

УДК 581.1;577.19

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРЕССОУСТОЙЧИВОЙ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ ПШЕНИЦЫ, СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН ФЕРМЕНТА БИОСИНТЕЗА ЖАСМОНАТОВ, 12-ОКСОФИТОДИЕНОАТРЕДУКТАЗЫ *AtOPR3*

© 2024 г. Д. Н. Мирошниченко^{a, b}, А. В. Пиголев^a, К. Г. Тихонов^a, Е. А. Дегтярёв^a,
Е. Ф. Лещенко^{a, c}, В. В. Алексеева^b, А. С. Пушкин^b, С. В. Долгов^b, А. Баснет^d, Д. П. Горбач^d,
Т. С. Леонова^d, А. А. Фролов^{d, e}, Т. В. Савченко^{a, *}

^aПуцинский научный центр биологических исследований,
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук,
г. Пушкино, Россия

^bФилиал Института биоорганической химии Российской академии наук
им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, г. Пушкино, Россия

^cПуцинский филиал Российского биотехнологического университета, г. Пушкино, Россия

^dДепартамент химии природных соединений,
Институт биохимии растений им. Лейбница,
г. Галле/Заале, Германия

^eИнститут физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: savchenko_t@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 27.11.2023 г.

Жасмонаты участвуют в регуляции защитных механизмов в растениях при неблагоприятных условиях среды, а также их роста и развития. В основном, знания о путях биосинтеза и передачи сигналов жасмонатов получены благодаря исследованию модельного двудольного растения *Arabidopsis thaliana*, однако их функции и молекулярные механизмы действия у однодольных растений, а именно у пшеницы, до сих пор остаются малоизученными. В данной работе мы исследовали устойчивость к стрессовым воздействиям мягкой пшеницы сорта Саратовская-60 и созданной на ее основе трансгенной линии (Тг-3) со сверхэкспрессией гена биосинтеза жасмонатов, 12-оксофитодиеноатредуктазы *AtOPR3* (12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 3) из *Arabidopsis thaliana*. Несмотря на высокий уровень экспрессии перенесенного гена *AtOPR3*, содержание жасмоновой кислоты и ее конъюгата с изолейцином оказалось неизменным в листьях интактных трансгенных растений. После механического повреждения листьев, содержание жасмоновой кислоты в изучаемой трансгенной линии Тг-3 оказалось даже ниже в сравнении с поврежденными нетрансгенными растениями пшеницы Саратовская-60. Различий в содержании 12-оксофитодиеновой кислоты и жасмоноил-изолейцина не было. При этом стресс-индуцированный уровень экспрессии собственных генов алленоксидсинтазы, регулируемых жасмонатами, в трансгенных растениях Тг-3 стал выше, в сравнении с нетрансгенным контролем. Трансгенные растения пшеницы проявили повышенную устойчивость к заражению некротрофным грибом *Botrytis cinerea*, а также к осмотическому стрессу, вызванному полиэтиленгликолем при прорастании семян. В листьях трансгенной линии Тг-3, зараженных *B. cinerea*, наблюдалась более высокая активность каталазы, фермента антиоксидантной системы, в сравнении с зараженными листьями нетрансгенных растений, что свидетельствует о ее возможной роли в повышении устойчивости Тг-3 к фитопатогену. Таким образом, немногочисленные данные об особенностях функционирования жасмонатной системы в пшенице дополнены новыми данными о роли экспрессии одного из ключевых генов биосинтеза жасмонатов, а именно 12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE, в регуляции защитных ответов при пониженном стресс-индуцированном уровне жасмоновой кислоты.

Ключевые слова: *Botrytis cinerea*, *Triticum aestivum*, жасмонаты, осмотический стресс, трансгенная пшеница, 12-оксофитодиеноат-редуктаза, устойчивость.

DOI: 10.31857/S0015330324020051, EDN: OBMHDY

ВВЕДЕНИЕ

Растительные гормоны жасмонаты регулируют защитные ответы растений в неблагоприятных условиях окружающей среды, а также некоторые аспекты их роста и развития [1, 2]. В настоящее время путь биосинтеза этих гормонов хорошо исследован, известны основные, хотя и не все, сигнальные пути и механизмы, посредством которых реализуются их регуляторные функции [3].

Регулируемые жасмонатами защитные механизмы являются индуцибельными. В отличие от конститутивных защитных механизмов они подавлены (или не активированы) в благоприятных условиях среды и активируются лишь при необходимости. В связи с этим содержание гормонов в тканях и активность системы передачи их сигналов строго контролируются, в том числе путем регуляции активности ферментов пути биосинтеза жасмонатов и катаболизма/превращений биологически активных форм жасмонатов в неактивные [4, 5]. Уровень этих гормонов и активность сигнальных путей регулируются в зависимости от стадии развития растений, типа ткани, условий окружающей среды. Базовый уровень жасмонатов в интактных листьях растений, растущих в благоприятных условиях, очень низок. В этом состоянии основные репрессоры жасмонатных ответов, транскрипционные факторы (ТФ) JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ), взаимодействуя с группой ко-репрессорных белков, подавляют работу других ТФ, таких как MYC2 или R2R3-MYB (MYB21, MYB24 и др.), которые являются положительными регуляторами жасмонат-индуцируемых генов [6, 7]. Другими важными репрессорами сигналинга жасмоновой кислоты являются ТФ bHLH подгруппы III_d, к которым относятся bHLH17/JASMONATE ASSOCIATED MYC2-like (JAM1), bHLH13/JAM2, bHLH3/JAM3 и bHLH14 [8]. Эти ТФ взаимодействуют с белками JAZ и препятствуют работе транскрипционных активаторов жасмонатных ответов, таких как ТФ MYC2 или транскрипционный комплекс WD-repeat/bHLH/MYB, отвечающих за устойчивость к насекомым и некротрофным патогенам, биосинтез антоцианов, ингибирование роста корня, формирование трихом и репродуктивных органов и деградация хлорофилла [9–11]. Известен и другой репрессор, например, WRKY57, который, взаимодействуя с белками JAZ4/JAZ8 и IAA29

(Indole-3-Acetic Acid inducible 29), подавляет жасмонат-индуцируемое старение листьев [12]. Большой интерес представляет репрессор JAV1 (JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF), который подавляет устойчивость растений к патогенам и насекомым, но не затрагивает функции жасмонатов, связанные с регуляцией роста [13, 14].

В условиях стресса, в первую очередь механического повреждения тканей, накопление жасмонатов, так называемый “жасмонатный взрыв”, происходит очень быстро, отчасти благодаря положительной регуляции экспрессии генов биосинтетического пути самими продуктами биосинтеза [15]. Есть и другие факторы, которые вносят вклад в быстрое накопление жасмонатов в неблагоприятных условиях. Так, например, этилен положительно регулирует накопление жасмонатов в условиях стресса с помощью ТФ ERF15 (Ethylene Response Factor15) и ERF16, которые выступают транскрипционными активаторами генов липоксигеназ, алленоксидсинтазы (AOS) и оксофитодиеноатредуктазы (OPR3), ключевых генов биосинтеза жасмонатов [16]. Образовавшиеся в условиях стресса жасмонаты активируют путь передачи сигнала, связываясь с рецептором COI1 (Coronatine-Insensitive 1), и вызывая деградацию белков JAZ, что приводит к высвобождению других ТФ – положительных регуляторов жасмонатных ответов [15].

Важно, чтобы содержание этих стрессовых гормонов быстро возвращалось к базовому уровню после того, как стресс миновал, так как повышенное содержание жасмонатов отрицательно сказывается на росте и развитии растений. Одним из основных регуляторов – терминаторов жасмонат-зависимой транскрипционной активности выступает bHLH ТФ MYC2, то есть тот самый транскрипционный активатор жасмонат-зависимых ответов [17]. Свои функции по регулированию терминирования жасмонатного сигналинга MYC2 осуществляет посредством активации других жасмонат-индуцируемых bHLH белков, названных MYC2-TARGETED BHLH (MTB), которые оказывают антагонистический эффект на функционирование регуляторного комплекса MYC2-MED25 (Mediator subunit 25), таким образом образуя авторегуляторную цепь отрицательной обратной связи для прекращения сигналинга жасмонатов.

Дополнительная регуляция обеспечивается тем, что активность генов биосинтеза жасмонатов регулируется не только на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, но и на эпигенетическом [18, 19], также есть сообщения о возможности альтернативного сплайсинга РНК генов биосинтеза жасмонатов [20].

Сокращения: ЖАК – жасмоновая кислота, ОФДК – 12-оксофитодиеновая кислота, Иле-ЖАК – жасмоноил-изолейцин, OPR – 12-оксофитодиеноатредуктаза, AOS – алленоксидсинтаза, ДМАБ – 3-(диметиламино)бензойная кислота, НСТ – нитросиний тетразолий, СОД – супероксиддисмутаза, ТФ – транскрипционный фактор, МДА – малоновый диальдегид, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

Еще один регуляторный уровень формируется путем изменения функциональной активности белков, ферментов биосинтеза жасмонатов и компонентов передачи сигнала. Например, димеризация белков OPR приводит к ингибированию ферментативной активности, как это было показано ранее для белков OPR3 томата [21], а рецепторный белок COI1 фосфорилируется при термоморфогенезе — морфологической перестройке растений в условиях повышенных температур, что сказывается на его функциях [22].

Наличие такой сложной системы активаторов и супрессоров, положительных и отрицательных обратных связей помогает растению, с одной стороны, осуществлять тонкую регуляцию множества физиологических процессов, быстро реагировать на изменения окружающей среды, а с другой стороны, избегать избыточной активации защитных ответов, обычно отрицательно сказывающихся на росте и развитии.

Почти все фундаментальные знания о функционировании жасмонатной системы получены благодаря исследованию модельного двудольного растения *Arabidopsis thaliana* [3, 6]. Насколько эти знания применимы к другим растениям, в частности, к однодольным видам, еще предстоит выяснить. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является непростым объектом исследования, поскольку представляет собой аллополиплоид, содержащий хромосомы трех таксонов. После того как стали доступны данные секвенирования генома и экспрессионного профиля мягкой пшеницы, стало очевидным наличие большого числа гомологичных и негомологичных генов, кодирующих ферменты биосинтетического и сигнального путей жасмонатов. Это свидетельствует о том, что жасмонатная система пшеницы намного сложнее, чем у *A. thaliana*. В современной биологии для полного и точного понимания функций генов, важно модифицировать их активность *in planta*.

Цель данной работы — исследовать устойчивость полученных нами ранее трансгенных растений мягкой пшеницы, сверхэкспрессирующих ген биосинтеза жасмонатов *OPR3 A. thaliana*, к некоторым биотическим и абиотическим стрессам, с целью выявления особенностей функционирования жасмонатной системы в пшенице.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В исследованиях использовали T₃-T₄ растения одновставочной гомозиготной сублинии первичного трансгенного растения пшеницы Tr-3, полученного нами ранее в результате генетической трансформации мягкой пшеницы Саратовская-60 (Sar-60) вектором pBAR-GFP.UbOPR3 [23]. Растения пшеницы для большей части экспериментов вы-

ращивали в условиях зимней теплицы с фотопериодом 16/8 ч при температуре воздуха 25 ± 2°C днем и 20 ± 2°C ночью, с интенсивностью света до 150 мкмоль × м⁻² × с⁻¹. Выращивали по 5 растений в 3-литровых горшках, наполненных универсальным грунтом, с дополнительной стандартной подкормкой. Растения культивировали до стадии четырех-пяти листьев (25–30 сут после посева), для исследований использовали третий и четвертый листья.

Анализ экспрессии генов. Для анализа экспрессии генов суммарную РНК выделяли из тканей листа согласно методике, описанной в предыдущей работе [24]. Относительную экспрессию генов *AtOPR3* и *TaAOS* анализировали методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Cycler (Thermo Fisher Scientific), как описано нами ранее [24]. Уровень экспрессии оценивали относительно референсного гена *TaWIN1* [25]. В работе использовали следующие праймеры: *TaWIN1* прямой — 5'-TTT TCTGTGTTCTACTATGAGATCTTGAA-3', *TaWIN1* обратный — 5'-AAGTGCATAATTAACACAGAGGTAGTGATG-3'; *AtOPR3* прямой — 5'-ACGTGCTTCTCATGCAGTGT-3'; *AtOPR3* обратный — 5'-ACTTCACGTGGGAACCATCG-3'; *TaAOS* прямой — 5'-GGCCGGAGAGAAGTTCCAC-3', *TaAOS* обратный — 5'-CTTCTCCAGCGCCTCTATCG-3'.

Анализ содержания фитогормонов. Для анализа фитогормонов использовали интактные и механически поврежденные листья. Для поранения лист зажимали пинцетом поперек листовой пластины по всей его длине с интервалом 10 см. Ткани листьев собирали через 30 мин после ранения параллельно с необработанным контролем. После сбора материал сразу же измельчали в жидком азоте с помощью ступки и пестика, затем в шаровой мельнице Mixer Mill MM 400 с шарами из нержавеющей стали диаметром 3 мм (“Retsch”, Наан, Германия) при частоте вибрации 30 Гц в течение 2 мин. Экстракцию и анализ гормонов проводили, как описано ранее [24].

Анализ устойчивости к *Botrytis cinerea*. Инокулят конидий некротрофного гриба *B. cinerea* готовили в соответствии с описанным ранее протоколом [26]. Патоген выращивали на картофельно-декстрозном агаре при pH 6.5. Конидии собирали через 10 дней после посева путем промывания спорообразующих культур дистиллированной водой. Суспензию конидий фильтровали через стекловату для удаления фрагментов мицелия, их концентрацию определяли с помощью гемоцитометра и разбавляли до концентрации 2 × 10⁶ конидий/мл. Водную суспензию конидий перед нанесением на листья разбавляли в четыре раза смесью 2 : 1 дистиллированной стерильной воды и персико-

вого сока (стерилизованного с использованием мембранного фильтра).

Срезанные фрагменты листьев длиной 9 см заражали суспензией конидий *B. cinerea* объемом 4 мкл. Инфицирование листьев проводили во второй половине дня. Концы листьев накрывали полосками фильтровальной бумаги для предотвращения высыхания. Срезанные листья после заражения оставляли на фильтровальной бумаге, пропитанной раствором кинетина (10 мг/л), при комнатной температуре на рассеянном естественном свете 5 дней. Размер повреждений измеряли по цифровым изображениям листьев с использованием компьютерной программы ImageJ, с обязательным включением в изображения масштабированных объектов [27].

Анализ активности антиоксидантных ферментов. Для анализа образцы листьев отбирали в течение 5 дней, начиная со дня заражения конидиями *B. cinerea*, замораживали при -70°C , растирали в жидком азоте и готовили вытяжки водорастворимых ферментов в буферном растворе, содержащем 60 мМ фосфат Na, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.2 и ингибитор протеаз. Крупную взвесь отделяли процеживанием сквозь синтетическую ткань, мелкую – центрифугированием при 24000 g в течение 20 мин. Вытяжки хранили замороженными при -70°C . Содержание продуктов перекисного окисления липидов, а именно малонового диальдегида (МДА), измеряли в вытяжках на 80% этаноле по реакции с тиобарбитуровой кислотой [28].

Активность ферментов в водных вытяжках измеряли в растворе, содержащем 60 мМ фосфат Na, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.2. Активность каталазы измеряли по скорости выделения O_2 при разложении 2 мМ H_2O_2 с использованием кислородного электрода Кларка (“Hansatech”, Англия). Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Agilent 8453 (“Agilent Technologies”, США) с кюветным отделением, оборудованным магнитной мешалкой. Активность пероксидазы определяли по методу Ngo и Lenhoff [29]. Пероксидазную активность оценивали по скорости образования индаминового красителя при 590 нм ($\epsilon = 47600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в присутствии 0.05 мМ 3-метил-2-бензотиазолинон-гидразона (гидразон), 0.5 мМ 3-(диметиламино) бензойной кислоты (ДМАБ) и 0.025 мМ H_2O_2 . Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности фермента ингибировать восстановление нитросинего тетразолия (НСТ) супероксидным анионом [30]. Среда измерения содержала 0.05 мМ НСТ, 13 мМ L-метионин, 2 мкМ рибофлавин. Для образования супероксидного аниона раствор во время измерения освещали синим светодиодом и измеряли скорость цветной реакции образования формазана из НСТ при 560 нм. За 1 условную единицу актив-

ности СОД принимали ее количество, подавляющее цветную реакцию на 50% [31]. Удельные активности ферментов выражали по скорости измеряемой реакции, пересчитанной на 1 г сырой ткани.

В работе использованы реактивы: НСТ, L-метионин, NaH_2PO_4 , ЭДТА (“AppliChem”, Германия); ДМАБ, гидразон, ионол (“Sigma-Aldrich”, США); ТХУ (“Химмед”, Россия); тиобарбитуровая кислота (“ДиаэМ”, Россия); H_2O_2 (Тульская фармацевтическая фабрика, Россия); рибофлавин (“Reanal”, Венгрия); ингибиторы протеаз (“Roche”, Швейцария).

Тест на устойчивость к осмотическому стрессу. Для анализа семена проращивали в пластиковых чашках Петри диаметром 9 см. Поверхностную стерилизацию семян проводили путем 30-секундного погружения в 80% этиловый спирт с последующей 20-минутной инкубацией в 4% растворе гипохлорита натрия. Затем семена тщательно промывали в стерильной воде и помещали в чашки Петри, выстланные двумя слоями фильтровальной бумаги, по 15–20 семян на чашку. В чашки добавляли по 8 мл стерильной воды или раствора полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ) (“PanReas Applichem”, Италия). При необходимости воду или раствор ПЭГ добавляли в чашки во время длительной инкубации. Чашки инкубировали при $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ с соблюдением 12/12 ч (день/ночь) фотопериода ($10\text{--}35 \text{ мкМ}$ фотонов $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Длину корней проростков, выращенных в воде, измеряли на 5 сут после замачивания семян, проростков выращенных на 20% ПЭГ 6000 – на 8 сут.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили в программах LibreOffice Calc, jamovi, Origin (“OriginLab Corporation”, США) и Microsoft Excel (“Microsoft”, США). Статистическую значимость различий для большинства экспериментов определяли с помощью *t*-теста Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $P \leq 0.05$ и отмечали на графиках звездочкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ содержания жасмонатов в трансгенных растениях пшеницы Tr-3. Прежде всего, мы убедились в том, что перенесенный ген *AtOPR3* экспрессируется в тканях исследуемых растений. В трансгенной линии Tr-3 данный ген находится под контролем конститутивного промотора *Ubi1* кукурузы [23], что должно обеспечить его высокую экспрессию на всех стадиях развития растений. Поскольку гены биосинтеза жасмонатов могут регулироваться также на пост-транскрипционном уровне, мы изучили экспрессию трансгена как в интактных, так и в поврежденных листьях растений. С помощью метода ОТ-ПЦР в

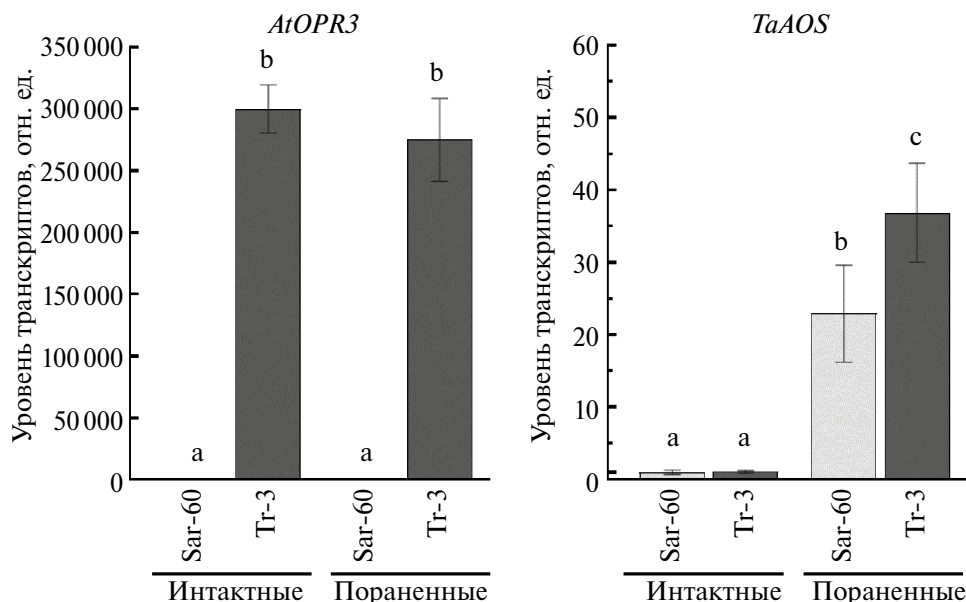


Рис. 1. Анализ экспрессии генов пути биосинтеза жасмонов в трансгенных (Tr-3) и контрольных растениях (Sar-60) пшеницы. Данные представляют собой средние значения $\pm$ стандартные ошибки ($n = 4$). Буквы обозначают статистически значимые различия при $P < 0.05$ (ANOVA с последующим тестом Дункана).

режиме реального времени подтверждено одинаково высокое содержание мРНК трансгена при пораниении растений и без него, в то время как нетрансгенные родительские растения не накапливали мРНК *AtOPR3* (рис. 1). Также, мы оценили уровни экспрессии собственного гена алленоксидсинтазы пшеницы (*TaAOS*). Результаты показали, что механическое повреждение приводит к осязательному повышению содержания транскрипта *TaAOS* как в контрольных растениях, так и в трансгенной линии. Более того, стресс-индуцируемый уровень *TaAOS* оказался достоверно выше ($P = 0.0247$) в трансгенной линии со сверхэкспрессией *AtOPR3* (рис. 1).

На рисунке 2 представлены результаты анализа содержания основных жасмонов, 12-оксофитодиеновой кислоты (12-ОФДК), жасмоновой кислоты (ЖАК) и конъюгата жасмоноил-изолейцина (Иле-ЖАК), у трансгенных и нетрансгенных родительских растений в интактных и пораненных листьях. Как было показано нами ранее [24], растения мягкой пшеницы Саратовская-60 проявляют довольно высокую внутригрупповую дисперсию содержания фитогормонов. Вследствие этого, а также из-за низкого исходного уровня гормонов, не удалось выявить статистически значимые различия в содержании жасмонов в листьях нетрансгенных и трансгенных растений мягкой пшеницы (рис. 2а–в). В механически поврежденных растениях уровень ЖАК оказался значимо ниже в трансгенной линии Tr-3 по сравнению с нетрансгенным контролем. Достоверных различий в содержании 12-ОФДК и Иле-ЖАК обнаруже-

но не было, хотя средние значения оставались чуть ниже в трансгенной линии Tr-3.

Исследование устойчивости трансгенной линии пшеницы Tr-3 к *B. cinerea*. Изучили развитие инфекции некротрофного фитопатогенного гриба на третьем листе трансгенной линии гексаплоидной пшеницы Tr-3 (рис. 3). Заражение листьев пшеницы конидиями *B. cinerea* сопровождается образованием желтой (хлоротической) и бурой (некротической) зон [24]. У трансгенной пшеницы суммарная длина повреждений листьев и величина некроза были на 35% меньше, чем у контрольной пшеницы Саратовская-60 ($P < 0.01$), свидетельствуя о повышенной устойчивости линии Tr-3 к заражению *B. cinerea*. При этом листья Tr-3 сохраняли более яркую зеленую окраску.

Для того чтобы выявить механизмы, обуславливающие повышенную устойчивость трансгенных растений к патогену, мы проанализировали состояние антиоксидантной системы в листьях незараженных и зараженных растений в процессе развития симптомов инфекции. Для этого измерили содержание продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида) и активность трех антиоксидантных ферментов (пероксидазы, каталазы и СОД). Содержание МДА во всех образцах составляло приблизительно 100 нмоль/г сырого веса независимо от наличия или отсутствия заражения грибом, времени после инокуляции и генотипа (трансген или родительский сорт) (рис. 4а). Пероксидазная активность увеличилась уже через сутки после заражения, а к 3 дню она достигла наибольших значений, превысив исходную в

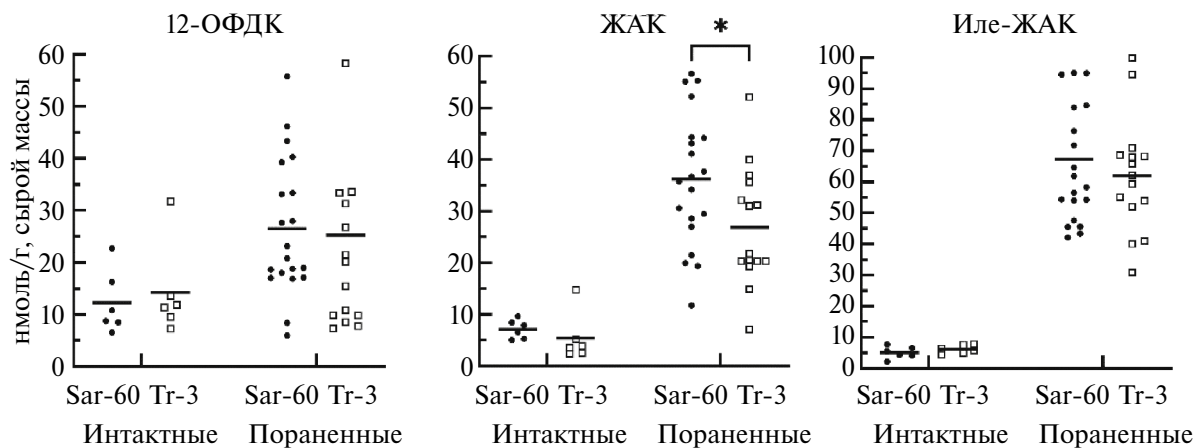


Рис. 2. Содержание индивидуальных жасмонатов (12-ОФДК; ЖАК; Иле-ЖАК) в intactных и пораненных листьях гексаплоидной пшеницы Саратовская-60 (Sar-60) (закрашенные круги) и трансгенного растения, сверхэкспрессирующего *AtOPR3* (Tr-3) (незакрашенные квадраты). Каждый круг и квадрат представляют индивидуальное растение; горизонтальные линии — среднее значение. Звездочка обозначает статистически значимое различие между двумя генотипами при $P < 0.05$.

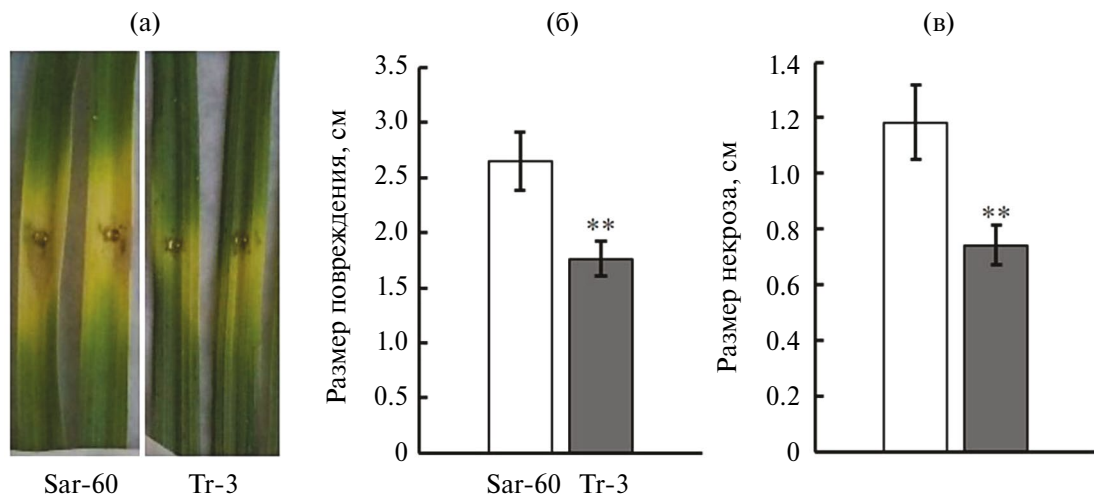


Рис. 3. Восприимчивость трансгенной линии пшеницы Tr-3 к *Botrytis cinerea*. (a) Репрезентативные изображения зараженных листьев на пятые сутки после инфицирования; (б) Размер суммарного повреждения листьев; (в) Размер некротических повреждений листьев. Данные представляют собой средние значения трех независимых экспериментов по 6–7 биологических повторностей со стандартной ошибкой среднего. ** — статистически значимое различие между двумя генотипами при $P < 0.01$, согласно оценке по *t*-тесту Стьюдента.

3 раза (рис. 4б). В незараженном контроле пероксидазная активность также возрастала, но с задержкой на 1–2 сут. Через 4 дня эксперимента пероксидазная активность в зараженных листьях нетрансгенных растений понизилась, тогда как в незараженных листьях и зараженной трансгенной линии Tr-3 она осталась неизменной или увеличилась. Достоверное различие ($P < 0.05$) между зараженными листьями Tr-3 и Sar-60 проявилось на 5 день, однако если учитывать продолжительность всего эксперимента, дисперсионный анализ не подтвердил достоверного влияния генотипа на пероксидазную активность ($P = 0.2$).

Схожую тенденцию наблюдали по отношению к супероксиддисмутазной активности, а именно ее повышение в течение 4 сут с последующим снижением на 5 день. Так, начиная со вторых суток после инокуляции *B. cinerea* (рис. 4г) СОД активность возросла в среднем на 50%; на пятые сутки она снизилась почти до исходного значения. В незараженных листьях также наблюдался значительный рост, но с задержкой на один день, при этом снижения активности на 5 день не происходило. Значимых различий между трансгенными и нетрансгенными растениями не обнаружено.

Каталазная активность уменьшилась, начиная с 4 дня после инокуляции, достигая 50%

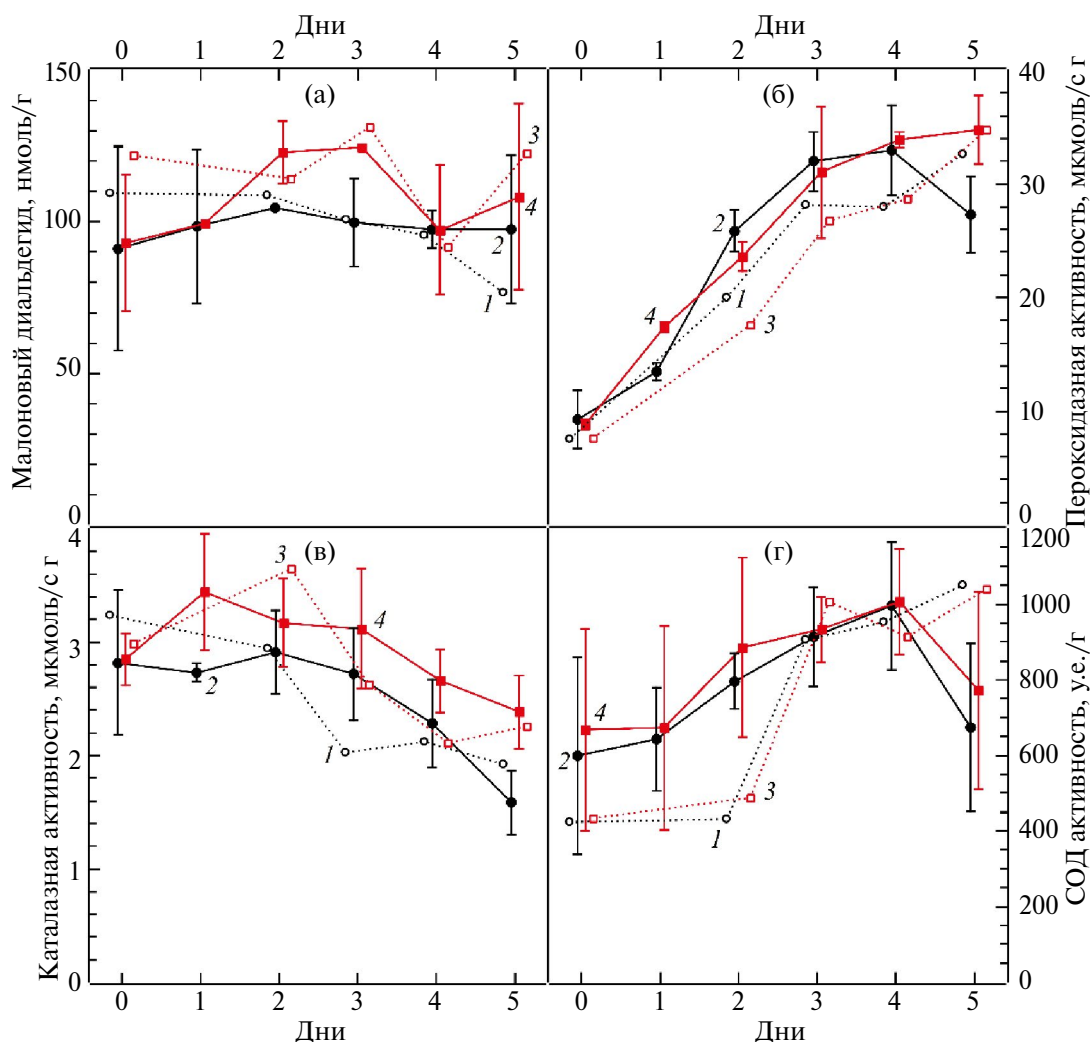


Рис. 4. Зависимость содержания МДА и активности антиоксидантных ферментов в листовой ткани Sag-60 (1, 2) и Tr-3 (3, 4), не зараженной (1, 3) и зараженной *B. cinerea* (2, 4), от времени, прошедшего с начала инокуляции *B. cinerea*: (а) содержание МДА; (б) активность пероксидазы; (в) активность каталазы; (г) активность СОД. Для зараженных листьев представлены средние значения и стандартные отклонения по 2–3 биологическим повторностям.

в листьях пшеницы Саратовская-60 (рис. 4в). В целом, активность снижалась как в зараженных, так и в незараженных листьях. При заражении трансгенной линии Tr-3 каталазная активность была выше по сравнению с контрольным сортом пшеницы в 1.1–1.5 раза. Дисперсионный анализ показал, что различие между трансгенными и контрольными растениями статистически достоверно ($P < 0.01$).

Исследование устойчивости Tr-3 к осмотическому стрессу. В качестве модели абиотического стресса использовали осмотический стресс, создаваемый с помощью 20% ПЭГ 6000. При проращивании семян сначала оценивали их всхожесть, подсчитывая число проростков с корнями более 1 мм. Семена обеих групп легко прорастали как в воде, так и в присутствии 20% ПЭГ; эффективность прорастания составила 100%. На рисунке 5 представлены суммированные данные

длины наиболее развитого корня трансгенных и нетрансгенных образцов. Осмотический стресс приводил к значительному подавлению роста корней обоих генотипов, но в значительно меньшей степени негативный эффект наблюдали у линии экспрессирующей *AtOPR3*. Мы наблюдали существенную разницу между длиной корней Саратовской-60 и трансгенной линии Tr-3 как в условиях стресса, так и без него, но интересно, что при проращивании на воде корни линии Tr-3 были короче, тогда как в условиях осмотического стресса – длиннее.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы описывали создание коллекции трансгенных растений гексаплоидной мягкой пшеницы, сверхэкспрессирующих гены биосинтеза жасмонатов [23, 24]. Для сверхэкспрессии

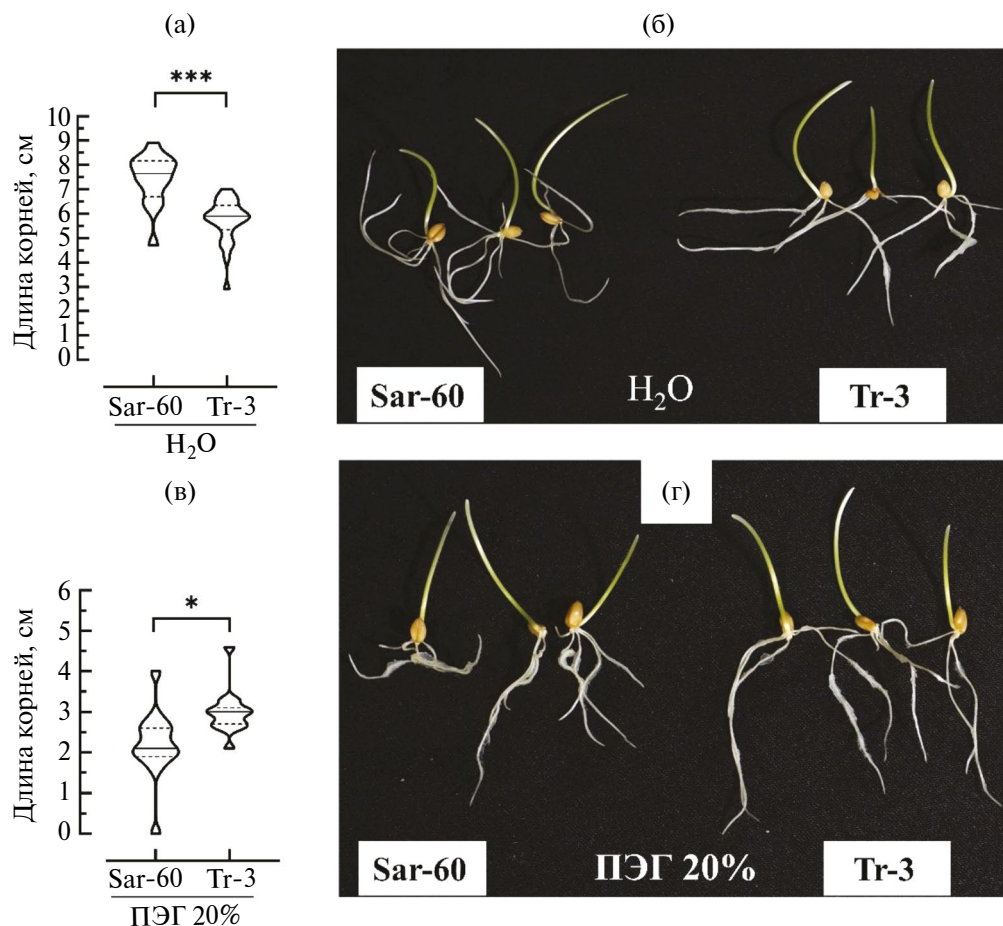


Рис. 5. Рост корней проростков нетрансгенных (Sar-60) и трансгенных растений (Tr-3) на воде (а, б) и 20% растворе ПЭГ 6000 (в, г). (а, в) — репрезентативные изображения проростков на воде (а) и на ПЭГ (в). Графики отображают длину самых развитых корней проростков ($n = 15-25$); сплошные горизонтальные линии показывают медиану, пунктирные линии — 75 и 25 процентиля распределения. Звездочками отмечены статистически значимые различия между генотипами, согласно оценке по t -тесту Стьюдента (* — $P \leq 0.05$), (***) — $P \leq 0.001$).

в пшенице был выбран хорошо изученный ген *A. thaliana AtOPR3*, чья роль в биосинтезе жасмонов была экспериментально подтверждена. Растения независимых трансгенных линий различаются по некоторым фенотипическим признакам, особенно по устойчивости к стрессовым факторам. Для растений линии Tr-3 характерна выраженная задержка в росте и развитии, особенно на ранних этапах развития, также они демонстрируют устойчивость к низким температурам [23], т. е. проявляются признаки, которые характерны для влияния жасмонов, производимых растением эндогенно или нанесенных экзогенно. Растения трансгенной линии Tr-3 характеризовались наиболее высоким уровнем экспрессии перенесенного гена *AtOPR3* и несколько повышенным базовым уровнем ЖАК (анализ был выполнен на стадии четырех листьев растений T₂-T₃, анализировали экстракты третьего листа). В настоящей работе мы продолжили подробное изучение этой трансгенной линии, но в этот раз для большинства анализов

использовали третий лист растений, находящихся на стадии формирования четырех или пяти листьев. Принимая во внимание, что базовый уровень жасмонов в пшенице Саратовская-60 очень низок и разброс в значениях между индивидуальными растениями очень велик, как ранее было показано в наших исследованиях [24], оценку содержания жасмонов и уровня экспрессии гена биосинтеза жасмонов проводили в механически поврежденных листьях, т. е. в условиях индуцируемого стресса. В растениях линии Tr-3 (семенное поколение T₄) по-прежнему высок уровень экспрессии трансгена, причем механическое повреждение не приводит к значимому изменению уровня мРНК (рис. 1), что, скорее всего, свидетельствует об отсутствии посттранскрипционной регуляции экспрессии перенесенного гена. Разница в базовом уровне жасмонов между трансгенными и нетрансгенными растениями не выявлена, а вот результаты анализов содержания гормонов в поврежденных листьях оказались неожиданными: хотя в обо-

их генотипах наблюдалось повышение уровней жасмонатов, уровень ЖК в трансгенной линии Tr-3 оказался ниже, чем в родительском сорте (рис. 2). Также, мы оценили изменение уровня экспрессии собственного гена *TaAOS*, активность которого обычно положительно регулируется жасмонатами, используя для этого праймеры, подобранные к консервативному участку пшеничных гомеологов *AOS*, так как в настоящий момент ткане- и времяспецифичность экспрессии отдельных генов гомеологов *AOS* генома пшеницы мало исследована. Стресс-индуцируемый уровень *TaAOS*, оказался достоверно выше в трансгенной линии со сверхэкспрессией *AtOPR3* (рис. 1). Одно из возможных объяснений таких противоречивых данных – транзистентный характер индукции жасмонатной системы и сложность регуляторной системы, поддерживающей уровень гормона в тканях и активность путей передачи сигнала. Трансгенная линия Tr-3, сверхэкспрессирующая *AtOPR3*, послужит удобным инструментом для изучения этих регуляторных механизмов в будущем.

Недавно мы опубликовали данные, показывающие, что повышенный стресс-индуцируемый уровень жасмонатов в трансгенных растениях гексаплоидной (мягкая пшеница) и тетраплоидной пшеницы (полба) коррелирует с повышенной восприимчивостью к *B. cinerea* [24]. Эта работа хорошо согласуется с представленными здесь данными о повышенной устойчивости листьев пшеницы со сниженным стресс-индуцируемым уровнем ЖАК (рис. 3), однако противоречит многим сообщениям о защитных функциях жасмонатов против *B. cinerea* [32] и других некротрофных фитопатогенов [33]. В то же время, была показана и негативная функция жасмонатов в защите растений от некротрофов. Так, у жасмонат-дефицитного мутанта томата *def1* (*defense 1*) симптомы поражения некротрофным грибом *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* оказались меньше по сравнению с растениями дикого типа, а обработка метилжасмонатом снижала устойчивость к заболеванию как мутантных растений, так и дикого типа [34]. По утверждению авторов, ЖАК не влияет на действие токсина гриба AAL (*Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*), но может негативно регулировать общую резистентность растения-хозяина на более поздней стадии заражения.

Известно, что салициловая кислота часто выступает антагонистом ЖАК, проявляя протекторные свойства при заболеваниях, вызываемых биотрофными патогенами [35], однако есть данные о том, что салициловая кислота положительно влияет на локальную защиту от *B. cinerea*, не изменяя экспрессии *PR1* или *PDF 1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) [36]. Помимо антагонизма жасмонатов и салициловой кислоты, у

A. thaliana описано взаимное подавление двух параллельных ветвей жасмонатного сигналинга: ERF- и MYC-ветви. Первая реагирует на поражение фитопатогенами, а вторая – фитофагами. ТФ MYC2 может напрямую связываться с ТФ EIN3 (Ethylene Insensitive 3) и ТФ EIL1 (EIN3-Like1), мешая связыванию EIN3 с промотором гена-мишени, кодирующего ТФ ORA59 (Octadecanoid-Responsive Arabidopsis 59), что способствует заражению *B. cinerea* и другими некротрофами [37, 38].

Негативный эффект жасмонатов также может быть связан с регуляцией старения листьев. У *A. thaliana* MYC2 положительно регулирует жасмонат-опосредованное старение листьев, что может негативно влиять на защиту от некротрофных и биотрофных фитопатогенов [33, 39]. При этом не всегда жасмонат-опосредованное старение связано с жасмонат-зависимыми защитными механизмами. Например, репрессор жасмонатного ответа JAZ7 *A. thaliana* замедляет старение листьев, но способствует заражению некротрофами, при этом защищая от биотрофов. Ряд исследований указывает на связь между устойчивостью к патогенам, старением листьев и активностью антиоксидантных ферментов. Известно, что у *A. thaliana* ряд ключевых генов, регулирующих старение, *SAG*-гены (*Senescence-Associated Genes*), транскрипционно активируются в ответ на действие пероксида водорода, а жасмонаты способны подавлять экспрессию гена антиоксидантного фермента каталазы, а также, возможно, и других генов антиоксидантных ферментов во время старения листьев MYC2-зависимым образом (возможно, также и MYC3-, MYC4-зависимым), тем самым увеличивая концентрацию пероксида водорода [39]. Кроме этого, CAT2 способствует активности ACS2 (Acyl-CoA Oxidase 2) и ACS3, ферментов β -окисления, заключительной стадии синтеза жасмоновой кислоты, а салициловая кислота ингибирует активность CAT2 [40]. Помимо негативной регуляции старения листьев каталаза и пероксидаза способны разлагать пероксид водорода, который выделяется кончиками гиф и инфекционными подушками гриба *B. cinerea* для окисления полимеров кутикулы растений [41].

В данной работе оценку степени окислительного стресса в листьях проводили с помощью измерения концентрации продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Этот метод широко используется, однако при интерпретации полученных результатов важно помнить, что реакция ТБК и МДА не является специфичной, а МДА – основной, но не единственный продукт перекисного окисления липидов. Полученные данные (рис. 4) указывают на отсутствие выраженного окислительного стресса в срезанных листьях пшеницы как в от-

сутствие, так и в присутствии *B. cinerea*. В кинетике изменения активности антиоксидантных ферментов наблюдаются значительные сходства между зараженными и незараженными листьями. Вероятно, основной причиной таких изменений служит старение листа. Развитие гриба, в основном, не приводит к дополнительному увеличению или уменьшению ферментных активностей, а лишь ускоряет эти изменения на 1–2 сут. Достоверные различия между генотипами обнаружены лишь для пероксидазной и каталазной активностей: пероксидазная активность выше в трансгенной линии Tr-3 по сравнению с Саратовской-60 на пятые сутки после заражения, а каталазная – с 1 по 5 дни.

Антиоксидантная система служит неспецифическим приспособлением растений против различных неблагоприятных условий, поэтому можно предположить, что увеличение активности антиоксидантных ферментов является одной из причин повышенной устойчивости трансгенной линии Tr-3 в условиях стресса. Необходимо отметить, что наблюдаемое повышение активности каталазы у линии Tr-3, сверхэкспрессирующей *AtOPR3*, содержащей пониженный стресс-индуцируемый уровень ЖАК, оказалось неожиданным, так как противоречит данным о том, что жасмонаты усиливают активность антиоксидантных ферментов растений, по крайней мере в условиях абиотических стрессов [42], хотя про- и антиоксидантное действие гормонов может зависеть от их концентрации, как это было показано для салициловой кислоты [43]. Молекулярные механизмы, обуславливающие устойчивость проростков трансгенной линии Tr-3 в условиях осмотического стресса (рис. 5), еще предстоит выяснить. В решении этой и других задач будут очень полезны генетически модифицированные растения пшеницы с измененной активностью жасмонатной системы.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (грант № 22-16-00047). Исследование антиоксидантной системы поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122041100274-6).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Song L., Gong X., Xu J., Li M. Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress // *Inter. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms21041446>
2. Пиголев А.В., Дегтярёв Е.А., Мирошниченко Д.Н., Савченко Т.В. Перспективы применения жасмонатов, салицилатов и абсцизовой кислоты в сельском хозяйстве для повышения стрессоустойчивости растений // *Сельскохозяйственная биология*. 2023. Т. 58. С. 3. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.1.3rus>
3. Wasternack C., Song S. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 1303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
4. Koo A., Howe G. Catabolism and deactivation of the lipid-derived hormone jasmonoyl-isoleucine // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00019>
5. Heitz T., Smirnova E., Marquis V., Poirier L. Metabolic control within the jasmonate biochemical pathway // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 2621. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz172>
6. Wasternack C., Strnad M. Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds // *New Biotechnol.* 2016. V. 33. P. 604. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.11.001>
7. Song S., Qi T., Huang H., Ren Q., Wu D., Chang C., Peng W., Liu Y., Peng J., Xie D. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis* // *Plant cell.* 2011. V. 23. P. 1000. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083089>
8. Goossens J., Mertens J., Goossens A. Role and functioning of bHLH transcription factors in jasmonate signalling // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 68. P. 1333. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw440>
9. Nakata M., Mitsuda N., Herde M., Koo A.J., Moreno J.E., Suzuki K., Howe G.A., Ohme-Takagi M. A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 1641. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111112>
10. Sasaki-Sekimoto Y., Jikumaru Y., Obayashi T., Saito H., Masuda S., Kamiya Y., Ohta H., Shirasu K. Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2013. V. 163. P. 291. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220129>
11. Fonseca S., Fernandez-Calvo P., Fernandez G.M., Díez-Díaz M., Gimenez-Ibanez S., Lopez-Vidriero I., Godoy M., Fernandez-Barbero G., Van Leene J., De Jaeger G. bHLH003, bHLH013 and bHLH017 are new targets of JAZ repressors negatively regulating JA responses // *PloS One.* 2014. V. 9. P. e86182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086182>

12. Jiang Y., Liang G., Yang S., Yu D. Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid—and auxin-mediated signaling in jasmonic acid—induced leaf senescence // *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 230.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.117838>
13. Hu P., Zhou W., Cheng Z., Fan M., Wang L., Xie D. JAV1 controls jasmonate-regulated plant defense // *Molec. Cell*. 2013. V. 50. P. 504.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.027>
14. Ali M.R.M., Uemura T., Ramadan A., Adachi K., Nemoto K., Nozawa A., Hoshino R., Abe H., Sawasaki T., Arimura G.I. The ring-type E3 ubiquitin ligase JUL1 targets the VQ-motif protein JAV1 to coordinate jasmonate signaling // *Plant Physiol.* 2019. V. 179. P. 1273.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.00715>
15. Wasternack C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development // *Ann. Bot.* 2007. V. 100. P. 681.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm079>
16. Hu C., Wei C., Ma Q., Dong H., Shi K., Zhou Y., Foyer C.H., Yu J. Ethylene response factors 15 and 16 trigger jasmonate biosynthesis in tomato during herbivore resistance // *Plant Physiol.* 2021. V. 185. P. 1182.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa089>
17. Liu Y., Du M., Deng L., Shen J., Fang M., Chen Q., Lu Y., Wang Q., Li C., Zhai Q. MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop // *Plant Cell*. 2019. V. 31. P. 106.
<https://doi.org/10.1105/tpc.18.00405>
18. Shi R., Yu J., Chang X., Qiao L., Liu X., Lu L. Recent advances in research into jasmonate biosynthesis and signaling pathways in agricultural crops and products // *Processes*. 2023. V. 11. P. 736.
<https://doi.org/10.3390/pr11030736>
19. Pradhan M., Pandey P., Baldwin I.T., Pandey S.P. Argonaute4 Modulates Resistance to *Fusarium brachygibbosum* Infection by regulating jasmonic acid signaling // *Plant Physiol.* 2020. V. 184. P. 1128.
<https://doi.org/10.1104/pp.20.00171>
20. Chehab E.W., Kim S., Savchenko T., Kliebenstein D., Dehesh K., Braam J. Intronic T-DNA insertion renders Arabidopsis opr3 a conditional jasmonic acid-producing mutant // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 770.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.174169>
21. Breithaupt C., Kurzbauer R., Lilie H., Schaller A., Strassner J., Huber R., Macheroux P., Clausen T. Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006. V. 103. P. 14337.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0606603103>
22. Zhu T., Herrfurth C., Xin M., Savchenko T., Feussner I., Goossens A., De Smet I. Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 4804.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-24883-2>
23. Pigolev A.V., Miroshnichenko D.N., Pushin A.S., Terentyev V.V., Boutanayev A.M., Dolgov S.V., Savchenko T.V. Overexpression of Arabidopsis OPR3 in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) alters plant development and freezing tolerance // *Inter. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 3989.
<https://doi.org/10.3390/ijms19123989>
24. Degtyaryov E., Pigolev A., Miroshnichenko D., Frolov A., Basnet A.T., Gorbach D., Leonova T., Pushin A.S., Alekseeva V., Dolgov S., Savchenko T. 12-Oxophytodienoate reductase overexpression compromises tolerance to *Botrytis cinerea* in hexaploid and tetraploid wheat // *Plants (Basel)*. 2023. V. 12. P. 2050.
<https://doi.org/10.3390/plants12102050>
25. Tenea G.N., Bota A.P., Raposo F.C., Maquet A. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions // *BMC Research Notes*. 2011. V. 4. P. 373.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-373>
26. Rowe H.C., Kliebenstein D.J. Elevated genetic variation within virulence-associated *Botrytis cinerea* polygalacturonase loci // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 2007. V. 20. P. 1126.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-20-9-1126>
27. Savchenko T., Walley J.W., Chehab E.W., Xiao Y., Kaspi R., Pye M.F., Mohamed M.E., Lazarus C.M., Bostock R.M., Dehesh K. Arachidonic acid: an evolutionarily conserved signaling molecule modulates plant stress signaling networks // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3193.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.073858>
28. Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds // *Planta*. 1999. V. 207. P. 604.
<https://doi.org/10.1007/s004250050524>
29. Ngo T.T., Lenhoff H.M. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions // *Analyt. Biochem.* 1980. V. 105. P. 389.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90475-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90475-3)
30. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants // *Plant Physiol.* 1977. V. 59. P. 309.
<https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
31. Полесская О.Г., Каширина Е.И., Алехина Н.Д. Изменение активности антиоксидантных ферментов в листьях и корнях пшеницы в зависимости от формы и дозы азота в среде // *Физиология растений*. 2004. Т. 51. С. 686.
<https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000040746.66725.77>
32. AbuQamar S., Moustafa K., Tran L.S. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea* // *Critical reviews in biotechnology*. 2017. V. 37. P. 262.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1271767>
33. Wan S., Xin X.F. Regulation and integration of plant jasmonate signaling: a comparative view of monocot and dicot // *J. Genet. Genom. = Yi chuan xue bao*.

2022. V. 49. P. 704.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2022.04.002>
34. Egusa M., Ozawa R., Takabayashi J., Otani H., Kodama M. The jasmonate signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen // *Planta*. 2009. V. 229. P. 965.
<https://doi.org/10.1007/s00425-009-0890-x>
 35. Li N., Han X., Feng D., Yuan D., Huang L.J. Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? // *Inter. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 671.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
 36. Ferrari S., Plotnikova J.M., De Lorenzo G., Ausubel F.M. Arabidopsis local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4 // *Plant J.* 2003. V. 35. P. 193.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01794.x>
 37. Lorenzo O., Chico J.M., Sánchez-Serrano J.J., Solano R. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 1938. <https://doi.org/10.1105/tpc.022319>
 38. Aerts N., Pereira Mendes M., Van Wees S.C.M. Multiple levels of crosstalk in hormone networks regulating plant defense // *Plant J.* 2021. V. 105. P. 489.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15124>
 39. Zhang Y., Wang H.L., Li Z., Guo H. Genetic network between leaf senescence and plant immunity: crucial regulatory nodes and new insights // *Plants (Basel)*. 2020. V. 9. P. 495.
<https://doi.org/10.3390/plants9040495>
 40. Yuan H.M., Liu W.C., Lu Y.T. CATALASE2 coordinates SA-mediated repression of both auxin accumulation and JA biosynthesis in plant defenses // *Cell Host Microbe*. 2017. V. 21. P. 143.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.007>
 41. Bi K., Liang Y., Mengiste T., Sharon A. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity // *Trends Plant Sci.* 2023. V. 28. P. 211.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
 42. Wang Y., Mostafa S., Zeng W., Jin B. Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses // *Inter. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 8568.
<https://doi.org/10.3390/ijms22168568>
 43. Ji Y., Liu J., Xing D. Low concentrations of salicylic acid delay methyl jasmonate-induced leaf senescence by up-regulating nitric oxide synthase activity // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 5233.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw280>