

Федеральное государственное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН)

РЕФЕРАТ - ПРЕЗЕНТАЦИЯ

«Изучение устойчивости к абиотическим стрессам винограда амурского и биосинтеза ценных стильбенов»

№	Ф.И.О. авторов, ученые степени и звания, должности по основному месту работы
1.	Киселев Константин Вадимович, к.б.н., в.н.с. лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (руководитель работы)
2.	Алейнова Ольга Артуровна, к.б.н., с.н.с. лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
3.	Дубровина Александра Сергеевна, к.б.н., с.н.с. лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
4	Нитяговский Николай Николаевич, аспирант 1 года обучения, м.н.с. лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
5	Огнева Злата Владимировна, аспирант 4 года обучения, вед.инженер лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
6	Супрун Андрей Романович, аспирант 1 года обучения, м.н.с. лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
7	Тюнин Алексей Петрович, к.б.н., с.н.с. лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

Исследование механизмов регуляции устойчивости растений к стрессам и биосинтеза вторичных метаболитов растений является одной из самых актуальных проблем в физиологии и биотехнологии растений. Огромное множество вторичных метаболитов растений являются ценными не только для медицины и фармакологии, но и выполняют важные функции для жизнедеятельности и формирования стрессоустойчивости самого растения, что имеет важное значение для сельского хозяйства. Понимание фундаментальных молекулярно-генетических механизмов, регулирующих биосинтез ценных вторичных метаболитов, в том числе стильбенов, и устойчивости растений к абиотическим стрессам необходимо для последующей разработки стратегии получения растений, культур клеток растений и штаммов микроорганизмов, которые могли бы использоваться как альтернативные источники и продуценты целевых биологически активных веществ (БАВ).

Наша работа посвящена изучению регуляции стильбенов и устойчивости винограда к абиотическим стрессам посредством кальциевой внутриклеточной сигнализации клеток растений. Дикий виноград *Vitis amurensis* Rupr., произрастающий на Дальнем Востоке России, является уникальным по своим свойствам, поскольку выдерживает довольно низкие температуры, а также является лидером по содержанию стильбенов. Стильбены – это относительно небольшая группа фенольных вторичных метаболитов растений, ключевым и наиболее известным среди которых является *транс*-резвератрол или *транс*-ресвератрол (3,5,4'-тригидрокси-*транс*-стильбен). Установлено, что *т*-резвератрол способен предупреждать возникновение и развитие онкологических и сердечнососудистых заболеваний, оказывает антиаллергическое действие, замедляет процесс старения. Регуляция устойчивости к абиотическим стрессам и вторичного метаболизма растений может осуществляться на различных уровнях, включающих транскрипцию, процессинг РНК, трансляцию, а также пострансляционные модификации – фосфорилирование-

дефосфорилирование белков. В нашем исследовании нам удалось понять, где находятся точки соприкосновения между транскрипционными факторами и такими семействами регуляторных генов, как кальций-зависимые протеинкиназы (CDPKs), поскольку известно, что гены кальций-сенсорных белков выполняют важнейшие функции в регуляции защитных реакций растений, в том числе в регуляции устойчивости к абиотическим стрессам и биосинтеза вторичных метаболитов.

В ходе работы были получены следующие результаты:

1. Впервые изучено влияние трансформации растительных клеток геном *rolB* из *A. rhizogenes* на биосинтез стильбенов. В клеточной культуре *V. amurensis*, активно экспрессирующей ген *rolB*, продукция *транс-резвератрола* клетками составила 111.5 мг/л среды или 1431.3 мкг/г сырого веса клеток (2.32% от сухого веса клеток), что значительно превышает ранее сообщаемые данные для резвератрол-продуцирующих клеточных культур растений. Патент «Способ получения резвератрола» (Заявка 2006135294).

2. Были получены клеточные линии винограда амурского, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS*. Содержание стильбенов в клетках *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих гены *VaSTS*, достоверно до 0.04-0.06% от сухой биомассы. Установлено, что сверхэкспрессия генов *STS* из ели аянской *Picea jezoensis* в клетках винограда амурского приводила к значительному увеличению содержания стильбенов до 3.1 мг/г от сухой. Данное увеличение было значительно выше, чем при сверхэкспрессии генов *STS* из винограда.

Показано, что обработка листьев винограда *V. amurensis* и игл ели *P. jezoensis* предшественниками фенольных соединений увеличивает содержание ценных стильбенов и экспрессию генов биосинтеза стильбенов. Более того данное увеличение коррелировало с повышенной выживаемостью листьев и игл после губительного воздействия ультрафиолета. Таким образом, предложен простой и эффективный способ увеличения содержания стильбенов и устойчивости листьев винограда и игл ели после ультрафиолетового облучения, которое является одним из самых

губительных воздействий для растений. Получено несколько трансгенных гомозиготных линий растений арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *STS* из винограда амурского. Полученные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие гены *STS*, были значительно более устойчивы к ультрафиолетовому излучению (УФ-С, УФ-В) по сравнению с контрольными растениями. Патент «Способ увеличения устойчивости растений к воздействию ультрафиолета» (Заявка 2020112942).

3. Показано, что увеличение уровня продукции резвератрола в клетках *V. amurensis* под действием салициловой кислоты связано с активным деметилированием нуклеотидных последовательностей генов *VaSTS2* и *VaSTS10*, что соответствовало увеличению экспрессии этих генов и продукции резвератрола. Был изучен молекулярный механизм, лежащий в основе индуцирующего воздействия ультрафиолета на биосинтез резвератрола в клетках *V. amurensis*. Были определены транскрипты кДНК *VaMyb1* и *VaMyb2*, принадлежащие к семейству транскрипционных факторов *R2R3-Myb*. Показано, что изменение их экспрессии связано с изменением уровня продукции резвератрола в клетках *V. amurensis*.

4. Была проведена оценка участия малых некодирующих РНК в процессе регуляции биосинтеза стильбенов в клетках амурского винограда при помощи метода высокопроизводительного секвенирования. Установлено, что биосинтез стильбенов в клетках амурского винограда регулируется малыми некодирующими РНК опосредованно, через регуляцию транскрипционных факторов *VaWRKY53* и *VaCAMTA4*, а также путём регуляции смежного биосинтетического пути биосинтеза флавоноидов и регуляцией экспрессии гена одного из главных белков клеточного ответа на заражение фитопатогенами.

5. Проанализирован состав стильбенов в 12 клеточных линиях *V. amurensis* и *V. coignetiae*. Сравнительный анализ показал, что содержание стильбенов в культурах клеток, полученных из *V. coignetiae* было выше, чем в культурах клеток *V. amurensis*.

6. Нами были накоплены и опубликованы многочисленные экспериментальные результаты, указывающие на участие кальциевой сигнальной системы в целом и CDPK, одного из классов кальциевых сенсоров, в регуляции биосинтеза стильбенов винограда. В ходе работы установлено, что сверхэкспрессия генов *VaCPK1*, *VaCPK20*, *VaCPK26* и *VaCPK29* в культурах клеток винограда значительно увеличивала накопление стильбенов. А именно, сверхэкспрессия гена *VaCPK20* в полученных трансгенных клеточных линиях *V. amurensis* достоверно увеличивает до 34 мг/л продукцию резвератрола. Полученные данные показали, что гены *VaCPK1*, *VaCPK20*, *VaCPK26* и *VaCPK29* являются позитивными регуляторами биосинтеза стильбенов в *V. amurensis*, в то время как гены *VaCPK9*, *VaCPK13*, *VaCPK21*, *VaCPK3a* не участвуют в регуляции биосинтеза этих веществ.

7. Установлено, что растения арабидопсиса и культуры клеток винограда сверхэкспрессирующие некоторые гены *CDPK V. amurensis*, были более устойчивы к холодовому стрессу и засухе (сверхэкспрессия *VaCDPK20*), солевому стрессу (сверхэкспрессия *VaCDPK21*), а также к тепловому и осмотическому стрессам (сверхэкспрессия *VaCDPK29*).

Накопленные коллективом результаты предоставляют ценную информацию для разработки технологий получения и культивирования различных растений, устойчивых к воздействию неблагоприятных условий окружающей среды, а также коллективом получены и запатентованы альтернативные источники ценного БАВ – резвератрола. Данная работа способствует переходу к высокопродуктивному и экологически чистому агрохозяйству, разработке и внедрению систем рационального применения средств применения химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений.

Результатом работы является 127 публикаций, из них 49 статей индексируемых в международных изданиях Web of Science и Scopus, 2 патента. Для реализации работы было получено 12 грантов научных фондов

(РФФИ, РНФ, Фонд Династия) и 2 гранта Фонда содействия инновациям по программам «УМНИК» и «СТАРТ». По данной теме было защищено 4 кандидатские диссертации, идет подготовка к защите 5-й кандидатской диссертации.

Работа по внедрению полученных разработок только началась. Сейчас полученные результаты находят живой интерес у ряда компаний и научно-исследовательских институтов, занимающихся выращиванием и производством продукции на основе винограда (группа компаний ЭФКО, Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магarach» РАН). Идет обсуждение возможности внедрения ряда разработок в производственный и научно-исследовательский процесс.