

ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ ГЕНА  $\text{Ca}^{2+}$ -ЗАВИСИМОЙ ПРОТЕИНКИНАЗЫ **VaCPK13**  
НА УСТОЙЧИВОСТЬ КУЛЬТУРЫ 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:**  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -DEPENDENT PROTEIN KINASE **VaCPK13**  
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:**  $\text{Ca}^{2+}$ -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 тurgора 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоли сигнализирует об изменениях в окружающей среде через связывание ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с белками-сенсорами  $\text{Ca}^{2+}$ , которые активируют дальнейшие события в сигнальной цепи. Одним из важнейших сенсорных белков в растительной клетке являются  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые протеинкиназы (CDPK). CDPK играют важную роль в поддержании мембранных потенциала, регуляции углеводного и азотного обмена, устойчивых движений и ответа клеток растений на абиотические и биотические стрессы [6]. Известно, что экспрессия генов и активность различных изоформ CDPK могут значительно возрастать 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 Биологического института ДВО РАН.

Для проведения экспериментов на культуре клеток винограда мы использовали  $W_{\text{B/A}}$  агаризованную питательную среду [10] с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2 мг/л а-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 рестрикций 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, сверх-экспрессирующих ген *VaCPK13*. Для этого эксперимент проводили при температуре +23°C, используя среду *W<sub>BA</sub>*, 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'-нетранскрибуемой 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 *pZP-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 B, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мКМ dNTP, 1 единицу активности Таq 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 реагентом 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<sup>-ΔΔCT</sup>. Полученное наивысшее значение экспрессии, накопленное отдельным образом, 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 супензационной культуры V2 штаммом *A. tumefaciens* GV3101:pMp90, несущим векторную конструкцию *pZP-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 KA-0, которая не содержала в конструкции ген *VaCPK13*, а содержала только ген *prtII*.

Селекцию трансгенных клеточных агрегатов проводили в течение 3 месяцев на средах, содержащих 10–15 мг/л Km, и затем отобрали несколько устойчивых к Km линий. В течение первого месяца трансформации мы отобрали быстрорастущие каллусы из отдельных маленьких агрегатов, которые обладали устойчивостью к Km, и несколько Km-устойчивых независимых клonalных линий KA-0, KA15-I, II, III, IV. Клеточная линия KA-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 KA-0 была использована далее как контрольная в ходе экспериментов. Четыре трансгенные клеточные линии KA15-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 KA15 не отличалась значительно от его экспрессии в контрольной клеточной линии KA-0 (рис.1, Б). Уровень тотальной экспрессии гена *VaCPK13* увеличился в 1,6–4,8 раза по сравнению с контрольной клеточной линией KA-0 (рис.1, В).

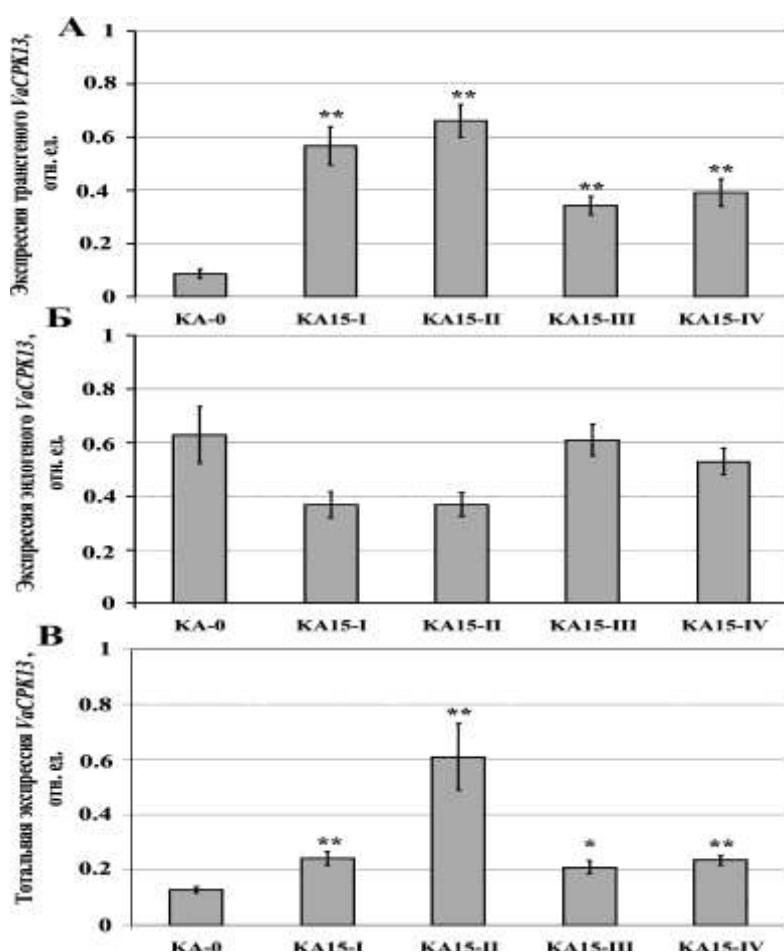


Рис.1. Экспрессия трансгена *VaCPK13* (А), эндогенного *VaCPK13* (Б), суммарная экспрессия эндогенного и экзогенного *VaCPK13* (В) в клеточных линиях *V. amurensis*: KA-0 – контрольная клеточная культура, содержащая ген *prtII* (устойчивость к Km); KA15-I, KA15-II, KA15-III и KA15-IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCPK13*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  СО; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  по сравнению с уровнем флюоресценции для KA-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).

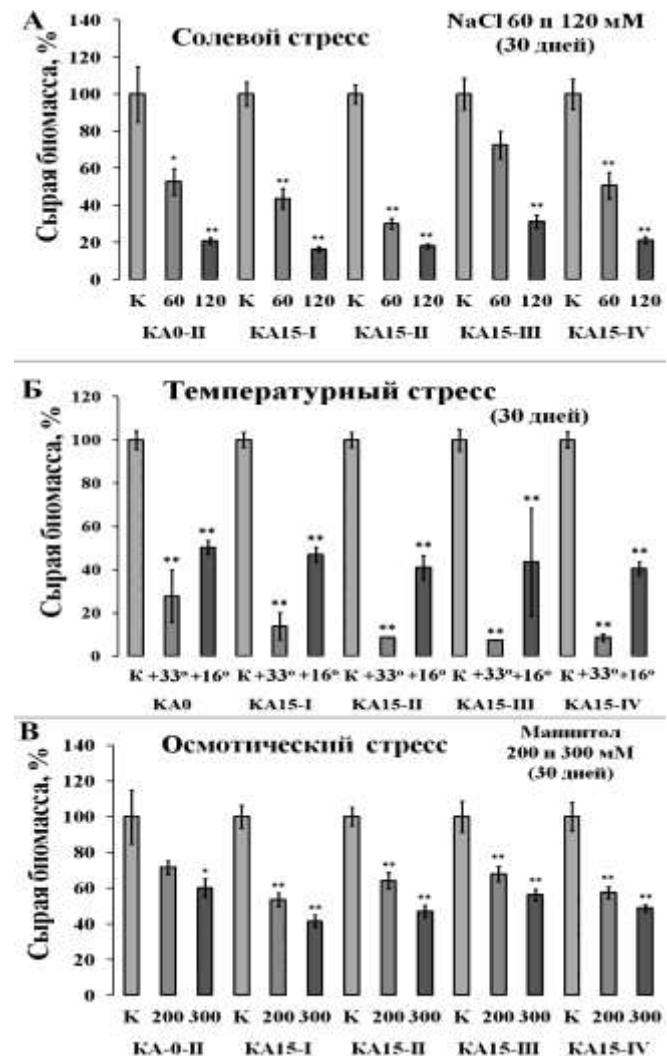


Рис.2. Накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 60 и 120 мМ NaCl при культивировании в течение 30 дней (А), теплового ( $+33^{\circ}\text{C}$ ) и холодового стрессов  $+16^{\circ}\text{C}$  при культивировании в течение 30 дней (Б), осмотического стресса, индуцированного маннитолом 200 и 300 мМ 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  $\pm$  СО; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$  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 мМ 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, %
<i>VvCPK10</i> (VIT_08s0105g00390)	99	99
<i>AtCPK13</i> (NM115044)	88	94
<i>OsCPK3</i> (AP004366)	80	87
<i>OsCPK16</i> (AC108503)	80	88
<i>PtCDPK14</i> (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 возрас- тала 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. Куцоконь, 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:  $\text{Ca}^{2+}$  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., M.lynarova 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, Tornielli 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.

