

# ГЕНЫ-МИШЕНИ ДЛЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE: ЭВОЛЮЦИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ (ОБЗОР)

Иванова К. А.<sup>1</sup>, Спасельникова А. В.<sup>1,2</sup>, Шумный В. К.<sup>1</sup>, Герасимова С. В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 10.

<sup>2</sup>Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,

Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

Метаболическая инженерия растений является инструментом получения продуцентов ценных метаболитов, и также может применяться для снижения токсичности ядовитых растений с целью расширения области их применения. Культурные растения семейства пасленовых широко применяются в хозяйственных целях. Вторичный метаболизм пасленовых (Solanaceae) отличается широким разнообразием. В селекции картофеля и томата направленно отбирались формы растений со сниженной токсичностью, а в селекции такого экзотического индийского растения, как витания снотворная (*Withania somnifera* L.), напротив, отбирались растения с повышенной токсичностью. В результате естественных процессов и направленного отбора, в геномах пасленовых сформировались сложные системы генов, регулирующих разнообразные биосинтетические процессы. Недавние исследования показывают, что формирование генетического контроля вторичного метаболизма происходило путем дупликаций генов первичного метаболизма и формирования кластеров, регулирующих новые метаболические пути. Секвенирование геномов пасленовых дает возможность отследить эволюционные пути формирования метаболизма алкалоидов, одних из наиболее представленных токсичных метаболитов этого семейства. Знание геномной организации и эволюции метаболизма алкалоидов позволяет предлагать стратегии по модификации его генетического контроля с целью снижения токсичности растений табака и картофеля. Получение безникотиновых форм табака (*Nicotiana tabacum* L.) позволит более широко вовлекать эту культуру в биотехнологию как перспективную растительную систему синтеза рекомбинантных белков. Снижение токсичности картофеля актуально для некоторых сортов и необходимо при привлечении в селекцию диких родственников этой культуры. В отличие от культурного картофеля (*Solanum tuberosum* L.), многие дикие родственные ему виды накапливают токсичные стероидные гликоалкалоиды, что мешает введению этих видов в селекцию как доноров генов устойчивости к различным биотическим и абиотическим факторам.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, картофель, табак, геномная инженерия, CRISPR/Cas, никотин, стероидные гликоалкалоиды, гены GAME

Прозрачность финансовой деятельности:

авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует

Иванова К.А., Спасельникова А.В., Шумный В.К., Герасимова С.В. Гены-мишени для метаболической инженерии представителей семейства Solanaceae: эволюция и структурная организация. Биотехнология и селекция растений. 2018; 1(1):34-42. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-34-42

Ivanova K. A., Spasel'nikova A. V., Shumny'j V. K., Gerasimova S. V. The target genes for Solanaceae secondary metabolism engineering: evolution and genome organization. Plant Biotechnology and Breeding. 2018; 1(1):34-42. DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-34-42

## THE TARGET GENES FOR SOLANACEAE SECONDARY METABOLISM ENGINEERING: EVOLUTION AND GENOME ORGANIZATION

Ivanova K. A.<sup>1</sup>, Spasel'nikova A. V.<sup>1,2</sup>, Shumny V. K.<sup>1</sup>, Gerasimova S. V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

10, Acad. Lavrentjev pr., Novosibirsk 630090, Russia

<sup>2</sup>Novosibirsk State University,

2, Pirogova Street, Novosibirsk 630090, Russia

e-mail: gerson@bionet.nsc.ru

Metabolic engineering of plant secondary metabolism provides a way to obtain plants with elevated level of valuable molecular compounds. Alternatively, metabolic engineering can be used for reduction of toxic substances accumulation in plant tissues. This approach allows one to expand the application of toxic plants in agriculture and biotechnology. The crops of Solanaceae family provide an example of toxic plants of high economic value. Solanaceae family includes edible crops such as potato, tomato and eggplants, medicinal plants like *Withania somnifera* L. and major non-food crop *Nicotiana tabacum* L. The secondary metabolism of Solanaceae family is widely diverse and includes the biosynthesis and accumulation of number of toxic compounds, such as nicotine and other alkaloids in tobacco, steroidal glycoalkaloids in potato and withanolides in winter cherry *W. somnifera*. The secondary metabolic pathways of Solanaceae family have evolved from primary metabolism via duplication of the enzyme coding genes and diversification of genes functions. Local, segment and the whole genome duplications and subsequent formation of metabolic genes clusters are the main processes in secondary metabolic pathways formation. Recent whole genome sequence data from number of Solanaceae species allows one to reconstruct the putative mechanism of primary and secondary metabolism genetic control and evolution. Genomic data together with novel guided endonuclease based genome modification tools provide an opportunity for introduction of precise changes into secondary metabolism. Suppression of nicotine accumulation in tobacco is promising approach for developing of novel plant systems for molecular farming. Toxicity of wild potato relatives impedes their usage in potato breeding. Tobacco and wild potato toxicity reduction can be achieved by different genome modification approaches: knock-out of the key enzyme genes of alkaloids synthesis, the large deletion of the whole cluster of the secondary metabolic genes or the precise editing of key transcription factors in secondary metabolism regulation pathways.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*, potato, tobacco, genome engineering, CRISPR/Cas, nicotine, steroidal glycoalkaloids, GAME genes

УДК 575.852

Поступила в редакцию 15.10.2018

Принята к публикации 26.11.2011



## Введение

Метаболизм растений представляет собой сложную систему многоступенчатых биосинтетических и катаболических процессов. Большинство элементарных событий метаболизма, а именно отдельных химических превращений простых молекул, катализируется специфическими ферментами, которые, в свою очередь, кодируются отдельными генами. Метаболизм принято подразделять на первичный и вторичный. Первичный метаболизм является неотъемлемой составляющей жизнеобеспечения растения, в него входят реакции, снабжающие организм веществом и энергией. Вторичный метаболизм объединяет биохимические процессы, специфические для отдельных растений и/или напрямую не связанные с их основными жизненно важными процессами. Растения производят сотни тысяч небольших молекул, известных как специализированные метаболиты, включающие фенольные соединения, терпеноиды/изопреноиды, и такие азот- и серо-содержащие вещества как алкалоиды и глюкозинолаты, соответственно (Patra et al., 2013). Функции таких соединений могут быть различными – от защиты против патогенов или абиотического стресса до, наоборот, привлечения опылителей или симбионтов (Patra et al., 2013). Такое разнообразие функций имеет экономическое и экологическое значение (Aharoni, Galili, 2011). Термин «метаболическая инженерия» означает направленное изменение метаболизма растения при помощи модификации его генетического контроля. Как правило, метаболическая инженерия подразумевает ряд манипуляций, приводящих к увеличению продукции какого-либо ценного вещества в растении. В ряде случаев метаболическая инженерия может также служить инструментом снижения содержания токсичных веществ, что может расширить применение растения в пищевых, кормовых и биотехнологических целях.

Семейство пасленовых включает как ценные возделываемые пищевые культуры, такие как картофель (*Solanum tuberosum* L.) и томат (*Solanum lycopersicum* L.), так и ряд полезных, но токсичных растений, накапливающих различные ядовитые алкалоиды, – белена (*Hyoscyamus niger* L.), дурман (*Datura* L.), витания снотворная (*Withania somnifera* L.). Дикие виды картофеля также токсичны и могут накапливать стероидные гликоалкалоиды (СГА). Важной непищевой пасленовой культурой является табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.), накапливающий мажорные токсические компоненты никотин и норникотин. Растения рода петунья (*Petunia* Juss.), известные как ценная декоративная культура, также накапливают алкалоиды для защиты от вредителей (Matsuura, Fett-Neto, 2017). Изменение метаболизма различных представителей семейства Solanaceae в процессе domestikации происходило в противоположных направлениях, в зависимости от их значения для человека. Домestikация пищевых культур и растений, использующихся в биотехнологических целях, была направлена на снижение токсичности. В то же время, известны случаи направленного отбора более токсичных форм, например, метаболизм *W. somnifera*, использующейся в индийской аюрведической медицине в качестве одного из главных целебных растений,

эволюционировал по пути увеличения накопления токсичных стероидных лактонов – витанолидов. При domestikации табака также выделялись направления отбора в пользу увеличения содержания никотина. Метаболическая инженерия пасленовых представляет интерес как инструмент изменения содержания ядовитых веществ в разных видах этого семейства с целью расширения их хозяйственного применения. Для проведения работ по метаболической инженерии таких сложных в плане организации генома объектов как пасленовые, многие из которых имеют полиплоидные геномы и другие особенности, необходимо исследовать организацию контроля вторичного метаболизма и его происхождение. Чтобы разработать оптимальные подходы к изменению токсичности, необходимо рассмотреть генетический контроль метаболизма алкалоидов и выделить гены-мишени, модификация которых приведет к снижению или увеличению накопления ядовитых веществ без негативного влияния на первичный метаболизм и жизнеспособность растений.

### 1. Происхождение и эволюция вторичных метаболических путей

Разнообразие вторичных метаболитов растений является следствием эволюционного расхождения и быстрого развития специализированных метаболических путей. Эти новые пути биосинтеза появляются в результате дублирования генов или функционального расхождения существующих генов, и впоследствии они эволюционируют путем отбора и/или дрейфа. Исследования за последние два десятилетия показали, что специализированные метаболические пути являются следствием встраивания в них ферментов первичного метаболизма. Хотя структурное разнообразие вторичных метаболитов гораздо обширнее первичных метаболитов, все специализированные классы вторичных метаболитов происходят из первичных метаболических предшественников (Moghe et al., 2015).

Дупликация генов является центральным генетическим механизмом для создания новых специализированных ферментов, поскольку до тех пор, пока дублированный ген не потерян, он позволяет сохранять старые функции при создании новых возможностей для метаболической диверсификации. Таким образом, дублированные гены могут последовательно вовлекаться в процесс субфункционализации и иметь дополнительную функцию, либо в процесс неофункционализации и приобретать совершенно новую функцию или, наоборот, лишаться какой-либо роли и дефункционализировать. Дупликация происходит тремя способами: tandemным, segmentным и целым геномом, а гены, происходящие из этих процессов, могут расходиться в контроле экспрессии и аминокислотной последовательности, что приводит к новым биохимическим активностям (Moghe et al., 2015). Анализ последовательностей геномов у нескольких видов растений показал, что дупликации генов первичного метаболизма, возникающие в результате tandemного дублирования или дупликации целого генома, имеют разные эволюционные судьбы. Гены, которые участвуют в первичном метаболизме (например, в углеводном, липидном, аминокислотном и нуклеотидном обмене) обычно имеют тенденцию возвращаться к статусу единичной копии как после tandemного



удвоения, так и после удвоения целого генома. Гены вторичного метаболизма при удвоении цельного генома тоже возвращаются к статусу единичной копии, а при локальном удвоении, как правило, становятся гомологами, образуют семейство или генетические кластеры (Chae et al., 2014). Формирование генетических кластеров специализированных биосинтетических путей является важной характеристикой вторичного метаболизма. Часто гены одного биосинтетического пути образуют кластеры, подобные прокариотическим оперонам, с единой регуляцией всей системы. Кластеризация генов отдельных путей вторичного метаболизма открыта относительно недавно и на настоящий момент показана для многих видов растений (Nützmann, Osbourn, 2014). Экспериментально описанные кластеры локализируются в динамических районах хромосом, с высоким содержанием транспозонов и высокой частотой рекомбинации (Field et al., 2011). Предполагается, что кластеры генов вторичного метаболизма не были унаследованы от прокариот, а формировались *de novo* из существующего в геноме растений материала, преимущественно генов первичного метаболизма (Osbourn, 2010). Элементы кластеров возникали в результате тандемных локальных дупликаций отдельных генов и, возможно, их дальнейшей случайной сборки (Schlöpfer et al., 2017). Совместное наследование группы генов, отвечающей за синтез защитных веществ, дает селективное преимущество и закрепляется эволюционно. Высокая частота рекомбинации и активные перестройки хромосомного района локализации кластера способствуют формированию новых выгодных комбинаций генов и пополнению кластеров новыми элементами. Расшифровка геномов позволила провести поиск и предсказание кластеров генов путей вторичного метаболизма у многих растений. Она показала, что до половины метаболических генов собраны в кластеры, и формирование кластеров происходит в эволюционно краткие сроки (Schlöpfer et al., 2017; Torpfer et al., 2017). К настоящему времени биосинтетические кластеры варьируются по длине от десятков до сотен тысяч пар оснований и состоят из трех-десяти генов (Nützmann, Osbourn, 2014).

## 2. Особенности эволюции геномов семейства пасленовых

Эволюция геномов растений семейства пасленовые характеризуется участием большого количества транспозонов (Qin et al., 2014; Bombarely et al., 2016; Xu et al., 2017), а также генов PI-2, кодирующих ингибиторы протеиназ семейства I20, которые способны ингибировать действие сериновых протеиназ, таких как субтилизин, химотрипсин, эластазу, трипсин и оризин (Beckwilder et al., 2000). Кроме того, эволюционные процессы данного семейства многократно формировали такой сложный феномен, как самонесовместимость – редкий пример межвидового отбора, когда невозможность самоопыления исключает инбредную депрессию вида. (Markova et al., 2017). Особенностью метаболизма пасленовых является синтез алкалоидов и стероидных соединений, несвойственных большинству растений. В числе метаболитов пасленовых –

никотин и родственные ему алкалоиды, стероидные гликоалкалоиды и витанолиды, названные так в честь лекарственного индийского растения витания снотворная.

Формирование биосинтетических путей накопления алкалоидов у растений семейства пасленовых происходило в результате дупликаций генов, кодирующих ферменты первичного метаболизма, приводящих к неофункционализации гена, либо вовлечением ферментов первичного метаболизма во вторичный (субфункционализация) и последующей организацией кластеров (Ober, 2005). В последние годы секвенированы геномы дикого картофеля (Li et al., 2018), петунии (Bombarely et al., 2016), перца (Qin et al., 2014), витании (Knoch et al., 2018) с аннотированием генов, реализующих вторичный метаболизм (Aversano et al., 2015; Xu et al., 2017). Геномные данные позволяют проводить филогенетический анализ генов вторичного метаболизма и выявлять события дупликации генов и последующей нео- либо суб- функционализации, либо псевдогенизации и потери функций (D'Amelia et al., 2018; Nagy et al., 2005; Zhang et al., 2015).

Ряд работ, посвященных эволюции пасленовых, свидетельствует о нескольких событиях полногеномной дупликации в этом семействе, имеющем множество полиплоидных видов (Schranz et al., 2012), а также полногеномной трипликации семейства (The Tomato Genome Consortium, 2012).

## 3. Филогенетическая связь путей биосинтеза холестерина, витанолидов и СГА в метаболизме растений семейства пасленовых

Важной чертой метаболизма пасленовых является накопление холестерина, несвойственное большинству растений. Синтез холестерина у томата и картофеля идет по мевалонатному пути (рис. 1) и относится к первичному метаболизму. Дальнейшие превращения холестерина приводят к синтезу и накоплению вторичных метаболитов – стероидных гликоалкалоидов (Sonawane et al., 2016). Синтез холестерина осуществляется ферментами, привлеченными из конститутивного биосинтетического пути фитостеринов. Часть из них имеет низкую субстратную специфичность, доминирующую в пользу фитостеринов, и обслуживает оба пути, а другая часть генов, возникших в результате дупликации и последующей неофункционализации генов синтеза фитостеринов, принимает участие уже только лишь в синтезе холестерина (см. рис. 1). Упомянутая выше низкая специфичность ферментов позволяет регулировать уровень конститутивных фитостеринов за счет повышения синтеза СГА и не затрагивать работу ферментов первичного метаболизма (Sonawane et al., 2016). Холестерин является ключевым предшественником для многих биоактивных растительных метаболитов растений рода *Solanum* L. В растениях томата и картофеля холестерин является предшественником СГА, синтез которых регулируется семейством *GAME*-генов (от *GlykoAlkaloid MEtabolism*). Большинство генов этого семейства формируют кластеры и коэкспрессируются. Различия биосинтетических путей СГА у томата и картофеля выявляются на финальных стадиях синтеза индивидуальных алкалоидов (Zhu et al., 2018, Hardigan et al., 2017). Гены ферментов биосинтеза СГА присутствуют не только у ядовитых растений,



но и у культурных сортов картофеля и томата, в которых не накапливаются токсичные вещества. Это объясняется тем, что метаболические пути сложны, порой зациклены и имеют множественную регуляцию (Иванова и др., 2018). Решающую роль в регуляции пути накопления алкалоидов играет ген *GAME9*, жасмонат-зависимый транскрипционный фактор группы *AP2/ERF*. Было показано, что данный ген связан с процессом доместикации. Предполагается, что снижение содержания различных токсичных соединений в культурных формах пасленовых обусловлено отбором по гену *GAME9* (Cárdenas et al., 2016).

В метаболизме фитостерина и холестерина томата и картофеля участвуют 2 гомологичных гена, кодирующих ферменты *SSR1* (редуктаза боковой цепи стерола 1) и *SSR2* (редуктаза боковой цепи стерола 2) (см. рис. 1). *SSR1* участвует в синтезе фитостерина, *SSR2* – в биосинтезе холестерина (Sonawane et al., 2016). Синтез витанолидов также связан с биосинтетическим путем фитостерина. Недавно у растений *W. somnifera* был найден ключевой фермент этого синтеза – стерол- $\Delta^{24}$ -изомераза (24ISO), также являющийся гомологом *SSR1* и *SSR2*. Ген, кодирующий 24ISO, может считаться геном доместикации витании, поскольку витанолиды являются классом разнообразных ядовитых соединений, которые традиционно рассматриваются как лекарственные вещества (Knoch et al., 2018). Считается, что витанолиды обладают противовоспалительным и антиканцерогенным действием (Mishra et al., 2000). Почти у всех растений пасленовых, синтезирующих алкалоиды, накапливаются только либо СГА, либо витанолиды. Существует предположение, что синтез витанолидов появляется в течение эволюции у тех пасленовых, вредители которых приобрели резистентность к СГА (Knoch et al., 2018).

#### 4. Происхождение путей биосинтеза алкалоидов табака

Культивируемый табак *Nicotiana tabacum* является аллотетраплоидным растением, образовавшимся, скорее всего, в результате гибридизации двух диплоидных предков *N. sylvestris* Speg. & Comes и *N. tomentosiformis* L. (Kajikawa et al., 2017). Биосинтез никотина и подобных ему алкалоидов в табаке не связан с мевалонатным путем синтеза холестерина, как у растений томата и картофеля, и имеет ряд уникальных особенностей. Молекула никотина состоит из пиридинового и пирролидинового циклов, которые синтезируются независимо друг от друга и далее объединяются в одну молекулу. Набор структурных генов, кодирующих ферменты путей синтеза двух предшественников молекулы никотина, располагается в разных локусах, но формирует единый регулон, строго контролирующийся жасмонат-опосредованной системой, и регуляторными генами, находящимися в локусе *NICOTINE2* (*NIC2*). Гены ферментов, участвующих в синтезе никотина, являются дублированными паралогами генов первичного метаболизма NAD и полиаминов (рис. 2), последовательно встроенными в этот регулон путем субфункционализации и неофункционализации (Kajikawa et al., 2017). Однако время и способ дублирования этих двух путей различаются. Дублирование пути биосинтеза полиаминов (синтез пирролидинового кольца никотина) про-

изошло эволюционно раньше, в результате полногеномной трипликации, а пиридиновая ветвь образовалась позже как результат череды отдельных событий дубликации генов биосинтеза NAD (Xu et al., 2017).

Ключевым геном, определяющим этап синтеза пирролидинового кольца, считается ген путресцин-N-метилтрансферазы (PMT) (Hibi et al., 1994; Riechers and Timko 1999), произошедший от гена спермидинсинтазы (SPDS) и получивший новые свойства после дубликации, то есть в результате неофункционализации (рис. 2). Следующим ферментом этого пути является N-метилпутресцин оксидаза (MPO), ген которой произошел от гена диаминооксидазы (DAO) во время полногеномной мультимпликации. Оба этих гена присутствуют в геномах родов *Nicotiana*, *Solanum* и *Petunia*, что указывает на древность этой дубликации в Solanaceae (Xu et al., 2017; Heim et al., 2007; Shoji, Hashimoto, 2008).

Ключевым ферментом биосинтеза пиримидинового кольца считается хинолилат фосфорибозилтрансфераза (QPT2), ген которой является локально дублированной копией аналогичного гена QPT1, принимающего участие в синтезе NAD. В отличие от относительно древнего происхождения биосинтеза пирролидинового кольца, удвоение генов пути NAD, кодирующих аспартат-оксидазу (AO) и фосфорибозилтрансферазу хинолиновой кислоты (QPT), ответственных за биосинтез пиридинового кольца, является специфичным для *Nicotiana* (Xu et al., 2017). Ферментами, принимающими участие в объединении колец, предположительно, являются изофлавоны редуктаза-подобный белок A622 и фермент BBL (berberine bridge enzyme-like) (Kajikawa et al., 2011).

#### 5. Опыт модификации метаболизма алкалоидов табака

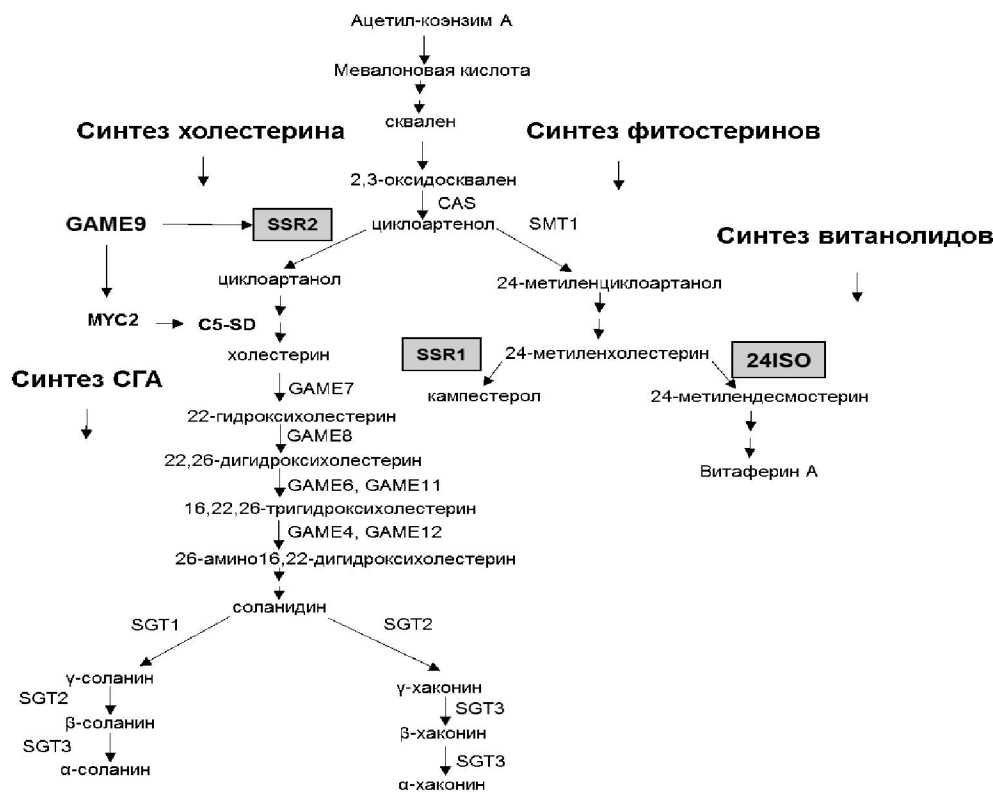
Определенный опыт в метаболической инженерии пасленовых накоплен в ряде работ по модификации системы биосинтеза никотина в растениях табака. В таблице представлен список экспериментов по манипуляции экспрессией генов метаболизма алкалоидов *N. tabacum*. Для модификации активности ключевых ферментов биосинтеза никотина использовали феномен РНК-интерференции, который заключается в том, что трансгенная экспрессия антисмысловых или двухцепочечных РНК приводит к супрессии целевого гена и снижению содержания его продукта. Супрессии подвергались гены, кодирующие ключевые ферменты разных стадий синтеза никотина. Во всех экспериментах наблюдалось снижение уровня никотина, а также, в некоторых случаях, накопление минорных алкалоидов, синтезирующихся из общих предшественников (рис. 2). При подавлении генов семейства *PMT* наблюдался эффект нарушения роста и развития растений.

#### 6. Жасмоновая регуляция метаболизма алкалоидов семейства пасленовые

Жасмоновая кислота и ее производные – жасмонаты, отвечают в растениях за регуляцию ответа на стресс, как абиотический, так и биотический. Известно, что каскады жасмоновой системы регуляции действуют через белок, принадлежащий F-box системе – CORONATINE



APETALA2/ERF транскрипционных факторов подсемейства ERF IXa (Zhou and Memelink, 2016). В растениях картофеля и томата эту регуляторную функцию выполняет ген *GAME9* (см. рис. 1). В работе Yangping Li с соавторами (2018) показано высокое разнообразие аллелей *GAME9* у диких родственников картофеля, в то время как domesticiрованные формы обладают малым числом аллелей этого гена. Феномен локального снижения разнообразия является индикатором отбора по данному локусу и свидетельствует в пользу того, что ген *GAME9* является геном доместикации, определяющим уровень токсичности. Ген *GAME9* вместе с другими подобными ему генами транскрипционных факторов локализован в пределах кластера, названного QTL1 (Cárdenas et al., 2016).



GAME9 – транскрипционный фактор типа AP2/ERF; гомологи отмечены рамкой: 24ISO – стерол- $\Delta^{24}$ -изомераз; SSR1 – редуктаза боковой цепи стерола 1; SSR2 – редуктаза боковой цепи стерола 2; CAS – циклоартенол-синтаза, SMT1 – стерол C24-метилтрансфераза, C5-SD – стерол C-5(6) деса-тураза, MYC2 – транскрипционный фактор, GAME7 – C22-гидроксилаза, GAME8 – C26-гидроксилаза, GAME6 – C16-гидроксилаза, GAME11 – 2-оксиглутаратзависимая диоксигеназа, GAME4 – цитохром P450 88D, GAME12 – трансминаза, SGT1 – галактозилтрансфераза, SGT2 – глюкозил-трансфераза, SGT3 – рамнозилтрансфераза

GAME9 – AP2/ERF type transcription factor; homologs marked with frame: 24ISO – sterol- $\Delta 24$ -isomerase; SSR1 – side chain sterolreductase 1; SSR2 – side chain sterolreductase 2; CAS – cycloartenol synthase, SMT1 – sterol C24-methyltransferase, C5-SD – sterol C-5 (6) desaturase, MYC2 – transcription factor, GAME7 – C22-hydroxylase, GAME8 – C26-hydroxylase, GAME6 – C16-hydroxylase, GAME6 – 2-oxyglutarate dioxygenase, GAME4 – cytochrome P450 88D, GAME12 – transaminase, SGT1 – galactosyltransferase, SGT2 – glucosyltransferase, SGT3 – rhamnosyltransferase.

являются гомологами *GAME9*. Транскрипционная регуляция посредством ERF и координирующее действие транскрипционных факторов MYC2 подтверждается частым появлением родственных цис-регуляторных элементов этих факторов в промоторных областях нижестоящих



структурных генов (Kajikawa et al., 2017). Подтверждением регуляторной роли генов *ERF189* и *ERF199* является

то, что в геноме линий табака с низким накоплением никотина и его производных присутствует делеция всего кластера генов *ERF* (Cárdenas et al., 2016).

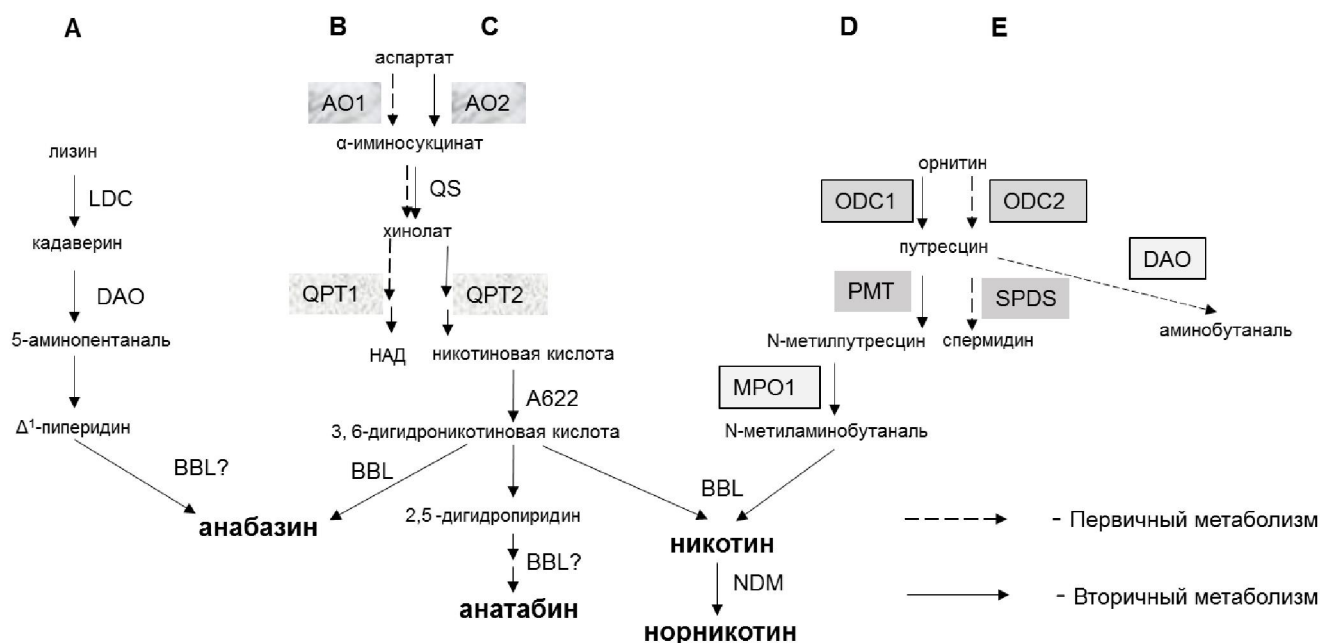


Рис. 2. Модель биосинтеза никотина, по Lewis et al., 2015.

A – предполагаемый синтез анабазина; B – синтез NAD; C – синтез пиридинового кольца никотина; D – синтез пирролидинового кольца никотина; E – синтез полиаминов. LDC – лизиндекарбоксилаза; DAO – диаминооксидаза; BBL – berberine bridge enzyme-like (нет аналога на русском); AO1 и AO2 – аспаргатаксидаза 1 и 2 (гомологи); QS – хинолатсинтаза; QPT1 и QPT2 – хинолилат фосфорибозилтрансфераза 1 и 2 (гомологи); A622 – изофлавононоредуктазоподобный белок; NDM – никотиндеметилаза; MPO1 – метилпутресцинооксидаза 1; PMT – путресцин метилтрансфераза; SPDS – спермидинсинтаза; ODC1 и ODC2 – орнитиндекарбоксилаза 1 и 2 (гомологи).

Fig. 2. Nicotine biosynthesis model, according to Lewis et al., 2015.

A – putative synthesis of anabasine; B – synthesis of NAD; C – synthesis of the pyridine ring of nicotine; D – synthesis of the pyrrolidine ring of nicotine; E – polyamine synthesis. LDC – lysine decarboxylase; DAO – diamine oxidase; BBL – berberine bridge enzyme-like; AO1 and AO2 – aspartate oxidase 1 and 2 (homologues); QS – quinolate synthase; QPT1 and QPT2 – quinolinate phosphoribosyltransferase 1 and 2 (homologues); A622 – isoflavone reductase-like protein; NDM – nicotine demethylase; MPO1 – methylputrescine oxidase 1; PMT – putrescine methyltransferase; SPDS – spermidine synthase; ODC1 and ODC2 – ornithine decarboxylase 1 and 2 (homologues).

### Возможные стратегии генетических модификаций для снижения токсичности пасленовых

Современные методы биотехнологии позволяют вносить направленные изменения в геном и манипулировать молекулярными процессами, происходящими в клетках растений. Быстрый прогресс в редактировании генома стал возможен благодаря открытию нуклеаз, которые создают двуниевые разрывы в целевых участках ДНК (Gerasimova et al., 2017). Система методов на основе РНК-направленных нуклеаз (CRISPR/Cas) в последние годы широко используется для улучшения отдельных свойств культурных растений (Korotkova et al., 2017). Применение этой системы для снижения токсичности растений семейства пасленовых может позволить достичь стойкого наследуемого эффекта и получить стабильные линии и сорта, которые далее могут быть использованы в селекции и производстве. Арсенал методов геномной инженерии включает в себя нокаут отдельных генов, редактирование регуляторных районов генов и изменение паттерна их экспрессии, точные

модификации кодирующей последовательности с изменением функций, большие делеции районов хромосом (Gerasimova et al., 2017). Весь этот арсенал можно использовать для метаболической инженерии семейства пасленовых. Нокаут генов отдельных ферментов метаболических путей может направить метаболизм растений по альтернативному пути или прервать цепочку химических превращений. В качестве генов-мишеней для снижения токсичности диких видов картофеля можно рассматривать гены гликозилаз *SGT* (McCue et al., 2006, 2007, 2009, 2017), находящиеся в конце пути синтеза СГА (см. рис. 1). При нокауте этих генов не будут затронуты жизненно важные синтетические пути. Понижение функции *GAME8* (*pga1*) и *GAME6* (*pga2*) (см. рис. 1) картофеля при помощи РНК-интерференции приводит к снижению содержания СГА более чем в 10 раз и повышению содержания субстратов этих ферментов. При их деактивации растения характеризовались нормальным вегетативным ростом и клубнеобразованием, но отличались стерильностью по мужскому типу. Кроме того, было показано, что клубни трансгенных растений не прорастали при хранении



на воздухе или в воде, но прорастали при хранении в почве, а также в питательной среде, что дает основания судить о плейотропном эффекте модификации этих генов (Umamoto et al., 2016). Схожую картину наблюдали при супрессии *GAME11* (*2ODG* – 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase), однако растения со сниженной функцией этого гена оставались фертильными, что дает основания рассматривать ген *GAME11* как кандидат для направленной модификации с целью снижения токсичности диких форм картофеля. Для снижения накопления никотина в листьях табака можно рассмотреть варианты нокаута ключевых генов синтеза никотина (*PMT*, *QPT*, *BBL*), а также генов транспортеров

никотина, поскольку в листьях никотин накапливается за счёт транспорта из корня, а не синтеза *in situ*. Однако, нацеливаясь на структурные гены вторичного метаболизма, можно столкнуться с проблемой нарушения первичного метаболизма и снижения жизнеспособности из-за индукции мутаций в гомологичных генах. Наиболее привлекательными мишенями для модификации метаболизма никотина являются гены *A622* и *BBL*, так как они участвуют в объединении пиридинового и пирролидинового колец и не затрагивают первичный метаболизм (Kajikawa et al., 2009, 2011).

**Таблица. Модификации метаболизма алкалоидов табака при помощи супрессии отдельных структурных генов**  
**Table. Modifications of the tobacco alkaloids metabolism via RNA-mediated gene suppression**

| Фермент<br>Enzyme                       | Функция гена<br>Gene Function   | Результат<br>Result  | Источник<br>Source   |
|---|---|--|--|
| Путресцин N-метилтрансфераза (PMT)      | Первая стадия синтеза пирролидинового кольца никотина   | Снижение содержания никотина, аномалии листьев и соцветий; резкое увеличение уровней анатабина   | Chintapakorn, Hamill, 2003; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009 |
| N-метилпутресцин-оксидоза (MPO)         | Катализирует вторую стадию биосинтеза пирролидинового кольца, окислительное дезаминирование N-метилпутресцина с образованием 4-метиламинобутанала | Анатабин стал преобладающим алкалоидом за счет уменьшения содержания никотина  | Shoji, Hashimoto, 2008   |
| Хинолинат фосфорибозилтрансфераза (QPT) | Катализирует точку входа в путь биосинтеза никотинамидадениндинуклеотида (NAD), в котором никотиновая кислота является промежуточным продуктом    | Снижение уровня никотина   | Xie et al., 2004   |
| Редуктаза (A622)                        | Участвует в поздних стадиях биосинтеза никотина   | Уменьшение синтеза никотина, накопление b-N гликозида никотиновой кислоты  | Deboer et al., 2009  |
| Berberine bridge enzyme-like (BBL)      | Флавинсодержащая оксидаза, предположительно участвующая в заключительной стадии окисления для синтеза никотина                                    | Фенотип со сниженным содержанием никотина, накопление нового метаболита, идентифицированного как дигидрометанникотин (DMN) в корнях табака | Kajikawa et al., 2011  |

Перспективным подходом к снижению токсичности может быть индукция протяженной делеции всего кластера регуляторных генов синтеза алкалоидов. Для картофеля можно рассмотреть возможность делеции кластера, находящегося в QTL1 хромосомы 1, для табака – делеции кластера *NIC2*. Показано, что гены, локализованные в этих кластерах, играют ключевую роль в синтезе алкалоидов (Cárdenas et al., 2016).

Изменение регуляции всего пути синтеза токсических веществ может оказаться наиболее эффективным подходом, поскольку такая модификация в наименьшей степени нарушит сами структурные функции генов и ферментов и, как следствие, в наименьшей степени скажется на жизнеспособности и развитии растения. Предполагается, что снижение токсичности культурных форм картофеля и томата по сравнению с дикими формами было достигнуто за счет отбора растений с определенными аллелями основного регулятора этого пути – транскрипционного фактора типа AP2/ERF (*GAME9*). Модификация или нокаут транскрипционных факторов, регулирующих накопление токсичных веществ, может позволить расширить понимание

регуляции вторичного метаболизма и оказаться эффективным способом модификации уровня токсичности ценных растений.

## Заключение

Возможности методов редактирования геномов позволяют ставить задачи, связанные с модификацией важнейших хозяйственных признаков растений и приданием растениям новых свойств, расширяющих область их применения. В случае модификации метаболизма возникает проблема сложной геномной организации его контроля, обилия гомологичных генов первичного метаболизма, а также дублированных копий генов, функции которых неизвестны или описаны только частично. Вмешательство в систему регуляции метаболизма может привести к непредсказуемым последствиям, однако именно геномное редактирование открывает пути к детальному исследованию функций каждого гена и разработки схем точной настройки метаболизма под конкретные задачи. Метаболизм пасленовых является одной из наиболее хорошо охарактеризованных биохимических систем растений, а



накопленные за последние годы данные о структуре геномов позволяют точно спланировать эксперимент по геномному редактированию и нацелиться на отдельные копии конкретных генов. Дополнительным преимуществом пасленовых как объекта для метаболической инженерии является их сравнительно простое культивирование *in vitro* и богатый опыт выращивания в сельском хозяйстве. Используя метаболизм пасленовых как модель, можно в обозримые сроки получить ряд ценных фундаментальных результатов, позволяющих реконструировать механизм

генетического контроля биосинтетических процессов растений и связи первичного метаболизма со вторичным. Модификация отдельных генов, регулирующих биосинтез алкалоидов у табака и картофеля, позволит создать новые линии растений, обладающие желаемыми свойствами, и предложить стратегии по модификации метаболизма у других ценных культур.

**Благодарности:** исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 18-416-543004.

## References/Литература

- Abdelkareem A. *et al.* Jasmonate-induced biosynthesis of steroidal glycoalkaloids depends on COI1 proteins in tomato // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. Vol. 489, № 2. P. 206–210.
- Aharoni A., Galili G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface // *Current Opinion in Biotechnology*. 2011. Vol. 22, № 2. P. 239–244. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.11.004
- Aversano R. *et al.* The *Solanum commersonii* Genome Sequence Provides Insights into Adaptation to Stress Conditions and Genome Evolution of Wild Potato Relatives // *The Plant Cell*. 2015. Vol. 27, № 4. P. 954–968. DOI: 10.1105/tpc.114.135954
- Beekwilder J. *et al.* Characterization of potato proteinase inhibitor II reactive site mutants // *Eur. J. Biochem*. 2000. Vol. 267, № 7. P. 1975–1984.
- Boer K.D. *et al.* APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR and basic helix–loop–helix tobacco transcription factors cooperatively mediate jasmonate-elicited nicotine biosynthesis // *The Plant Journal*. 2011. Vol. 66, № 6. P. 1053–1065. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04566.x
- Bombarely A. *et al.* Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida* // *Nature Plants*. 2016. Vol. 2, № 6. P. 16074. DOI: 10.1038/nplants.2016.74
- Cárdenas P.D. *et al.* GAME9 regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway // *Nat Commun*. 2016. Vol. 7. P. 10654. DOI: 10.1038/ncomms10654
- Chae L. *et al.* Genomic Signatures of Specialized Metabolism in Plants // *Science*. 2014. Vol. 344, № 6183. P. 510–513. DOI: 10.1126/science.1252076
- Chintapakorn Y., Hamill J.D. Antisense-mediated down-regulation of putrescine N-methyltransferase activity in transgenic *Nicotiana tabacum* L. can lead to elevated levels of anatabine at the expense of nicotine // *Plant Mol. Biol*. 2003. Vol. 53, № 1–2. P. 87–105. DOI: 10.1023/B:PLAN.0000009268.45851.95
- Chu H.Y., Wegel E., Osbourn A. From hormones to secondary metabolism: the emergence of metabolic gene clusters in plants // *The Plant Journal*. 2011. Vol. 66, № 1. P. 66–79. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04503.x
- D'Amelia V. *et al.* Subfunctionalization of duplicate MYB genes in *Solanum commersonii* generated the cold-induced ScAN2 and the anthocyanin regulator ScAN1 // *Plant Cell Environ*. 2018. Vol. 41, № 5. P. 1038–1051. DOI: 10.1111/pce.12966
- Deboer K.D. *et al.* The A622 gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis // *Plant Mol. Biol*. 2009. Vol. 69, № 3. P. 299–312. DOI: 10.1007/s11103-008-9425-2
- Field B. *et al.* Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions // *PNAS*. 2011. Vol. 108, № 38. P. 16116–16121. DOI: 10.1073/pnas.1109273108
- Freeling M., Thomas B.C. Gene-balanced duplications, like tetraploidy, provide predictable drive to increase morphological complexity // *Genome Res*. 2006. Vol. 16, № 7. P. 805–814. DOI: 10.1101/gr.3681406
- Gerasimova S.V. *et al.* Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots // *Russ J Plant Physiol*. 2017. Vol. 64, № 2. P. 141–155. DOI: 10.1134/S1021443717010071
- Goossens J. *et al.* Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses // *Plant Mol Biol*. 2016. Vol. 91, № 6. P. 673–689. DOI: 10.1007/s11103-016-0480-9
- Hardigan M.A. *et al.* Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato // *PNAS*. 2017. Vol. 114, № 46. P. E9999–E10008. DOI: 10.1073/pnas.1714380114
- Heim W.G. *et al.* Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript // *Phytochemistry*. 2007. Vol. 68, № 4. P. 454–463. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.11.003
- Hibi N. *et al.* Gene expression in tobacco low-nicotine mutants // *Plant Cell*. 1994. Vol. 6, № 5. P. 723–735. DOI: 10.1105/tpc.6.5.723
- Ivanova K.A., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. The Biosynthesis Regulation of Potato Steroidal Glycoalkaloids // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018. Vol. 22, № 1. P. 25–34. DOI: 10.18699/VJ18.328
- Kajikawa M. *et al.* Genomic Insights into the Evolution of the Nicotine Biosynthesis Pathway in Tobacco // *Plant Physiol*. 2017. Vol. 174, № 2. P. 999–1011. DOI: 10.18699/VJ18.328
- Kajikawa M. *et al.* Vacuole-Localized Berberine Bridge Enzyme-Like Proteins Are Required for a Late Step of Nicotine Biosynthesis in Tobacco[C][W] // *Plant Physiol*. 2011. Vol. 155, № 4. P. 2010–2022. DOI: 10.1104/pp.110.170878
- Kajikawa M., Hirai N., Hashimoto T. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids // *Plant Mol. Biol*. 2009. Vol. 69, № 3. P. 287–298. DOI: 10.1007/s11103-008-9424-3
- Knoch E. *et al.* Third DWF1 paralog in Solanaceae, sterol  $\Delta 24$ -isomerase, branches withanolide biosynthesis from the general phytosterol pathway // *PNAS*. 2018. P. 201807482. DOI: 10.1073/pnas.1807482115
- Korotkova A.M. *et al.* Crop genes modified using the CRISPR/Cas system // *Russ J Genet Appl Res*. 2017. Vol. 7, № 8. P. 822–832. DOI: 10.1134/S2079059717050124
- Kumar A. *et al.* Lanosterol synthase-like is involved with differential accumulation of steroidal glycoalkaloids in potato // *Planta*. 2017. Vol. 246, № 6. P. 1189–1202. DOI: 10.1007/s00425-017-2763-z
- Lewis R.S. *et al.* Transgenic and Mutation-Based Suppression of a Berberine Bridge Enzyme-Like (BBL) Gene Family Reduces Alkaloid Content in Field-Grown Tobacco // *PLOS ONE*. 2015. Vol. 10, № 2. P. e0117273. DOI: 10.1371/journal.pone.0117273
- Li Y. *et al.* Genomic Analyses Yield Markers for Identifying Agronomically Important Genes in Potato // *Molecular Plant*. 2018. Vol. 11, № 3. P. 473–484. DOI: 10.1016/j.molp.2018.01.009
- Markova D.N. *et al.* Evolutionary history of two pollen self-incompatibility factors reveals alternate routes to self-compatibility within *Solanum* // *Am. J. Bot*. 2017. Vol. 104, № 12. P. 1904–1919. DOI: 10.3732/ajb.1700196
- Matsuura H.N., Fett-Neto A.G. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action // *Plant Toxins*. – Springer, Dordrecht. 2017. – P. 243–261. DOI 10.1007/978-94-007-6728-7\_2-1

- McCue K.F. *et al.* Modification of potato steroidal glycoalkaloids with silencing RNA constructs // *Am. J. Potato Res.* 2018. Vol. 95, №1. P. 9–14. DOI: 10.1007/s12230-017-9609-x
- McCue K.F. *et al.* Potato glycoesterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis // *Phytochemistry*. 2007. Vol. 68, № 3. P. 327–334. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.10.025
- McCue K.F. *et al.* The primary in vivo steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato // *Phytochemistry*. 2006. Vol. 67, № 15. P. 1590–1597. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.09.037
- McCue K.F. Potato glycoalkaloids, past present and future. *Fruit Veget. Cereal Sci. Biotechn.* 2009. Vol. 3, №1. P. 65–71.
- Mishra L.C., Singh B.B., Dagenais S. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review // *Altern Med Rev.* 2000. Vol. 5, № 4. P. 334–346.
- Moghe G.D. *et al.* Consequences of Whole-Genome Triplication as Revealed by Comparative Genomic Analyses of the Wild Radish *Raphanus raphanistrum* and Three Other Brassicaceae Species // *The Plant Cell*. 2014. Vol. 26, № 5. P. 1925–1937. DOI: 10.1105/tpc.114.124297
- Moghe G.D., Last R.L. Something Old, Something New: Conserved Enzymes and the Evolution of Novelty in Plant Specialized Metabolism // *Plant Physiology*. 2015. Vol. 169, № 3. P. 1512–1523. DOI: 10.1104/pp.15.00994
- Nagy R. *et al.* The characterization of novel mycorrhiza-specific phosphate transporters from *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* uncovers functional redundancy in symbiotic phosphate transport in solanaceous species // *Plant J.* 2005. Vol. 42, № 2. P. 236–250. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02364.x
- Nakayasu M. *et al.* A Dioxygenase Catalyzes Steroid 16 $\alpha$ -Hydroxylation in Steroidal Glycoalkaloid Biosynthesis1 // *Plant Physiol.* 2017. Vol. 175, № 1. P. 120–133. DOI: 10.1104/pp.17.00501
- Nützmann H.-W., Osbourn A. Gene clustering in plant specialized metabolism // *Current Opinion in Biotechnology*. 2014. Vol. 26. P. 91–99. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.10.009
- Ober D. Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism // *Trends Plant Sci.* 2005. Vol. 10, № 9. P. 444–449. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.07.007
- Osborn A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation // *Trends in Genetics*. 2010. Vol. 26, № 10. P. 449–457. DOI: 10.1016/j.tig.2010.07.001
- Patra B. *et al.* Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1829, № 11. P. 1236–1247. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.09.006
- Qin C. *et al.* Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into Capsicum domestication and specialization // *PNAS*. 2014. Vol. 111, № 14. P. 5135–5140. DOI: 10.1073/pnas.1400975111
- Riechers D.E., Timko M.P. Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco // *Plant Mol. Biol.* 1999. Vol. 41, № 3. P. 387–401.
- Schläpfer P. *et al.* Genome-Wide Prediction of Metabolic Enzymes, Pathways, and Gene Clusters in Plants // *Plant Physiol.* 2017. Vol. 173, № 4. P. 2041–2059. DOI: 10.1104/pp.16.01942
- Schranz M.E., Mohammadin S., Edger P.P. Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: the WGD Radiation Lag-Time Model // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. Vol. 15, № 2. P. 147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.03.011
- Shoji T., Hashimoto T. Tobacco MYC2 Regulates Jasmonate-Inducible Nicotine Biosynthesis Genes Directly and By Way of the NIC2-Locus ERF Genes // *Plant Cell Physiol.* 2011. Vol. 52, № 6. P. 1117–1130. DOI: 10.1093/pcp/pcr063
- Shoji T., Hashimoto T. Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonate-elicited cultured tobacco BY-2 cells? // *Plant Cell Physiol.* 2008. Vol. 49, № 8. P. 1209–1216. DOI: 10.1093/pcp/pcn096
- Sonawane P.D. *et al.* Plant cholesterol biosynthetic pathway overlaps with phytosterol metabolism // *Nat Plants*. 2016. Vol. 3. P. 16205. DOI: 10.1038/nplants.2016.205
- The Tomato Genome Consortium. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution // *Nature*. 2012. Vol. 485, № 7400. P. 635–641. DOI: 10.1038/nature11119
- Töpfer N., Fuchs L.-M., Aharoni A. The PhytoClust tool for metabolic gene clusters discovery in plant genomes // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, № 12. P. 7049–7063. DOI: 10.1093/nar/gkx404
- Unemoto N. *et al.* Two Cytochrome P450 Monooxygenases Catalyze Early Hydroxylation Steps in the Potato Steroid Glycoalkaloid Biosynthetic Pathway // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171, № 4. P. 2458–2467. DOI: 10.1104/pp.16.00137
- Wang P. *et al.* Generation of tobacco lines with widely different reduction in nicotine levels via RNA silencing approaches // *J. Biosci.* 2008. Vol. 33, № 2. P. 177–184.
- Wang P. *et al.* Silencing of PMT expression caused a surge of anatabine accumulation in tobacco // *Mol. Biol. Rep.* 2009. Vol. 36, № 8. P. 2285–2289. DOI: 10.1007/s11033-009-9446-1
- Xie J. *et al.* Biotechnology: A tool for reduced risk tobacco products - The nicotine experience from test tube to cigarette pack // *Rev Adv Tob Sci.* 2004. Vol. 30. P. 17–37.
- Xu S. *et al.* Wild tobacco genomes reveal the evolution of nicotine biosynthesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. Vol. 114, № 23. P. 6133–6138. DOI: 10.1073/pnas.1700073114
- Zhang H.-B. *et al.* Tobacco Transcription Factors NtMYC2a and NtMYC2b Form Nuclear Complexes with the NtJAZ1 Repressor and Regulate Multiple Jasmonate-Inducible Steps in Nicotine Biosynthesis // *Molecular Plant*. 2012. Vol. 5, № 1. P. 73–84. DOI: 10.1093/mp/ssr056
- Zhang S. *et al.* Distinct subfunctionalization and neofunctionalization of the B-class MADS-box genes in *Physalis floridana* // *Planta*. 2015. Vol. 241, № 2. P. 387–402. DOI: 10.1007/s00425-014-2190-3
- Zhou M., Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism // *Biotechnology Advances*. 2016. Vol. 34, № 4. P. 441–449. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.004
- Zhu G. *et al.* Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding // *Cell*. 2018. Vol. 172, № 1–2. P. 249–261.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2017.12.019