

**ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ VACPК13
НА УСТОЙЧИВОСТЬ КУЛЬТУР КЛЕТОК ВИНОГРАДА АМУРСКОГО VITIS AMURENSIS RUPR.
К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ***

Полученные в результате исследования данные показали, что сверхэкспрессия гена VaCPK13 не влияла на устойчивость клеток V. amurensis к температурному, осмотическому и солевому стрессам. Полученные результаты свидетельствуют, что ген VaCPK13 не является сильным позитивным регулятором ответа растений на проанализированные абиотические стрессы.

Ключевые слова: Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, Vitis amurensis, абиотический стресс, клеточные культуры растений

V.S. Khristenko, A.S. Dubrovina,
O.A. Aleynova, K.V. Kiselev

**THE INFLUENCE OF THE GENE OVEREXPRESSION Ca^{2+} -DEPENDENT PROTEIN KINASE VACPК13
ON THE RESISTANCE OF THE AMUR GRAPE (VITIS AMURENSIS RUPR.) CELL
CULTURES TO THE ABIOTIC STRESS**

The obtained as research result data showed that the VaCPK13 gene overexpression did not influence on the stability of the V. amurensis cells to the temperature, osmotic and salt stress. The obtained results prove that the gene VaCPK13 is not a strong positive regulator of the plant response to the analyzed abiotic stress.

Key words: Ca^{2+} dependent protein kinase, Vitis amurensis, abiotic stress, plant cell cultures.

Введение. Воздействие на растение абиотических стрессовых факторов, таких как экстремальные температуры, засуха, высокая соленость почвы или затопление, приводит к многомиллионным потерям в сельском хозяйстве и является главным лимитирующим фактором этой отрасли экономики. По данным FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations), приблизительно 22 % находящихся в сельхозпользовании земель являются засоленными, и с каждым годом это количество возрастает [1]. Засоление (первичное – природное или вторичное – вызванное нарушениями ирригации) связано с наличием в почве избыточных количеств ионов натрия, кальция или магния, хлоридов, сульфатов или карбонатов [2]. Помимо засоления почв, истощение запасов почвенной влаги также является важным фактором, лимитирующим развитие сельского хозяйства. Дефицит влаги приводит к снижению тургора клеток, закрытию устьиц, угнетению роста и уменьшению урожая. Воздействие критических температур понижает всхожесть семян и интенсивность фотосинтеза главным образом из-за повреждения компонентов фотосистемы II, локализованной в мембранах тилакоидов хлоропластов. Кроме того, при температурном стрессе уменьшается скорость поглощения углекислого газа и происходят нарушения мембранного транспорта. Нарушается также процесс окислительного фосфорилирования и синтез АТФ [3].

Понимание молекулярно-генетических механизмов ответа растений на неблагоприятные условия окружающей среды поможет понять, как растения справляются со стрессом. Приобретение растениями устойчивости к абиотическому стрессу нуждается в различных биохимических и физиологических изменениях, и большинство из них зависит от изменений в экспрессии генов. Исследования последних двух десятилетий показали, что различные стрессы влекут за собой сигнал-специфичные изменения уровня цитоплазматического Ca^{2+} , который функционирует как передатчик в модуляции разнообразных физиологических процессов, важных для адаптации к стрессам [4, 5].

* Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект №14-14-00366).

Известно, что увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоли сигнализирует об изменениях в окружающей среде через связывание ионов Ca^{2+} с белками-сенсорами Ca^{2+} , которые активируют дальнейшие события в сигнальной цепи. Одним из важнейших сенсорных белков в растительной клетке являются Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPK). CDPK играют важную роль в поддержании мембранного потенциала, регуляции углеводного и азотного обмена, устьичных движений и ответа клеток растений на абиотические и биотические стрессы [6]. Известно, что экспрессия генов и активность различных изоформ CDPK могут значительно возрасти в ответ на воздействие абиотических стрессов [7]. Кроме того, некоторые из идентифицированных белков-мишеней CDPK участвуют в защитном ответе клеток растений на абиотический стресс [8].

Особый интерес представляет изучение экспрессии генов CDPK в дикорастущих растениях с высоким уровнем устойчивости к стрессам, поэтому объектом нашего исследования был выбран виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr., произрастающий на Дальнем Востоке России и обладающий высоким адаптивным потенциалом и устойчивостью к неблагоприятным условиям внешней среды. Ранее нами была изучена экспрессия генов CDPK под воздействием таких абиотических стрессовых факторов, как солевой стресс, водный дефицит, осмотический и температурные стрессы в дикорастущем *V. amurensis*. Согласно полученным данным, экспрессия гена *VaCPK13* значительно увеличивалась при холодовом стрессе в растениях *V. amurensis* [9].

Цель работы. Изучение роли гена *VaCPK13* в устойчивости дикорастущего винограда *V. amurensis* к абиотическим стрессам.

Материалы и методы исследования

Растительный материал и клеточные культуры. Каллусная культура V2 была получена в 2002 году из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis* (Vitaceae), которое было собрано на Дальнем Востоке России (юг Приморского края) и определено в отделе ботаники Биолого-почвенного института ДВО РАН.

Для проведения экспериментов на культуре клеток винограда мы использовали $W_{в/а}$ агаризованную питательную среду [10] с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2 мг/л α -нафтилуксусной (АНУ) кислоты, которую разливали в пробирки 150·16 мм по 8 мл. Интервал субкультивирования составлял 30 дней в темноте при $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Получение трансгенных культур клеток винограда *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих ген *VaCPK13*, с помощью агробактериальной трансформации. Комплементарная (кДНК) гена *VaCPK13* (номер доступа в ГенБанк KC488320) была амплифицирована после выделения РНК из листьев *V. amurensis*. Для амплификации полноразмерной кодирующей последовательности кДНК *VaCPK13* использовали пару праймеров 5'ATG GGG AAC TGT TGC AGA T, 5'TTA CTC ATT CCC CAA GTT TAG. Полученный ОТ-ПЦР продукт *VaCPK13* был выделен из геля при помощи набора Cleanup Mini kit (Евроген, Москва, Россия), клонирован в вектор pTZ57R/T согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Вильнюс, Литва). Затем, используя пару праймеров 5'GCT CGA GCT CAT GGG GAA CTG TTG CAG AT и 5'TCG AGG TAC CTT ACT CAT TCC CCA AGT TTA G, содержащих в своей последовательности сайты рестрикции для рестриктаз *SacI* and *KpnI*, мы амплифицировали полную последовательность *VaCPK13*. В качестве матрицы использовали предварительно полученную генетическую конструкцию pTZ57-*VaCPK13*. Полученные ПЦР-продукты перенесли по рестрикционным сайтам *SacI* and *KpnI* в вектор pSAT1. В этой конструкции ген *VaCPK13* находится под контролем двойного CaMV 35S промотора. После этого мы перенесли кассету, содержащую *VaCPK13*, из вектора pSAT1 в вектор pZP-RCS2-nptII [11], используя сайт рестриктазы *PstI* (СибЭнзим, Новосибирск, Россия). Далее генетическая конструкция pZP-RCS2-*VaCPK13*-nptII была перенесена в агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMp90.

Суспензионную культуру клеток винограда *V. amurensis* V2 трансформировали полученными штаммами агробактерий по методике, описанной ранее [12]. После трансформации каллусы культивировали в течение 3 месяцев в присутствии 250 мг/л цефотаксима для подавления роста агробактерий. Отбор трансгенных клеток проводили на канамицине (Km) в концентрации 10–15 мг/л в течение 3–4 месяцев.

Воздействие абиотических стрессов на культуры клеток *V. amurensis*. Для анализа воздействия абиотических стрессовых факторов на устойчивость *VaCPK13*-трансгенных культур клеток мы исследовали влияние пониженной и повышенной температуры на рост трансгенных кле-

точных культур (культивирование в течение 30 дней при температурах +16°C и +33°C) и влияние солевого стресса (культивирование в течение 30 дней при +23°C на питательных средах, содержащих NaCl в концентрации 60 и 120 мМ). NaCl добавляли в питательные среды после измерения pH. Также исследовали влияние осмотического стресса на рост трансгенных клеточных культур, сверхэкспрессирующих ген *VaCPK13*. Для этого эксперимент проводили при температуре +23°C, используя среду W_{В/А}, содержащую маннитол в концентрации 200 и 300 мМ.

Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК (кДНК). Выделение РНК из культур клеток *V. amurensis* осуществляли на основе СТАВ протокола по Bekesiova и др. [13]. кДНК была синтезирована, как описано ранее [12, 14].

Количественная оценка экспрессии гена *VaCPK13*. Доказательство экспрессии экзогенного и эндогенного *VaCPK13*, а также тотальной экспрессии *VaCPK13* проводили с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ). ПЦР РВ для гена был выполнен согласно методике, описанной Giulietti и др. [15]. Тотальную экспрессию гена *VaCPK13* анализировали с помощью пары праймеров, подобранных к последовательности киназного домена гена *VaCPK13* (табл.1). Эндогенную экспрессию *VaCPK13* изучали, используя праймеры, один из которых был комплементарен концу последовательности киназного домена *VaCPK13*, а другой к последовательности 3'-нетранскрибируемой области (3'UTR) *VaCPK13*. Экспрессию дополнительной вставки гена *VaCPK13* определяли, используя пару праймеров, подобранных к концу белок-кодирующей последовательности гена *VaCPK13* и к последовательности CaMV 35S терминатора, находящегося в бинарной конструкции *rZP-RCS2-nptII-VaCPK13*. Геноспецифичные пары праймеров представлены в таблице 1.

Таблица 1

Праймеры для определения суммарной, эндогенной экспрессии и экспрессии трансгена *VaCPK13*

Ген	Праймеры для определения тотальной экспрессии, 5'–3'	Праймеры для определения эндогенной экспрессии, 5'–3'	Праймеры для определения экспрессии трансгена, 5'–3'
<i>VaCPK13</i>	5'TAT TCT TCA AGC CAG GTG AGA 5'CCA TAA TTC CGC TTG AGG AC	5'CTT CTA GGC ATT ATT CAA GAG G 5'CTT GTG TGG ATG AAC AAA AGA C	5'CTT CTA GGC ATT ATT CAA GAG G 5'GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG

кДНК амплифицировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 × TaqMan буфер В, 2,5 мМ MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 1 единицу активности Taq ДНК полимеразы, 15 нг кДНК и 0,25 мкМ каждого из праймеров (Синтол, Россия). Амплификацию проводили при следующих условиях: 2 мин при 95°C, затем 50 циклов при 95°C в течение 10 с и 62 °C в течение 25 с.

кДНК амплифицировали с реактивом EvaGreen (Biotium, Хейвард, США). Для амплификации использовали амплификатор с функцией детекции результатов в реальном времени (ДНК Технология, Москва, Россия). Уровень экспрессии генов был определен по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$. Полученное наивысшее значение экспрессии, накопленное отдельным образцом, было принято за единицу относительно количества мРНК. Гены *VaActin1* (ГенБанк DQ517935) и *VaGAPDH* (ГенБанк GU585870) были использованы в качестве внутренних контролей для нормализации количества кДНК в каждой реакции ПЦР РВ. Данные ПЦР РВ были получены из 8 независимых реакций ПЦР РВ [16].

Статистический анализ полученных результатов. Результаты были обработаны при помощи программы Statistica, версия 10.0. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка (СО). Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0,05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

Результаты исследования. Трансгенные по гену *VaCPK13* клеточные культуры КА-15-I, КА-15-II, КА-15-III и КА-15-IV были получены в результате независимых трансформаций суспензионной культуры V2 штаммом *A. tumefaciens* GV3101:pMp90, несущим векторную конструкцию *rZP-RCS2-VaCPK13-nptII*. В конструкции ген *VaCPK13* находится под контролем CaMV 35S промотора вируса мозаики цветной капусты [11]. Конструкция также несет ген устойчивости к Km (*nptII*) под контролем

35S промотора. Сходным способом была получена контрольная клеточная линия КА-0, которая не содержала в конструкции ген *VaCPK13*, а содержала только ген *nptII*.

Селекцию трансгенных клеточных агрегатов проводили в течение 3 месяцев на средах, содержащих 10–15 мг/л Км, и затем отобрали несколько устойчивых к Км линий. В течение первого месяца трансформации мы отобрали быстрорастущие каллусы из отдельных маленьких агрегатов, которые обладали устойчивостью к Км, и несколько Км-устойчивых независимых клональных линий КА-0, КА15-I, II, III, IV. Клеточная линия КА-0 идентична родительской клеточной культуре V2 по ростовым и морфологическим признакам. Это свидетельствует о том, что трансформация пустым вектором не вызвала значительных изменений в клеточных культурах. Клеточная линия КА-0 была использована далее как контрольная в ходе экспериментов. Четыре трансгенные клеточные линии КА15-I, II, III, и IV, активно экспрессирующие ген *VaCPK13*, были получены в результате четырех независимых трансформаций. Данные ПЦР РВ показали, что трансген *VaCPK13* активно экспрессируется во всех полученных клеточных линиях (рис.1, А), а экспрессия эндогенного гена *VaCPK13* в трансгенных клеточных линиях КА15 не отличалась значительно от его экспрессии в контрольной клеточной линии КА-0 (рис.1, Б). Уровень тотальной экспрессии гена *VaCPK13* увеличился в 1,6–4,8 раза по сравнению с контрольной клеточной линией КА-0 (рис.1, В).

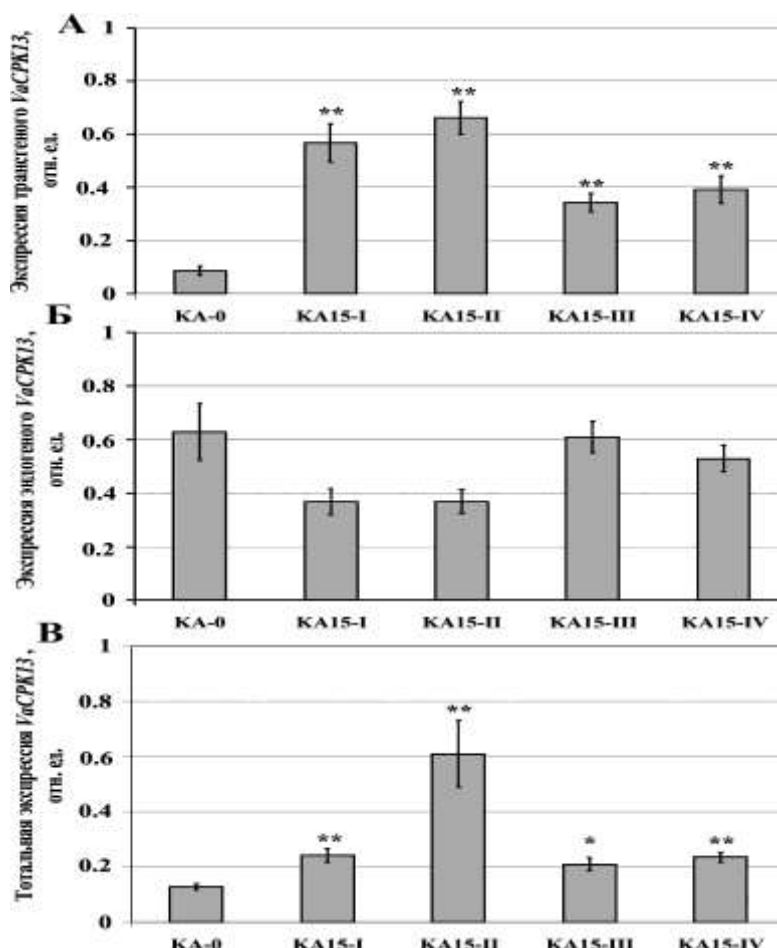


Рис.1. Экспрессия трансгена *VaCPK13* (А), эндогенного *VaCPK13* (Б), суммарная экспрессия эндогенного и экзогенного *VaCPK13* (В) в клеточных линиях *V. amurensis*: КА-0 – контрольная клеточная культура, содержащая ген *nptII* (устойчивость к Км); КА15-I, КА15-II, КА15-III и КА15-IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCPK13*. Данные представлены как среднее значение \pm СО; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ по сравнению с уровнем флуоресценции для КА-0

Мы проанализировали эффект солевого, осмотического, теплового и холодового стрессов на рост четырёх *VaCPK13*-трансгенных клеточных линий *V. amurensis*. Сверхэкспрессия гена *VaCPK13* незначительно увеличила устойчивость одной трансгенной клеточной линии *V. amurensis* (KA15-III) из четырёх к солевому стрессу (рис. 2, А).

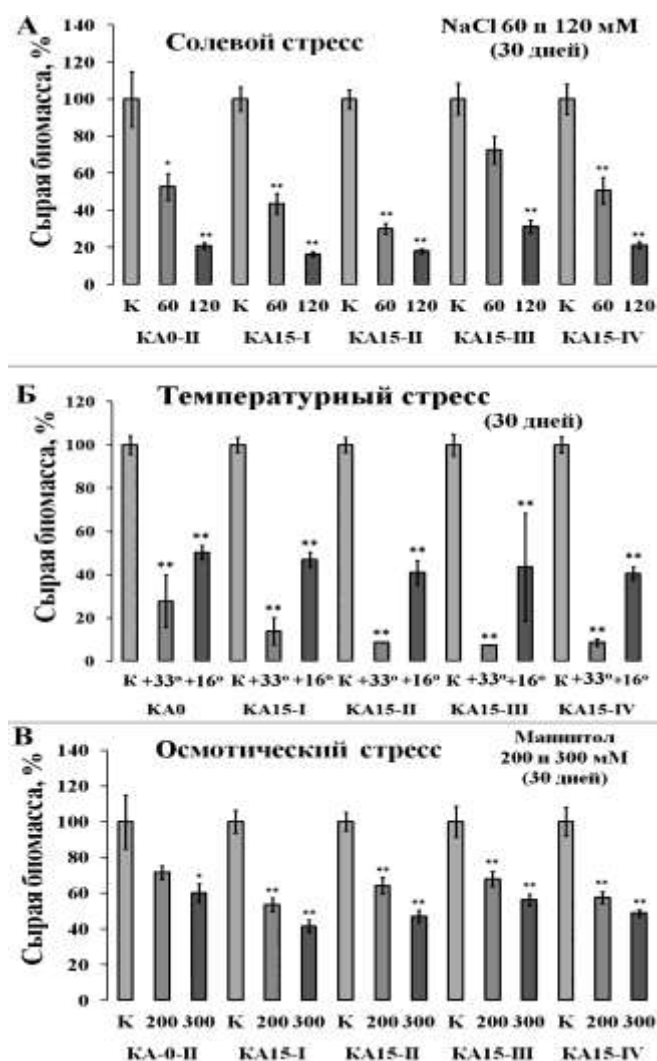


Рис.2. Накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 60 и 120 mM NaCl при культивировании в течение 30 дней (А), теплового (+33° С) и холодового стрессов +16°С при культивировании в течение 30 дней (Б), осмотического стресса, индуцированного маннитолом 200 и 300 mM в течение 30 дней (В): KA-0 – контрольная клеточная культура, содержащая ген *nptII* (устойчивость к Km); KA15-I, KA15-II, KA15-III и KA15-IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCPK13*. Данные представлены как среднее значение \pm CO; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией KA-0

Устойчивость проанализированных трансгенных культур клеток к холодовому стрессу не отличалась от устойчивости контрольной клеточной линии KA-0 (рис. 2, Б). Сверхэкспрессия гена *VaCPK13* ингибировала рост KA15-II и KA15-III трансгенных клеточных линий при действии теплового стресса (рис. 2, Б). Сверхэкспрессия гена *VaCPK13* не вызывала значительных изменений роста клеточных линий при действии маннитола в концентрациях 200 и 300 mM относительно роста контрольной клеточной линии KA-0 (рис. 2, В).

Заключение. В литературе присутствует информация о функциях и свойствах ближайших гомологов *VaCPK13* у других растений (табл. 2). Известно, что ближайший гомолог *VaCPK13* из *Vitis vinifera*, *VvCPK10* активируется в период роста и развития растения [17]. Наибольшая экспрессия гена *OsCPK3* в рисе наблюдалась в меристематических тканях [18]. Известно, что большое количество мРНК генов *OsCPK3* и *OsCPK16* образовывалось в каллусной культуре и в метёлках риса [19]. Также известно, что ген *OsCPK16* является позитивным регулятором ответа риса на засуху и солевой стресс, а ген *OsCPK3* – отрицательным регулятором при солевом воздействии [17]. Стоит отметить, что экспрессия гена *PtCDPK14* из *Populus trichocarpa* увеличивалась при механическом воздействии в листьях и в корневых волосках [20].

Таблица 2

Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей *VaCPK13* (KC488320) с другими известными CDPK растений

Показатель	I, %	S, %
VvCPK10 (VIT_08s0105g00390)	99	99
AtCPK13 (NM115044)	88	94
OsCPK3 (AP004366)	80	87
OsCPK16 (AC108503)	80	88
PtCDPK14 (POPTR_0016s12460)	91	95

Примечание. I – аминокислотная идентичность; S – аминокислотная гомология.

В настоящем исследовании показано, что сверхэкспрессия гена *VaCPK13* значительно не влияет на устойчивость клеток *V. amurensis* к солевому, тепловому, холодовому и осмотическому стрессам. Данные показывают, что ген *VaCPK13* не является сильным позитивным регулятором ответа *V. amurensis* на проанализированные абиотические стрессы (холодовой, тепловой, осмотический и солевой стрессы). Поскольку известно, что экспрессия гена *VaCPK13* значительно возрастала при воздействии холодового стресса [14], можно предположить, что ген *VaCPK13* не влияет на устойчивость растений напрямую как позитивный регулятор, но может участвовать в ответе винограда на холодовой стресс опосредованно либо в небольшой степени.

Литература

1. FAO (Food, Agriculture Organization of the United Nations) // FAO production yearbook. – Rome, FAO. – 2004.
2. Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам / Я.С. Колодяжная, Н.К. Куцонь, Б.А. Левенко [и др.] // Цитология и генетика. – 2009. – Т. 2. – С. 72–93.
3. Al Khatib K., Paulsen G.M. High temperature effects on photosynthetic processes in temperate and tropical cereals // Crop Sci. Soc. Amer. – 1999. – V. 39 – P. 119–125.
4. McAinsh M.R. and Pittman J.K. Shaping the calcium signature // New Phytol. – 2009. – V.181. – P. 275–294.
5. DeFalco T.A., Bender K.W. and Snedden W.A. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signaling // Biochem. J. – 2010. – V. 425. – P.27–40.
6. Медведев С.С. Кальциевая сигнальная система растений. Физиология растений. – 2005. – № 52. – Т. 1. – С. 1–24.

7. Das R., Pandey G.K. Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Curr Genomics*. – 2010. – V. 11. – P. 2–13.
8. Boudsocq M., Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling // *Trends Plant Sci*. – 2013. – V.1. – P. 30–40.
9. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., & Khristenko V.S. Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* // *J. Plant Physiol*. – 2013. – V.170. – P.1491–1500.
10. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., & Bulgakov V.P. Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2009. – V. 82. – P. 647–655.
11. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants // T. Tzfira, G.W. Tian, B. Lacroix [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2005. – V. 57. – P. 503–516.
12. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / K.V. Kiselev, A.S. Dubrovina, M.V. Veselova [et al.] // *J Biotechnol*. – 2007. – V.128. – P. 681–692.
13. Bekesiova I., Nap J., Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* // *Plant Mol Biol Rep*. – 1999. – V. 17. – P. 269–77.
14. Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in CDPK gene expression / A.S. Dubrovina, K.V. Kiselev, M.V. Veselova [et al.] // *J. Plant Physiol*. – 2009. – V.166 – P.1194–206.
15. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression / A. Giulietti, L. Overbergh, D. Valckx [et al.] // *Methods*. – 2001. – V. 25 – P. 386–401.
16. Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, *CDPK3a*, in leaves, stems, grapes, and cell cultures of wild-growing grapevine *Vitis amurensis* Rupr / K.V. Kiselev, A.S. Dubrovina, O.A. Shumakova [et al.] // *Plant Cell Rep*. – 2013. – V. 3. – P. 431–42.
17. The Evolutionary History and Diverse Physiological Roles of the Grapevine Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family / Chen Fei, Fasoli Marianna, Torielli Giovanni Battista [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 12. – P. 808–818.
18. Genome-wide Identification of the Rice Calcium-dependent Protein Kinase and its Closely Related Kinase Gene Families: Comprehensive Analysis of the CDPKs Gene Family in Rice / Asano Takayuki, Tanaka Naoki, Yang Guangxiao [et al.] // *Plant Cell Physiol*. – 2005. – V. 2. – P. 356–366.
19. Expression profile of calcium-dependent protein kinase (CDPKs) genes during the whole lifespan and under phytohormone treatment conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) / Shuifeng Ye, Lei Wang, Weibo Xie [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2009. – V. 70. – P. 311–325.
20. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*) / Ran Zuo, Ruibo Hu, Guohua Chai [et al.] // *Mol Biol Rep*. – 2013. – V. 40. – P. 2645–62.

