

УДК 577.113

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ НА БИОСИНТЕЗ РЕЗВЕРАТРОЛА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ВИНОГРАДА АМУРСКОГО *Vitis amurensis* Rupr.

© 2013 г. К. В. Киселёв*, О. А. Шумакова**, А. Ю. Маняхин***

*Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: kiselev@biosoil.ru

**Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690090

***Горнотаежная станция ДВО РАН, Горнотаежное, 692533

Поступила в редакцию 3.10.2011 г.

Исследован биосинтез резвератрола при добавлении предшественника биосинтеза — фенилаланина (**Фен**). Показано, что добавление **Фен** достоверно увеличивало экспрессию генов фенилаланин-аминок-лиаз (**ФАЛ**), стильбенсинтаз (**СТС**) и продукцию резвератрола в 8.5 раза. Полученные данные по продукции резвератрола при добавлении **Фен** и кумаровой кислоты (**КК**) сравнены с известными аналогами.

DOI: 10.7868/S0555109913010078

В настоящее время одним из перспективных и активно развивающихся направлений в биотехнологии является поиск альтернативных источников получения биологически активных веществ (**БАВ**). Большинство из этих веществ обладают ценными фармакологическими свойствами и поэтому являются важнейшими компонентами различных лекарственных препаратов. Трудность промышленного получения **БАВ** — недостаток быстро восполняемых сырьевых источников. В настоящее время к таким источникам промышленного производства **БАВ** относятся клеточные культуры и генетически модифицированные микроорганизмы. Однако опыт получения клеточных культур показывает, что содержание в них целевых веществ чаще всего ниже, чем необходимо для эффективного производства [1]. Поэтому увеличение содержания **БАВ** в клетках растений *in vitro* с помощью различных биотехнологических приемов актуально на сегодняшний день.

Виноград содержит ряд **БАВ**, которые благоприятно воздействуют на организм человека. Среди таких веществ самое известное — это резвератрол: 3,5,4'-тригидроксистилен [1]. Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких, как тутовое дерево, арахис, клюква и голубика. Виноград, в том числе и дикий виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr., относят к основным источникам резвератрола [1]. Известно, что резвератрол обладает превентивными свойствами против некоторых видов рака, положительно влияет на сердечнососудистую систему, а также обладает высоким фармакологическим потенциалом в лечении

нейродегенеративных заболеваний [2–5]. Резвератрол выделяется среди полифенолов растений своей мощной антиоксидантной активностью, которая превосходит активность витамина Е [6, 7]. Кроме того, существуют данные о положительном эффекте резвератрола на продолжительность жизни организмов [8, 9]. В настоящее время на основе этого вещества уже создаются биологически активные добавки к пище. Резвератрол обладает высоким потенциалом для применения в фитотерапии и фармакологии [5].

На сегодняшний день нет дешевого и эффективного способа получения резвератрола. В растениях содержание этого вещества невелико, и необходимо довольно долгое время для их выращивания. Поэтому резвератрол, выделенный из растений, является дорогостоящим сырьем для промышленного производства **БАВ**. Клеточные культуры винограда, при условии их высокой продуктивности, могли бы стать альтернативным источником резвератрола. Однако известно, что содержание резвератрола в клеточных культурах растений обычно ниже необходимого для использования этих культур в промышленном производстве стильбенов [1, 10], поэтому следует индуцировать биосинтез резвератрола с помощью методов биотехнологии. Классическими методами индукции синтеза вторичных метаболитов в культурах клеток растений являются методы селекции и отбора наиболее продуктивных клеточных линий, варьирование состава питательных сред, добавление предшественников, а также обработка клеток разнообразными элиситорами.

Кроме клеточных культур, в настоящее время резвератрол получают при помощи добавления предшественника резвератрола к метаболически модифицированной *Escherichia coli*, экспрессирующей растительную стильбенсинтазу (СТС) и ку-марат-КоА-4-лигазу (ККЛ) [11].

Цель работы – исследование влияния предшественников фенольных соединений растений на продукцию резвератрола в культуре клеток винограда и ее сравнение с синтезом в генетически модифицированных микроорганизмах.

МЕТОДИКА

Растительный материал и клеточные культуры.

Использовали две модельные системы: клеточную культуру *V. amurensis* (V2, [12]) с низким содержанием резвератрола (не более 0.01% от сухой массы клеток) и культуру клеток *V. amurensis*, трансгенная по гену *rolB* из *Agrobacterium rhizogenes* (VB2, [12]), отличающаяся высоким уровнем биосинтеза резвератрола (~0.5–1.5% от сухой массы). Каллусная культура V2 получена в 2002 г. из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis* Rurp. (*Vitaceae*), которое было собрано на юге Приморского края и определено в отделе ботаники Биолого-почвенного института ДВО РАН [12]. Трансгенная каллусная культура VB2 была получена в результате трансформации суспензионной культуры V2 штаммом *A. tumefaciens* GV3101/pMP90RK, несущим векторную конструкцию rPCV002-CaMV [12]. В конструкции ген *rolB* находится под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты 35S CaMV [13].

Использовали агаризованную модифицированную питательную среду по Мурасиге и Скугу с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина, 2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, 0.2 мг/л тиамина, 0.5 мг/л никотиновой кислоты, 0.5 мг/л пиридоксина, 100 мг/л мезо-инозита, 100 мг/л пептона, 25 г/л сахарозы и 7 г/л агара. [14]. Питательную среду разливали в пробирки диаметром 20 мм высотой 200 мм по 15 мл. Интервал субкультивирования составлял 35–40 сут в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Обработка фенилаланином (Фен). Фенилаланин (Фен, “Panheas”, Испания) растворяли в 50%-ном этиловом спирте. Растворы Фен добавляли в питательные среды в концентрации 0.1, 0.5 и 2 мМ в асептических условиях после автоклавирования (исходный раствор Фен 20 мг/мл).

Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК (кДНК). кДНК получали, используя 1.5 мкг тотальной РНК, с помощью набора для обратной транскрипции (“Силекс М”, Россия). Для проведения обратно-транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1-кратный ОТ буфер, по 0.25 мМ каждого

из 4 дезоксинуклеозид трифосфатов, 0.2 мкМ праймера, последовательность которого включала 15 дезокситимидин трифосфатов (олиго-(dT)₁₅ праймер), 200 единиц активности обратной транскриптазы из вируса лейкемии мышей Молони. Реакцию проводили при 37°C в течение 1–2 ч. Образцы полученных продуктов (0.5 мкл) были затем амплифицированы при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Количественная оценка экспрессии генов ФАЛ и СТС. Для количественного анализа экспрессии генов ФАЛ и СТС использовали ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ). ПЦР РВ для генов был выполнен согласно рекомендациям, описанным Гиулетти и др. [15]. Геноспецифичные пары праймеров и TaqMan пробы представлены ранее в работе [16]. кДНК амплифицировали с помощью набора для ПЦР (“Синтол”, Россия), использовали iQ5 амплификатор с функцией ПЦР РВ (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) с оптической системой программного обеспечения, версия 2.0. Условия проведения ПЦР РВ подробно описаны ранее [17–19].

Определение содержания стильбенов в образцах ткани *V. amurensis*. Определение качественного и количественного содержания стильбенов производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в Горно-таежной станции ДВО РАН, куда были переданы образцы высушенной ткани *V. amurensis* в соответствии с методикой, описанной ранее [20]. Количество резвератрола определяли путем сравнения со стандартом резвератрола (“Sigma-Aldrich”, США).

Статистическая обработка полученных результатов. Результаты были обработаны при помощи программы Statistica, версия 9.0. Все данные представлены, как среднее значение \pm стандартная ошибка. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран, как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние Фен на рост и биосинтез резвератрола в клеточных культурах *V. amurensis*. Биосинтез резвератрола осуществляется фенилпропаноидным путем (рисунок), поэтому мы предположили, что увеличения продукции резвератрола растительными клетками можно добиться стимулированием фенилпропаноидного пути на разных этапах биосинтеза. Фенилаланин-аммиак-лиаза (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) – первый фермент в этом пути катализирует дезаминирование Фен, превращая его в коричную кислоту, поэтому присутствие Фен – важный фактор для начала биосинтеза резвератрола.

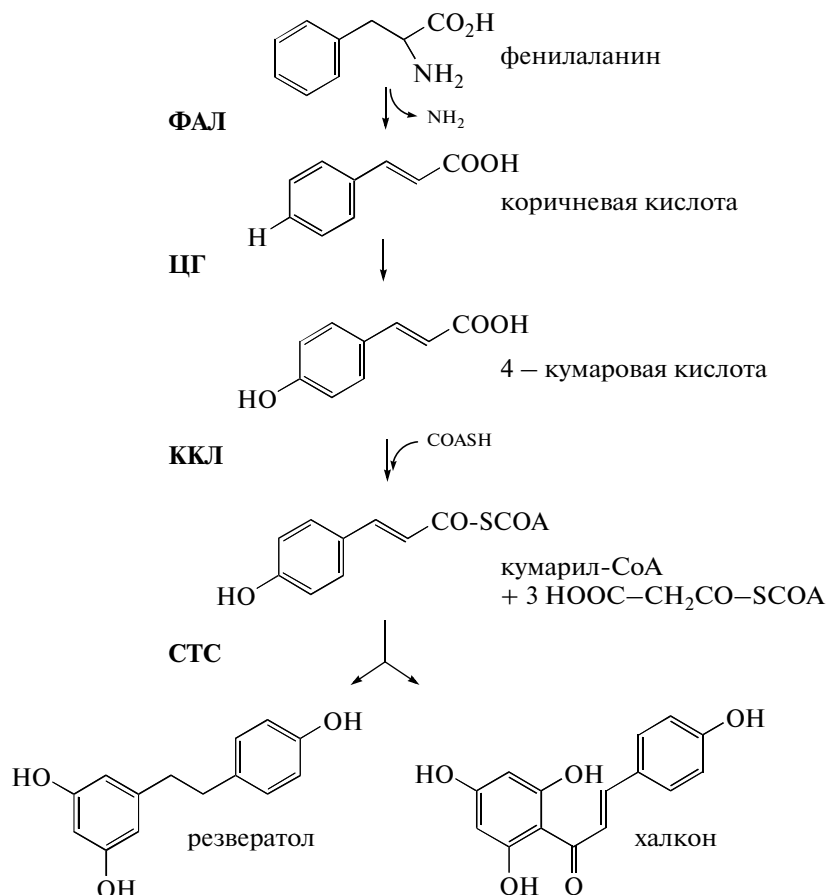


Схема биосинтеза резвератрола и халкона. ФАЛ – фенилаланин-аммиак-лиаза, ЦГ – циннамат-4-гидроксилаза, ККЛ – кумарат-КоА-4-лигаза, СТС – стильбенсинтаза, ХС – халконсинтаза.

Нами показано, что добавление Фен в концентрациях 0.5 и 2 мМ в питательные среды ингибировало прирост сырой биомассы как в контрольной культуре V2, так и в *rolB*-трансгенной культуре клеток VB2 (табл. 1). Содержание резвератрола в контрольной культуре V2 при добавлении Фен достоверно увеличилось в 6.3–14.5 раз. При этом необходимо заметить, что максимальная продукция резвератрола в контрольной культуре V2 (6.82 мг/л) наблюдалась при добавлении 0.1 мМ Фен. Также нами показано, что добавление 0.1 и 2 мМ Фен ведет к недостоверному увеличению продукции резвератрола в *rolB*-трансгенной культуре VB2 (17–20.7 мг/л, в 1.2–1.5 раза соответственно).

Несмотря на то, что степень увеличения содержания резвератрола выше в культуре V2, наибольшая продукция резвератрола среди всех проанализированных вариантов была именно в трансгенной VB2 культуре (20.7 мг/л), что в 3.1 раза выше, чем в V2 культуре при обработке Фен. Это обусловлено тем, что продукция резвератрола в трансгенной культуре VB2 без добавления предшественников фенольных соединений растений

изначально была выше в 17.5 раза, чем в контрольной культуре V2.

Последним ферментом в биосинтезе резвератрола и его производных в фенилпропаноидном пути является стильбенсинтаза (СТС, КФ 2.3.1.95), которая конденсирует 3 молекулы малонил-КоА с одной молекулой кумарил-КоА, конечным продуктом этой реакции является резвератрол (рисунок). Кумарил-КоА образуется в результате формирования ферментом циннамат-4-гидроксилаза (ЦГ) тиоэфирной связи между карбоксильной группой КК и коэнзимом А. Поэтому мы предположили, что добавление КК должно активировать последние этапы биосинтеза резвератрола, тем самым повысить продукцию резвератрола в культурах клеток *V. amurensis*. Основные результаты влияния обработки КК на продукцию биомассы клеток и резвератрола клеточными культурами винограда получены ранее [16].

Далее в клеточных культурах V2 и VB2, обработанных Фен, анализировали экспрессию генов ФАЛ и СТС, белковые продукты которых участвуют в биосинтезе резвератрола.

Таблица 1. Влияние Фен на рост и биосинтетическую продукцию клеточных культур винограда *V. amurensis* V2 и VB2

Продукция	Фен, мМ							
	V2				VB2			
	0	0.1	0.5	2	0	0.1	0.5	2
Сырая биомасса, г/л	208.9 ± 21.1	204.3 ± 26.0	119.2 ± 4.9**	110.7 ± 5.4**	75.9 ± 16.4	65.4 ± 17.3	49.0 ± 4.4	38.5 ± 4.0*
Сухая биомасса, г/л	8.3 ± 0.9	5.2 ± 0.6	8.1 ± 0.9	6.7 ± 0.7	5.5	5.7	2.8	6.7
Резвератрол, % от сухой массы	0.009 ± 0.001	0.131 ± 0.071*	0.071 ± 0.03*	0.057 ± 0.024*	0.254 ± 0.069	0.298 ± 0.071	0.339 ± 0.063	0.309 ± 0.132
Суммарная продукция резвератрола, мг/л	0.8 ± 0.2	6.8 ± 1.5*	5.8 ± 1.4*	3.8 ± 1.2	14.0 ± 2.2	17.0 ± 3.5	9.5 ± 1.9	20.7 ± 5.3

Примечание к таблицам 1–3. V2k, VB2k – экспрессия *rolB* и *ФАЛ* в культурах клеток V2 и VB2 без добавления Фен; V2-0.1, VB2-0.1 – экспрессия в культурах клеток V2 и VB2 при добавлении 0.1 мМ Фен; V2-0.5, VB2-0.5 – экспрессия в культурах клеток V2 и VB2 при добавлении 0.5 мМ Фен; V2-2, VB2-2 – экспрессия в культурах клеток V2 и VB2 при добавлении 2 мМ Фен; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, сравнивали с экспрессией генов *rolB* и *ФАЛ* в культурах клеток V2 и VB2 без добавления Фен.

Таблица 2. Данные об экспрессии генов *rolB* и *ФАЛ* в культурах V2 и VB2 при добавлении Фен, полученные методом ПЦР РВ

Ген	Фен							
	V2k	V2-0.1	V2-0.5	V2-2	VB2k	VB2-0.1	VB2-0.5	VB2-2
<i>rolB</i>	0	0	0	0	0.55 ± 0.21	0.56 ± 0.18	0.55 ± 0.22	0.63 ± 0.23
<i>ФАЛ1</i>	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.26 ± 0.10	0.53 ± 0.20	0.43 ± 0.21	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.10
<i>ФАЛ2</i>	0.31 ± 0.09	0.68 ± 0.19	0.58 ± 0.13	0.82 ± 0.10*	0.42 ± 0.11	0.31 ± 0.08	0.37 ± 0.06	0.36 ± 0.14
<i>ФАЛ3</i>	0.10 ± 0.07	0.09 ± 0.05	0.77 ± 0.08**	0.51 ± 0.21	0.28 ± 0.17	0.24 ± 0.11	0.24 ± 0.14	0.25 ± 0.13
<i>ФАЛ4</i>	0.09 ± 0.04	0.17 ± 0.11	0.13 ± 0.05	0.21 ± 0.14	0.64 ± 0.20	0.24 ± 0.14	0.22 ± 0.15	0.23 ± 0.13
<i>ФАЛ5</i>	0.11 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.33 ± 0.09	0.81 ± 0.19	0.36 ± 0.17	0.35 ± 0.16	0.29 ± 0.20

Влияние Фен на экспрессию генов *rolB*, *ФАЛ* и *СТС*. Уровень экспрессии генов *rolB*, *ФАЛ* и *СТС* был измерен при помощи ПЦР РВ в культурах клеток винограда при добавлении Фен. Экспрессия гена *rolB* в трансгенной культуре при добавлении Фен и КК значительно не изменялась (табл. 2; [16]), поэтому наблюдаемые изменения в VB2 культуре при добавлении предшественников мы склонны относить к влиянию вносимых веществ на экспрессию генов биосинтеза резвератрола.

Нами показано, что при добавлении Фен к контрольной культуре клеток V2 *V. amurensis* наблюдается тенденция на увеличение экспрессии всех генов *ФАЛ*, но достоверность степени увеличения экспрессии зависела от количества добавляемого Фен и гена *ФАЛ* (табл. 2). Так, мы наблюдали при добавлении 2 мМ Фен достоверное увеличение в 2.5 раза экспрессии гена *ФАЛ2*. Экспрессия *ФАЛ3* достоверно увеличилась в 7.8 раза при добавлении 0.5 мМ Фен в питательные среды культуры V2 (табл. 2).

При добавлении Фен в питательные среды контрольной клеточной культуры V2 также наблюдалась тенденция на увеличение экспрессии 9 из 10 генов *СТС*, которая зависела от количества добавляемого Фен и гена *СТС*. Концентрация 0.1 мМ Фен достоверно увеличила экспрессию генов *СТС4* и *СТС2* в 3.3–5 раз соответственно (табл. 3). Добавление 0.5 мМ Фен достоверно увеличило экспрессию генов *СТС1*, *СТС2*, *СТС3*, *СТС4*, *СТС6*, *СТС8* и *СТС10* 2.4–9.2 раза. Концентрация 2 мМ также достоверно увеличивала экспрессию *СТС4*, *СТС6*, *СТС8* и *СТС10*.

В трансгенной культуре VB2 при добавлении Фен наблюдалась тенденция на снижение экспрессии генов *ФАЛ* (табл. 2). Экспрессия генов *СТС* в клеточной культуре VB2 при добавлении Фен оставалась в пределах ошибки эксперимента, за исключением генов *СТС7* и *СТС5*, экспрессия которых при добавлении 0.5 мМ Фен достоверно увеличивалась в 3.9–4.1 раза соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Данные об экспрессии генов *СТС* в культурах V2 и VB2 при добавлении Фен, полученные методом ПЦР РВ

Ген	Фен							
	V2k	V2-0.1	V2-0.5	V2-2	VB2k	VB2-0.1	VB2-0.5	VB2-2
<i>СТС1</i>	0.14 ± 0.04	0.41 ± 0.12	0.67 ± 0.19*	0.40 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.15 ± 0.04
<i>СТС2</i>	0.07 ± 0.02	0.34 ± 0.09*	0.79 ± 0.17**	0.37 ± 0.13	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.23 ± 0.09	0.24 ± 0.09
<i>СТС3</i>	0.05 ± 0.02	0.39 ± 0.21	0.44 ± 0.09**	0.37 ± 0.20	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.38 ± 0.14	0.32 ± 0.10
<i>СТС4</i>	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.02**	0.41 ± 0.10**	0.44 ± 0.25*	0.15 ± 0.08	0.16 ± 0.10	0.48 ± 0.25	0.15 ± 0.06
<i>СТС5</i>	0.12 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.20 ± 0.6	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.67 ± 0.19*	0.41 ± 0.09*
<i>СТС6</i>	0.14 ± 0.04	0.37 ± 0.21	0.36 ± 0.14*	0.61 ± 0.19**	0.35 ± 0.09	0.28 ± 0.10	0.44 ± 0.13	0.43 ± 0.18
<i>СТС7</i>	0.14 ± 0.08	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.06	0.14 ± 0.04	0.73 ± 0.17*	0.22 ± 0.08
<i>СТС8</i>	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.15	0.19 ± 0.05*	0.45 ± 0.14*	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.12	0.36 ± 0.16	0.22 ± 0.11
<i>СТС9</i>	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.31 ± 0.19	0.13 ± 0.04	0.29 ± 0.14	0.28 ± 0.09	0.35 ± 0.14
<i>СТС10</i>	0.01 ± 0.01	0.22 ± 0.16	0.31 ± 0.19	0.22 ± 0.09*	0.17 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.33 ± 0.18	0.22 ± 0.07

Возможно, увеличение продукции резвератрола в контрольной культуре при добавлении Фен произошло за счет прямой активации фенилпропаноидного пути. Об этом свидетельствует достоверная активация экспрессии нескольких генов семейства *ФАЛ* (*ФАЛ2*, *ФАЛ3*). Продуктом экспрессии генов *ФАЛ* является фермент, который непосредственно дезаминирует Фен до коричной кислоты (рисунок) и тем самым увеличивает количество субстрата для дальнейшего каскада реакций фенилпропаноидного пути, что и приводит в конечном итоге к увеличению количества резвератрола. В трансгенной культуре VB2 фенилпропаноидный путь в норме находится в активированном состоянии, т.к. VB2 культура отличается повышенным содержанием резвератрола (табл. 1; [12, 14]) и экспрессией генов *ФАЛ* и *СТС* (табл. 2, 3 [14]), поэтому добавление Фен ведет к незначительному увеличению продукции резвератрола относительно увеличения в контрольной культуре V2.

Основные результаты влияния обработки КК на экспрессию генов *ФАЛ* и *СТС* получены ранее и представлены в [16]. При добавлении КК в питательные среды культур клеток *V. amurensis* V2 и VB2 экспрессия генов *ФАЛ* оставалась неизменной, либо наблюдалась тенденция на снижение экспрессии генов *ФАЛ* с повышением концентрации КК, экспрессия 2 из 10 генов *СТС* достоверно увеличивалась [16]. Таким образом, добавление КК не ведет к активации всего фенилпропаноидного пути, опосредованного увеличением экспрессии генов *ФАЛ*, как было при добавлении Фен, потому что экспрессия четырех генов *ФАЛ* из пяти достоверно ингибировалась [16]. Мы предполагаем, что добавление КК в питательные среды повысило содержание резвератрола через выборочное воздействие на экспрессию отдельных генов *СТС*, то есть через активацию послед-

него этапа в биосинтезе резвератрола — только отдельных реакций фенилпропаноидного пути.

Сравнение эффективности преобразования предшественников фенольных соединений в резвератрол в клетках растений и микроорганизмов. При добавлении 0.1 мМ Фен к контрольной культуре клеток винограда *V. amurensis* V2 продукция резвератрола увеличивалась в 8.5 раз (табл. 1), а при добавлении 0.1 мМ КК продукция резвератрола увеличилась в 16 раз [16]. Эти результаты показывают, что активация последних стадий фенилпропаноидного пути более эффективно действует на биосинтез резвератрола в клеточных культурах. Таким образом, мы показали, что эффективность КК в увеличении биосинтеза резвератрола выше, чем при добавлении Фен почти в 2 раза.

Недавно получены интересные для биотехнологического получения резвератрола результаты, где при добавлении КК к метаболически модифицированной *E. coli*, несущей на плазмиде перенесенные гены *ККЛ* и *СТС* из растений, выход резвератрола составил около 100 мг/л [11]. Мы решили сравнить уровень преобразования Фен и КК в резвератрол в клеточных культурах *V. amurensis* и в метаболически модифицированной *E. coli*. При добавлении 2 мМ Фен или 0.5 мМ КК [16] в культуру клеток винограда амурского в результате наибольшая продукция резвератрола в клетках винограда составила 0.09 мМ (20.7 мг/л) и 0.16 мМ (36.8 мг/л) соответственно. Необходимо при этом отметить, что в отличие от микроорганизмов, в норме в *rolB*-трансгенной культуре клеток в проводимых экспериментах было 0.06 мМ (14 мг/л, табл. 1) и 0.11 мМ резвератрола (25.8 мг/л, [16]), т.е. продукция резвератрола при добавлении Фен возросла на 0.03 мМ (6 мг/л), а при добавлении КК на 0.05 мМ (11 мг/л). Таким образом, эффективность преобразования пред-

шественников в резвератрол клетками винограда составила не более 10%. Метаболически модифицированная *E. coli* преобразует 1 мМ КК в 0.44 мМ резвератрола [11], следовательно, эффективность преобразования КК в резвератрол в бактериях составляет 44%. Таким образом, клетки винограда амурского более чем в 4 раза меньше преобразуют предшественники в резвератрол, чем клетки метаболически модифицированной *E. coli*. Эффективность преобразования резвератрола из добавляемых предшественников в клеточных культурах *V. amurensis* меньше, возможно, потому что в клетках растений есть ферменты как биосинтеза, так и его деградации до низкомолекулярных соединений или олигомеризации до более высокомолекулярных производных [21, 22].

Исследования были выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ (10-04-00189-а) и ДВО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kiselev K.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. № 2. P. 417–425.
2. Aggarwal B., Bhardwaj A., Aggarwal R., Seeram N., Shishodia S., Takada Y. // Anticancer Res. 2004. V. 24. № 5A. P. 2783–2840.
3. Li H., Yan Z.Y., Zhu J.A., Yang J., He J.S. // Neuropharmacology 2010. V. 60. № 2–3. P. 252–258.
4. Pervaiz S. // Faseb J. 2003. V. 17. № 14. P. 1975–1985.
5. Shankar S., Nall D., Tang S.N., Meeker D., Passarini J., Sharma J., Srivastava R.K. // Public Library of Science One. 2007. V. 6. № e16530.
6. Lastra C.A., Villegas I. // Biochem. Soc. Trans. 2007. V. 35. № 2. P. 1156–1160.
7. Chang H.C., Chen T.G., Tai Y.T., Chen T.L., Chiu W.T., Chen R.M. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2011. V. 31. № 3. P. 842–854.
8. Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., Sinclair D. // Nature. 2004. V. 430. № 7000. P. 686–689.
9. Giovannelli L., Pitozzi V., Jacomelli M., Mulinacci N., Laurenzana A., Dolara P., Mocali A. // J. Gerontol. Ser. A-Biol. Sci. Med. Sci. 2011. V. 66. № 1. P. 9–18.
10. Donnez D., Jeandet P., Clement C., Courot E. // Trends Biotechnol. 2009. V. 27. № 12. P. 706–713
11. Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C. // BioMed Central Biotechnol. 2006. V. 6. № 22.
12. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // J. Biotechnol. 2007. V. 128. № 3. P. 681–692.
13. Spena A., Schmulling T., Koncz C., Schell J.S. // EMBO J. 1987. V. 6. № 13. P. 3891–3899.
14. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. № 4. P. 647–655.
15. Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 386–401.
16. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 5–6. P. 1427–1436.
17. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2010. V. 103. № 2. P. 197–204.
18. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N. // Plant Cell Tissue Organ. Cult. 2011. V. 105. № 1. P. 65–72.
19. Киселёв К.В., Булгаков В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 618–624.
20. Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., Kiselev K.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 3. P. 727–736.
21. Chong J.L., Poutaraud A., Huguene P. // Plant Sci. 2009. V. 177. № 3. P. 143–155.
22. Jeandet P., Douillt-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 10. P. 2731–2741.

Effect of Plant Stilbene Precursors on the Biosynthesis of Resveratrol in *Vitis amurensis* Rupr. Cell Cultures

K. V. Kiselev^a, O. A. Shumakova^b, and A. Yu. Manyakhin^c

^a Laboratory of Biotechnology, Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^b Department of Biochemistry and Biotechnology, Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690090 Russia

^c Mountain Taiga Station, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Gornotaezhnoe, Primorskii krai, Ussuriisk region, 692533 Russia

e-mail: kiselev@biosoil.ru

Received October 3, 2011

Abstract—The biosynthesis of resveratrol after the application of a precursor for biosynthesis, i.e., phenylalanine (Phe), has been studied. The application of Phe has been shown to increase significantly the expression of the phenylalanine—ammonia—lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) genes and enhance the production of resveratrol by 8.5 times. Data on resveratrol production after the addition of Phe and coumaric acid (CA) were compared with known analogs.