что дупликация бифункционального гена приводит к разделению труда между возникшими копиями. Так, белок DFR-B из *Ipomoea purpurea*

работал эффективно с пятью проанализированными субстратами из группы флавоноидов. Белок DFR выонковых и родственных видов растений, у которых ген *DFR* не дуплицирован, справлялся с этой работой хуже. Наконец, белки DFR-A и DFR-C не проявляли катализической активности по отношению к анализируемым субстратам [25]. Авторы предполагают неофункционализацию генов *DFR-A* и *DFR-C*, хотя новую функцию этих генов пока установить не удалось. Появление в геноме “лишней” копии гена, по-видимому, открывает свободу для эволюционного экспериментирования. Поскольку большое число генов *PAL* и *STS* у растений сем. Vitaceae возникает в результате генных дупликаций [9], в нашем случае некоторые белки *VaPAL* и *VaSTS* могут выполнять некие новые функции, не связанные с биосинтезом резвератрола. Так, интересен белок *VaSTS1*, ген которого активно экспрессируется в культуре клеток *VV V. amurensis*, содержащей небольшие количества резвератрола.

Впервые показано, что СК активирует экспрессию определенных генов мультигенных семейств *VaPAL* и *VaSTS*: *VaPAL3*, *VaSTS2*, *VaSTS3*, *VaSTS4*, *VaSTS5*, *VaSTS6* и *VaSTS8*. При этом влияние СК на экспрессию ключевых генов биосинтеза резвератрола (*PAL* и *STS*) значительно отличается от эффекта трансформации геном *rolB*. На этом основании мы предполагаем, что СК и белковый продукт гена *rolB* индуцируют биосинтез и накопление резвератрола, действуя через различные регуляторные пути.

Работа выполнена при поддержке грантов Дальневосточного отделения Российской академии наук, гранта Президента России (МК-714.2008.4) и гранта Фонда содействия отечественной науке и ДВО РАН (№ 09-III-B-06-234).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies // Anticancer Res. 2004. V. 24. P. 2783–2840.
- Docherty J.J., Fu M.M., Stiffler B.S., Limperos R.J., Pokabla C.M., DeLucia A.L. Resveratrol Inhibition of Herpes Simplex Virus Replication // Antiviral. Res. 1999. V. 43. P. 145–155.
- Daroch F., Hoeneisen M., Gonzalez C.L., Kawaguchi F., Salgado F., Solar H., Garcia A. In Vitro Antibacterial Activity of Chilean Red Wines against *Helicobacter pylori* // Microbios. 2001. V. 104. P. 79–85.
- Pervaiz S. Resveratrol: From Grapevines to Mammalian Biology // Faseb J. 2003. V. 17. P. 1975–1985.
- Langcake P., Pryce R.J. A New Class of Phytoalexins from Grapevines // Experientia. 1977. V. 33. P. 151–152.
- Rupprich N., Hildebrand H., Kindl H. Substrate Specificity In Vivo and In Vitro in the Formation of Stilbenes – Biosynthesis of Rhaponticin // Arch. Biochem. Biophys. 1980. V. 200. P. 72–78.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quetier F., Wincker P. The Grapevine Genome Sequence Suggests Ancestral Hexaploidization in Major Angiosperm Phyla // Nature. 2007. V. 449. P. 463.
- Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., Pruss D., Pindo M., Fitzgerald L.M., Vezzulli S., Reid J., Malacarne G., Iliev D., Coppola G., Wardell B., Micheletti D., Macalma T., Facci M., Mitchell J.T., Perazzolli M., Eldredge G., Gatto P., Oyzerski R., Moretto M., Gutin N., Stefanini M., Chen Y., Segala C., Davenport C., Dematé L., Mraz A., Battilana J., Stormo K., Costa F., Tao Q., Si-Ammour A., Harkins T., Lackey A., Perbost C., Taillon B., Stella A., Solovyev V., Fawcett J.A., Sterck L., Vandepoele K., Grando S.M., Toppo S., Moser C., Lanchbury J., Bogden R., Skolnick M., Sgaramella V., Bhattacharjee S.K., Fontana P., Gutin A., van de Peer Y., Salamini F., Viola R. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety // PLoS One. 2007. V. 2. P. e1326.
- Sparvoli F., Martin C., Scienza A., Gavazzi G., Tonelli C. Cloning and Molecular Analysis of Structural Genes Involved in Flavonoid and Stilbene Biosynthesis in Grape (*Vitis vinifera* L.) // Plant Mol. Biol. 1994. V. 24. P. 743–755.
- Kao Y.Y., Harding S.A., Tsai C.J. Differential Expression of Two Distinct Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes in Condensed Tannin-Accumulating and Lignifying Cells of Quaking Aspen // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 796–807.
- Chaman M.E., Copaja S.V., Argandoña V.H. Relationships between Salicylic Acid Content, Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) Activity, and Resistance of Barley to Aphid Infestation // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 2227–2231.
- Raes J., Rohde A., Christensen J.H., van de Peer Y., Boerjan W. Genome-Wide Characterization of the Lignification Toolbox in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 1051–1071.
- Cochrane F.C., Davin L.B., Lewis N.G. The *Arabidopsis* Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family: Kinetic Characterization of the Four PAL Isoforms // Phytochemistry. 2004. V. 65. P. 1557–1564.
- Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. Phenylalanine Ammonia-Lyase and Stilbene Synthase Gene Expression in *rolB* Transgenic Cell Cultures of *Vitis amurensis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. P. 647–655.
- Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The *rolB* Gene-Induced Overproduction of Resveratrol in *Vitis amurensis* Transformed Cells // J. Biotechnol. 2007. V. 128. P. 681–692.
- Estruch J., Schell J., Spena A. The Protein Encoded by the *rolB* Plant Oncogene Hydrolyses Indole Glucosides // EMBO J. 1991. V. 10. P. 3125–3128.
- Nilsson O., Crozier A., Schmülling T., Sandberg G., Olofsson O. Indole-3-Acetic Acid Homeostasis in Transgenic Tobacco Plants Expressing the *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* Gene // Plant J. 1993. V. 3. P. 681–689.
- Filippini F., Rossi V., Marin O., Trovato M., Costantino P., Downey P.M., Lo Schiavo F., Terzi M. A

- Plant Oncogene as a Phosphatase // *Nature*. 1996. V. 379. P. 499–500.
19. *Moriuchi H., Okamoto C., Nishihama R., Yamashita I., Machida Y., Tanaka N.* Nuclear Localization and Interaction of RolB with Plant 14-3-3 Proteins Correlates with Induction of Adventitious Roots by the Oncogene *rolB* // *Plant J.* 2004. V. 38. P. 260–275.
 20. *Bekesiova I., Nap J.P., Mlynarova L.* Isolation of High Quality DNA and RNA from Leaves of the Carnivorous Plant *Drosera rotundifolia* // *Plant Mol. Biol. Rep.* 1999. V. 17. P. 269–277.
 21. *Kiselev K.V., Kusaykin M.I., Dubrovina A.S., Bezverbny D.A., Zvyagintseva T.N., Bulgakov V.P.* The *rolC* Gene Induces Expression of a Pathogenesis-Related β -1,3-Glucanase in Transformed Ginseng Cells // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 2225–2231.
 22. *Персиянова Е.В., Киселев К.В., Булгаков В.П., Тимченко Н.Ф., Чернодед Г.К., Журавлев Ю.Н.* Индукция защитных реакций в каллусных культурах женьшения при взаимодействии с патогеном человека *Yersinia pseudotuberculosis* // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. С. 834–841.
 23. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Veselova M.V., Isaeva G.A., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N.* Enhanced Resveratrol Accumulation in *rolB* Transgenic Cultures of *Vitis amurensis* Correlates with Unusual Changes in *CDPK* Gene Expression // *J. Plant Physiol.* 2009. V. 166. P. 1194–1206.
 24. *Киселев К.В., Чернодед Г.К.* Соматический эмбриогенез в культуре клеток женьшения *Panax ginseng*, вызванный онкогеном *rolC*, связан с повышением экспрессии генов *WUS* и *SERK* // *Генетика*. 2009. Т. 45. С. 511–518.
 25. *Des Marais D.L., Rausher M.D.* Escape from Adaptive Conflict after Duplication in an Anthocyanin Pathway Gene // *Nature*. 2008. V. 454. P. 762–U85.