

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 577.3:577.1:631.8
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-317-324>

Поступило в редакцию 11.12.2019
Received 11.12.2019

Н. Г. Аверина, А. В. Емельянова, Т. Г. Каляга, С. М. Савина

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ
ДИГИДРОФЛАВОНОЛ РЕДУКТАЗЫ И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА HY5
ЭКЗОГЕННОЙ 5-АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ
В ПРОРОСТКАХ ОЗИМОГО РАПСА**

(Представлено академиком И. Д. Волотовским)

Аннотация. Изучено влияние экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) на активность дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR), экспрессию *dfr* гена и *hy5* гена транскрипционного фактора HY5, а также действие света разной интенсивности в сочетании с действием АЛК на накопление антоцианов в семядольных листьях озимого рапса (*Brassica napus* L.). Показано, что стимуляция накопления антоцианов под действием экзогенной АЛК на молекулярном уровне обеспечивается повышением уровня экспрессии *dfr* и *hy5* генов, а также возрастанием активности DFR фермента. Увеличение интенсивности света от 40,5 до 66,2 мкмоль фотонов/м²·с приводило к повышению способности растений накапливать антоцианы в среднем на 35 %. Действие АЛК в концентрациях 50, 100, 150 и 200 мг/л приводило к дополнительному усилению накопления антоцианов при двух используемых уровнях освещенности, причем в дозозависимой манере. При этом величина стимулирующего эффекта АЛК при использовании света высокой интенсивности была выше, чем в случае более низкой освещенности. Так, стимуляция накопления антоцианов при освещенности 40,5 мкмоль фотонов/м²·с составила 106 % при использовании 50 мг/л АЛК, 165 % – при использовании 100 мг/л АЛК, 222 % – в случае 150 мг/л АЛК и 350 % – при действии 200 мг/л АЛК по сравнению со световым контролем без обработки растений АЛК. При освещенности 66,2 мкмоль фотонов/м²·с эти показатели были 164, 262, 359 и 583 % соответственно по отношению к световому контролю. Таким образом, продемонстрировано, что стимуляция накопления антоцианов под действием АЛК в растениях озимого рапса обусловлена на молекулярном уровне ее влиянием на транскрипцию *dfr* и *hy5* генов.

Ключевые слова: 5-аминолевулиновая кислота, дигидрофлавонол-4-редуктаза, транскрипционный фактор HY5, гены *dfr* и *hy5*, озимый рапс (*Brassica napus* L., сорт Зорны), разные уровни освещенности

Для цитирования: Молекулярно-генетические механизмы регуляции дигидрофлавонол редуктазы и транскрипционного фактора HY5 экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой в проростках озимого рапса / Н. Г. Аверина [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 3. – С. 317–324. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-317-324>

Natalia G. Averina, Hanna V. Yemelyanova, Tatsiana G. Kaliaha, Sviatlana M. Savina

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF REGULATION OF DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE
AND TRANSCRIPTION FACTOR HY5 BY EXOGENOUS 5-AMINOLEVULINIC
ACID IN WINTER RAPE PLANTS**

(Communicated by Academician Igor D. Volotovskiy)

Abstract. The effect of exogenous 5-aminolevulinic acid (ALA) on the activity of dihydroflavonol-4-reductase (DFR), the expression of the *dfr* gene and the *hy5* gene of the transcription factor HY5 and the light effect of different intensities in combination with the ALA action on the accumulation of anthocyanins in cotyledonous leaves of winter rape (*Brassica napus* L.) were studied. It was shown that the stimulation of the accumulation of anthocyanins under the exogenous ALA action at

the molecular level was provided by increasing the expression level of the *dfr* and *hy5* genes and the activity of the DFR enzyme. Increasing the light intensity from 40.5 to 66.2 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ enhanced the ability of plants to accumulate anthocyanins on average by 35 %. The ALA action at concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg/L led to an additional increase in the accumulation of anthocyanins at the two used levels of illumination, and in a dose-dependent manner. The stimulating effect of ALA under high light intensity was much higher than in the case of lower illumination. Thus, the stimulation of the anthocyanin accumulation under illumination of 40.5 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ was 106 % when using 50 mg/L ALA, 165 % – when using 100 mg/L ALA, 222 % – in the case of 150 mg/L ALA and 350 % – under the action of 200 mg/L ALA compared with light control without of ALA treatment. At an illumination of 66.2 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$, these indicators were 164, 262, 359 and 583 % respectively. Thus, it was demonstrated that the stimulation of the accumulation of anthocyanins under the action of ALA in winter rape plants was due to its positive effect on the transcription of the *dfr* and *hy5* genes at the molecular level.

Keywords: 5-aminolevulinic acid, dihydroflavonol-4-reductase, transcription factor HY5, *dfr* and *hy5* genes, winter rape (*Brassica napus* L.), different illumination levels

For citation: Averina N. G., Yemelyanova H. V., Kaliaha T. G., Savina S. M. Molecular-genetic mechanisms of regulation of dihydroflavonol reductase and transcription factor HY5 by exogenous 5-aminolevulinic acid in winter rape plants. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 3, pp. 317–324 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-3-317-324>

Введение. Вторичные метаболиты растений – антоцианы, принадлежат к наиболее распространенному и многочисленному классу полифенолов – флавоноидам. Они являются универсальными компонентами растительных тканей и играют важную физиологическую и экологическую роль в защите растений от патогенов и неблагоприятных факторов внешней среды, что определяет их высокую значимость в мире растений, животных и человека [1]. Они активно используются в фармакологической, косметической и пищевой промышленности в качестве натуральных красителей и биологически активных соединений, обладающих окислительно-восстановительными, антиоксидантными, противовоспалительными и нейропротекторными свойствами. Они снижают риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и злокачественных образований, улучшают зрение и состояние сосудов. В антоцианах нуждается пищевая индустрия, активно использующая в настоящее время искусственные красители, которые представляют прямую угрозу человеку, повышая риск развития онкологических заболеваний. В растениях антоцианы уменьшают степень фотоингибирования, ускоряют восстановление фотосинтетического аппарата, активно поглощают излучение в УФ-области, защищая растения (в частности, генетический аппарат) от губительного действия УФ лучей [2]. Благодаря наличию в структуре антоцианов ароматических колец и свободных гидроксильных групп, они способны с легкостью вступать в свободнорадикальные реакции, связывать активные формы кислорода и перекисные радикалы, образующиеся при стрессовых воздействиях, выполняя при этом роль низкомолекулярных антиоксидантов [2]. Очищенные растворы антоцианов удаляют практически все виды активных форм кислорода и азота с эффективностью в четыре раза большей, чем аскорбат и α -токоферол [3].

В растениях антоцианы синтезируются шикиматным путем через содержащую бензольное кольцо аминокислоту фенилаланин [2]. Ключевыми ферментами синтеза флавоноидов являются фенилаланин аммиак-лиаза (PAL), осуществляющая образование фенилпропаноидов, халконсинтаза (CHS) и халкоизомераза (CHI), участвующие в образовании второго бензольного кольца и формировании дигидрофлавонолов, а также завершающая образование антоцианов дигидрофлавонол-4-редуктаза (DFR). Наряду со структурными генами, кодирующими ферменты пути биосинтеза антоцианов, функционируют регуляторные гены, кодирующие транскрипционные факторы, которые контролируют тканеспецифическую экспрессию структурных генов. Активация пути биосинтеза антоцианов контролируется транскрипционными факторами WD40-bHLH-MYB, образующими WBM тройной комплекс. В частности, сверхэкспрессия одного из важнейших транскрипционных факторов PAP1/MYB75 в трансгенных растениях *Arabidopsis* приводит к накоплению больших количеств антоцианов в листьях, стеблях, цветах и корнях [4; 5]. Транскрипционный фактор HY5, участвующий в регуляции фотоморфогенеза и осуществляющий прямое воздействие на транскрипцию фотоиндуцибельных генов, связывается с промоторными участками структурных генов и генов транскрипционных факторов, стимулируя их экспрессию и контролируя светозависимый биосинтез антоцианов [2].

Потребность в антоцианах огромна, что стимулирует интенсивные исследования в области их биосинтеза, регуляции и применения. Осуществляется поиск новых быстро возобновляемых растительных источников антоцианов, разрабатываются новые биотехнологии, увеличивающие выход этих соединений, создаются новые высокотехнологичные продукты, обогащенные антоцианами, осуществляется поиск высокоэффективных положительных регуляторов их биосинтеза, а также изучаются механизмы взаимодействия различных метаболических систем и сигнальных путей, осуществляющих контроль над их биосинтезом. 5-Аминолевулиновая кислота (АЛК) – важнейший предшественник в системе биосинтеза тетрапирролов (хлорофиллов, гемов, корриноидов, фикобилинов), экологически безопасный природный регулятор роста растений и антистрессор [6] – является также высокоэффективным индуктором накопления антоцианов. АЛК усиливает обусловленную антоцианами окраску плодов, улучшает товарный вид и вкусовые качества яблок, персиков, груш, китайской сливы [7]. В кожуре яблок и в листьях реликтового лекарственного растения *Ginkgo biloba*, обработанных АЛК, отмечено повышение экспрессии генов ключевых ферментов системы биосинтеза антоцианов – PAL, CHS, CHI, DFR [8]. Нами впервые осуществлена индукция накопления антоцианов с помощью АЛК в ценной сельскохозяйственной культуре – озимом рапсе, что сопровождалось повышением активности системы синтеза гема, содержания пролина, а также возрастанием антиоксидантной и антирадикальной активностей [9]. Представляло значительный интерес изучить влияние экзогенной АЛК в растениях озимого рапса на систему синтеза антоцианов и регуляцию их образования.

Целью данной работы стало выяснение биохимических и молекулярно-генетических механизмов действия высоких концентраций экзогенной АЛК на активность DFR и экспрессию *dfr* гена фермента в растениях озимого рапса, а также ее влияние на экспрессию *hy5* гена транскрипционного фактора HY5, осуществляющего прямое воздействие на экспрессию светоиндуцибельных генов, участвующих в синтезе антоцианов и регуляции их образования.

Материалы и методы исследования. Семена озимого рапса (*Brassica napus* L., сорт Зорны) выращивали до 7-дневного возраста. Проращивание семян проводили в пластиковых контейнерах на фильтровальной бумаге при температуре 26 ± 2 °C и освещении белыми люминесцентными лампами Philips TD-36/765 (освещенность 40,5 и 66,2 мкмоль фотонов/м²·с) в режиме 14 ч света/10 ч темноты на дистиллированной воде (контроль), а также на растворе АЛК разных концентраций (50–200 мг/л). При отборе проб использовали семядольные листья, которые срезали, измельчали, тщательно перемешивали, взвешивали и подвергали анализу.

Содержание антоцианов определяли согласно методу [9] с некоторыми модификациями. Навеску 0,05 г растительного материала растирали в 1 мл 1 %-ной HCl. К полученному экстракту добавляли 1 мл хлороформа, пробы перемешивали и центрифугировали 10 мин при 12000 g на микроцентрифуге Scanspeed (Дания). Затем отбирали супернатант и измеряли его оптическую плотность при 525 нм на спектрофотометре Solar PB 2201 (Беларусь). Содержание антоцианов рассчитывали в мкмоль на г сырой массы, используя коэффициент молярной экстинкции $31,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Для определения активности DFR 0,1 г семядольных листьев рапса растирали в 1 мл среды выделения (137 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KН₂PO₄, pH 7,4). К экстракту приливали 1 мл хлороформа, перемешивали и центрифугировали 15 мин при 15000 g (4 °C). Супернатант использовали в дальнейшем для определения активности фермента согласно [10]. Реакционная среда состояла из 25 mM Трис-HCl (pH 7,0), 4 mM НАДФН, 100 mM дигидрокверцетина (таксифолина) и супернатанта. Реакцию запускали добавлением НАДФН, измеряли кинетику окисления НАДФН при 340 нм в течение 15 мин. Ферментативную активность рассчитывали, используя коэффициент экстинкции НАДФН $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

ПЦР в реальном времени проводили, используя термоциклер C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США). Суммарную РНК выделяли из свежих листьев с помощью Tri-реагента (Sigma-Aldrich, США) и количественно определяли, используя спектрофотометр ND-2000 (Thermo Scientific, США). Синтез кДНК осуществляли с помощью PhotoScript II Reverse Transcriptase (New England BioLabsing, США). ПЦР реакцию проводили, используя 2,5x реакционную смесь для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии EVA Green

(Синтол, Россия) с ген-специфичными праймерами: TATGCCGCCTAGCCTTATTACCG (прямой) и CCTTGGCAGCAGCTTGTTCGT (обратный) для *dfi* гена [11], рассчитанными нами праймерами AGCGATGAAGAGATACGGCG (прямой) и TCTCTTGCTTGCTGTGCTGA (обратный) для *hy5* гена, а также праймерами AACCCAAAGGCCAACAGAGA (прямой) и AAGGTACGTCACGTCAGCAAGGT (обратный) для референсного гена актина (*act*) [11].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета программ Excel 2010 и статистических методов, принятых в области биологических исследований. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$. В работе приведены средние значения из 3–6 экспериментов и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. Ранее нами было показано, что выращивание растений озимого рапса на растворах экзогенной АЛК 50–300 мг/л приводило к изменению характерной для контрольных растений зеленой окраски семядольных листьев и гипокотилей на розово-фиолетовую, что было вызвано дозозависимым накоплением в них антоцианов [9]. При использовании 200 мг/л АЛК и освещенности 66,2 мкмоль фотонов/м²·с в семядолях 7-дневных растений рапса накапливается в среднем 571 ± 67 мкмоль антоцианов в расчете на грамм сырой массы, что в 5,4 раз больше, чем в контрольных растениях (рис. 1, а).

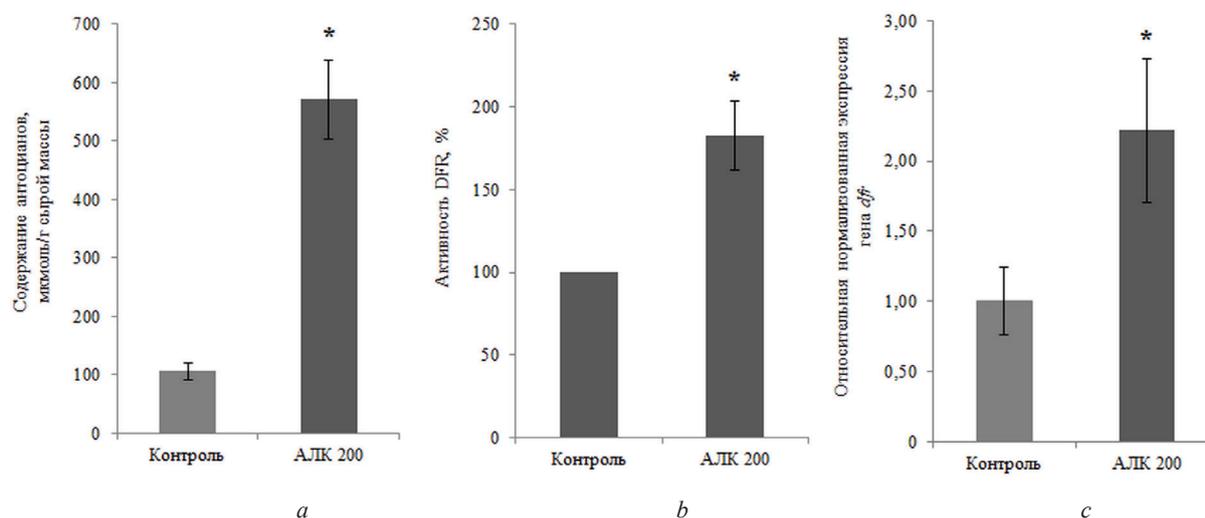


Рис. 1. Содержание антоцианов (а), активность DFR (b) и относительная нормализованная экспрессия гена *dfi* (c) в семядольных листьях 7-дневного озимого рапса, выращенного на дистиллированной воде (контроль) и на растворе АЛК в концентрации 200 мг/л (АЛК 200). Достоверные значения при $p \leq 0,05$ отмечены звездочкой

Fig. 1. Content of anthocyanins (a), DFR activity (b) and relative normalized expression of the *dfi* gene (c) in the cotyledonous leaves of 7-day-old winter rape plants grown on distilled water (control) and on ALA solution at a concentration of 200 mg/L (ALA 200). Reliable values at $p \leq 0.05$ are marked with an asterisk

Чтобы понять причину усиления накопления антоцианов нами был осуществлен анализ действия экзогенной АЛК на ключевой фермент в цепи биосинтеза антоцианов – субстрат-специфичную DFR, использующую в качестве субстрата дигидрофлавонолы – дигидрокверцетин, дигидрокемпферол или дигидромирицетин. В экспериментах в качестве субстрата DFR использовали дигидрокверцетин. В растениях, обработанных АЛК 200 мг/л, активность фермента оказалась в среднем в 1,8 раза выше, чем в контроле (рис. 1, b).

С целью выяснения молекулярных механизмов действия экзогенной АЛК на активность DFR был использован количественный ПЦР анализ – изучена экспрессия гена *dfi*. На рис. 1, c отчетливо видно возрастание количества мРНК-транскриптов *dfi* гена в растениях варианта «АЛК» (в среднем в 2,2 раза) по сравнению с их количеством в растениях контрольного варианта.

Свет является одним из наиболее важных факторов внешней среды, воздействующих на синтез антоцианов. Главная роль в контроле биосинтеза антоцианов под действием света отводится транскрипционному фактору HY5, который является компонентом цепи переноса светового сигнала и усиливает накопление антоцианов [2]. Нами изучено действие света разной интенсивно-

сти, а также действие света в сочетании с действием АЛК (200 мг/л) на накопление антоцианов в семядольных листьях озимого рапса. Увеличение интенсивности света от 40,5 до 66,2 мкмоль фотонов/м²·с приводило к повышению способности растений накапливать антоцианы (в среднем на 35 %). Действие АЛК в концентрациях 50, 100, 150 и 200 мг/л приводило к дополнительному усилению накопления антоцианов при двух используемых уровнях освещенности, причем в дозозависимой манере (рис. 2, а). При этом величина стимулирующего эффекта АЛК при использовании света высокой интенсивности была выше, чем в случае более низкой освещенности. Так стимуляция накопления антоцианов при освещенности 40,5 мкмоль фотонов/м²·с составила 106 % при использовании 50 мг/л АЛК, 165 % – при использовании 100 мг/л АЛК, 222 % – в случае 150 мг/л АЛК и 350 % – при действии 200 мг/л АЛК по сравнению с растениями светового варианта, не обработанными АЛК. При освещенности 66,2 мкмоль фотонов/м²·с эти показатели были 164, 262, 359 и 583 % соответственно по отношению к световому контролю.

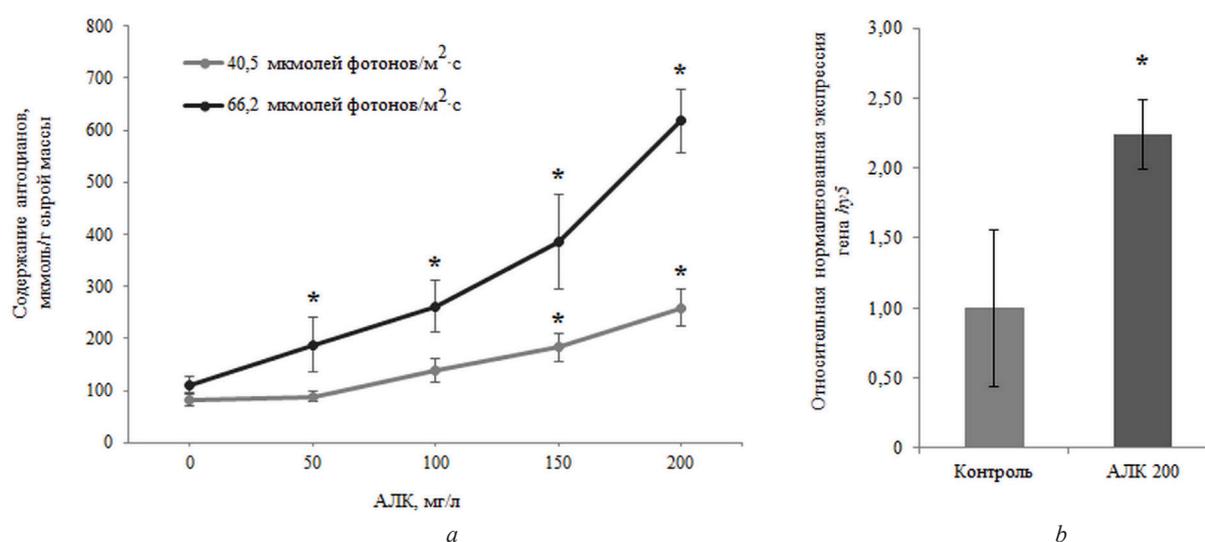


Рис. 2. Содержание антоцианов в семядольных листьях 7-дневного озимого рапса, выращенного при различном режиме освещения (40,5 и 66,2 мкмоль фотонов/м²·с) на растворах АЛК (50, 100, 150 и 200 мг/л) (а) и относительная нормализованная экспрессия гена *hu5* в семядольных листьях 7-дневного озимого рапса, выращенного на дистиллированной воде (контроль) и на растворе АЛК (200 мг/л) при освещенности 66,2 мкмоль фотонов/м²·с (б). Достоверные значения при $p \leq 0,05$ отмечены звездочкой

Fig. 2. Content of anthocyanins in the cotyledonary leaves of 7-day-old winter rape plants grown under different light conditions (40.5 and 66.2 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$) on ALA solutions (50, 100, 150 and 200 mg/L) (a) and the relative normalized expression of the *hu5* gene in the cotyledonary leaves of 7-day-old winter rape plants grown on distilled water (control) and on ALA solution (200 mg/L) at an illuminance of 66.2 $\mu\text{mol photons/m}^2\cdot\text{s}$ (b). Reliable values at $p \leq 0.05$ are marked with an asterisk

В связи с важной ролью транскрипционного фактора НУ5 в световой регуляции синтеза антоцианов, мы изучили влияние АЛК 200 мг/л на экспрессию гена белка НУ5 в растениях рапса, выращиваемых на свету при освещенности 66,2 мкмоль фотонов/м²·с (рис. 2, б). В растениях, выращенных на экзогенной АЛК, уровень экспрессии гена *hu5* в 2,2 раза превышал таковой в контрольных растениях, выращенных на свету без обработки АЛК.

Таким образом, впервые на растениях озимого рапса показано, что стимуляция накопления антоцианов под действием экзогенной АЛК на молекулярном уровне обеспечивается повышением уровня экспрессии гена одного из ключевых ферментов синтеза антоцианов – DFR и возрастанием активности фермента. Ранее стимуляцию экспрессии гена *dfi* под действием экзогенной АЛК наблюдали в кожуре плодов персика и кожуре яблок, что сопровождалось усилением накопления в этой ткани антоцианов и улучшением товарного вида фруктов [5; 7].

Впервые изучено действие АЛК на экспрессию гена *hu5* транскрипционного фактора НУ5 – компонента цепи переноса светового сигнала, которому отводят центральную роль в сети транс-

крипционных факторов сигнальных путей гормонов, различных стрессов и активных форм кислорода [12]. Белок HY5 относится к семейству транскрипционных факторов bZIP – белков, которые содержат структурный мотив «лейциновая молния» [2]. Свет индуцирует транскрипцию гена *hy5*, продукт которого регулирует транскрипцию свето-индуцибельных структурных генов биосинтеза антоцианов, таких как *CHS*, *CHI*, а также *MYB10* и *MYB75/PAP1* генов, продукты которых входят в состав белкового комплекса MYB-bHLH-WD40, контролирующего синтез антоцианов путем регуляции экспрессии структурных генов этого пути [12]. Двукратное возрастание уровня транскриптов *hy5* гена в растениях варианта «АЛК» указывает на чрезвычайно эффективный контроль синтеза HY5 транскрипционного фактора со стороны АЛК.

Также показано, что при разных уровнях освещенности, АЛК в дозозависимой манере стимулирует накопление антоцианов, по сравнению с действием одного света. При этом эффект АЛК оказывался намного сильнее, чем действие одного света. Так, при возрастании освещенности в 1,6 раза накопление антоцианов под действием АЛК (200 мг/л) возрастало в 5,8 раз. Не исключено, что такое сильное влияние АЛК на содержание антоцианов обусловлено возможной ее сигнальной функцией, в рамках которой она могла бы контролировать экспрессию множества ядерных генов фенилпропаноидного пути биосинтеза антоцианов. Ранее Maruyama-Nakashita и соавт. продемонстрировали, что экзогенная АЛК увеличивала уровень транскриптов ряда генов, участвующих в ассимиляции серы в растениях *Arabidopsis thaliana* [13]. Затем Czarnecki и соавт. показали, что изменение биосинтеза АЛК вносит определенный вклад в процесс пластиндно-ядерной сигнализации [14]. Ими было показано, что угнетение синтеза АЛК приводило к репрессии 158 ядерных генов и стимуляции экспрессии 167 генов в растениях *Arabidopsis*. Нами было отмечено, что экзогенная АЛК участвует в регуляции экспрессии ядерного гена *Nar I* нитратредуктазы [15]. Результаты настоящей работы также демонстрируют участие экзогенной АЛК в контроле экспрессии двух ядерных генов, принимающих участие в синтезе и регуляции антоцианов. Несомненно, что исследование роли АЛК как сигнальной молекулы представляет в будущем значительный интерес.

Заключение. Представленные выше данные показали, что уже на самых ранних стадиях развития растений рапса экзогенная АЛК контролирует образование антоцианов путем стимуляции экспрессии как структурных генов цепи биосинтеза антоцианов, таких как *dfr*, так и генов транскрипционных факторов, таких как HY5. Использование АЛК в растениеводстве в качестве индуктора накопления антоцианов может стать эффективным приемом получения высокотехнологичных пищевых продуктов, обогащенных антоцианами, новых растительных источников антоцианов, а также растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Список использованных источников

1. Peer, W. A. Flavonoids as Signal Molecules: Targets of Flavonoid Action / W. A. Peer, A. S. Murphy // The Science of Flavonoids / ed. by P. E. Grotewald. – N. Y., 2008. – Ch. 9. – P. 239–268. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_9
2. Shi, M. Z. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana* / M. Z. Shi, D. Y. Xie // Recent Pat Biotechnol. – 2014. – Vol. 8, N 1. – P. 47–60. <https://doi.org/10.2174/1872208307666131218123538>
3. Wang, H. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins / H. Wang, G. Cao, R. L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 1997. – Vol. 45, N 2. – P. 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
4. Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *Arabidopsis thaliana* / D. D. Rowan [et al.] // New Phytol. – 2009. – Vol. 182, N 1. – P. 102–115. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02737.x>
5. Functional Genomics by Integrated Analysis of Metabolome and Transcriptome of *Arabidopsis* Plants Over-Expressing an MYB Transcription Factor / T. Tohge [et al.] // Plant J. – 2005. – Vol. 42, N 2. – P. 218–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02371.x>
6. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск, 2012. – 413 с.
7. Proteomic and SSH analyses of ALA-promoted fruit coloration and evidence for the involvement of a MADS-BOX gene, MdMADS1 / X. Feng [et al.] // Front. Plant Sci. – 2016. – Vol. 7. – P. 1615. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01615>
8. Effects of 5-Aminolevulinic Acid on Chlorophyll, Photosynthesis, Soluble Sugar and Flavonoids of *Ginkgo biloba* / F. Xu [et al.] // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. – 2011. – Vol. 39, N 1. – P. 41–47. <https://doi.org/10.15835/nbha3915880>
9. Индукция накопления антоцианов и состояние защитной системы в растениях озимого рапса, обработанных 5-аминолевулиновой кислотой / Н. Г. Аверина [и др.] // Физиол. растений. – 2017. – Т. 64, № 3. – С. 173–182.

10. Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice / M. Hayashi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102, N 19. – P. 7020–7025. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502556102>
11. Proanthocyanidin biosynthesis in the seed coat of yellow-seeded, canola quality *Brassica napus* YN01-429 is constrained at the committed step catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase / L. Akhiv [et al.] // *Botany*. – 2009. – Vol. 87, N 6. – P. 616–625. <https://doi.org/10.1139/b09-036>
12. Gangappa, S. N. The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development / S. N. Gangappa, J. F. Botto // *Molecular Plant*. – 2016. – Vol. 9, N 10. – P. 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>
13. Exogenous application of 5-aminolevulinic acid increases the transcript levels of sulfur transport and assimilatory genes, sulfate uptake, and cysteine and glutathione contents in *Arabidopsis thaliana* / A. Maruyama-Nakashita [et al.] // *Soil Sci. Plant Nutr.* – 2010. – Vol. 56, N 2. – P. 281–288. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00458.x>
14. Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling / O. Czarnecki [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00236>
15. Beizaei, Z. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants / Z. Beizaei, R. A. Sherbakov, N. G. Averina // *J. Plant Growth Regul.* – 2014. – Vol. 33, N 4. – P. 745–750. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9422-4>

References

1. Peer W. A., Murphy A. S. Flavonoids as Signal Molecules: Targets of Flavonoid Action. Grotewald P. E. (ed.). *The Science of Flavonoids*. N. Y., 2008, ch. 9, pp. 239–268. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28822-2_9
2. Shi M. Z., Xie D. Y. Biosynthesis and metabolic engineering of anthocyanins in *Arabidopsis thaliana*. *Recent Patents on Biotechnology*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 47–60. <https://doi.org/10.2174/1872208307666131218123538>
3. Wang H., Cao G., Prior R. L. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, vol. 45, no. 2, pp. 304–309. <https://doi.org/10.1021/jf960421t>
4. Rowan D. D., Cao M., Lin-Wang K., Cooney J. M., Jensen D. J., Austin P. T., Hunt M. B., Norling C., Hellens R. P., Schaffer R. J., Allan A. C. Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 2009, vol. 182, no. 1, pp. 102–115. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02737.x>
5. Tohge T., Nishiyama Y., Hirai M. Y., Yano M., Nakajima J., Awazuahara M., Inoue E., Takahashi H., Goodenow D. B., Kitayama M., Noji M., Yamazaki M., Saito K. Functional Genomics by Integrated Analysis of Metabolome and Transcriptome of *Arabidopsis* Plants Over-Expressing an MYB Transcription Factor. *Plant Journal*, 2005, vol. 42, no. 2, pp. 218–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02371.x>
6. Averina N. G., Yaronskaya E. B. *Tetrapyrroles biosynthesis in plants*. Minsk, 2012. 413 p. (in Russian).
7. Feng X., Yuyan A., Jie Zh., Miao S., Liangju W. Proteomic and SSH analyses of ALA-promoted fruit coloration and evidence for the involvement of a MADS-BOX gene, MdMADS1. *Frontiers Plant Science*, 2016, vol. 7, pp. 1615. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01615>
8. Xu F., Cheng Sh., Zhu J., Zhang W., Wang Y. Effects of 5-Aminolevulinic Acid on Chlorophyll, Photosynthesis, Soluble Sugar and Flavonoids of *Ginkgo biloba*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2011, vol. 39, no. 1, pp. 41–47. <https://doi.org/10.15835/nbha3915880>
9. Averina N. G., Sherbakov R. A., Yemelyanova H. V., Domanskaya I. N., Usatov A. V. Induction of anthocyanin accumulation and status of protective system in winter rape plants treated with 5-aminolevulinic acid. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2017, vol. 64, no. 3, pp. 310–318. <https://doi.org/10.1134/s1021443717030025>
10. Hayashi M., Takahashi H., Tamura K., Huang J., Yu L.-H., Kawai-Yamada M., Tezuka T., Uchimiya H. Enhanced dihydroflavonol-4-reductase activity and NAD homeostasis leading to cell death tolerance in transgenic rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 19, pp. 7020–7025. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502556102>
11. Akhiv L., Ashe P., Tan Y., Datla R., Selvaraj G. Proanthocyanidin biosynthesis in the seed coat of yellow-seeded, canola quality *Brassica napus* YN01-429 is constrained at the committed step catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase. *Botany*, 2009, vol. 87, no. 6, pp. 616–625. <https://doi.org/10.1139/b09-036>
12. Gangappa S. N., Botto J. F. The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Molecular Plant*, 2016, vol. 9, no. 10, pp. 1353–1365. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>
13. Maruyama-Nakashita A., Yokota Hirai M., Funada Sh., Fueki Sh. Exogenous application of 5-aminolevulinic acid increases the transcript levels of sulfur transport and assimilatory genes, sulfate uptake, and cysteine and glutathione contents in *Arabidopsis thaliana*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2010, vol. 56, no. 2, pp. 281–288. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00458.x>
14. Czarnecki O., Gläßer Ch., Chen J.-G., Mayer K. F. X., Grimm B. Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 2012, vol. 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00236>
15. Beizaei Z., Sherbakov R. A., Averina N. G. Response of nitrate reductase to exogenous application of 5-aminolevulinic acid in barley plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2014, vol. 33, no. 4, pp. 745–750. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9422-4>

Сведения об авторах

Аверина Наталья Георгиевна – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: averina_ng@tyt.by.

Емельянова Анна Викторовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yashchuk.anna@mail.ru.

Каляга Татьяна Геннадьевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: t_kalyaga@mail.ru.

Савина Светлана Михайловна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Республика Минск). E-mail: svetlanapavluchkova@yandex.ru.

Information about authors

Averina Natalia G. – D. Sc. (Biology), Professor, Chief researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: averina_ng@tyt.by.

Yemelyanova Hanna V. – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yashchuk.anna@mail.ru.

Kaliha Tatsiana G. – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: t_kalyaga@mail.ru.

Savina Sviatlana M. – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svetlanapavluchkova@yandex.ru.