

На правах рукописи

ХРИСТЕНКО ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА

**РОЛЬ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНАЗ *VaCDPK13*,
VaCDPK20, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* В УСТОЙЧИВОСТИ
ВИНОГРАДА *VITIS AMURENSIS* RUPR. К АБИОТИЧЕСКИМ
СТРЕССАМ**

03.01.06 – биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



ВЛАДИВОСТОК – 2018

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, Киселев Константин Вадимович

Официальные оппоненты:

Ашапкин Василий Васильевич,

доктор биологических наук, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБУН ВО МГУ им. Ломоносова, старший научный сотрудник отдела молекулярных основ онтогенеза.

Кипрюшина Юлия Олеговна,

кандидат биологических наук, ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» ДВО РАН, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий.

Ведущая организация: ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа.

Защита состоится «5» июня 2018 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 999.204.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159.

Факс: (423) 2310-193. E-mail: info@biosoil.ru

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными подписями просим направлять по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159 ученому секретарю диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке ДВО РАН и на сайте «Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН: <http://www.biosoil.ru/>
Автореферат разослан «3» апреля 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



А. П. Тюнин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Воздействие на растения таких абиотических стрессовых факторов, как засуха, повышенная соленость почвы, затопление или неблагоприятные температуры, снижает урожайность и продуктивность сельскохозяйственных культур, что приводит к многомиллионным потерям в сельском хозяйстве (Колодяжная и др., 2009; Gao et al., 2007; Witcombe et al., 2008). Например, около 21% земель, используемых в сельском хозяйстве, засолены в значительной степени (Ghassemi et al., 1995), что является проблемой пустынных и полупустынных районов. Ионы натрия и калия в высоких концентрациях способны снижать активность ферментов и приводить к нарушениям таких функций, как клеточное деление, ассимиляция углерода и др. (Алехина и др., 2005). 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 (Колодяжная и др., 2009). Кроме того, глобальное потепление и высокие температуры в отдельных районах негативно влияют на растения и наносят значительный урон мировому сельскому хозяйству. Воздействие критических температур снижает всхожесть семян и интенсивность фотосинтеза главным образом из-за повреждения компонентов фотосистемы II, локализованной в мембранах тилакоидов хлоропластов (Алехина и др., 2005). Кроме того, при температурном стрессе уменьшается скорость поглощения углекислого газа, и происходят нарушения мембранного транспорта (Колодяжная и др., 2009).

Изучение молекулярно-генетических механизмов ответа растений на неблагоприятные условия окружающей среды поможет понять, как растения справляются со стрессом. Приобретение растениями устойчивости к абиотическому стрессу проявляется 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 (DeFalco et al., 2010). Известно, что увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоли сигнализирует об изменениях в окружающей среде через связывание 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). Известно, что экспрессия генов и активность различных изоформ CDPK могут значительно возрасти в ответ на воздействие абиотических стрессов (Das and Pandey, 2010). Кроме того, некоторые

из идентифицированных белков-мишеней CDPK участвуют в защитном ответе клеток растений на абиотический стресс (Boudsocq et al., 2013).

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.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы – изучение роли генов *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* в устойчивости дикорастущего винограда *V. amurensis* к абиотическим стрессам.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить трансгенные каллусные клеточные линии *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие гены *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29*, и изучить их устойчивость к температурному, осмотическому и солевому стрессам.

2. Получить трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, сверхэкспрессирующие гены *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29*, и изучить их устойчивость к засухе, температурному и солевому стрессам.

3. Изучить экспрессию ключевых стресс-индуцируемых генов, являющихся маркерами активации различных сигнальных путей ответа растения на абиотические стрессы, в полученных *VaCDPK*-трансгенных растениях *A. thaliana*.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Впервые изучено влияние генов *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* кальций-зависимых протеинкиназ на устойчивость клеточных линий *V. amurensis* и растений *A. thaliana* к абиотическим стрессам.

2. Каллусные клеточные линии *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие гены *CDPK*, обладали устойчивостью к температурному, осмотическому и солевому стрессам. Клеточные линии *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20*, обладали повышенной устойчивостью к холодному стрессу, в то время как клеточные линии *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21*, были устойчивы к солевому стрессу. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK26* придавала устойчивость трансгенным клеточным линиям *V. amurensis* к солевому стрессу. Клеточные линии *V. amurensis*, трансгенные по гену *VaCDPK29*, были устойчивы к осмотическому стрессу. Полученные трансгенные клеточные линии *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK13*, не были устойчивы к исследуемым абиотическим стрессам.

3. Сверхэкспрессия генов *CDPK* увеличивает устойчивость растений *A. thaliana* к абиотическим стрессам. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK20* повышала устойчивость растений к холодovому стрессу и засухе, в то время как сверхэкспрессия гена *VaCDPK21* повышала выживаемость растений *A. thaliana* при солевом стрессе. Полученные *VaCDPK26*-трансгенные линии растений *A. thaliana* показывали достоверную устойчивость к солевому стрессу и засухе. Сверхэкспрессия *VaCDPK29* повышала устойчивость растений *A. thaliana* в условиях высоких температур и осмотического стресса.

4. Наблюдаемая устойчивость у трансгенных растений *A. thaliana* коррелировала с увеличением экспрессии ряда ключевых стресс-индуцируемых генов, являющихся маркерами активации различных сигнальных путей ответа растения на абиотические стрессы.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые показано, что сверхэкспрессия некоторых генов *CDPK* (*VaCDPK20*, *21*, *26* и *29*) в клетках *V. amurensis* и в растениях *A. thaliana* достоверно увеличивает устойчивость к абиотическим стрессам, что напрямую указывает на участие основных белковых сенсоров кальция в адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Полученные результаты могут быть использованы биотехнологическими компаниями для создания генетических конструкций и методических подходов для создания растений устойчивых к абиотическим стрессам. Также результаты диссертационной работы можно использовать для проведения теоретических и практических занятий в университете на биологических факультетах.

Апробация работы и публикации. Результаты работы представлены на I Межрегиональной молодежной школе-конференции «Актуальные проблемы биологических наук» (Владивосток, 2013); в материалах VIII Международной конференции молодых ученых «Биология: от молекулы до биосферы» (Харьков, 2013); на XI Международной конференции по генетике винограда (Пекин, 2014); Международной научно-практической конференции молодых учёных «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 2014); в материалах Международной научной конференции и школе молодых учёных (Годичное собрание ОФР 2014) «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 2014); в материалах 3-ей Международной конференции "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений" PlantGen 2015 (Новосибирск, 2015); на Всероссийской научной конференции и школе для молодых ученых, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» (Москва, 2015) .

Материалы диссертации изложены в 11 публикациях, из них 5 в журналах из списка ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 100 странице, иллюстрирована 24 рисунками и содержит 9 таблиц. Список литературы насчитывает 144 наименования.

Благодарности. Автор искренне благодарит научного руководителя к.б.н. Киселева К.В. за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах работы. Также автор выражает глубокую признательность сотрудникам лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН за поддержку на всех этапах работы. Данная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (12-04-33069-мол_вед), РНФ (14-14-00366) и ДВО РАН (12-III-B-06-053).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для получения трансгенных растений использовали *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia. Каллусная культура V2 была получена в 2002 году из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis*, которое было собрано на юге 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 (Kiselev et al., 2009) 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 24 \pm 1°C.

Получение трансгенных каллусных клеточных линий клеток *V. amurensis* и трансгенных растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK*, с помощью агробактериальной трансформации. Бинарные векторы, несущие в своей последовательности полноразмерные транскрипты *VaCDPK13*, *20*, *21*, *26*, *29* были получены по методике описанной в работе Aleynova-Shumakova et al., 2014. Культуру клеток *V. amurensis* трансформировали полученными штаммами агробактерий, несущими тот или иной бинарный вектор, по методике описанной ранее (Kiselev et al., 2007). После трансформации каллусы культивировали в течение 5 месяцев в присутствии 250 мг/л цефотаксима для подавления роста агробактерий. Отбор трансгенных клеток проводили при помощи селекции на канамицине (15-20 мг/л) в течение 3 месяцев.

Растения арабидопсиса трансформировали полученными штаммами агробактерий, несущими тот или иной бинарный вектор, методом цветочного погружения (Zhang et al., 2006b).

Проверка трансгенности полученных клеточных линий *V. amurensis* и растений *A. thaliana*. Трансгенность полученных линий была доказана по

наличие вставки гена *nptII* с помощью праймеров 5'-GAG GCT ATT CGG СТА TGA CTG и 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA по условиям, описанным ранее (Kiselev et al., 2007). Отсутствие сигнала после ПЦР на ген *virB2* служило доказательством того, что агробактерий не было в анализируемых пробах. Для количественного анализа экспрессии генов *VaCDPK* проводили метод ПЦР РВ с использованием SYBR® Green (Giulietti et al., 2001). Тотальную экспрессию *VaCDPK* (суммарную экспрессию внутриклеточного и дополнительной вставки гена) определяли с помощью пары праймеров, подобранных к последовательности киназного домена *VaCDPK*. Эндогенную или внутриклеточную экспрессию определяли используя пару праймеров, комплементарных к концу последовательности киназного домена и к последовательности 3' нетранскрибируемой области (3'UTR) известной кДНК гена. Экспрессию дополнительной вставки гена *VaCDPK* определяли используя пару праймеров, подобранных к концу белок-кодирующей последовательности гена *VaCDPK* и к последовательности CaMV 35S терминатора, находящейся в бинарной конструкции *pZP-RCS2-nptII-VaCDPK*. Для проверки трансгенности растений мы выделяли ДНК *A. thaliana* (Kiselev et al., 2015) и проводили ПЦР, используя специфичные праймеры для амплификации участка генов *VaCDPK20, 21, 26* и *29* (Dubrovina et al., 2015).

Воздействие абиотических стрессов на каллусные клеточные линии *V. amurensis* и на растения *A. thaliana*. Для изучения влияния холодого и теплового стрессов клеточные линии культивировали на средах W_{B/A} (Kiselev et al., 2011), при температурах +16°C и +33°C. Для изучения влияния солевого стресса в питательные среды добавляли NaCl в концентрациях 60 и 120 мМ. Осмотический стресс индуцировали, добавляя в среду маннитол в концентрациях 200 и 300 мМ.

Для изучения устойчивости трансгенных растений *A. thaliana* к абиотическим стрессовым воздействиям растения выращивали в горшках в климатических камерах при температуре +22°C, 16 часов день/8 часов ночь, освещенности ~120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Семена арабидопсиса проращивали на твердой среде W0 с уменьшенным содержанием макро- и микросолей в 2 раза и канамицином 50 мкг/мл. (Kiselev et al., 2009). На 7 день проростки переносили в грунт и помещали в климатические камеры для доращивания на 3 недели.

Солевой стресс индуцировали с помощью пропитки почвы раствором NaCl в концентрации 350 мМ в течение 4 часов (до полного промокания). Затем обработанные солевым раствором растения культивировали в стандартных условиях. Через одну неделю горшки отстаивали в воде для вымывания соли из почвы. После семи дней проводился подсчет выживших растений. Тепловой стресс индуцировали при +45°C в течение 3.5 часов в термостате. Холодовой

стресс был индуцирован температурой -10°C в морозильной камере в течение 1.5 часов, затем переносили на $+4^{\circ}\text{C}$ на 15 минут. После эксперимента растения в течение недели культивировали в стандартных условиях и подсчитывали выживаемость. Для имитации засухи растения не поливали 5 недель. Эффект воздействия тестируемых абиотических стрессовых факторов определяли путем подсчета живых растений через 7 дней после воздействия стрессовых условий. На один эксперимент приходилось по два горшка каждой линии с 10 растениями в каждом горшке. Эксперименты проводились по шесть раз для каждого стресса.

Количественная оценка экспрессии генов. Для количественного анализа экспрессии генов *CDPK* и стресс-маркерных генов проводили ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) с использованием Taq-man и SYBR® Green. Подробные условия проведения реакций описаны в работах Dubrovina et al., 2015 и 2017.

Статистический анализ полученных результатов. Все данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка (С.О.). Значимость различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для всех тестов был выбран уровень значимости 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Устойчивость *VaCDPK*-трансгенных клеточных линий *V. amurensis* к абиотическим стрессам. На рис. 1А представлены данные по накоплению сырой биомассы *VaCDPK13*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях выращивания в течение 30 дней. Все трансгенные клеточные линии КА0, КА15-I, II, III и IV накапливали биомассу примерно на одном уровне. Следовательно, сверхэкспрессия гена *VaCDPK13* не влияла на рост клеток в культуре винограда в стандартных условиях культивирования. При солевом стрессе накопление биомассы клеточными линиями КА15 было сопоставимо с накоплением биомассы контрольной клеточной линии КА0 (рис. 1Б). Рост большинства *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий при высоких концентрациях маннитола было достоверно ниже накопления биомассы КА0 (рис. 1В). Устойчивость большинства проанализированных *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий к температурным стрессам не отличалась от устойчивости КА0 (рис. 1Г).

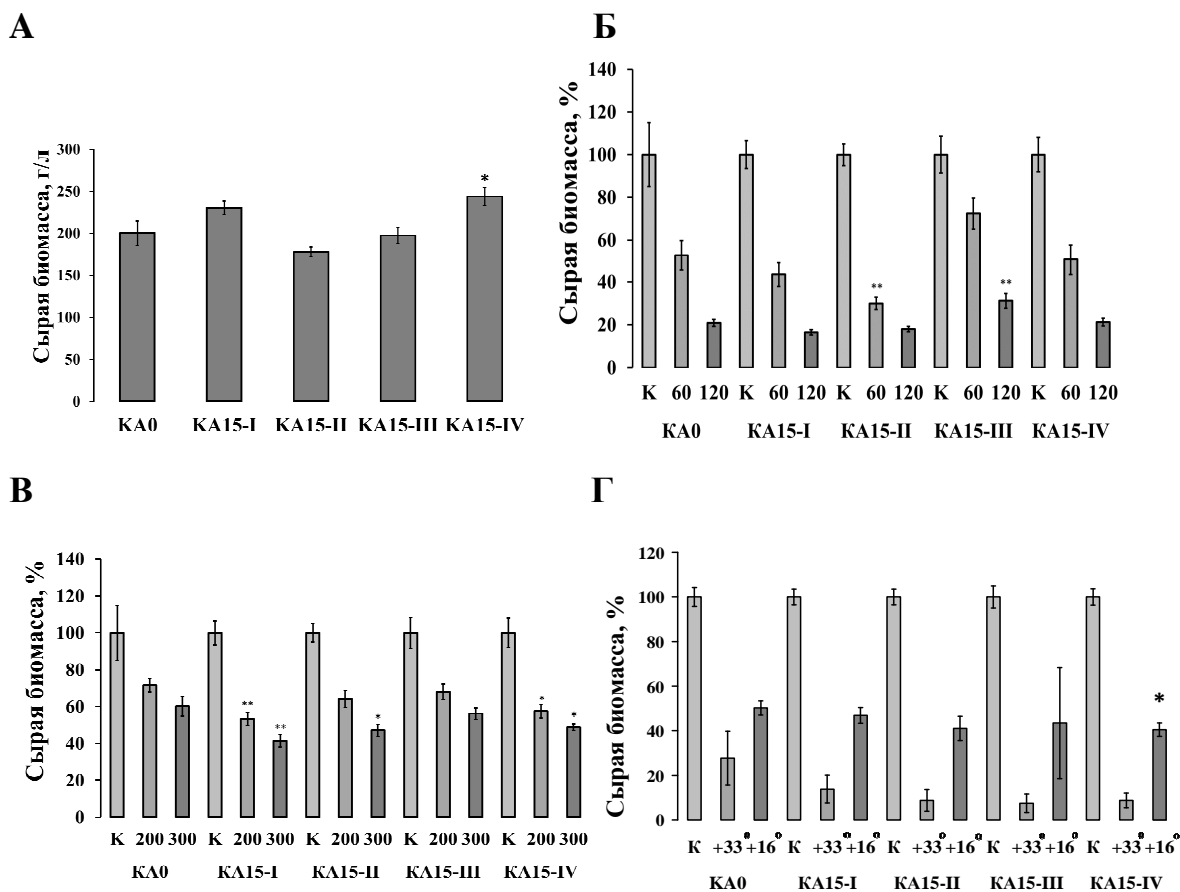


Рис. 1. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK13* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. А – рост *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 60 и 120 мМ NaCl; В – осмотического стресса, индуцированного 200 и 300 мМ маннитола; Г – холодового и теплового стресса, индуцированного культивированием при +16°C и +33°C; KA0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; KA15-I, II, III, IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK13*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией KA0, культивируемой в соответствующих условиях.

На рис. 2А представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK20*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях культивирования. Все трансгенные клеточные линии KA0, KA09-I, II, III, IV и V накапливали биомассу примерно на одном уровне. При низкотемпературном стрессе большинство трансгенных клеточных линий KA09 накапливали биомассу более активно по сравнению с KA0 (рис. 2Б). Результаты эксперимента по

воздействию теплового стресса показали, что рост культур КА09-II, III, IV и V значительно ингибировался, в то время как рост КА09-I был статистически не отличим от роста контрольной культуры КА0 (рис. 2В). Исследования по устойчивости *VaCDPK20*-трансгенных клеточных линий к солевому стрессу показали ингибирование роста на одном уровне с контролем для большинства линий (4 из 5 при 50 мМ и 3 из 5 при 100 мМ NaCl) (рис. 9Г).

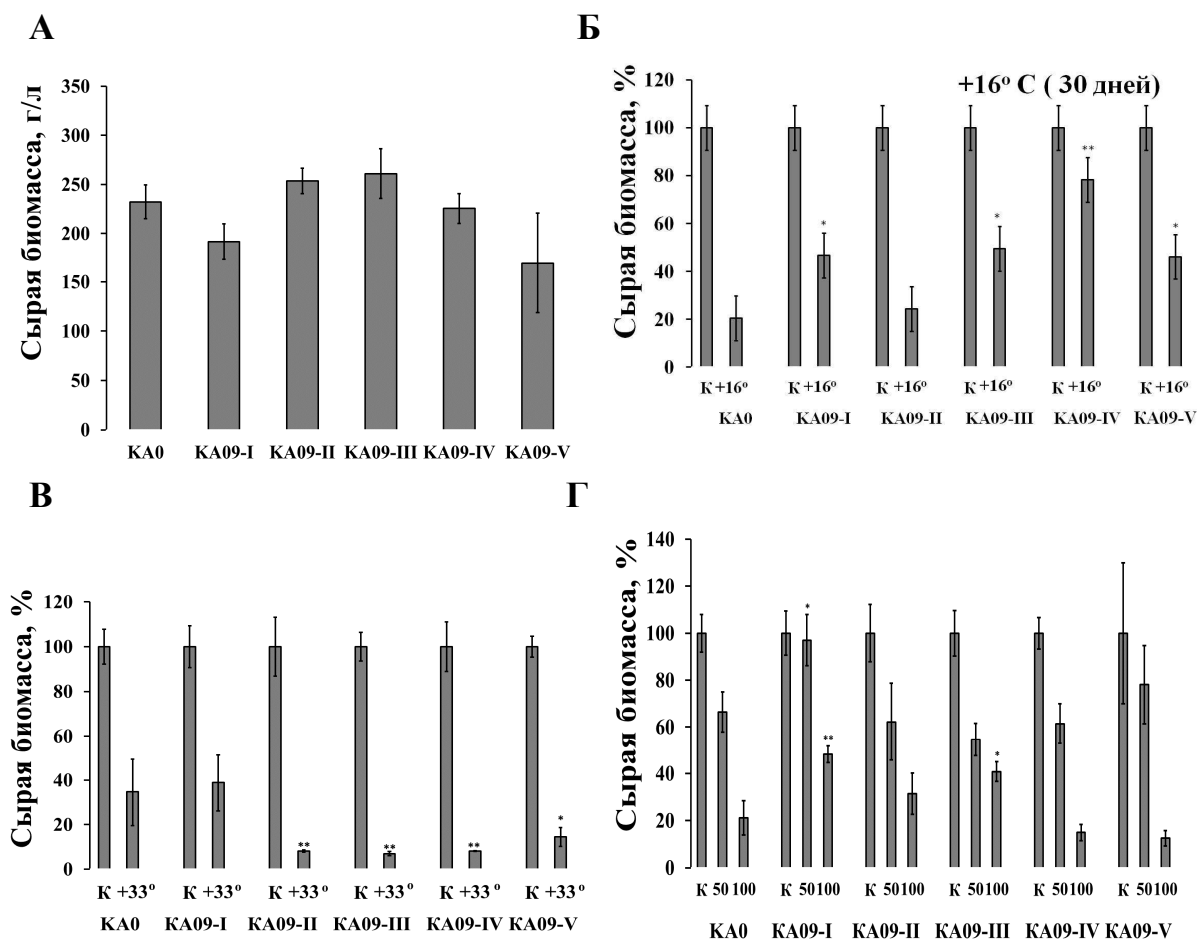


Рис. 2. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK20* на рост клеточных линий *V. aturensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. Рост *VaCDPK20*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях (А). Накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием холодового (Б) и теплового стресса (В), индуцированного культивированием при +16°C и +33°C; солевого стресса, индуцированного 50 и 100 мМ NaCl (Г). КА0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; КА09-I, II, III, IV, V – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20*. Данные представлены как среднее значение ± С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией КА0, культивируемой в соответствующих условиях.

На рис. 3А представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK21*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях культивирования. Рост большинства полученных трансгенных клеточных линий (КА0, КА07-I, II, III, IV и V) статистически не отличался от контрольной линии КА0. В ходе проведенных экспериментов оказалось, что трансгенные клеточные линии КА07 накапливали биомассу более активно при использовании одной или двух концентраций NaCl по сравнению с накоплением биомассы линией КА0 (рис. 3Б). Таким образом, рост большинства клеточных линий, сверхэкспрессирующих *VaCDPK21*, был более активен под влиянием солевого стресса, по сравнению с ростом контрольной клеточной линии КА0. Полученные результаты показывают, что сверхэкспрессия гена *VaCDPK21* имеет позитивный эффект на рост трансгенных клеточных линий под действием солевого стресса. При температурных стрессах рост большинства клеточных линий КА07, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, был сопоставим с ростом КА0 (рис. 3 В, Г).

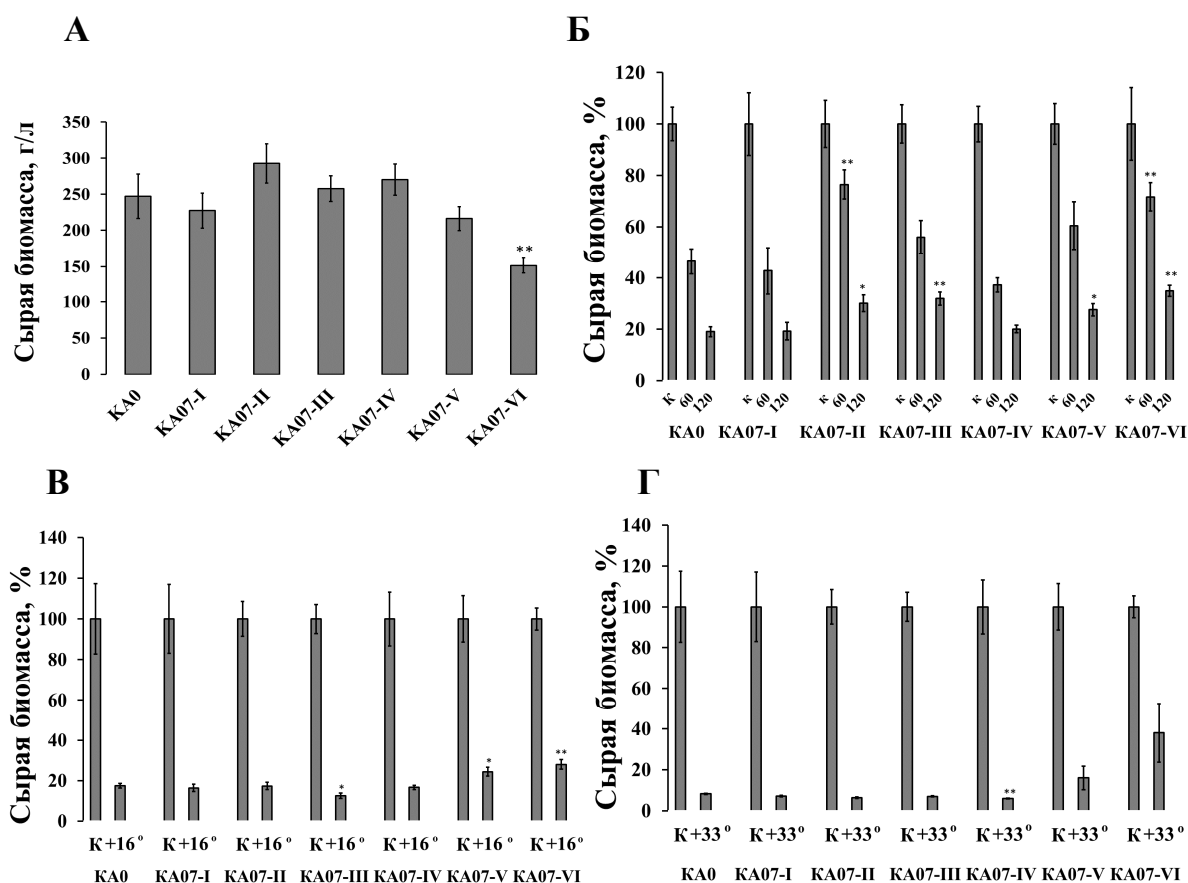
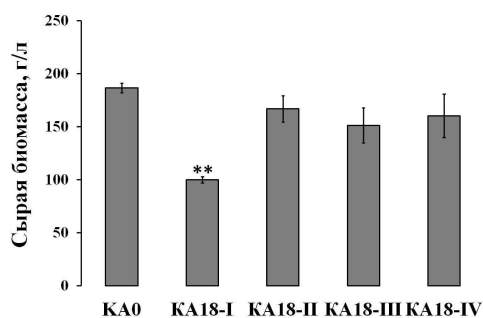


Рис. 3. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK21* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. А – рост *VaCDPK21*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 60 и 120 мМ NaCl; В –

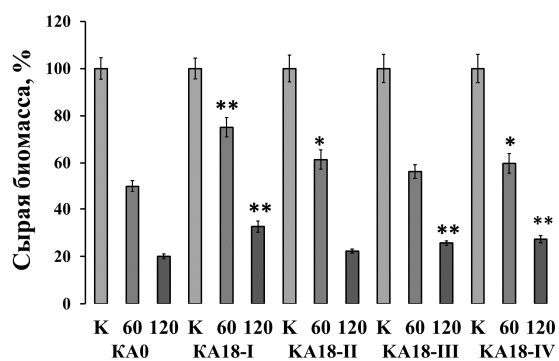
холодового и Г – теплового стресса, индуцированного культивированием при +16°C и +33°C; КА0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; КА07 - I, II, III, IV, V, VI – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21*. Данные представлены как среднее значение ± С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией КА0, культивируемой в соответствующих условиях.

На рис. 4А представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK26*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях культивирования. Большинство трансгенных клеточных линий КА18 накапливали биомассу на одном уровне к 30 дню по сравнению с КА0. По аналогии с предыдущими генами мы исследовали устойчивость полученных *VaCDPK26*-трансгенных клеточных линий *V. amurensis* при солевом стрессе (рис. 4Б). В соответствии с проведенными экспериментами рост большинства линий, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*, был достоверно выше относительно роста КА0, как при 60 мМ NaCl, так при 120 мМ NaCl. Эксперименты по индукции теплового стресса показали, что рост большинства клеточных линий КА18 ингибировался (рис. 4Г). При осмотическом и холодном стрессе накопление сырой биомассы у большинства трансгенных клеточных линий КА18 достоверно не отличалось от биомассы контроля (рис. 4В, Д).

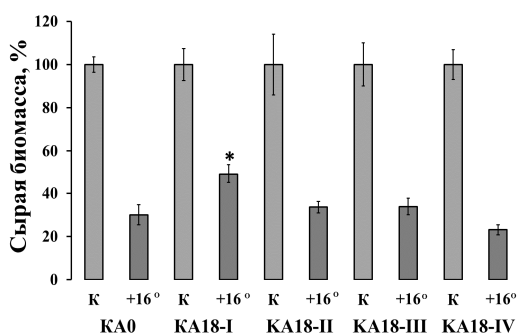
А



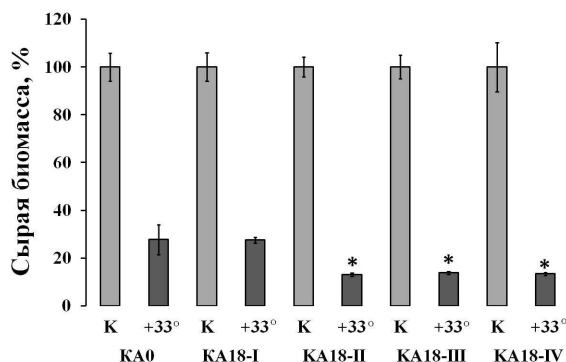
Б



В



Г



Д

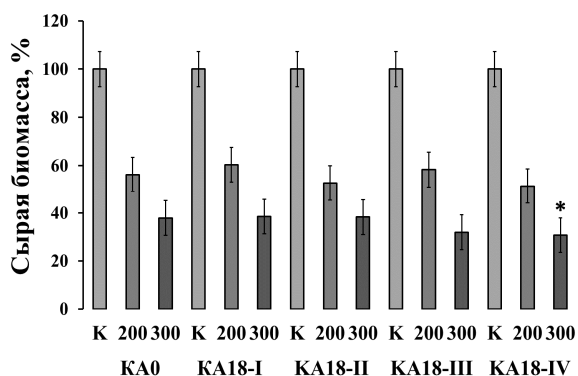


Рис. 4. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK26* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. А – рост *VaCDPK26*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 60 и 120 мМ NaCl; В – холодового и Г – теплового стресса, индуцированного культивированием при +16°C и +33°C; Д – осмотического стресса, индуцированного 200 и 300 мМ маннитола; KA0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; KA18-I, II, III, IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией KA0, культивируемой в соответствующих условиях.

На рис. 5А представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK29*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях культивирования. Накопление биомассы трансгенными клеточными линиями KA0, KA10-I, II, III и IV значительно не отличалось. Анализ влияния солевого и холодового стресса на рост *VaCDPK29*-трансгенных клеточных линий показал, что рост трансгенных клеточных линий был сопоставим с ростом KA0 (рис. 5Б,В). Половина трансгенных линий KA10 оказались устойчивы к тепловому стрессу в сравнении с KA0 (рис. 5Г). Также накопление сырой биомассы большинства линий KA10 при различных концентрациях маннитола было достоверно выше биомассы KA0 (рис. 12Д). Вышеизложенное дает основание полагать, что *VaCDPK29*-трансгенные клеточные линии устойчивы к добавлению маннитола в сравнении с KA0.

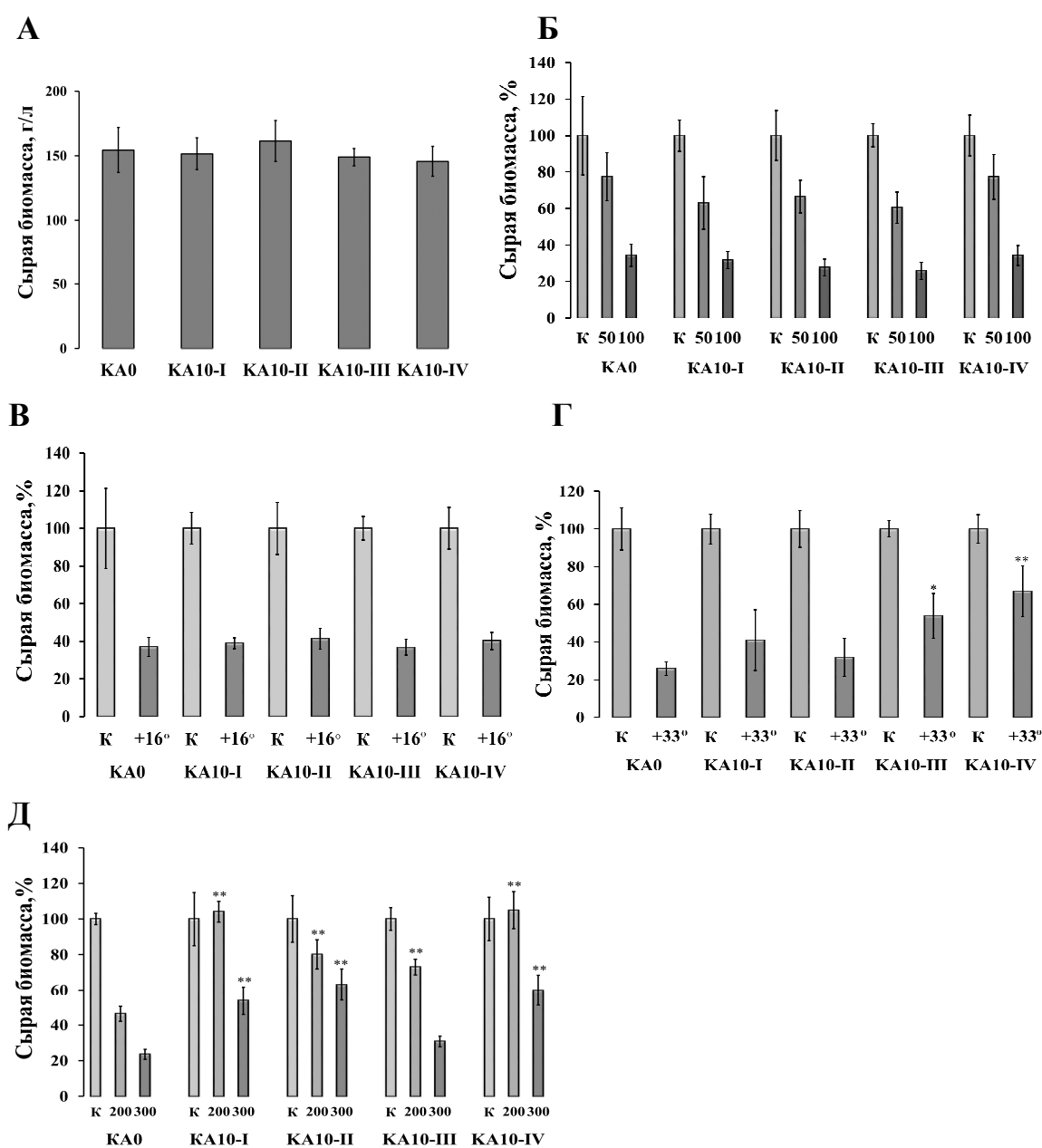


Рис. 5. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK29* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. А – рост *VaCDPK29*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 50 и 100 мМ NaCl; В – холодового и Г – теплового стресса, индуцированного культивированием при +16°C и +33°C; Д – осмотического стресса, индуцированного 200 и 300 мМ маннитола; KA0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *prtII*; KA10-I, II, III, IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29*. Данные представлены как среднее

значение \pm С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией КА0, культивируемой в соответствующих условиях.

Таким образом, сверхэкспрессия генов *VaCDPK13*, *20*, *21*, *26* и *29* существенно не влияла на накопление биомассы клеточными линиями винограда в контрольных условиях. Анализ накопления биомассы показал, что сверхэкспрессия генов *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29* повышала устойчивость большинства трансформированных клеточных линий к холодovому (*VaCDPK20*), солевому (*VaCDPK21* и *VaCDPK26*), тепловому (*VaCDPK29*) и осмотическому стрессам (*VaCDPK29*).

Устойчивость *VaCDPK*-трансгенных растений *A. thaliana* к абиотическим стрессам. После получения трансгенных гомозиготных линий *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29*, мы изучили влияние сверхэкспрессии генов *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29* на устойчивость трансгенных растений к различным абиотическим стрессовым факторам (солевой стресс, высокие и низкие температуры, водный дефицит и засуха).

Результаты проведенных экспериментов при солевом стрессе показали, что выживаемость всех линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, была выше выживаемости КА0 (рис. 6Б). Установлено, что выживаемость большинства трансгенных линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*, была достоверно выше выживаемости КА0 в условиях солевого стресса (рис. 6В). Выживаемость трансгенных линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20* (рис. 6А) и *VaCDPK29* (рис. 6Г) была сопоставима с выживаемостью КА0. Выживаемость при дефиците воды всех линий, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* и *VaCDPK26*, была выше по сравнению с КА0 (рис. 6Д, Ж), в то время как выживаемость большинства линий, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK29* и *VaCDPK21*, была на одном уровне с выживаемостью КА0 (рис. 6Е, З).

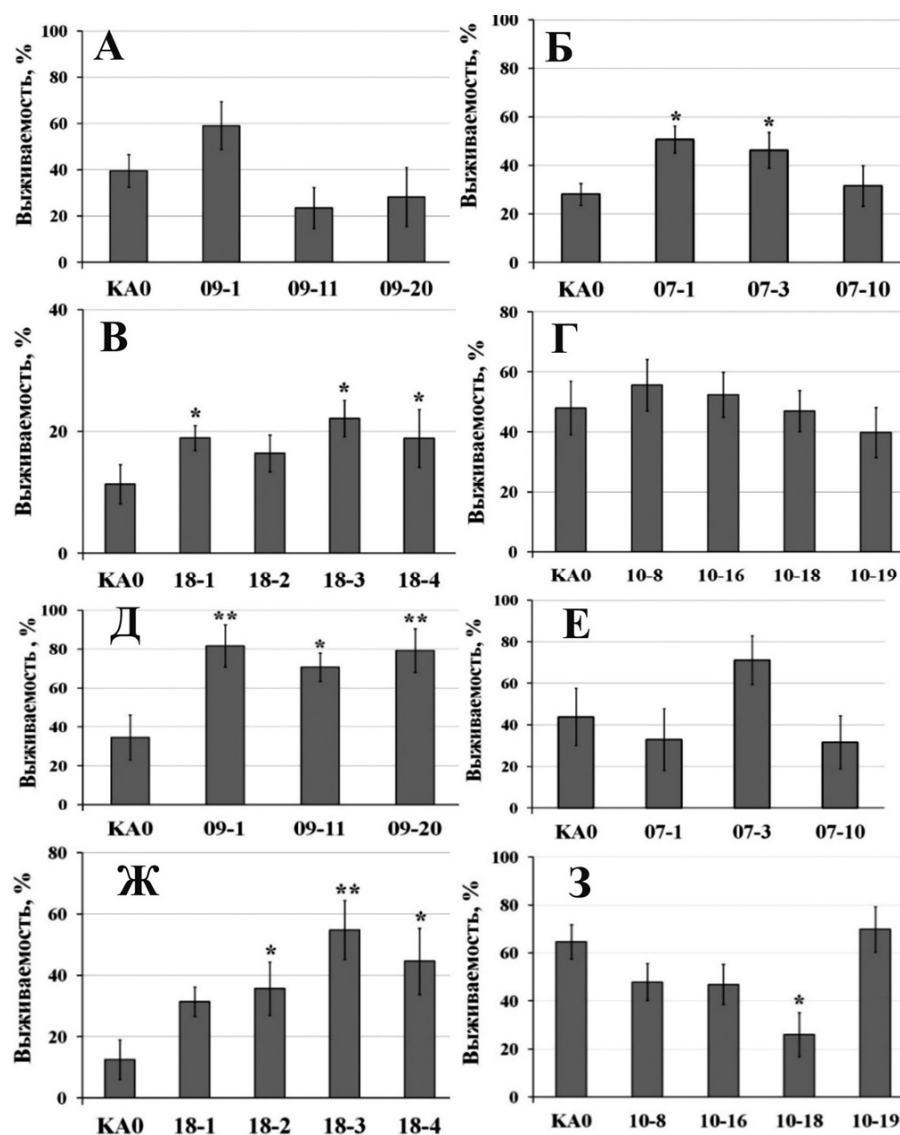


Рис. 6. Влияние солевого (А-Г) стресса и дефицита воды (Д-З) на выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (А, Д), *VaCDPK21* (Б, Е), *VaCDPK26* (В, Ж) и *VaCDPK29* (Г, З) соответственно. КА0 – контрольная линия растений; 09-1, 09-11, 09-20 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20* и *nptII*; 07-1, 07-3, 07-10 – сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21* и *nptII*; 18-1, 18-2, 18-3, 18-4 – сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26* и *nptII*; 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 – сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с КА0.

Данные показали, что при холодном стрессе выживаемость большинства линий арабидопсиса, трансгенных по гену *VaCDPK20*, была выше относительно выживаемости КА0 (рис. 7А). Результаты проведенных экспериментов показали, что выживаемость линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* статистически не отличалась от выживаемости КА0 при низкотемпературном стрессе (рис. 7Б–Г). Результаты проведенных экспериментов

по влиянию теплового стресса показали, что выживаемость большинства линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20*, *VaCDPK21* и *VaCDPK26*, была сопоставима с выживаемостью контроля КА0 (рис. 7Д–Ж). Выживаемость всех линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих *VaCDPK29*, была выше выживаемости КА0 (рис. 7З).

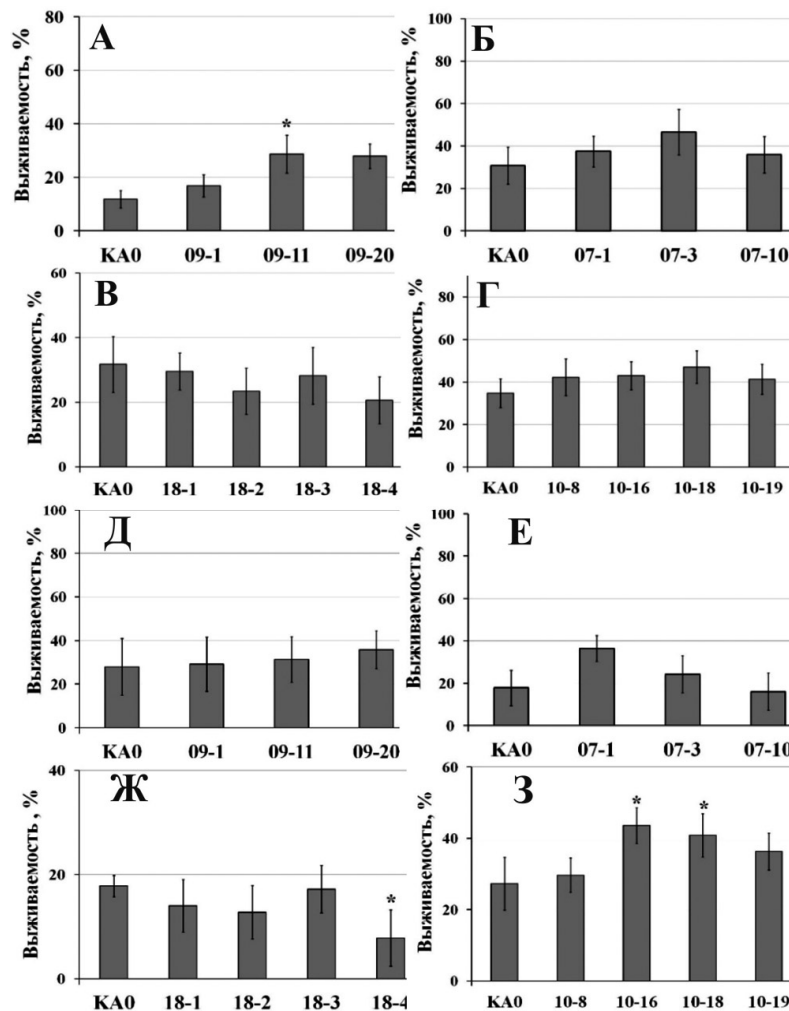


Рис. 7. Влияние холодового (А-Г) и теплового (Д-З) стресса на выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (А, Д), *VaCDPK21* (Б, Е), *VaCDPK26* (В, Ж) и *VaCDPK29* (Г, З) соответственно. КА0 – контрольная линия растений; 09-1, 09-11, 09-20 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20* и *nptII*; 07-1, 07-3, 07-10 – сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21* и *nptII*; 18-1, 18-2, 18-3, 18-4 – сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26* и *nptII*; 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 – сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с КА0.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы у растений представлены мультигенными семействами. Так, у культурного винограда *V. vinifera* описано около 20 генов *CDPK* (Zhang et al., 2015). Ранее нами было описано 13 генов *CDPK* у винограда

амурского (Dubrovina et al., 2013). Для дальнейших исследований были выбраны пять генов *CDPK V. amurensis* (*VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29), поскольку экспрессия этих генов *CDPK* значительно изменялась при различных абиотических стрессах, что показало возможность участия в формировании устойчивости винограда к абиотическим стрессам. Анализ экспрессии генов показал, что экспрессия *VaCDPK13* в лиане винограда значительно увеличивалась при холодовом стрессе, экспрессия *VaCDPK20* возрастала при высокой и низкой температуре, а экспрессия гена *VaCDPK21* – при действии солевого стресса и, в меньшей степени, при действии маннитола и высоких температур. Экспрессия гена *VaCDPK26* увеличивалась при солевом воздействии и при холодовом стрессе, в то время как экспрессия *VaCDPK29* возрастала при высоких концентрациях маннитола, водном дефиците и при температурных стрессах (Dubrovina et al., 2013).

В данной работе нами были получены *CDPK*-трансгенные клеточные линии винограда *V. amurensis* для исследований влияния сверхэкспрессии генов *CDPK* на устойчивость к абиотическим стрессам. В случае если эксперименты на культурах клеток *in vitro* подтверждали результаты, полученные ранее на лианах винограда, то далее мы получали *CDPK*-трансгенные растения *A. thaliana* и исследовали устойчивость полученных растений к абиотическим стрессам. На основе описанного подхода нами было показано, что сверхэкспрессия гена *VaCDPK20* повышала устойчивость клеточных линий *V. amurensis* к холодовому стрессу и увеличивала выживаемость растений *A. thaliana* под действием холодового стресса и дефицита воды. Полученные данные свидетельствуют о том, что ген *VaCDPK20* вовлечен в сигнальные пути, связанные с устойчивостью винограда амурского к холодовому стрессу, как позитивный регулятор. Анализ гомологии аминокислотных последовательностей показал высокую идентичность между *VaCDPK20* и *CDPK* других однодольных и двудольных растений, таких как *AtCDPK1*, *AtCDPK2*, *AtCDPK20*, *OsCDPK27*, *PtCDPK2*, *PtCDPK16*, *PtCDPK17*, *VvCDPK8*. В контрольных условиях сверхэкспрессия гена *VaCDPK20* изменяла экспрессию некоторых стресс-индуцируемых генов в растениях арабидопсиса (*AtNHX1*, *AtABF3*, *AtKIN1*, *AtRD29B* и *AtCOR47*), участвующих в ответе растений на засуху, солевой и температурные стрессы. Холодовой стресс индуцировал экспрессию генов *AtLEA*, *AtCOR47*, *AtNHX1*, *AtSOS1*, *AtKIN1*, *AtCSD1*, *AtRD29A* и *AtABF3* в *VaCDPK20*-трансгенных растениях в большей степени, чем в контроле. Высокий уровень транскрипции этих стресс-индуцируемых генов в растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20*, может влиять на гены, связанные с устойчивостью к холодовому стрессу, в то время как гены *AtCBF1*, *AtP5CS*, *AtRD29B*, *AtCOR15*, *AtRD22*, *AtCSD2*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD26* не вовлечены, вероятно, в увеличение

устойчивости к холодному воздействию. В условиях нехватки воды, стресс-индуцируемые гены (*AtCBF1*, *AtKIN1*, *AtLEA*, *AtP5CS*, *AtRD29A*, *AtRD29B*, *AtNHX1*, *AtSOS1*, *AtABF3*, *AtCOR47*, *AtCOR15*, *AtRD22*, *AtCSD1*, *AtCSD2*, *AtCAT1* и *AtDREB1A*) экспрессировались значительно более активно в растениях, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20*, чем в контрольных растениях. Полученные данные дают основание полагать, что ген *VaCDPK20* может влиять на уровень активности генов, вовлеченных в ответ растений на дефицит воды и низкотемпературный стресс.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *VaCDPK20* ведет к увеличению уровня транскрипции определенных стресс-индуцируемых генов в ответ на холод и засуху, что в свою очередь вносит свой вклад в устойчивость *A. thaliana* к данным видам стрессов.

Сверхэкспрессия гена *VaCDPK21* улучшает рост клеточных линий *V. amurensis* и повышает выживаемость трансгенных растений *A. thaliana* в условиях солевого стресса. Эти данные свидетельствуют о том, что ген *VaCDPK21* вовлечен в сигнальные пути связанные с устойчивостью винограда амурского к солевому стрессу. Анализ гомологии аминокислотных последовательностей показал высокую идентичность между генами *VaCDPK21* и CDPK других растений: *AtCDPK9*, *AtCDPK21*, *AtCDPK33*, *OsCDPK19*, *PtCDPK18*, *PtCDPK19*, *VvCDPK12* и *VvCDPK17*. Для определения влияния гена *VaCDPK21* на экспрессию стресс-маркерных генов, мы проанализировали экспрессию стресс-маркерных генов в *VaCDPK21*-трансгенных растениях. Солевой стресс индуцировал экспрессию генов *AtCOR15*, *AtCOR47*, *AtCAT1*, *AtCSD1*, *AtNHX1*, *AtKIN1*, *AtRD26* и *AtRD29B* в трансгенных растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*. Более того, в стандартных условиях уровень транскрипции генов *AtP5CS*, *AtRD22*, *AtSOS1* и *AtDREB1A* был выше в трансгенных растениях, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, в сравнении с контролем. Высокий уровень экспрессии некоторых стресс-маркерных генов в растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, дает основания полагать, что *VaCDPK21* может влиять на уровень транскрипции этих генов в борьбе с солевым стрессом, в то время как гены *AtDREB2A*, *AtLEA*, *AtRD29A* и *AtCSD2* вероятно не участвуют в механизмах, обеспечивающих устойчивость *VaCDPK21*-трансгенных растений арабидопсиса к солевому воздействию.

Полученные *VaCDPK26*-трансгенные линии растений арабидопсиса показывают достоверную устойчивость к солевому стрессу. Также в большинстве линий наблюдается достоверная устойчивость к засухе, в то время как устойчивости к холодному и низкотемпературному стрессу отсутствует. Анализ гомологичных аминокислотных последовательностей показал высокую идентичность между *VaCDPK26* и различными представителями семейства CDPK

из других растений: AtCDPK6, AtCDPK26, OsCDPK26, OsCDPK13, TcCDPK26, VrCDPK2, VvCDPK26. Проведенный нами анализ экспрессии ключевых стресс-маркерных генов *A. thaliana*, показал, что увеличение экспрессии генов *AtCSD1*, *AtDREB1A*, *AtRD26* вызывает солевой стресс, а водный дефицит повышает экспрессию генов *AtABA1*, *AtABI2*, *AtCBF1*, *AtCSD1*, *AtCSD2*, *AtDREB1a*, *AtDREB2a*, *AtRab18*, *AtRD26*, *AtRD29A* в растениях арабидопсиса, трансгенных по гену *VaCDPK26*. Эти данные свидетельствуют о значительной роли гена *VaCDPK26* в сигнальной цепи, обеспечивающей устойчивость к солевому стрессу и водному дефициту.

Сверхэкспрессия гена *VaCDPK29* повышает рост клеточных линий *V. amurensis* и выживаемость трансгенных растений *A. thaliana* в условиях высоких температур и осмотического стресса. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ген *VaCDPK29* участвует в устойчивости винограда амурского к осмотическому стрессу и тепловому воздействию как слабый позитивный регулятор и, вероятно, совместно с другими представителями генного семейства *CDPK* увеличивает устойчивость к стрессу *V. amurensis*. Гомологичный анализ аминокислотных последовательностей показал высокую идентичность между *VaCDPK29* и различными представителями семейства *CDPK*: AtCDPK9, AtCDPK21, AtCDPK29, OsCDPK1, OsCDPK15, VvCDPK15, PtCDPK19, PtCDPK23, PtCDPK24. Проведенный нами анализ экспрессии стресс-маркерных генов в *VaCDPK29*-трансгенных растениях *A. thaliana*, показал, что высокие температуры вызывали увеличение экспрессии генов *AtABF3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD29A* и *AtRD29B*, что свидетельствует о ключевой роли гена *VaCDPK29* в сигнальной цепи, обеспечивающей устойчивость к тепловому стрессу. Таким образом, сверхэкспрессия гена *VaCDPK29* приводит к увеличению экспрессии стресс-маркерных генов, увеличивая тем самым устойчивость растений к высокотемпературному и осмотическому стрессам.

Полученные трансгенные линии *V. amurensis*, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK13*, не были устойчивы к абиотическим стрессам. Это позволило нам предположить, что этот ген не участвует в устойчивости винограда к исследуемым стрессам. Поэтому мы не стали получать трансгенные растения арабидопсиса, что еще раз подтвердило, что анализ экспрессии генов без получения сверхэкспрессирующих клеток и растений является только первым способом сбора информации. Значит, увеличение экспрессии гена *VaCDPK13* в растениях при холодовом стрессе не является следствием адаптации растений винограда к данному стрессу, а затрагивает не относящиеся к формированию устойчивости процессы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучена роль пяти генов *VaCDPK13*, *20*, *21*, *26* и *29* винограда *V. amurensis* в процессах формирования устойчивости к абиотическим стрессам. Показано, что трансгенные растения арабидопсиса и клеточные линии винограда, сверхэкспрессирующие различные гены *VaCDPK* дикого винограда, более устойчивы к холодовому стрессу и засухе (сверхэкспрессия *VaCDPK20*), солевому стрессу (сверхэкспрессия *VaCDPK21*), осмотическому стрессу и водному дефициту (сверхэкспрессия *VaCDPK26*), а также к тепловому и осмотическому стрессам (сверхэкспрессия *VaCDPK29*). Таким образом, установлено, что гены *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29* вовлечены в адаптацию дикого винограда к абиотическим стрессам: осмотическому, низким и высоким температурам, дефициту воды. Нами показано, что исследуемые гены CDPK действовали в арабидопсисе через активацию экспрессии ключевых стресс-маркерных генов. Однако остаются неизвестными белковые партнеры этих CDPK и поэтому невозможно полностью раскрыть механизм действия этих генов, что может стать новой темой для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK20* повышает устойчивость клеточных линий *V. amurensis* к холодовому стрессу и устойчивость растений *A. thaliana* к холодовому стрессу и засухе. В трансгенных растениях *A. thaliana* при низких температурах увеличивается экспрессия стресс-маркерных генов *AtLEA*, *AtCOR47*, *AtNHX1*, *AtSOS1*, *AtKIN1*, *AtCSD1*, *AtRD29A* и *AtABF*, при дефиците воды *AtCBF1*, *AtKIN1*, *AtLEA*, *AtP5CS*, *AtRD29A*, *AtRD29B*, *AtNHX1*, *AtSOS1*, *AtABF3*, *AtCOR47*, *AtCOR15*, *AtRD22*, *AtCSD1*, *AtCSD2*, *AtCAT1* и *AtDREB1A*. Полученные данные свидетельствуют о том, что ген *VaCDPK20* является позитивным регулятором устойчивости винограда как к холодовому стрессу, так и засухе.
2. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK21* в небольшой степени повышает устойчивость клеточных линий *V. amurensis* и растений *A. thaliana* к солевому стрессу. В трансгенных растениях *A. thaliana* при солевом воздействии увеличивается экспрессия стресс-маркерных генов *AtCOR15*, *AtCOR47*, *AtCAT1*, *AtCSD1*, *AtNHX1*, *AtKIN1*, *AtRD26*, *AtRD29B*. Таким образом, ген *VaCDPK21* является слабым позитивным регулятором устойчивости винограда к солевому стрессу.
3. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK29* увеличивает устойчивость клеточных линий *V. amurensis* и растений *A. thaliana* к тепловому и осмотическому стрессам. В растениях *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK29* при действии теплового стресса повышается уровень экспрессии стресс-маркерных генов *AtABF3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD29A* и *AtRD29B*. Полученные данные показывают, что ген *VaCDPK29* является позитивным регулятором в устойчивости винограда к тепловому и осмотическому стрессам.

4. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK26* увеличивает устойчивость клеточных линий *V. amurensis* и растений *A. thaliana* к солевому стрессу и засухе. Устойчивость трансгенных растений арабидопсиса сопровождается при солевом стрессе увеличением экспрессии генов *AtCSD1*, *AtDREB1A*, *AtRD26*, а при дефиците воды *AtABA1*, *AtABI2*, *AtCBF1*, *AtCSD1*, *AtCSD2*, *AtDREB1a*, *AtDREB2a*, *AtRab18*, *AtRD26*, *AtRD29A*. Таким образом, ген *VaCDPK26* является позитивным регулятором в устойчивости винограда *V. amurensis* к солевому стрессу и засухе.
5. Сверхэкспрессия гена *VaCDPK13* не влияет на устойчивость клеток *V. amurensis* к температурному, осмотическому и солевому стрессам. Полученные результаты свидетельствуют, что ген *VaCDPK13* не играет значительной роли в регуляции ответа винограда на проанализированные абиотические стрессы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ:

1. Dubrovina AS, Kiselev KV, Khristenko VS. (2013) Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* // J Plant Physiol, 170: 1491-1500.
2. Христенко ВС, Дубровина АС, Алейнова ОА, Киселев КВ. (2015) Влияние сверхэкспрессии гена Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы *VaCDPK13* на устойчивость культур клеток винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. к абиотическим стрессам // Вестник КрасГАУ. 2: 132-138.
3. Dubrovina AS, Kiselev KV, Khristenko VS, Aleynova OA. (2015) *VaCDPK20*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr. mediates cold and drought stress tolerance // J Plant Physiol, 185: 1-12.
4. Dubrovina AS, Kiselev KV, Khristenko VS, Aleynova OA. (2016) *VaCDPK21*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., is involved in grape response to salt stress // Plant Cell Tiss Organ Cult, 127: 137-150.
5. Dubrovina AS, Kiselev KV, Khristenko VS, Aleynova OA. (2017) The calcium-dependent protein kinase gene *VaCDPK29* is involved in grapevine responses to heat and osmotic stresses // Plant Growth Regul, 82: 79-89.

Работы, опубликованные в материалах региональных, всероссийских и международных научных конференциях:

6. Христенко ВС, Шумакова ОА, Киселев КВ, Дубровина АС. (2013) Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK20* на устойчивость клеток растений к абиотическим стрессам // Биология: от молекулы до биосферы: материалы VIII Международной конференции молодых ученых. Харьков С. 154-155.

7. Khristenko VS, Ogneva ZV, Kiselev KV, Dubrovina AS. (2014) Expression of calcium-dependent protein kinase genes in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* // 11th International Conference on Grapevine Breeding and Genetics. Beijing. P. 234-235.

8. Христенко ВС, Шумакова ОА, Киселев КВ, Дубровина АС. (2014) Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK21* на устойчивость клеток растений к абиотическим стрессам // Проблемы и перспективы исследований растительного мира: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых. Ялта. С. 71

9. Христенко ВС, Дубровина АС, Киселев КВ, Шумакова ОА. (2014) Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK20* на устойчивость клеток *Vitis amurensis* и *Arabidopsis thaliana* к абиотическим стрессам // Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий: материалы Международной научной конференции и школы молодых ученых (Годичное собрание ОФР 2014). Калининград. С. 468-470.

10. Khristenko VS, Aleynova OA, Kiselev KV, Dubrovina AS. (2015) The role of calcium-dependent protein kinase gene *VaCDPK21* in the abiotic stress resistance of wild-growing grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // Материалы 3-ей Международной конференции "Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений" PlantGen 2015. Новосибирск. Том 1. С. 23-24.

11. Христенко ВС, Дубровина АС, Алейнова ОА, Киселев КВ. (2015) Влияние сверхэкспрессии гена Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы *VaCDPK29* на устойчивость культур клеток *Vitis amurensis* Rupr. и растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. к абиотическим стрессам // Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений: материалы докладов Всероссийской научной конференции и школы для молодых ученых, посвященной 125-летию Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Москва. С. 695-698.

ХРИСТЕНКО ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА

**РОЛЬ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИИКИНАЗ
VaCDPK13, VaCDPK20, VaCDPK21, VaCDPK26 и *VaCDPK29* В
УСТОЙЧИВОСТИ ВИНОГРАДА *VITIS AMURENSIS RUPR.* К
АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук