

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОРАЗНООБРАЗИЯ НАЗЕМНОЙ
БИОТЫ ВОСТОЧНОЙ АЗИИ»
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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)

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Киселев К.В.

ВЛАДИВОСТОК

2018

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Виноград амурский <i>V. amurensis</i> Rupr. как модельный объект для научных исследований	11
1.2. Резуховидка Таля <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. как модельный объект.....	12
1.3. Стресс-маркерные гены <i>A. thaliana</i>	13
1.4. Кальциевая сигнальная система и ее роль во внутриклеточной сигнальной системе растений	16
1.5. Ca ²⁺ -зависимые протеинкиназы (CDPK): структура и функции.....	17
1.6. Влияние абиотических стрессов на растение и механизмы устойчивости растений к ним.....	20
1.7. Трансгенные растения, устойчивые к различным абиотическим стрессам.....	23
1.8. Экспрессия генов <i>CDPK</i> в <i>V. amurensis</i> под влиянием абиотических стрессов	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	29
2.1. Растительный материал	29
2.2. Получение трансгенных каллусных клеточных линий <i>V. amurensis</i> с помощью агробактериальной трансформации.....	29
2.3. Получение трансгенных растений с помощью метода цветочного погружения.....	32
2.4. Проверка трансгенности трансформированных растений <i>A. thaliana</i>	34

2.5. Воздействие абиотических стрессов на трансгенные клеточные линии <i>V. amurensis</i>	34
2.6. Воздействие абиотических стрессов на растения <i>A. thaliana</i>	35
2.7. Количественная оценка экспрессии генов.....	36
2.8. Статистический анализ полученных результатов	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	40
3.1. Получение клеточных линий <i>V. amurensis</i> , сверхэкспрессирующих гены <i>VaCDPK</i>	40
3.2. Оценка экспрессии экзогенных и эндогенных <i>CDPK</i> в клеточных линиях <i>V. amurensis</i>	41
3.3. Устойчивость <i>VaCDPK</i> -трансгенных клеточных линий <i>V. amurensis</i> к абиотическим стрессам.....	46
3.4. Получение трансгенных растений <i>A. thaliana</i> , сверхэкспрессирующих гены <i>VaCDPK</i>	55
3.5. Устойчивость <i>VaCDPK</i> -трансгенных растений <i>A. thaliana</i> к абиотическим стрессам.....	57
3.6. Влияние сверхэкспрессии генов <i>CDPK V. amurensis</i> на экспрессию стресс-индуцируемых и антиоксидантных генов в растениях <i>A. thaliana</i>	62
3.6. Анализ гомологии аминокислотных последовательностей <i>VaCDPK20</i> , <i>VaCDPK21</i> , <i>VaCDPK26</i> , <i>VaCDPK29</i>	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
ВЫВОДЫ.....	83
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

АФК – активные формы кислорода

АНУ – α -нафтилуксусная кислота

БАП – 6-бензиламинопурин

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР – обратнo-транскрипционная полимеразная цепная реакция

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

$[Ca^{2+}]_{цит}$ – концентрация кальция в цитоплазме

CaM – кальмодулин

2*35S CaMV промотор – двойной 35S промотор вируса мозаики цветной
капусты

CDPK – Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы

CVL – кальцийнейрин-В-подобные белки

CML – CaM-подобные белки

Ser – серин

Thr – треонин

ВВЕДЕНИЕ

Воздействие на растения таких абиотических стрессовых факторов, как засуха, повышенная солёность 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 клеточного деления, ассимиляции 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 целом 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). CDPK играют важную роль в поддержании мембранного потенциала, регуляции углеводного и азотного обмена, устьичных движениях и ответа клеток растений на абиотические и биотические стрессы (Медведев, 2005). Известно, что экспрессия генов и активность различных изоформ CDPK могут значительно возрастать 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 окружающей среды. Ранее нами было изучена экспрессия генов CDPK под воздействием таких абиотических стрессовых факторов, как солевой стресс, водный дефицит, осмотический и температурные стрессы в дикорастущем винограде *V. amurensis* (Dubrovina et al., 2013). Особое внимание привлекли гены *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29*. Данные ПЦР РВ показали, что уровень транскрипции гена *VaCDPK13* значительно увеличивался при холодном стрессе; достоверное и значительное увеличение транскрипции гена *VaCDPK20* наблюдалось в ответ на температурные стрессы. Уровень транскрипции гена *VaCDPK21* был повышен при тепловом, солевом и осмотическом стрессах; экспрессия гена

VaCDPK26 увеличалась при солевом и при холодном стрессах. Значительное повышение экспрессии гена *VaCDPK29* наблюдалось при высоких концентрациях маннитола, водном дефиците и при температурных стрессах.

Модельными объектами нашей работы являются растения *A. thaliana* и клеточные линии *V. amurensis*. Короткий жизненный цикл и хорошо изученный геном (определены функции около 35000 белков, закодированных в геноме *A. thaliana*) делают арабидопсис главным модельным растением для исследований в области устойчивости растений к абиотическим стрессам. *V. amurensis* достаточно удобный объект для применения методов молекулярной биологии и различных экспериментальных исследований, поскольку геном культурного винограда *V. vinifera*, близкородственного вида к *V. amurensis*, секвенирован и депонирован в GenBank (Jaillon et al., 2007). Таким образом, эксперименты с клеточными линиями винограда и растениями арабидопсиса, сверхэкспрессирующими гены *VaCDPK*, дают основание экстраполировать результаты на целое растение *V. amurensis*.

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 *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 холодovому 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.

2. 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.

3. 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 клеточных линиях *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 ученых «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 2014); в материалах Международной научной конференции и школе молодых ученых (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 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и содержит 9 таблиц. Список литературы насчитывает 144 наименования.

Благодарности. Автор искренне благодарит научных руководителей к.б.н. Киселева К.В. и к.б.н. Дубровину А.С. 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Виноград амурский *V. amurensis* Rupr. как модельный объект для научных исследований

Виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr. принадлежит к семейству Виноградовых (Vitaceae), ареал его произрастания раскинулся на территориях Китая, России и Кореи (Xiong and Zhang, 2007). Данный вид винограда устойчив к низкой температуре и различным видам болезней (Song et al., 2008). Так ветви винограда способны выживать при температуре -40°C , а корни могут переносить температуру в диапазоне от -14°C до -16°C (Ge et al., 1997).

V. amurensis также обладает устойчивостью к патогенам, которые часто наносят вред плодovому винограду (He et al., 1991): белой гнили (*Coniothyrium diplodiella*), виноградному антракнозу (*Glomerella cingulate*), горькой гнили плодов (*Greeneria unicola*) и ложной мучнистой росе (*Plasmopara viticola*). Поэтому *V. amurensis* часто используют для привоя новых культур, которые впоследствии могут приобрести высокую устойчивость к неблагоприятным условиям. *V. amurensis* содержит множество питательных веществ: глюкозу, сахарозу, белки и витамины, которые также присутствуют в вине (Zhang and Li, 2006a).

Ягоды *V. amurensis* имеют следующие отличительные характеристики, интересные для сельского хозяйства и производства вина: высокое содержание кислот, большое содержание танина, полифенолов. Однако ягоды *V. amurensis* уступают ягодам *V. vinifera*, обладая такими свойствами как низкое содержание сахаров, низкая соковая урожайность и низкая температура ферментации (Li et al., 2009). Ягоды *V. amurensis* обладают высокой питательностью, например, отличаются повышенным содержанием микроэлементов, природных полифенолов и свободных аминокислот (Wang, 2010; Chen et al., 2008; Li and He, 2000).

V. amurensis является достаточно удобным объектом для применения методов молекулярной биологии и различных экспериментальных

исследований, поскольку геном культурного винограда *V. vinifera*, близкородственного вида к амурскому винограду, секвенирован и депонирован в GenBank (Jaillon et al., 2007).

1.2. Резуховидка Таля *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. как модельный объект

Резуховидка Таля *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – это растение рода Резуховидка (*Arabidopsis*) семейства Крестоцветные (Brassicaceae). Растение обитает в Европе, Малой и Средней Азии. В России арабидопсис распространен в Европейской части, Западной Сибири и Предкавказье. Арабидопсис представляет собой однолетнее растение высотой 8–30 см, с тонким, прямым, простым или ветвистым стеблем. Цветки арабидопсиса являются самоопыляющимися. В виду короткого цикла развития (может пройти полный цикл развития за шесть недель) и относительно небольшого размера генома (около 157 миллионов пар нуклеотидов и наличие всего лишь 5 хромосом), арабидопсис представляет собой удобный модельный объект для исследований в области физиологии, молекулярной биологии и генетики растений (Bennett et al., 2003; Rensink et al., 2004; Coelho et al., 2007).

С 1943 года арабидопсис стали использовать в качестве модельного организма (Meyerowitz et al., 2001). Было проведено много исследований для определения функций около 35000 белков и генов, закодированных в геноме *A. thaliana*. Также арабидопсис широко используется в качестве удобного растения для агробактериальной трансформации. Для доставки ДНК в клетки арабидопсиса широко используют штамм агробактерий *Agrobacterium tumefaciens*. Распространенным протоколом для получения трансгенного *A. thaliana* является метод цветочного погружения, предполагающий обмакивание цветков в растворе, содержащем агробактерии с целевым геном и детергентом (Zhang et al., 2006).

1.3. Стресс-маркерные гены *A. thaliana*

Для получения более полной картины о функциях изучаемых генов, например, для определения участия в известных молекулярных механизмах клеточной регуляции, исследователи используют данные об экспрессии стресс-маркерных генов. На сегодняшний день значительное количество исследований посвящено сверхэкспрессии стресс-маркерных генов в растениях (Kasuga et al., 1999; Liu et al., 1998; Kang et al., 2002; Dubouzet et al., 2003; Sakuma et al., 2006a; Msanne et al., 2011).

Большое количество литературы посвящено роли абсцизовой кислоты (АБК) при осмотическом стрессе, вызванном засухой и низкими температурами (Алехина и другие, 2005; Bartels et al., 2005; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2006; Finkelstein et al., 2013). Поэтому гены, продуктами которых являются ферменты, участвующие в биосинтезе АБК и его регуляции, используются в качестве стресс-маркерных генов для исследований (Larkindale et al., 2005). Зеаксантин эпоксидаза (АВА1) и ксантоксин дегидрогеназа (АВА2) являются ферментами, участвующими в биосинтезе абсцизовой кислоты. Гены *ABI1* (protein phosphatase 2C family protein), *ABI2* (protein phosphatase 2C family protein), *ABI3* (AP2/B3-like transcriptional factor family protein), *ABI4* (integrase-type DNA-binding superfamily protein), *ABI5* (basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein) вовлечены в регуляцию передачи сигнала АБК (Leung et al., 1997; Zhang et al., 2014).

ABF3 (abscisic acid responsive elements-binding factor 3) – это ген, кодирующий промотор-связывающий фактор АБК; вовлечен в стрессовый ответ на водный дефицит, холодовой и тепловой стрессы посредством регуляции генов участвующих в различных стрессах (Kim et al., 2004; Abdeen et al., 2010; Choi et al., 2013). Недавние исследования показали, что *ABF3* может влиять на движения устьиц, уменьшает потерю воды при высоких температурах и при водном дефиците (Choi et al., 2013). Для определения

функций CDPK была использована группа генов, кодирующих антиоксидантные ферменты *CSD1* (ген, кодирующий хлоропластную Cu/Zn-супероксид дисмутазу), *CSD2* (ген, кодирующий цитозольную Cu/Zn-супероксид дисмутазу), *CAT1* (ген, кодирующий каталазу 1), которые способны детоксифицировать активные формы кислорода (АФК), образующиеся в ответ на абиотический стресс, в том числе образовавшиеся вследствие солевого воздействия (Xiong et al., 2002). CBF1 (C-repeat/DRE binding factor 1) является транскрипционным фактором, вовлеченным в ответ растений на холодовой стресс (Hsieh et al., 2002; Novillo et al., 2004). Известно, что накопление транскриптов гена *CBF1* происходило уже через 15 минут после холодового воздействия (Gilmour et al., 1998). Продуктами стресс-маркерных генов *COR15* (cold-regulated 15), *COR47* (cold-regulated 47), *LEA* (dehydrin LEA) и *Rab18* (dehydrin family protein) являются дегидрины (Ingram et al., 1996). Все эти белки характеризуются высокой гидрофильностью. Во время обезвоживания клеток под действием водного стресса дегидрины за счет высокой гидрофильности препятствуют потере клеткой воды. Экспрессия генов *COR* индуцируется холодовым стрессом (Thomashow et al., 1998). Сверхэкспрессия дегидринов *COR47* и *Rab18* увеличивала толерантность трансгенных растений арабидопсиса к холодовому стрессу (Puhakainen et al., 2004). Ген *Rab18* экспрессируется в ответ на воздействие АБК. Исследования Lang с коллегами (1992), показали, что низкая температура, водный дефицит и экзогенная АБК индуцируют накопление мРНК *Rab18* (Lang et al., 1992). Известно, что продукты генов *DREB1A* (dehydration response element B1A) и *DREB2A* (DRE-binding protein 2A) кодируют транскрипционные факторы, специфично связывающиеся с продуктом гена *DREB2A* регулируют транскрипцию генов в условиях дефицита воды, высоких концентраций солей и при холодовом воздействии, посредством связывания с DRE-элементами (dehydration responsive element) в промоторной области целевых генов (Liu et al., 1998; Kasuga et al., 1999;

[Sakuma et al., 2006a](#)). Известно, что экспрессия гена *DREB2A* регулируется тепловым шоком ([Sakuma et al., 2006b](#); [Schramm et al., 2008](#)).

Известно, что низкие температуры и экзогенная АБК индуцируют экспрессию гена *KIN1* и *LTP3* (lipid transfer protein 3) – это неспецифичный липид-переносящий белок ([Kader, 1984](#)). Guo с коллегами получили трансгенные растения арабидопсиса сверхэкспрессирующие ген *LTP3*. Ген *LTP3* значительно увеличивал устойчивость трансгенных растений арабидопсиса (по гену *LTP3*) к холодовому стрессу ([Guo et al., 2013](#)). Продукт гена *KIN1* представляет собой Ser/Thr протеинкиназу ([Kurkela et al., 1990](#)).

Гены *NHX1* и *SOS1* кодируют ионные транспортеры (вакуолярные и плазматические Na^+/H^+ антипортеры, соответственно). Известно, что ген *NHX1*, при сверхэкспрессии в растениях арабидопсиса, увеличивал способность растений к фотопротекции под действием солевого стресса и засухи ([Liu et al., 2010](#)), а сверхэкспрессия гена *SOS1* увеличивала устойчивость растений табака к солевому стрессу ([Yue et al., 2012](#)). Пирролин-5-карбоксилатсинтетаза (*P5CS*) является ключевым ферментом в биосинтезе пролина ([Kiyosue et al., 1996](#)). Пролин синтезируется из глутамина или орнитина. Известно, что в геноме арабидопсиса имеются два гена, контролирующих синтез *P5CS*. Один из генов (*AtP5CS2*) содержит DRE-элементы в промоторной области второй (*AtP5CS1*) не имеет этих элементов, но оба гена активируются низкой температурой, засухой, наличием высоких концентраций соли и осмотическим стрессом ([Strizhov et al., 1997](#); [Székely et al., 2008](#)). К группе белков, участвующих в ответе на дегидратацию, принадлежат: *RD22* (BURP domain-containing protein), *RD29A* (desiccation-responsive protein 29A) и *RD29B* (CAP160 protein). Известно, что уровень экспрессии генов *RD22*, *RD29A* и *RD29B* увеличивается при дегидратации, при солевом, холодовом и осмотическом стрессах ([Hanana et al., 2008](#); [Msanne et al., 2011](#)). *RD26* (NAC domain transcriptional regulator superfamily protein) – это ген транскрипционного фактора NAC (No Apical

Meristem), индукцию которого вызывает дефицит воды и солевой стресс (Fujita et al., 2004).

1.4. Кальциевая сигнальная система и ее роль во внутриклеточной сигнальной системе растений

Известно, что Ca^{2+} являются одним из наиболее важных элементов в системе внутриклеточной сигнализации растений (Trewavas and Malho, 1998). Ca^{2+} , как вторичный посредник, является эффективным регулятором метаболических процессов во всех клетках, где существуют системы, реагирующие на изменение его концентрации. Особенность Ca^{2+} как вторичного посредника состоит в том, что он способен к образованию большого числа координационных связей от 6 до 9 с лигандами (Левицкий, 1990). Считается, что информация о стимуле, воздействующем на клетку растения, кодируется в кальциевом сигнале, а именно в характере возрастания концентрации Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$). Амплитуда и частота изменений $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ специфичны для каждого стрессового фактора, воздействующего на клетку растения, и могут иметь вид всплесков, волн, пульсаций или осцилляций, плато, градиента или быть сочетанием этих проявлений. Такую специфичную информацию о стимуле называют кальциевыми «подписями» (calcium signatures) (Evans et al., 2001). Какой-либо Ca^{2+} -регулируемый клеточный процесс начинается с генерации сигнал-специфичных всплесков $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ через синхронизированную активность ионных каналов, помп и транспортеров. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ узнается специфическими белками под названием белки-сенсоры Ca^{2+} . Такие Ca^{2+} -связывающие белки – основные внутриклеточные мишени для Ca^{2+} ; подвергаясь конформационным изменениям, регулируют экспрессию различных генов, фосфорилируя факторы транскрипции (Reddy and Reddy, 2004).

Другими элементами в кальциевой сигнальной системе растений являются различные типы Ca^{2+} -каналов, Ca^{2+} -АТФазы, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обменники,

различные Ca^{2+} -регулируемые ионные каналы. В систему кальциевой сигнализации также входят различные рецепторы и вторичные посредники (инозит-1,3,4-трифосфат и др.), каскады амплификации Ca^{2+} -сигнала, белки цитоскелета и факторы транскрипции (Медведев, 2005).

Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ возникает под действием различных абиотических стрессовых факторов, таких как свет, низкая и высокая температура, гиперосмотический стресс и окислительный стресс. Процесс распространения сигнала по цитоплазме обеспечивается последовательной активацией или ингибированием Ca^{2+} -каналов и Ca^{2+} -насосов эндоплазматического ретикулула, что обуславливает прохождение Ca^{2+} - импульса за счет повышения/снижения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме (Bootman et al., 2002). Усиление единичного Ca^{2+} -сигнала осуществляется путем подключения Ca^{2+} -каналов и Ca^{2+} -насосов эндоплазматической мембраны, через активацию других вторичных посредников, модификацию элементов цитоскелета и, главным образом, взаимодействие кальция с Ca^{2+} -связывающими белками. При этом образуется Ca^{2+} -белковый комплекс, в котором происходят значительные изменения конформации белковой молекулы, вследствие чего молекула приобретает способность транслировать сигнал далее, что приводит к инициации Ca^{2+} -зависимых физиологических процессов (Klimecka et al., 2007).

1.5. Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPK): структура и функции

Одна из больших групп Ca^{2+} -связывающих белков содержит “EF-мотивы”: кальмодулин (CaM); CaM-подобные белки (CML); кальцийнейрин-В-подобные белки (CBL) и Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPK) и др. (Медведев, 2005). Предполагается, что у растений большая часть киназной активности, которая стимулируется кальцием, связана именно с CDPK (Cheng et al., 2002), поэтому изучение свойств этих белков привлекает наибольшее внимание.

Все члены семейства CDPK имеют общую структуру и содержат: N-терминальный вариабельный домен, Ser/Thr-киназный домен, автоингибиторный домен и Ca^{2+} - связывающий CaM-подобный домен с EF-мотивами (Harmon et al., 2001). CaM-подобный домен, как правило, имеет четыре Ca^{2+} - связывающих “EF-мотива”, организованных в две пары, что обеспечивает точное сродство к Ca^{2+} (DeFalco et al., 2010). Внутримолекулярное взаимодействие между Ca^{2+} -связывающим доменом, автоингибиторным доменом и каталитическим центром поддерживает киназу в инактивированном состоянии по псевдосубстратному механизму (Harmon et al., 2001). Ионы Ca, связываясь с низкоафинной N-терминальной частью CaM-подобного домена, индуцируют конформационные изменения, которые приводят к освобождению автоингибиторного домена. Активность CDPK может регулироваться не только Ca^{2+} , но и процессами фосфорилирования или дефосфорилирования, некоторыми фосфолипазами и 14-3-3 белками (Harmon et al., 2000). Присоединение миристиновой кислоты (14:0) к глицину N-конца обеспечивает взаимодействие CDPK с мембранами (Cheng et al., 2002).

Субстратами CDPK являются ферменты углеродного и азотного метаболизма, стрессовые белки, мембранные переносчики, ионные каналы, белки цитоскелета и факторы транскрипции (Harmon et al., 2000). CDPK могут контролировать процессы роста и развития растений, углеродный и азотный метаболизм, процессы мембранного транспорта, экспрессию стресс-индуцируемых генов, систему защитных реакций от патогенов (Cheng et al., 2002; Sheen et al., 1996; Lee et al., 2002). Экспрессию генов CDPK изучали в растениях риса, арабидописа, кукурузы, томата (Ray et al., 2007; Das and Pandey, 2010) под влиянием различных абиотических стрессов. Получены трансгенные растения, сверхэкспрессирующие различных представителей семейства генов CDPK, и проявившие устойчивость к абиотическим стрессам (Asano et al., 2012; Jiang et al., 2013).

Большое количество исследований посвящено влиянию генов семейства *CDPK* на устойчивость растений к водному дефициту. Zou с коллегами (2010) получили мутантные растения арабидопсиса по гену *AtCDPK10*, в которых блокировались АБК - калиевые каналы, что приводило к уменьшению закрытия устьиц и сверхчувствительности к засушливым условиям (Zou et al., 2010). Также засуха вызывала увеличение количества транскриптов генов *BnaCDPK11*, 14, 18 и 28 в молодых листьях *Brassica napus* L. (Zhang et al., 2014). Наблюдалось увеличение экспрессии генов *AtCDPK10* и *AtCDPK11* в засушливых условиях у арабидопсиса, что говорит о возможном включении этих генов в сигнальные пути ответа на осмотический стресс (Urao et al., 1994). Экспрессия гена *VfCDPK1* увеличивалась в растениях *Vicia faba* L. в условиях засухи (Liu et al., 2006). Chen с коллегами (2013б) получили трансгенные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген из *PeCDPK10* (*Populus euphratica* Oliv.). При анализе изолированных листьев обнаружили, что потеря воды происходит с меньшей скоростью в растениях, сверхэкспрессирующих ген *PeCDPK10*, по сравнению с контрольными растениями (Chen et al., 2013b). Сверхэкспрессия гена *ZmCDPK4* (из *Zea mays* L.) в трансгенных растениях арабидопсиса увеличивала устойчивость к засухе (Jiang et al., 2013).

Линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *OsCDPK13*, обладали устойчивостью к холодovому стрессу (Komatsu et al., 2007). Увеличение экспрессии гена *LeCDPK2* наблюдалось при +42° С в течение 4 часов в трехнедельных проростках *Solanum lycopersicum* L. (Chang et al., 2009). Число транскриптов генов *VpCDPK4*, *VpCDPK6*, *VpCDPK9* и *VpCDPK10* повышалось в растениях *Vitis pseudoreticulata* во всех временных точках выделения РНК при +42°С (Zhang et al., 2015). В растениях *Brassica napus* увеличение числа транскриптов генов *BnaCDPK7*, 14 и 21 наблюдалось при тепловом стрессе (+37°С) (Zhang et al., 2014). Как показал Wan с коллегами, экспрессия гена *OsCDPK25* индуцировалась при +45° С (Wan et al., 2007). Также существует ряд работ, посвященных доказательству участия генов

CDPK в ответе растений на действие высоких концентраций солей. Мутантные линии арабидопсиса по гену *AtCDPK10* были устойчивы к солевому стрессу (Ma and Wu, 2007). Сверхэкспрессия гена *OsCDPK21* в рисе увеличивала устойчивость к солевому стрессу (Asano et al., 2012). В растениях риса экспрессия гена *OsCDPK9* достоверно увеличивалась при солевом воздействии в различных тканях относительно контрольных условий (Wei et al., 2014), а экспрессия гена *OsCDPK7* увеличивалась при солевом стрессе в корнях и побегах десятидневных проростков (Saijo et al. 2000).

1.6. Влияние абиотических стрессов на растение и механизмы устойчивости растений к ним

Воздействие на растение абиотических стрессовых факторов, таких как засуха, повышенная соленость почвы, затопление, экстремальные температуры снижают 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). Около 21% земель, используемых в сельском хозяйстве, являются засоленными (Ghassemi et al., 1995), что является проблемой пустынных и полупустынных районов. Ионы в высоких концентрациях способны снижать активность ферментов и приводить к нарушениям таких функций, как клеточное деление, ассимиляция углерода и др. (Алехина и др., 2005). Глобальное потепление негативно влияет на растения и наносит значительный урон мировому сельскому хозяйству.

Эффекты воздействия на растения различных абиотических стрессовых факторов имеют много общего за исключением некоторых нюансов. Одним из эффектов воздействия абиотического стресса на растение является снижение содержания воды в клетках. Сопутствующее обезвоживанию, увеличение концентрации ионов в цитоплазме вызывает различного рода нарушения в структуре и функциях биополимеров, так, например, происходит денатурация белков и подавляется их ферментативная

активность, изменяется структура липидного бислоя мембран и нарушается их целостность. На клеточном уровне возникает потеря тургора, а на уровне целого растения водный дефицит проявляется в обращении градиента водного потенциала в системе почва-корень-побег и ингибировании роста (Алехина, 2005; Кузнецов, 2006). Повышение концентрации ионов может дезинтегрировать клеточные мембраны, подавлять активность ферментов и приводить к нарушениям таких жизненно-важных функций, как клеточное деление, ассимиляция углерода, поглощение элементов минерального питания. NaCl в концентрациях выше 0.4 М ингибирует многие ферменты вследствие нарушения гидрофобно-электростатического баланса сил, поддерживающих структуру белковых молекул (Wyn Jones & Pollard, 1983). Выделено множество губительно действующих на растения факторов при отрицательных температурах: потеря тепла, разрыв сосудов, обезвоживание, льдообразование, повышенные кислотность и концентрация клеточного сока и т.п. Многие растения, не повреждаясь при температурах выше 0°C, гибнут от образования льда в тканях. В обводненных незакаленных органах лед может образовываться в протопластах, межклетниках и клеточных стенках (Березина, 2009).

К физиологическим механизмам адаптации растений к абиотическим стрессам относят торможение увеличения листовой поверхности, стимуляция роста корневой системы, уменьшение потерь воды за счет закрытия устьиц и др. (Кузнецов, 2006). Молекулярными механизмами адаптации растений к засухе являются биосинтез осмолитов, lea-белков, шаперонов и увеличение числа аквапоринов (Алехина, 2005).

Осмолиты образуют небольшую группу низкомолекулярных органических соединений. Общая функция осмолитов – это участие в процессах осморегуляции. Роль осмолитов особенно важна в условиях засухи и засоления, когда необходимо сконцентрировать в клетках осмотически активные вещества (Morgan et al., 1984; Rhodes et al., 1994). Различия растений по устойчивости к дегидратации связаны со степенью

эффективности у них систем биосинтеза осмолитов. Ксерофиты и галофиты – растения, обитающие при низком содержании влаги в среде и на засоленных почвах, синтезируют осмолиты с более высокой скоростью и аккумулируют их в клетках до более высоких концентрации по сравнению с растениями, обитающих в условиях нелимитированного водоснабжения ([Warming et al., 2014](#)). В вакуолях, которые занимают приблизительно 90% объема созревших клеток, осморегуляция осуществляется за счет аккумуляции неорганических K^+ , Na^+ , Cl^- . За счет осмолитов достигается осмотическое равновесие цитозоля с вакуолями и всеми остальными органеллами клетки. К наиболее распространенным осмолитам относятся пролин, глицин-бетаин, маннитол, спемидин, спермин ([Алехина, 2005](#)).

Белки, связывающие полипептиды во время их сворачивания, то есть при формировании третичной структуры и сборки белковой молекулы из субъединиц, называют шаперонами. При дегидратации клеток тенденция к повреждениям и денатурации белков усиливается, поэтому защитная роль шаперонов возрастает ([Vaseva et al., 2012](#)). Аквапорины – интегральные мембранные белки, формирующие поры в мембранах клеток. Аквапорины или "водные каналы" избирательно пропускают молекулы воды, позволяя ей поступать в клетку и покидать ее, в то же время, препятствуя потоку ионов и других растворимых веществ ([Agre, 2006](#)). Другие аквалицеропорины пропускают не только воду, но и глицерин, CO_2 , аммиак и мочевины, в зависимости от диаметра и формы образуемой поры, однако аквапорины совершенно непроницаемы для заряженных частиц и это их свойство позволяет сохранять электрохимический мембранный потенциал ([Gonen et al., 2006](#)). Увеличение содержания аквапоринов в мембране, и их последующая активация приводят к возрастанию водной проводимости плазматической мембраны и, соответственно, к увеличению потока воды в клетку в период восстановления тургора.

Одним из важных адаптационных механизмов устойчивости растений к температурным воздействиям является изменение в липидном составе

мембран. Например, у устойчивых к высоким температурам растений накапливаются нейтральные липиды, фосфолипиды, количественные соотношения которых определяют мембранную проницаемость, увеличивается в составе липидов доля насыщенных жирных кислот (Klueva et al., 2001). Выявлено, что у холодостойких растений содержание ненасыщенных жирных кислот гораздо выше, чем у растений чувствительных к холоду. Увеличение количества ненасыщенных жирных кислот приводит к снижению температуры фазового перехода мембранных липидов (Медведев, 2004).

Большое значение в формировании жаростойкости принадлежит также белкам теплового шока (Vierling, 1991). В то время как для обеспечения холодостойкости в растениях синтезируются антифризные белки (АФБ), тормозящие рост кристаллов льда и не влияя при этом на температуру замерзания раствора, которые связываются с кристаллами льда, предотвращая или замедляя их дальнейший рост (Бильданова и др., 2012).

1.7. Трансгенные растения, устойчивые к различным абиотическим стрессам

Засуха, холодовой стресс, высокая соленость и высокая температура являются главными абиотическими стрессовыми воздействиями, снижающими продуктивность сельского хозяйства. Современные технологии молекулярной биологии позволяют исследовать механизмы адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды. Исследования физиологических и молекулярных механизмов устойчивости растений к абиотическим стрессам легли в основу описания большого количества генов, ассоциированных с адаптацией растений к стрессам. На сегодняшний день получено множество трансгенных растений устойчивых к абиотическим стрессам: растения, сверхэкспрессирующие гены осмопротекторов, фитогормонов, различных транскрипционных факторов, сигнальных молекул и так далее (Agarwal et al., 2010).

К элементам первичного ответа на природные сигналы относятся различные сигнальные молекулы и белки, осуществляющие фосфорилирование/дефосфорилирование или участвующие в фосфолипидном метаболизме и так далее. Известно, что их сверхэкспрессия придает высокую устойчивость растениям к абиотическим стрессам (Agarwal et al., 2010). Одним из механизмов передачи внешних стимулов является митоген-активируемая протеинкиназная сигнальная система (МАРК). Важными звеньями МАРК-сигнального каскада являются связанные между собой протеинкиназы МАРККК (MAP kinase kinase kinase), МАРКК (mitogen-activated protein kinase kinase) и МАРК (mitogen-activated protein kinase). Увеличение устойчивости к засухе, солевому и холодovому стрессам в трансгенных растениях риса, сверхэкспрессирующих OsМАРК5 и OsМАРК44, описано Xiong с коллегами (2003) и Jeong с коллегами (2006). Tang с коллегами получили трансгенные растения картофеля, сверхэкспрессирующие ген нуклеотид дифосфаткиназы *NDPK2*, устойчивые к высокотемпературному стрессу (Tang et al., 2008). Ген *NDPK* играет ключевую роль в передаче сигнала связанного с окислительным стрессом (Otero, 2000).

Транскрипционные факторы взаимодействуют с цис-элементами в промоторной области генов, активируя их экспрессию. Так, транскрипционные факторы играют ключевую роль в развитии устойчивости растений к различным природным воздействиям. Транскрипционные факторы занимают значительный объем в геноме и могут быть отнесены более чем к 50 семействам. В обзоре Wang с коллегами (2016) приводится множество примеров трансгенных растений, сверхэкспрессирующих различные транскрипционные факторы и проявивших повышенную устойчивость к абиотическим стрессам (Wang et al., 2016).

У высших растений семейство транскрипционных факторов Муб представлено большим числом генов. Растения арабидопсиса, трансгенные по гену *TaMUB2A*, показали увеличение устойчивости к засухе, солевому

стрессу и холоду. Трансгенные растения табака по гену *TaPIMP1* (из пшеницы) были устойчивы к засухе (Liu et al., 2011). Трансгенные растения риса, сверхэкспрессирующие ген *ZmWRKY58* (из семейства транскрипционных факторов WRKY), были устойчивы к засухе и солевому воздействию (Cai et al., 2014).

Осмолиты являются метаболитами с низкой молекулярной массой и известны как растворимые вещества, не влияющие на клеточные функции. Такие осмолиты, как глицинбетаин, фруктаны, трегалоза, маннитол, сорбитол и ононитол, являются осмопротекторами. Гены биосинтеза многих осмолитов были клонированы, а затем перенесены под сильные промоторы в растения (Agarwal et al., 2010). Например, растения риса сверхэкспрессирующие ген трегалозо-6-фосфат синтазы (*OsTPS1*, ген выделенный из *Oriza sativa*), показали увеличение устойчивости к холоду, высоким концентрациям соли и засухи (Li et al., 2011). Известно, что биосинтез пролина происходит в результате действия таких абиотических стрессов, как соль и засуха (Molinari et al., 2004; Zhu et al., 2005). Получены растения табака (Kishor et al., 1995; Hong et al., 2000), риса (Zhu et al., 1998; Su et al., 2004) и арабидопсиса (Nanjo et al., 1999; Ma et al., 2008), сверхэкспрессирующие фермент P5CS, показавшие устойчивость к солевому стрессу.

Абиотические стрессы вызывают образование активных форм кислорода (АФК), а именно синглетный кислород (O_2^*), радикалы супероксид аниона ($H_2O_2^{\cdot-}$), гидроксил-радикала ($OH^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2). АФК выступают в роли сигнальных молекул, которые регулируют стрессовый ответ для поддержания роста и развития растений. Некоторые ферменты вовлечены в детоксификацию антиоксидантных веществ. Так, супероксиддисмутаза (SOD) превращает супероксид в H_2O_2 , которая в дальнейшем инактивируется каталазой. Аскорбатпероксидаза (APX) также инактивирует H_2O_2 и присутствует в различных изоформах в различных органеллах растений. Ген *Chl-APX5* (из арабидопсиса) в трансгенных

растениях табака увеличивал устойчивость к солевому стрессу и засухе (Badawi et al., 2004). Ген *Cu/MgSOD* (из мангрового дерева *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.) придавал устойчивость трансгенным растениям риса к солевому стрессу и засухе (Prashanth et al., 2008). Растения риса, сверхэкспрессирующие ген каталазы *katE* из *Eschrechia coli*, были устойчивы к солевому воздействию (Moriwaki et al., 2008).

Растения используют ионный и осмотический гомеостаз для восстановления при неблагоприятных условиях, применяя различные стратегии для поддержания низкого уровня Na^+ в клетках. Например, выведение излишка Na^+ с помощью мембранного Na^+/H^+ - антипортера *SOS1* или посредством депонирования чрезмерного количества ионов в вакуоли через вакуолярные Na^+/H^+ - антипортеры. Транспортные протеины являются важными кандидатами для направления создания растений, устойчивых к различным абиотическим стрессам, но особенно к высоким концентрациям соли. Трансген *NHX1* в растениях арабидопсиса увеличивал способность к фотопротекции под действием солевого стресса и засухи (Liu et al., 2010). Сверхэкспрессия гена *SOS1* увеличивала устойчивость растений табака к солевому стрессу (Yue et al., 2012). Сверхэкспрессия гена *SsVP* (из галофита *Suaeda salsa* (L.) Pall.) H^+ -вакуолярной фитофосфатазы увеличивала устойчивость растений арабидопсиса к соли и засухе (Guo et al., 2006).

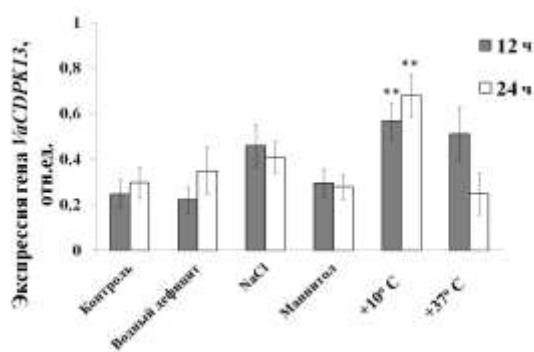
1.8. Экспрессия генов *CDPK* в *V. amurensis* под влиянием абиотических стрессов

Ранее нами (Dubrovina et al., 2013) была проведена работа по выявлению генов *CDPK*, участвующих в регуляции ответа растений *V. amurensis* на абиотические стрессовые факторы. Экспрессия 10 генов (*VaCDPK 1, 2, 3, 9, 13, 16, 20, 21, 26* и *29*) значительно изменялась в ответ на воздействие абиотических стрессов (температурный, осмотический, солевой стрессы). Таким образом, полученные данные указывают на то, что эти гены могут быть вовлечены в ответ винограда на осмотический, солевой и

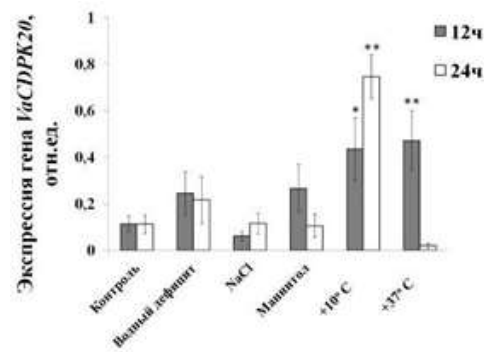
температурные стрессы как позитивные регуляторы (Dubrovina et al., 2013). Особое внимание привлекли гены *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29*. Уровень транскрипции гена *VaCDPK13* значительно увеличивался при холодном стрессе (рис. 1А). Значительное увеличение экспрессии гена *VaCDPK20* наблюдалось в растениях *V. amurensis* в ответ на температурные стрессы (рис. 1Б). Уровень транскрипции гена *VaCDPK21* значительно возрастал при тепловом, солевом и осмотическом стрессах (рис. 1В), а экспрессия гена *VaCDPK26* была достоверно выше относительно контроля при солевом воздействии и при холодном стрессе у растений *V. amurensis* (рис. 1Г). Значительное увеличение числа транскриптов гена *VaCDPK29* наблюдалось при высоких концентрациях маннитола, водном дефиците и при температурных стрессах (рис. 1Д).

Таким образом, проанализировав имеющуюся информацию, нами была проведена серия экспериментов по изучению вовлеченности генов *VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29 в устойчивость растений *V. amurensis* к абиотическим стрессам.

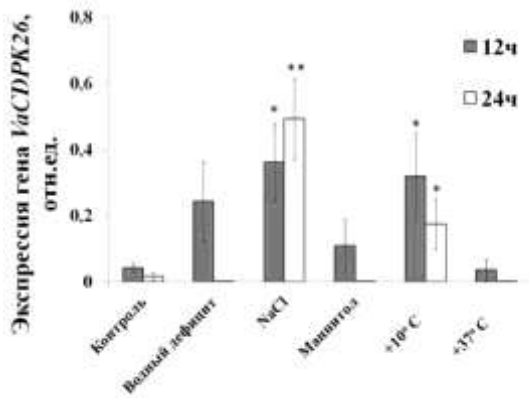
А



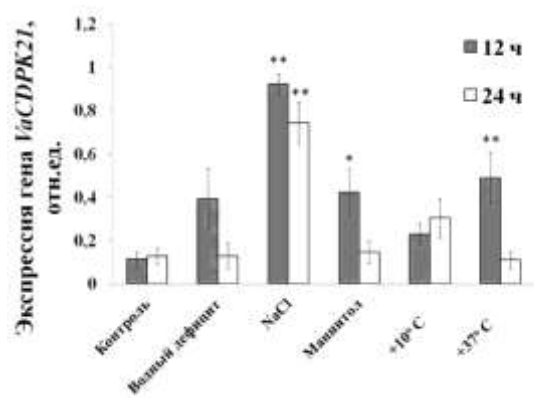
Б



В



Г



Д

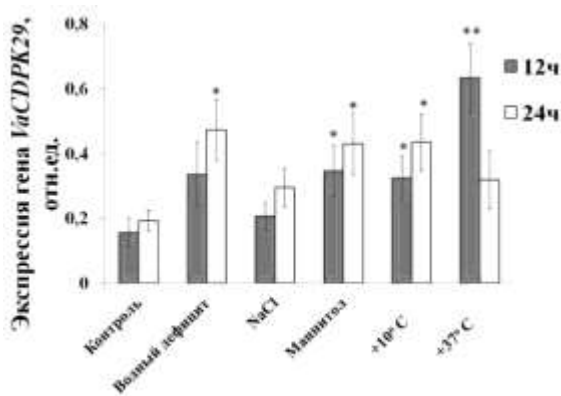


Рис. 1. Экспрессия генов *VaCDPK13* (А), *VaCDPK20* (Б), *VaCDPK21* (В), *VaCDPK26* (Г), *VaCDPK29* (Д) после 12 ч (серый цвет) и 24 ч (белый цвет) воздействия контрольных условий (дистиллированная вода), солевого стресса (0.4 М NaCl), осмотического стресса (0.4 М маннитол), водного дефицита (безводные условия), высокой температуры (+37°C) и низкой температуры и (+10°C) (по: [Dubrovina et al., 2013](#)). Данные представлены как среднее значение \pm CO. ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ по сравнению с экспрессией *VaCDPK* в контрольных условиях.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

Для получения трансгенных растений использовали *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia. Семена дикого типа и трансгенных растений проращивали на среде Мурасига и Скуга (MS) в чашках Петри, среда для трансгенных растений содержала канамицин 50 мкг/мл. Через неделю подросшие растения переносили в грунт и выращивали при температуре +22°C с фотопериодом 16 часов день и 8 часов ночь, освещенностью $\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ в климокамере (Panasonic MLR-352, Япония). Каллусная культура V2 была получена в 2002 году из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis*, которое было собрано на Дальнем Востоке (юг Приморского края) и определено в отделе ботаники Биолого-почвенного института ДВО РАН. Для проведения экспериментов на культуре клеток винограда мы использовали $W_{B/A}$ 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 $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.2. Получение трансгенных каллусных клеточных линий *V. amurensis* с помощью агробактериальной трансформации

Для трансформации клеточной культуры V2 *V. amurensis* мы амплифицировали полноразмерные кодирующие последовательности генов *VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29 (номера доступа в GenBank: KC488320, KC488322, KC488318, KC488323, KC488317 соответственно). Для этого использовали кДНК культуры клеток V2 и геноспецифичные пары праймеров (табл. 1). Полученные ампликоны генов *VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29 были выделены из геля с помощью набора Glass Milk (Силекс, Москва) и клонированы в вектор pTZ57R/T, согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Вильнюс, Литва). Затем, используя праймеры (табл. 2), содержащие в своей последовательности сайты рестрикции для рестриктаз, мы амплифицировали

полные последовательности *VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29. В качестве матриц использовали предварительно полученные генетические конструкции pTZ57-*VaCDPK13*, pTZ57-*VaCDPK20*, pTZ57-*VaCDPK21*, pTZ57-*VaCDPK26* и pTZ57-*VaCDPK29*. Полученные ПЦР-продукты переносили в вектор pSAT1 (по: Tzfira et al., 2005). В данной конструкции гены *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26*, *VaCDPK29* находились под контролем 2*35S CaMV (рис. 2). После этого мы перенесли кассеты, содержащие *VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29, соответственно, из вектора pSAT1 в вектор pZP-RCS2-*nptII* (Tzfira et al., 2005), используя соответствующие сайты для рестрикции (табл. 2) (СибЭнзим, Новосибирск, Россия). Далее генетические конструкции pZP-RCS2-*VaCDPK13-nptII*, pZP-RCS2-*VaCDPK20-nptII*, pZP-RCS2-*VaCDPK21-nptII*, pZP-RCS2-*VaCDPK26-nptII* и pZP-RCS2-*VaCDPK29-nptII* были перенесены в агробактерии штамма *A. tumefaciens* GV3101::pMB90. Выделение ДНК из клеточных линий осуществляли, используя модифицированный метод Echt и др. (Kiselev et al., 2015). Трансгенность полученных линий была доказана, как описано ранее (Aleynova-Shumakova et al., 2014; Aleynova et al., 2015). В результате независимых трансформаций суспензионной культуры V2 штаммом *A. tumefaciens* получены трансгенные клеточные линии: КА15-I, II, III, IV; КА09-I, II, III, IV, V; КА07-I, II, III, IV, V, VI; КА18-I, II, III, IV; КА10-I, II, III, IV, сверхэкспрессирующие гены *VaCDPK13*, 20, 21, 26, 29 соответственно. Сходным способом была получена контрольная клеточная линия КА0, которая была трансформирована только геном *nptII*, кодирующим устойчивость к канамицину.

Табл. 1. Праймеры для получения полных последовательностей кДНК генов *CDPK* винограда.

Ген	праймер, 5'-3'
<i>VaCDPK13</i> (2a) (KC488320)	5'ATG GGG AAC TGT TGC AGA TC 5'TTA CTC ATT CCC CAA GTT TAG
<i>VaCDPK20</i> (3c) (KC488322)	5'ATG GGG AAC ACA TGT GTA GGA 5'TTA GGT TAT TTT GTA TCC CTT CTT
<i>VaCDPK21</i> (1d) (KC488318)	5'ATG GGT TGT TTT AGC AGT AAG 5'AAA TAG CTT GAC TGG CGG TT
<i>VaCDPK26</i> (3d) (KC488323)	5'ATG GGC AAC ACA TGC CGG GGA 5'CTA AAA AGC TCC TGG TGC ATC TC
<i>VaCDPK29</i> (1a) (KC488317)	5'ATG GGT TTC TGC TTC TCC AG 5'TTA TCT CTG CTT CAA CTC GGT ATC

Табл. 2. Праймеры и рестриктазы для получения бинарных векторов. В последовательности праймеров жирным шрифтом с подчеркиванием отмечены сайты рестрикции.

Ген	праймер, 5'-3'	Рестриктазы
<i>VaCDPK13</i>	5'GCTC <u>GAGCTC</u> ATGGGGAAC TGTGCAGAT 5'TCGA <u>GGTACC</u> CTTACTCATCCCCAAGTTTAG	SacI KpnI
<i>VaCDPK20</i>	5'GCTC <u>CTCGAG</u> ATGGGGAACACATGTGTAGGA 5'TCGA <u>GGATCC</u> TTAGGTATTTTGTATCCCTTCTT	XhoI BamHI
<i>VaCDPK21</i>	5'GCTC <u>CTCGAG</u> ATGGGTTGTTTTAGCAGTAA 5'TCGA <u>GGATCC</u> AAATAGCTTGA CTGGCGGT	XhoI BamHI
<i>VaCDPK26</i>	5'CTC <u>GAGCTC</u> ATGGGCAACACATGCCGGGGA 5'CGAT <u>TCTAGA</u> CTAAAAAGCTCCTGGTGCATCTC	SacI Xba I
<i>VaCDPK29</i>	5'ACTC <u>GAGCTC</u> ATGGGTTTCTGCTTCTCCAG 5'TCGA <u>GGATCC</u> TTATCTCTGCTTCACTCGGTATC	SacI BamHI

Суспензионную культуру клеток *V. amurensis* V2 трансформировали штаммами агробактерий, полученными по методике, описанной ранее (Kiselev et al., 2007). После трансформации каллусы культивировали в течение трех месяцев в присутствии 250 мг/л цефотаксима для подавления

роста агробактерий и на канамицине (10-15 мг/л) для отбора трансгенных клеточных агрегатов.

2.3. Получение трансгенных растений с помощью метода цветочного погружения

На первом этапе работы мы получили штаммы агробактерий *A. tumefaciens* КА07, КА09, КА10 и КА18, содержащие бинарные вектора (плазмиды pZp-RCS и РМР90), в состав которых входили целевые гены *VaCDPK21*, 20, 29, 26 под контролем 2*35S CaMV промотора соответственно, селективный ген *nptII*, а также гены *Vir* (рис. 2Б). Кроме того, мы получили контрольный штамм *A. tumefaciens* КА0, содержащий бинарный вектор, в состав которого входили только ген *nptII* и гены *Vir* (рис. 2А).

Растения арабидопсиса, трансгенные по генам *VaCDPK20* (линии 09-1, 09-11, 09-20), *VaCDPK21* (линии 07-1, 07-3, 07-10), *VaCDPK26* (линии 18-1, 18-2, 18-3, 18-4) и *VaCDPK29* (линии 10-8, 10-16, 10-18, 10-19) получены в результате независимых трансформаций *A. thaliana* штаммами *A. tumefaciens* GV3101::pMP90, содержащие вектора pZP-RCS2-*nptII*-*VaCDPK20*, pZP-RCS2-*nptII*-*VaCDPK21*, pZP-RCS2-*nptII*-*VaCDPK26* и pZP-RCS2-*nptII*-*VaCDPK29* соответственно. Также была произведена трансформация *A. thaliana* штаммом *A. tumefaciens* GV3101::pMP90, содержащим вектор pZP-RCS2-*nptII* (рис. 2А), в результате чего была получена контрольная трансгенная линия растений *A. thaliana*. Перед трансформацией арабидопсиса мы инокулировали полученный штамм агробактерий в жидкую среду Лурия-Бертани (LB), содержащую необходимые антибиотики. Трансформацию проводили методом цветочного погружения (Zhang et al. 2006).

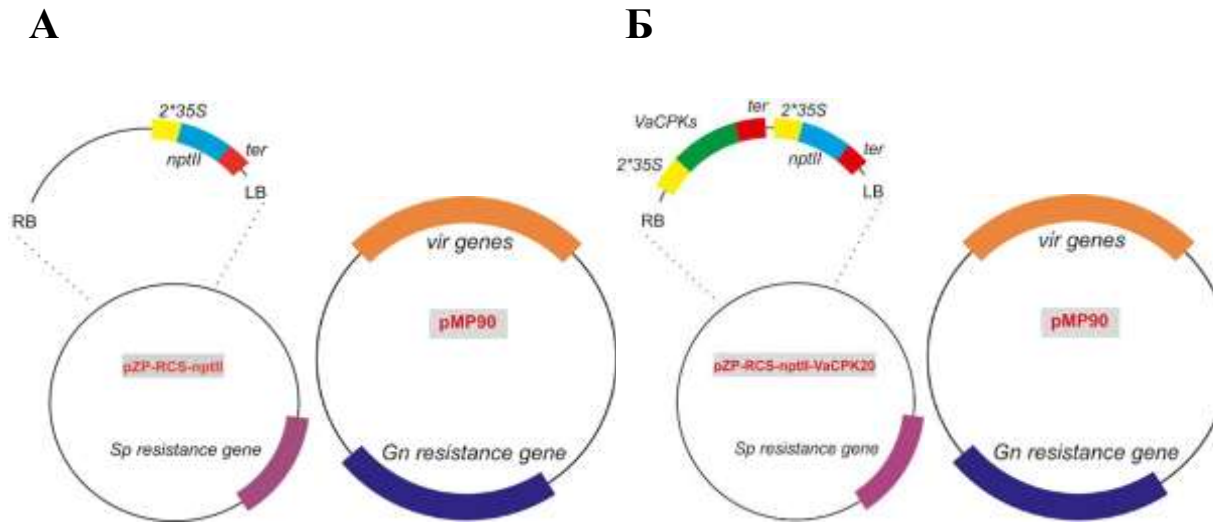


Рис. 2. Бинарные векторные конструкции, используемые для агробактериальной трансформации. А – бинарный вектор для получения контрольного штамма агробактерий КА0. В состав вектора входят плаزمиды рZP-RCS-*nptII*, содержащая RB – и LB – правый и левый бордер, 2*35S – конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты, *nptII* – ген неомилцилфосфотрансферазы, *ter* – терминатор, *Sp* resistance gene – ген устойчивости к спектиномицину; плазмиды рMP90, содержащая *vir* – гены и ген устойчивости к гентамицину (*Gn* resistance gene). Б – бинарный вектор для получения штаммов КА07, КА09, КА10, КА15, КА18. В состав вектора входят плазмиды рZP-RCS-*nptII*, содержащая RB – и LB – правый и левый бордер, 2*35S – конститутивный промотор вируса мозаики цветной капусты, *VaCDPK* – целевые гены, *nptII* – ген неомилцилфосфотрансферазы, *ter* – терминатор, *Sp* resistance gene – ген устойчивости к спектиномицину; плазмиды рMP90 – содержащая *vir*-гены и ген устойчивости к гентамицину (*Gn* resistance gene).

2.4. Проверка трансгенности трансформированных растений *A. thaliana*

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* (табл. 3). кДНК амплифицировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 × TaqMan буфер, 2.5 mM MgCl₂, 250 мкМ dNTP, 2 единицы активности Taq ДНК полимеразы (Силекс, Москва, Россия), 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 95°C в течение 10 сек и 62°C в течение 25 сек (Kiselev et al., 2015).

Табл. 3. Праймеры для определения экспрессии трансгена *VaCDPK* в трансгенных растениях.

Ген	Праймеры для доказательства трансгенности растений, 5'–3'
<i>VaCDPK20</i>	5'TCG AGA AGG AGG ATC ATT TGT 5'GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG
<i>VaCDPK21</i>	5'ATG GCA ATG GAA CGA TTG AC 5'GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG
<i>VaCDPK26</i>	5'TAT GAT GCA AAA GGG CAA TGC 5'GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG
<i>VaCDPK29</i>	5'GAA TGG GGG ATG AAG CGA CT 5'GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG

2.5. Воздействие абиотических стрессов на трансгенные клеточные линии *V. amurensis*

Для анализа воздействия абиотических стрессовых факторов на устойчивость трансгенных клеточных линий *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK13*, *20*, *21*, *26*, *29*, мы исследовали влияние температурного, осмотического и солевого стрессов на накопление биомассы полученных трансгенных клеточных линий КА15 – I, II, III, IV;

KA07 – I, II, III, IV, V, VI; KA09 – I, II, III, IV, V; KA10 – I, II, III, IV; KA18 – I, II, III, IV. Для изучения влияния холодого и теплового стрессов клеточные линии культивировали на стандартных средах $W_{B/A}$ (Kiselev et al., 2011), при температурах $+16^{\circ}\text{C}$ и $+33^{\circ}\text{C}$ в термостатах с функцией нагрева и охлаждения (ТСО-1/80 СПУ, СКТЬ, Смоленск, Россия). Для изучения влияния солевого стресса на рост трансгенных клеточных линий использовали питательные среды, содержащие NaCl в концентрации 50, 60, 100 и 120 мМ. Осмотический стресс индуцировали, добавляя в среду маннитол в концентрациях 200 и 300 мМ.

2.6. Воздействие абиотических стрессов на растения *A. thaliana*

Для изучения устойчивости трансгенных растений *A. thaliana* к абиотическим стрессовым воздействиям растения выращивали в горшках в климатических камерах (Panasonic MLR-352, Япония) при температуре $+22^{\circ}\text{C}$, 16 часов день/8 часов ночь, освещенности $\sim 120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Семена арабидопсиса проращивали на твердой среде W0 с уменьшенным содержанием макро - и микросолей в 2 раза (Kiselev et al., 2007). На 7 день проростки пересаживали в землю 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 $+45^{\circ}\text{C}$ в течение 3.5 часов в термостате (ES-20/60 BioSan, Рига, Латвия). Холодовой стресс был индуцирован температурой -10°C в морозильной камере (LG, GA B489YVCZ, Республика Корея) 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 в течение 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.

Для изучения влияния солевого стресса на проростки арабидопсиса пятидневные стерильные проростки трансгенных растений, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, и проростки контрольных растений высаживали на чашки Петри на твердую среду MS, содержащую NaCl в концентрации 300 мМ. Проростки культивировали при температуре +23° С с фотопериодом 16 часов день и 8 часов ночь в течение трех дней, после чего определяли эффект воздействия тестируемых абиотических стрессовых факторов путем подсчета живых растений.

2.7. Количественная оценка экспрессии генов

Выделение РНК из клеточных линий *V. amurensis* и растений *A. thaliana* осуществляли на основе СТАВ протокола (по: [Bekesiova et al., 1999](#)). кДНК была синтезирована как описано ранее ([Kiselev et al., 2007](#)). Доказательство экспрессии экзогенных и эндогенных *VaCDPK13, 20, 21, 26* и *29*, а также их суммарной экспрессии генов в трансгенных клеточных линиях *V. amurensis* проводили с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ). ПЦР РВ был выполнен согласно методике, описанной ранее ([Livak and Schmittgen, 2001](#)).

Суммарную экспрессию эндогенных и экзогенных *VaCDPK* анализировали с помощью пары праймеров, подобранных к последовательностям киназного домена. Экспрессию эндогенных генов *VaCDPK* изучали в трансгенных клеточных линиях, используя праймеры, один из которых был подобран к концу белок-кодирующей последовательности *VaCDPK*, а другой – к последовательности 3'-нетранскрибируемой области (3'UTR) гена *VaCDPK*. Экспрессию трансгена

VaCDPK определяли, используя пару праймеров, подобранных к концу белок-кодирующей последовательности гена *VaCDPK* и к последовательности CaMV 35S терминатора, находящегося в бинарной конструкции *pZP-RCS2-nptII-VaCDPK*. Геноспецифичные пары праймеров представлены в табл. 4.

Табл. 4. Праймеры для определения суммарной, эндогенной экспрессии и экспрессии трансгена *VaCDPK*.

Ген	Праймеры для определения суммарной экспрессии, 5'-3'	Праймеры для определения эндогенного <i>VaCDPK</i> , 5'-3'	Праймеры для определения экспрессии трансгена, 5'-3'
<i>VaCDPK13</i>	5'TATTCTTCAAGCCAGGTGAGA 5'CCATAATTCGCTTGAGGAC	5'CTTCTAGGCATTATTCAAGAG G 5'CTTGTGTGGATGAACAAAAGA C	5'CTTCTAGGCATTATTCAAGAGG 5'GAGAGACTGGTGATTTTTGCG
<i>VaCDPK20</i>	5'TCGAGAAGGAGGATCATTGT 5'TTAGGTTATTTGTATCCCTTC TT	5'TCGAGAAGGAGGATCATTGT 5'TTGTGGCATTTCGAGGATCAAG	5'TCGAGAAGGAGGATCATTGT 5'GAGAGACTGGTGATTTTTGCG
<i>VaCDPK21</i>	5'TCAGGGGCATTACTCTGAGA 5'TGCTTCATCCTTGCTGGACAA	5'ATGGCAATGGAACGATTGAC 5'ACATTCAGCAACCATCACTGA	5'ATGGCAATGGAACGATTGAC 5'GAGAGACTGGTGATTTTTGCG
<i>VaCDPK26</i>	5'TATGATGCAAAAAGGGCAATGC 5'CTCCTGGTGCATCTCTCAA	5'TATGATGCAAAAAGGGCAATGC 5'CGATTCTCCTTTCTAGCTCA	5'TATGATGCAAAAAGGGCAATGC 5'GAG AGA CTG GTG ATT TTT GCG
<i>VaCDPK29</i>	5'CGGCGAAAGGTAGTTATTC 5'TTCTCAGGCTTCAAGTCCCT	5'GAATGGGGGATGAAGCGACT 5'TTAAACTTATCTCTGCTTCCAC	5'GAATGGGGGATGAAGCGACT 5'GAGAGACTGGTGATTTTTGCG

кДНК амплифицировали с реактивом EvaGreen (Biotium, Хейвард, США) как описано ранее (Dubrovina et al., 2013). Для амплификации использовали амплификатор с функцией детекции результатов в реальном времени (ДНК Технология, Москва, Россия). Уровень экспрессии генов определен по формуле $2^{-\Delta\Delta CT}$. Полученное наивысшее значение экспрессии, накопленное отдельным образцом, было принято за единицу относительно количества мРНК. Гены *VaActin1* (GenBank DQ517935) и *VvGAPDH* (GenBank GU585870) использованы в качестве внутренних контролей для нормализации количества кДНК в каждой реакции ПЦР РВ для *V. amurensis*. Данные гены выбраны в качестве наиболее подходящих референсных генов для ПЦР РВ с генами рода *Vitis* (Reid et al., 2006). Гены *AtGAPDH* и *AtActin* выбраны в качестве наиболее подходящих референсных генов для ПЦР РВ с

генами арабидопсиса (Czechowski et al., 2005). Дизайн праймеров для оценки экспрессии стресс-индуцируемых генов (табл. 5) был взят из ранее опубликованных работ (Wang et al., 2011; Xiong et al., 2013; Zhao et al., 2013). Данные ПЦР РВ получены минимум из двух независимых экспериментов.

Суммарную РНК выделяли: из пятидневных растений, находящихся в условиях засухи (5 недель без воды) и в стандартных условиях (полив раз в неделю); из трехдневных растений в стандартных условиях (+22°C) и после 20-часового воздействия 350 мМ NaCl; после холодового воздействия (-10°C 45 минут) и 1 час после холодового воздействия; после теплового стресса (+45°C, 1.5 часа).

Табл. 5. Праймеры для амплификации кДНК *V. amurensis* и *A. thaliana* в ПЦР РВ.

Название гена (Генбанк)	Последовательность праймера, 5' - 3'
<i>VaActin1</i> (DQ517935)	GTA TTG TGC TGG ATT CTG GTG A GCA AGG TCA AGA CGA AGG ATA G
<i>VaGAPDH</i> (GU585870)	CAC TGA AGA TGA TGT TGT TTC C GCT ATT CCA GCC TTG GCA T
<i>AtActin2</i> (NM_112764)	GATTCAGATGCCCAGAAGTC TACCGTACAGATCCTTCCTG
<i>AtGAPDH</i> (NM_111283)	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA AAACTTGTCGCTCAATGCAAT
<i>AtRD29A</i> (NM_124610)	ATC ACT TGG CTC CAC TGT TGT TC ACA AAA CAC ACA TAA ACA TCC AAA G
<i>AtRD29B</i> (NM_124609)	GGA ATC CGA AAA CCC CAT AGT C GGA GTG AAG GAG ACG CAA CAA G
<i>AtCOR47</i> (NM_101894)	GAA AAG CTT CAC CGA TCC AA TAC CGG GAT GGT AGT GGA AA
<i>AtRD22</i> (NM_122472)	CAT GAG TCT CCG GGA GGA AGT G CGG CTG GGG TAA AGA AGT TGT C
<i>AtDREB1A</i> (NM_118680)	TGC GTT GGC GTT TCA GGA TG CAA ACT CGG CAT CTC AAA CAT CG
<i>AtDREB2A</i> (NM_120623)	CTG GAG AAT GGT GCG GAA GA CAG ATA GCG AAT CCT GCT GTT GT
<i>AtABF3</i> (NM_001036708)	CAA CAT CAG CAA TGG TAA TAG TGG A CGT CCG AGG CAA GGT AAG TG
<i>AtCBF1</i> (NM_118681)	GTT TGG GAT GCC GAC TTT GTT ACC ATC TCC TTC GCC GTC AT
<i>AtKIN1</i> AY114587	CCA ACA AGA ATG CCT TCC AAG C GCT GCC GCA TCC GAT ACA CT
<i>AtLEA</i> (NM_127721)	GAG CAT CTT CGT CGG TCT GGA CTC GTG AGG TTG GTC GGT AGT G
<i>AtP5CS</i>	AGC AGC CTG TAA TGC GAT GG

(NM_001125374)	AAG TGA CGC CTT TGG TTT GC
<i>AtCAT1</i> (NM_101914)	AGC GCT TTC GGA GCC TCG TG GGC CTC ACG TTA AGA CGA GTT GC
<i>AtCSD1</i> (NM_100757)	GTT GGT AGG GCT GTT GTT GTC TGG ACC TCC TTA TTA CAT CAA
<i>AtCSD2</i> (NM_128379)	TTA GTC TGA CCA CTG GAA ACG C GGA TGC TAA ATA AAC CAA AAT GTA
<i>AtNHX1</i> (NM_122597)	CCG TGC ATT ACT ACT GGA GAC AAT GTA CAA AGC CAC GAC CTC CAA
<i>AtSOS1</i> (NM_126259)	TCG TTT CAG CCA AAT CAG AAA GT TTT GCC TTG TGC TGC TTT CC
<i>AtRD26</i> (NM_118875)	GAT GTG AAG TTA CTG ATG GGT GAA GCG AGC CAA GTC ACA AGG AG
<i>AtCOR15</i> (NM_001202804)	AAC TCT GCC GCC TTG TTT GC AGT CGT TGA TCT ACG CCG CTA A
<i>AtLtp3</i> (NM_125323)	TTT CGC TTT GAG GTT CTT C TGG AAT GCT AAC ACC GC
<i>AtRab18</i> (NM_126038)	GCA GTA TGA CGA GTA CGG AAA TCC CCT TGT CCA TCA TCC GAG CTA GA
<i>AtABA1</i> (NM_180954)	GCT ATG AAG GTG ATC TGC TTG TGG TTC ATA CCA TTT GGA GCA TCA GC
<i>AtABA2</i> (AY082345)	ATT GAT CAC TGG AGG AGC CAC AG ATT ACG AAT ATC AGG GCA CGG TG
<i>AtABI1</i> (AY142623)	AGC TGC TGA TAT AGT CGT CGT TGA TA GAG GAT CAA ACC GAC CAT CTA ACA
<i>AtABI2</i> (NM_001345230)	GTT CTT GTT CTG GCG ACG GAG C CCA TTA GTG ACT CGA CCA TCA AG
<i>AtABI3</i> (NM_113376)	CAC AGC CAG AGT TCC TTC CTT TAC T TAG TTG CTG AGG AAC ACA AAC GG
<i>AtABI4</i> (NM_129580)	ACA AGA TTT CTG ACA TCG AGC TCA C ATC CAT CTC CAA CCA TAT AAC CCG
<i>AtABI5</i> (NM_001336591)	AGA GGG ATA GCG AAC GAG TCT AGT C GTT CGG GTT TGG ATT AGG TTT AGG

2.8. 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение клеточных линий *V. amurensis*, свехэкспрессирующих гены *VaCDPK*

VaCDPK-трансгенные клеточные линии *V. amurensis* получали методом агробактериальной трансформации суспензионной клеточной культуры винограда V2, которая была получена ранее из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis*. Для трансформации использовали штаммы агробактерий *A. tumefaciens* КА07, КА09, КА10, КА15, КА18, содержащие бинарные вектора, в состав Т-ДНК которых входили целевые гены *VaCDPK21*, *20*, *29*, *13*, *26* соответственно и ген *nptII*, кодирующий неомицинтрансферазу II, которая обеспечивает устойчивость растений к канамицину. В используемых векторных конструкциях гены *CDPK* и *nptII* находились под контролем 2*35S CaMV промотора. Суспензионная клеточная культура V2 была также трансформирована штаммом *A. tumefaciens* КА0, содержащим бинарный вектор, в состав которого входил только селективный ген *nptII*. После агробактериальной трансформации полученными бинарными векторами, несущими тот или иной ген *VaCDPK*, клетки винограда культивировали в течение 5 месяцев в присутствии 250 мг/л цефотаксима для подавления роста агробактерий и в течение трех-четырёх месяцев на питательной среде с добавлением 10–20 мг/л канамицина для отбора *VaCDPK*-трансгенных клеток *V. amurensis*. В ходе эксперимента было проведено несколько независимых трансформаций для каждого штамма агробактерий. В результате нами получено: пять трансгенных клеточных линий (КА09-I, II, III, IV, V), трансформированных *VaCDPK20* и *nptII*; шесть трансгенных клеточных линий (КА07-I, II, III, IV, V, VI) трансформированных *VaCDPK21* и *nptII*; четыре трансгенные клеточные линии (КА15-I, II, III, IV), трансформированных *VaCDPK13* и *nptII*; четыре трансгенные клеточные линии (КА18-I, II, III, IV), трансформированных *VaCDPK26* и *nptII*; четыре трансгенные клеточные линии (КА10-I, II, III, IV),

трансформированных *VaCDPK29* и *nptII*; и контрольная клеточная линия КА0, трансформированная только *nptII*.

Практически все трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие гены *VaCDPK*, имели рыхлую структуру, светлый серо-желтый цвет, как и векторная клеточная линия КА0.

3.2. Оценка экспрессии экзогенных и эндогенных *CDPK* в клеточных линиях *V. amurensis*

С помощью ПЦР нами показано, что все полученные клеточные линии несут ген устойчивости к канамицину *nptII*, что свидетельствует о факте вставки генетической конструкции, содержащей тот или иной ген *CDPK* в клетки винограда амурского. Образцы ДНК всех полученных клеточных линий не давали сигнал на ген *virB2*, что говорит об отсутствии в наших образцах примеси клеток агробактерий. С помощью метода ПЦР РВ, используя различные комбинации праймеров, проведена оценка экспрессии дополнительно введенных копий *CDPK* (трансгены), экспрессии эндогенных генов *CDPK* и тотальной экспрессии целевых *CDPK* (суммарная экспрессия внутриклеточной и дополнительной вставки гена) во всех полученных *CDPK*-трансгенных клеточных линиях *V. amurensis*.

В ходе независимых агробактериальных трансформаций геном *VaCDPK13* нами получено четыре клеточные линии *V. amurensis* (КА15-I, II, III, IV). Нами было отмечено, что все полученные клеточные линии КА-15, сверхэкспрессировали *VaCDPK13*, так как экспрессия трансгена *VaCDPK13* в этих линиях достоверно выше, чем базовая флюоресценция в векторной клеточной линии КА0 *V. amurensis* (рис. 3А). Показано, что в клеточных линиях КА15-I, II, III, IV экспрессия эндогенного *VaCDPK13* не отличалась от экспрессии *VaCDPK13* в контрольной клеточной линии КА0 (рис. 3Б). Суммарная экспрессия экзогенного и эндогенного *VaCDPK13* во всех полученных *VaCDPK13*-трансформированных клеточных линиях

V. amurensis достоверно выше, чем в контрольной клеточной линии КА0 (рис. 3В).

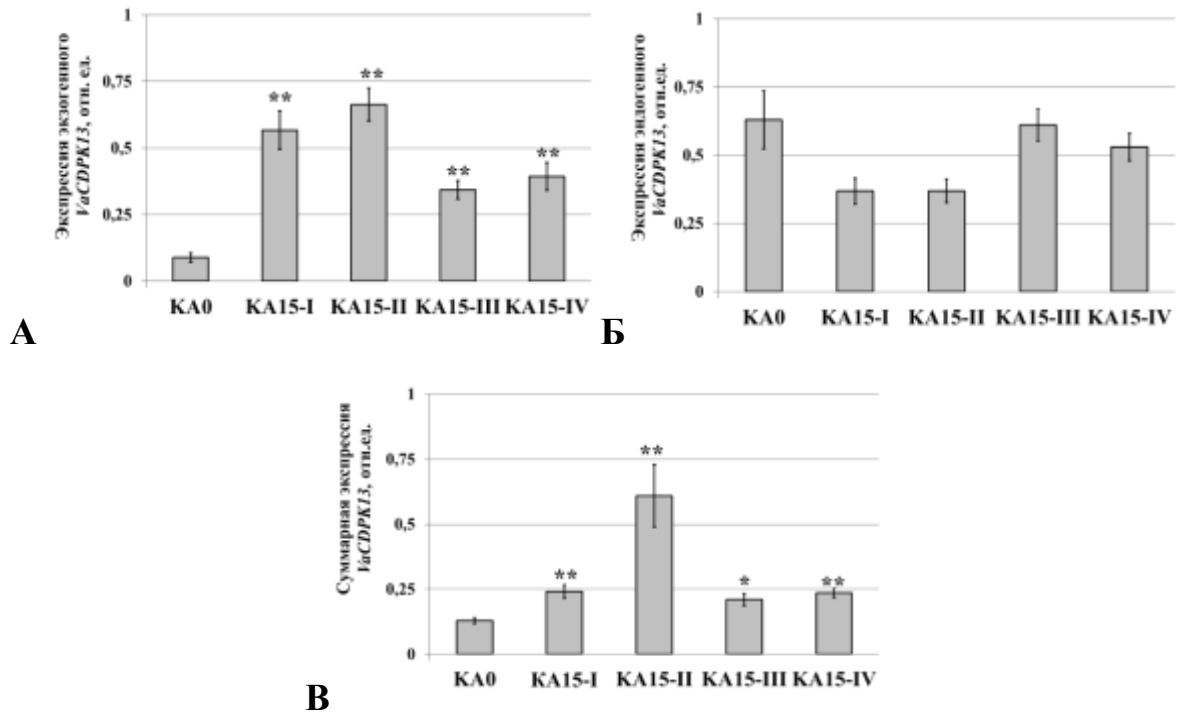


Рис. 3. Экспрессия гена *VaCDPK13* в клеточной линии КА0 и в *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линиях КА15-I, II, III, IV: А – экспрессия дополнительной вставки *VaCDPK13*; Б – экспрессия эндогенного *VaCDPK13*; В – суммарная экспрессия *VaCDPK13*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О.* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с КА0.

В ходе агробактериальной трансформации геном *VaCDPK20* было также получено пять клеточных линий КА09-I, II, III, IV, V. Установлено, что трансген *VaCDPK20* экспрессируется на высоком уровне во всех пяти клеточных линиях КА09 (рис. 4А). Экспрессия эндогенного гена *VaCDPK20* увеличивалась в 1.3 – 1.8 раза по сравнению с экспрессией в клеточной линии КА0 (рис. 4Б). Уровень суммарной экспрессии экзогенного и эндогенного *VaCDPK20* был достоверно выше в 1.8 – 3 раза относительно экспрессии в КА0 во всех полученных трансгенных клеточных линиях (рис. 4В).

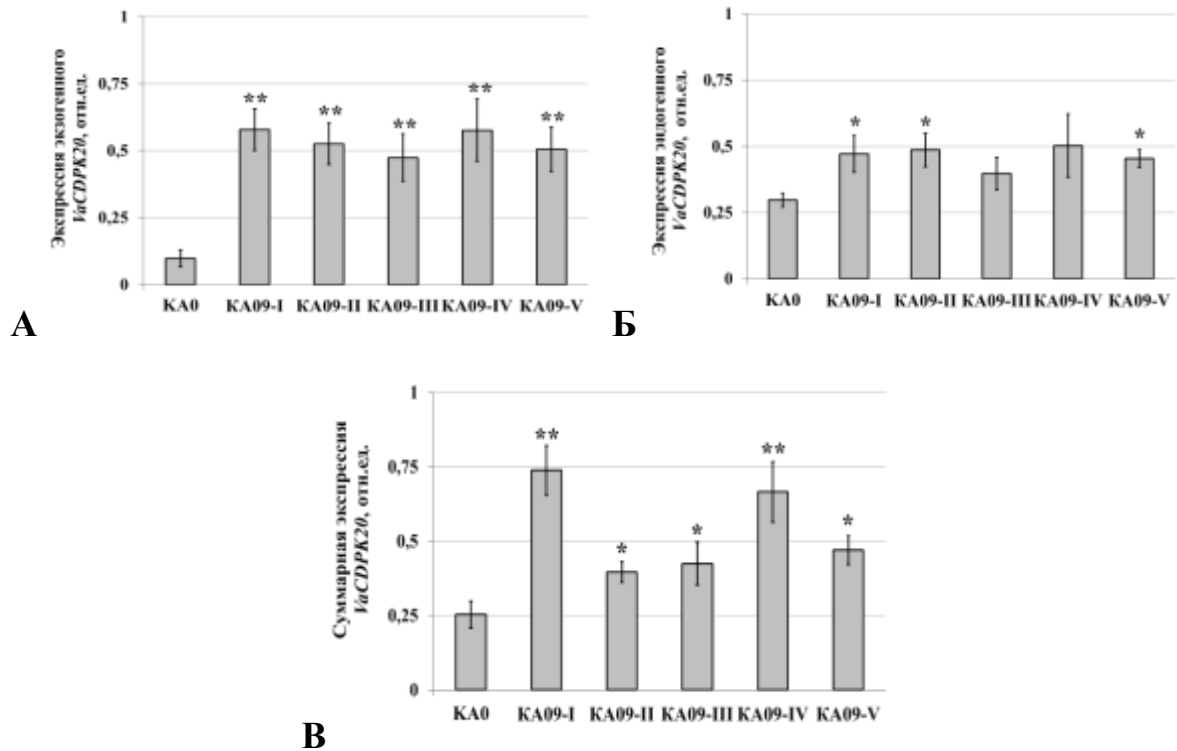


Рис. 4. Экспрессия гена *VaCDPK20* в клеточной линии KA0 и в *VaCDPK20*-трансгенных клеточных линиях KA09-I, II, III, IV, V: А – экспрессия дополнительной вставки *VaCDPK20*; Б – экспрессия эндогенного *VaCDPK20*; В – суммарная экспрессия *VaCDPK20*; Данные представлены как среднее значение \pm С.О.* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с KA0.

В ходе независимых агробактериальных трансформаций бинарным вектором, несущем в своей последовательности ген *VaCDPK21*, получено шесть клеточных линий *V. amurensis* KA07-I, II, III, IV, V, VI. Данные проведенных экспериментов демонстрируют, что трансген *VaCDPK21* активно экспрессировался во всех независимо полученных трансгенных клеточных линиях KA07-I, II, III, IV, V, VI (рис. 5А). Экспрессия эндогенного гена *VaCDPK21* в трансгенных клеточных линиях достоверно не отличалась от контроля KA0 (рис. 5Б). Уровень суммарной экспрессии *VaCDPK21* достоверно выше в KA07-II, III, VI клеточных линиях, сверхэкспрессирующих *VaCDPK21*, по сравнению с экспрессией *VaCDPK21* в контрольной линии KA0 (рис. 5В).

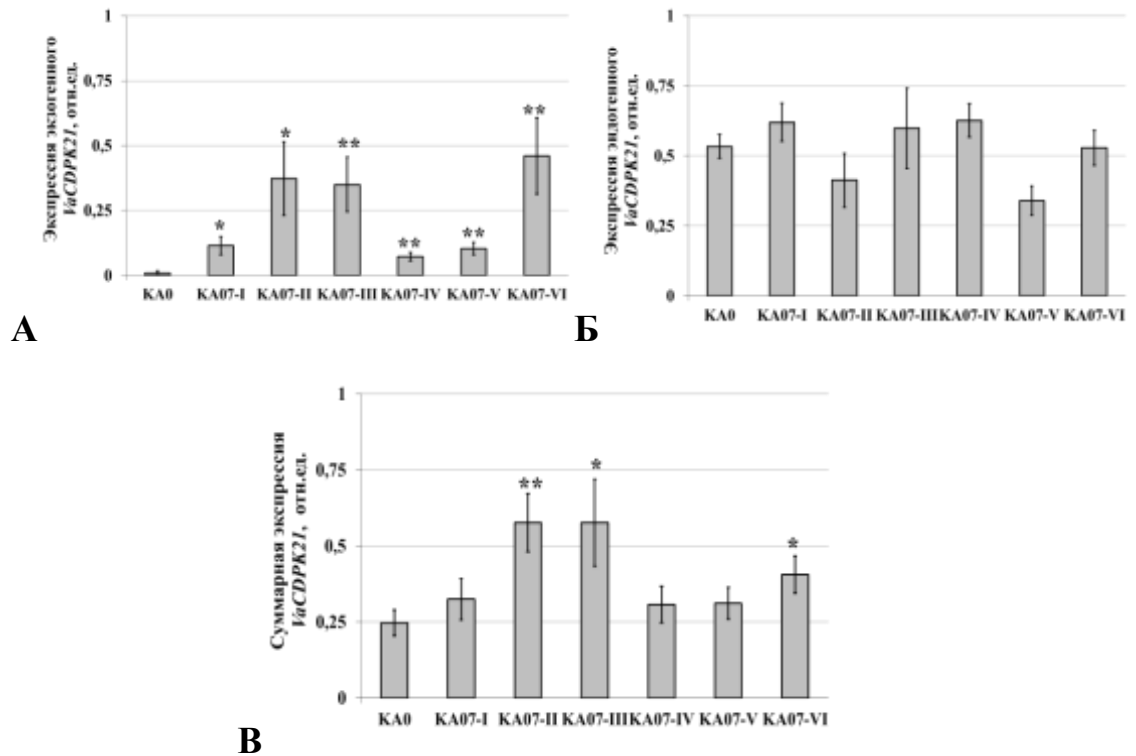


Рис. 5. Экспрессия гена *VaCDPK21* в клеточной линии KA0 и в *VaCDPK21*-трансгенных клеточных линиях KA07 - I, II, III, IV, V, VI: А – экспрессия дополнительной вставки *VaCDPK21*; Б – экспрессия эндогенного *VaCDPK21*; В – суммарная экспрессия *VaCDPK21*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О.* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с KA0.

С помощью агробактериальной трансформации получено четыре трансгенные клеточные линии KA18-I, II, III, IV, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*. Нами показано, что трансген *VaCDPK26* активно экспрессировался в линиях KA18-I и IV, и значения флюоресценции были достоверно выше базовой флюоресценции в контроле (рис. 6А). Экспрессия эндогенного гена *VaCDPK26* в полученных клеточных линиях KA18 не отличалась от экспрессии *VaCDPK26* в контрольной клеточной линии (рис. 6Б). Суммарная экспрессия экзогенного и эндогенного гена *VaCDPK26* достоверно выше в клеточных линиях KA18-I и IV относительно экспрессии в контроле KA0 (рис. 6А).

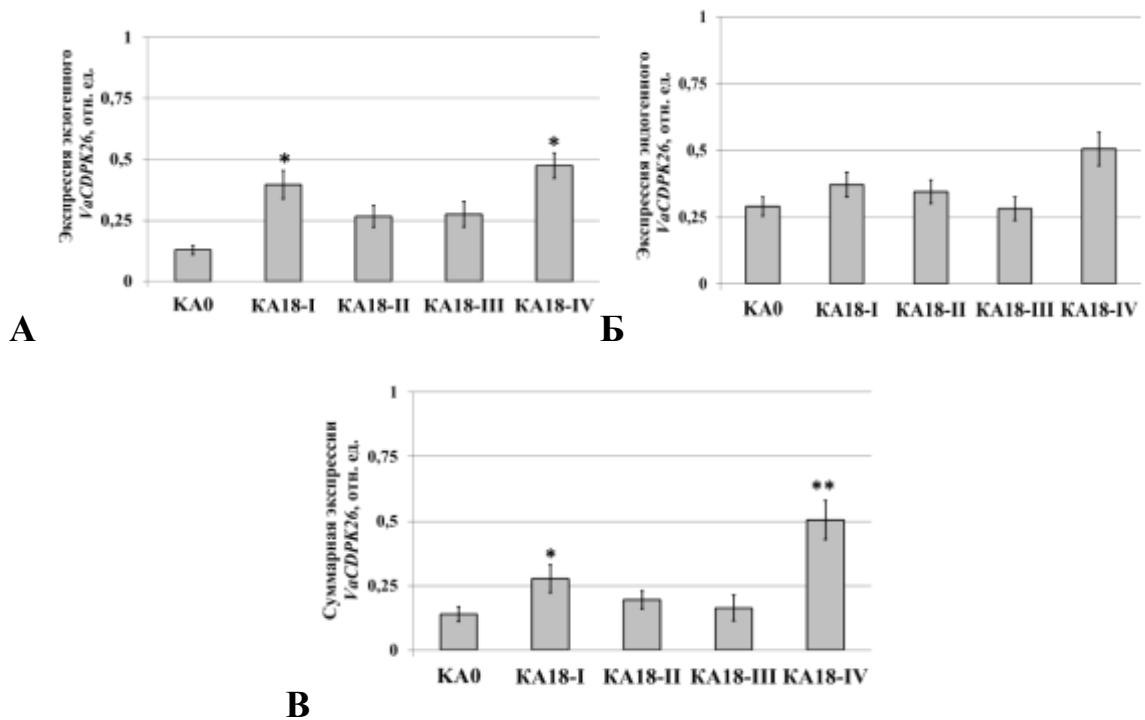
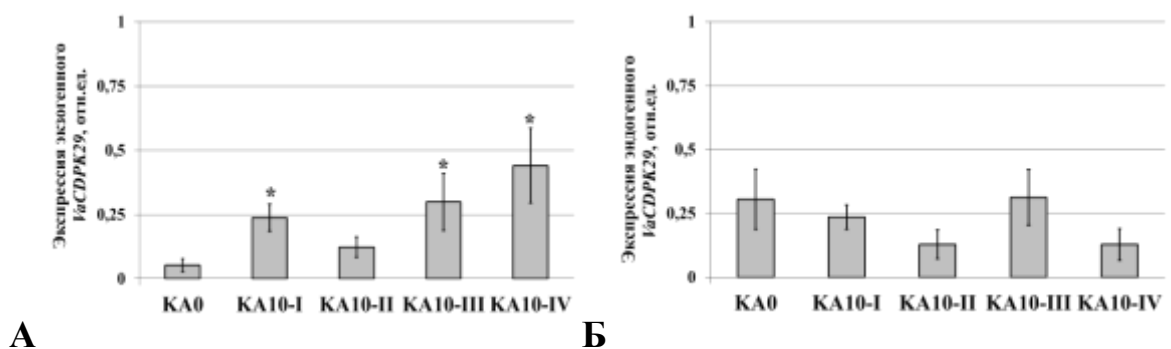


Рис. 6. Экспрессия гена *VaCDPK26* в клеточной линии KA0 и в *VaCDPK26*-трансгенных клеточных линиях KA18-I, II, III, IV: А – экспрессия дополнительной вставки *VaCDPK26*; Б – экспрессия эндогенного *VaCDPK26*; В – суммарная экспрессия *VaCDPK26*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О.* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с KA0.

Получено четыре трансгенные клеточные линии KA10-I, II, III, IV, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29*, методом агробактериальной трансформации. Трансген *VaCDPK29* активно экспрессировался в большинстве полученных линий KA10 (рис. 7А). Экспрессия эндогенного гена *VaCDPK29* в трансгенных клеточных линиях KA10 не отличалась от экспрессии в контрольной клеточной линии (рис. 7Б). Суммарная экспрессия экзогенного и эндогенного *VaCDPK29* достоверно выше в клеточных линиях KA10-I, III, IV, относительно KA0 (рис. 7Б и В).



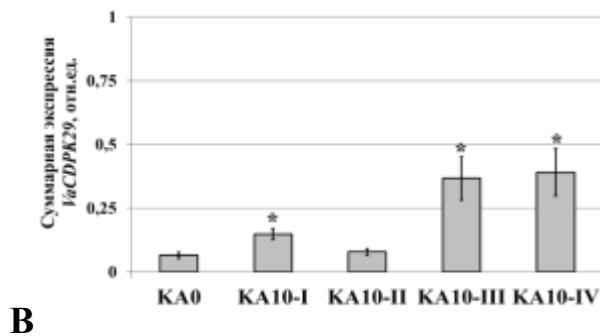


Рис. 7. Экспрессия гена *VaCDPK29* в клеточной линии KA0 и в *VaCDPK29*-трансгенных клеточных линиях KA10-I, II, III, IV: А – экспрессия дополнительной вставки *VaCDPK29*; Б – экспрессия эндогенного *VaCDPK29*; В – суммарная экспрессия *VaCDPK29*. Данные представлены как среднее значение \pm С.О.* – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$ в сравнении с KA0.

3.3. Устойчивость *VaCDPK*-трансгенных клеточных линий *V. amurensis* к абиотическим стрессам

На [рис. 8А](#) представлены данные по накоплению сырой биомассы *VaCDPK13*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях выращивания в течение 30 дней. Все трансгенные клеточные линии KA0, KA15-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.

Мы проанализировали эффект солевого, осмотического, теплового и холодного стрессов на рост четырех *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий *V. amurensis*. При солевом стрессе накопление биомассы клеточными линиями, сверхэкспрессирующими ген *VaCDPK13*, сопоставимо с накоплением биомассы контрольной клеточной линии KA0 ([рис. 8Б](#)). Накопление биомассы большинством *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий при высоких концентрациях маннитола достоверно ниже накопления биомассы клеточной линией KA0 ([рис. 8В](#)). Устойчивость большинства проанализированных *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий к температурным стрессам не отличалась от устойчивости контрольной клеточной линии KA0 ([рис. 8Г](#)).

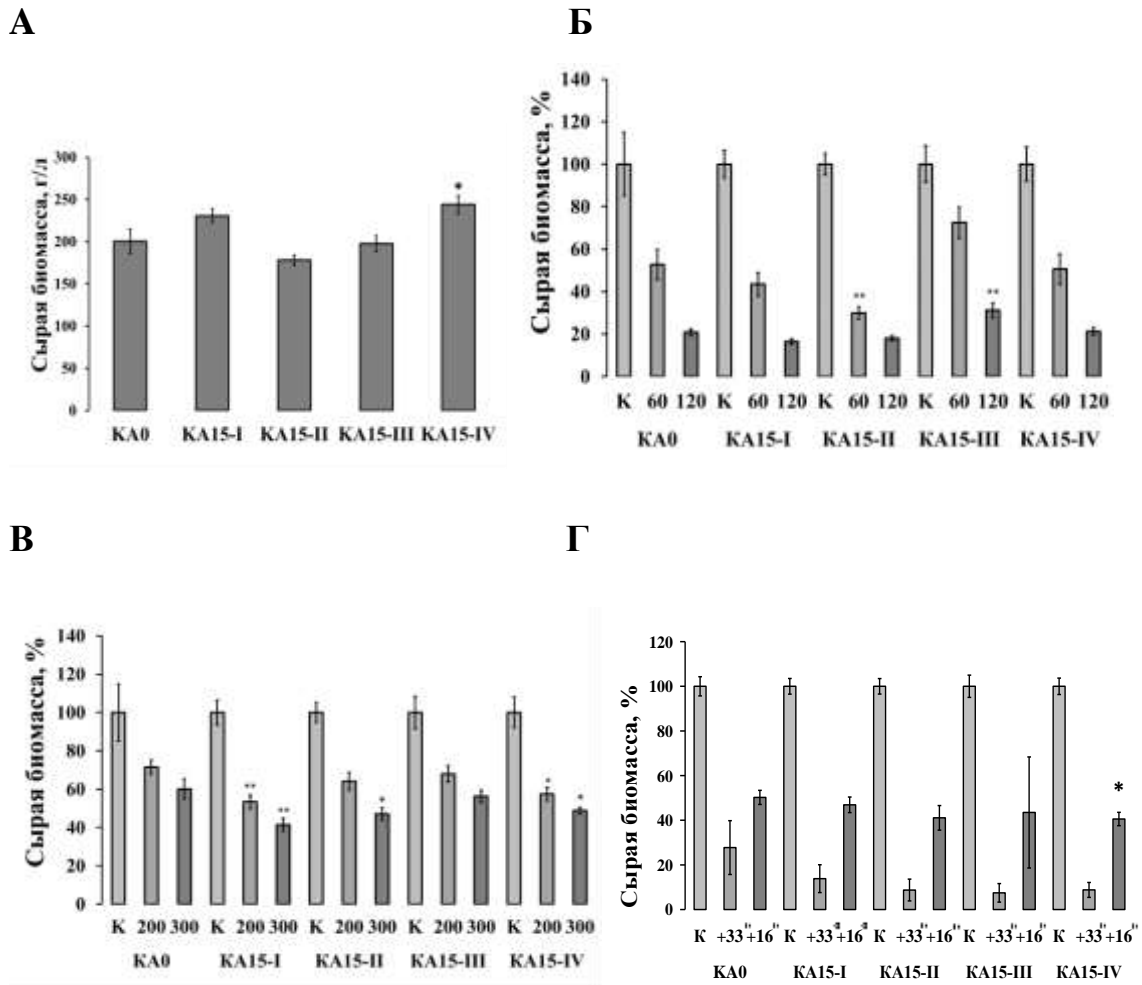


Рис. 8. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK13* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. А – рост *VaCDPK13*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление сырой биомассы клеточными 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 CO. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией KA0, культивируемой в соответствующих условиях.

На рис. 9А представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK20*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях культивирования в течение 30 дней. Все трансгенные клеточные линии KA0, KA09-I, II, III, IV и V накапливали биомассу примерно на одном уровне к 30

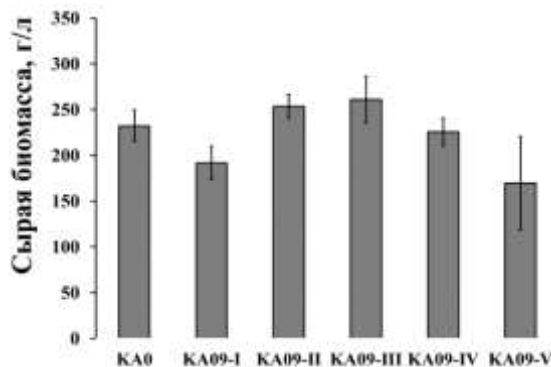
дню. Следовательно, сверхэкспрессия *VaCDPK20* не влияла на рост клеточных линий в стандартных условиях.

Холодовой стресс индуцировали, культивируя *VaCDPK20*-трансгенные клеточные линии при +16°C в течение 30 дней. Данные показали, что трансгенные клеточные линии КА09-I, III, IV и V накапливали биомассу более активно в условиях холодого стресса по сравнению с накоплением биомассы контрольной клеточной линией КА0 (рис. 9Б). Рост же клеточной линии КА09-II ингибировался температурой +16°C и был сопоставим с ростом клеточной линии КА0 в условиях холодого стресса.

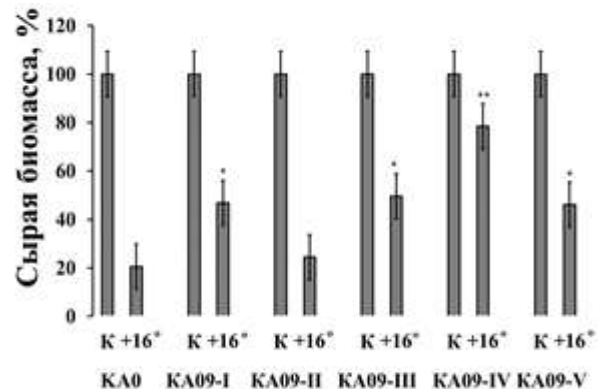
Тепловой стресс индуцировали, культивируя клеточные линии при температуре +33°C в течение 30 дней. Результаты эксперимента показали, что рост линий КА09-II, III, IV и V значительно ингибировался, в то время как рост КА09-I был статистически не отличим от роста КА0 (рис. 9В).

Нами была исследована устойчивость полученных трансгенных клеточных линий *V. amurensis* к солевому стрессу, индуцированного добавлением NaCl в концентрациях 50 и 100 мМ в питательные среды и последующим культивированием в течение 30 дней (рис. 9Г). Результаты показали, что солевой стресс ингибировал рост большинства *VaCDPK20*-трансгенных клеточных линий КА09 на одном уровне с контролем (рис. 9Г).

А



Б



В

Г

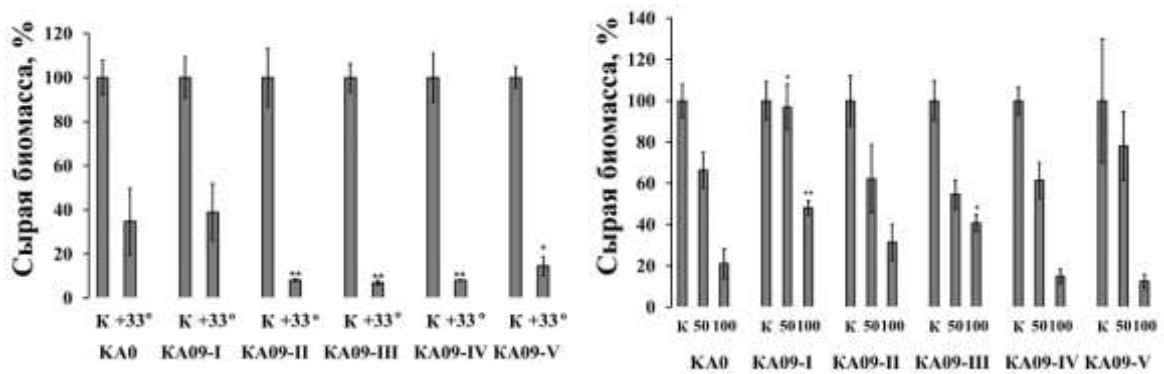


Рис. 9. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK20* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течении 30 дней. Рост *VaCDPK20*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях (А). Накопление сырой биомассы клеточными линиями 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). KA0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; KA09-I, II, III, IV, V – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20*. Данные представлены как среднее значение \pm CO. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией KA0, культивируемой в соответствующих условиях.

На рис. 10А представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK21*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях культивирования в течение 30 дней. Рост большинства полученных трансгенных клеточных линий KA0, KA07-I, II, III, IV, V статистически не различался, однако рост KA07-VI был достоверно ниже роста KA0. Следовательно, сверхэкспрессия гена *VaCDPK21* не влияет на рост большинства клеточных линий в стандартных условиях культивирования.

Нами была проанализирована устойчивость полученных трансгенных клеточных линий *V. amurensis* к солевому стрессу (NaCl в концентрации 60 и 120 мМ в питательных средах) в течение 30 дней. Данные показали, что трансгенные клеточные линии KA07-I, II, III, IV, V, VI накапливали биомассу более активно при использовании одной или двух концентраций NaCl по сравнению с накоплением биомассы контрольной клеточной линией KA0. Таким образом, рост пяти клеточных линий, сверхэкспрессирующих *VaCDPK21*, был более активен под влиянием солевого стресса, по сравнению

с ростом контрольной клеточной линии КА0 (рис. 10Б). Полученные результаты показывают, что сверхэкспрессия гена *VaCDPK21* имеет позитивный эффект на рост трансгенных клеточных линий под действием солевого стресса.

Температурный стресс индуцировали, культивируя клеточные линии при +16°C и +33°C в течение 30 дней. Рост преобладающего большинства клеточных линий КА07, кроме линии КА07-VI, сверхэкспрессирующей ген *VaCDPK21*, при заданных температурах был сравним с ростом КА0 в условиях теплового и холодого стрессов (рис. 10 В, Г).

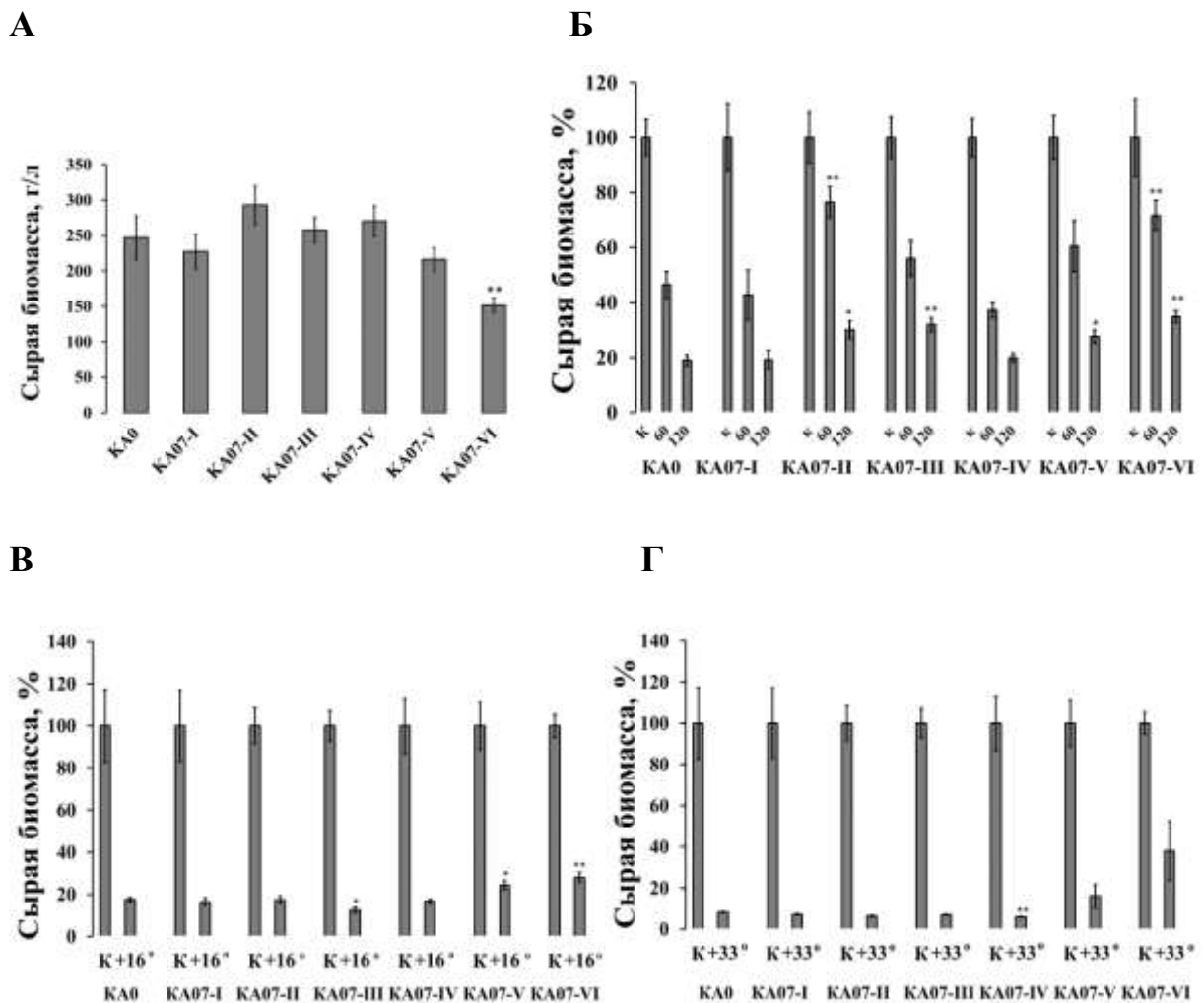


Рис. 10. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK21* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течении 30 дней. А – рост *VaCDPK21*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление сырой биомассы клеточными линиями под влиянием солевого стресса, индуцированного 60 и 120 mM NaCl; В – холодого и Г – теплового стресса,

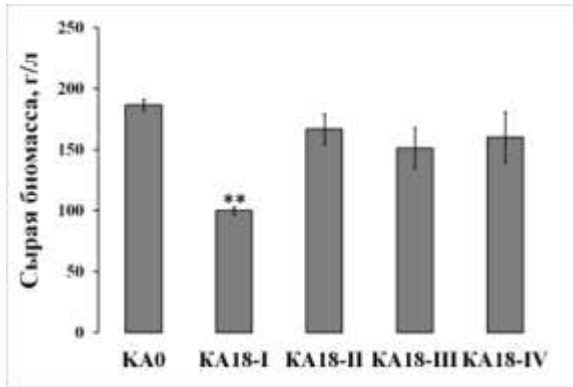
индуцированного культивированием при +16°C и +33°C; КА0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; КА07 - I, II, III, IV, V, VI – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21*. Данные представлены как среднее значение \pm CO. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению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

На [рис. 11А](#) представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK26*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях в течение 30 дней культивирования. Трансгенные клеточные линии КА0, КА18- II, III, IV накапливали биомассу на одном уровне к 30 дню культивирования, кроме КА18-I, рост этой клеточной линии значительно менее активен по сравнению с ростом контрольной клеточной линии КА0. Таким образом, сверхэкспрессия гена *VaCDPK26* не влияет на рост большинства клеточных линий в стандартных условиях.

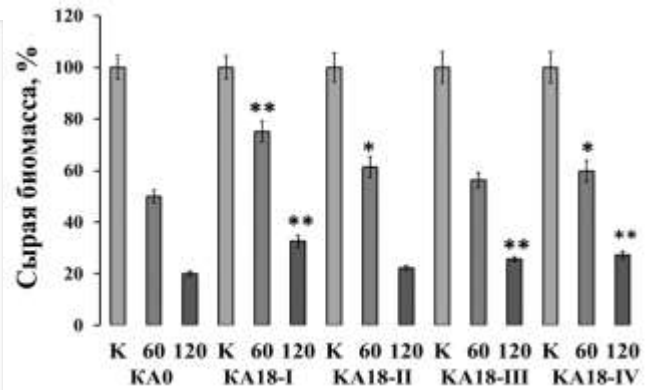
По аналогии с предыдущими генами мы исследовали устойчивость полученных *VaCDPK26* - трансгенных клеточных линий *V. amurensis* при солевом стрессе в течение 30 дней ([рис. 11Б](#)). В соответствии с проведенными экспериментами рост трех линий из четырех, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*, (КА18-I, II, IV был достоверно выше относительно роста контрольной клеточной линии), как при 60 мМ NaCl, так при 120 мМ NaCl (КА18-I, III, IV). Результаты показали, что холодовой стресс ингибировал рост трансгенных клеточных линий КА18, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26* ([рис. 11В](#)), на одном уровне с контролем для большинства клеточных линий, кроме КА18-I, накопление биомассы которой было достоверно выше биомассы КА0. Эксперименты по индукции теплового стресса показали, что рост трех клеточных линий (КА18-II, III, IV) ингибировался, в то время как рост клеточной линии (КА18-I) был статистически не отличим от роста контроля КА0 ([рис. 11Г](#)). Также было исследовано влияние осмотического стресса на устойчивость трансгенных клеточных линий *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*. Так, накопление сырой биомассы у всех трансгенных клеточных

линий KA18 при 200 мМ маннитола и у трех трансгенных клеточных линий (KA18-I, II, III) при 300 мМ достоверно не отличалось от биомассы контроля, кроме линии KA18-IV, рост которой был достоверно ниже относительно KA0 (рис. 11Д).

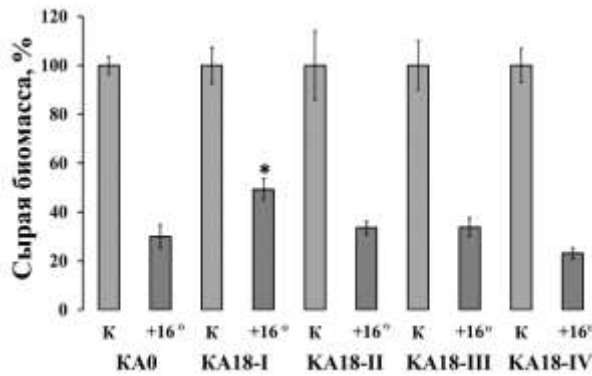
А



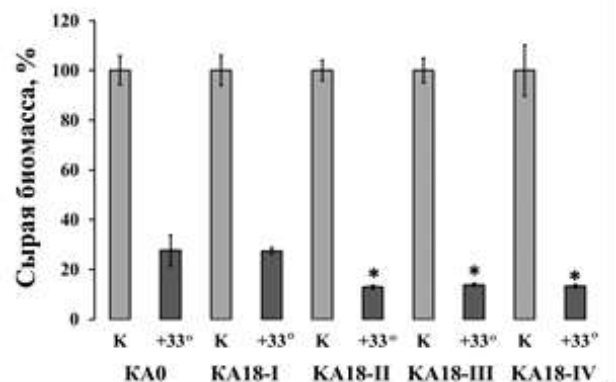
Б



В



Г



Д

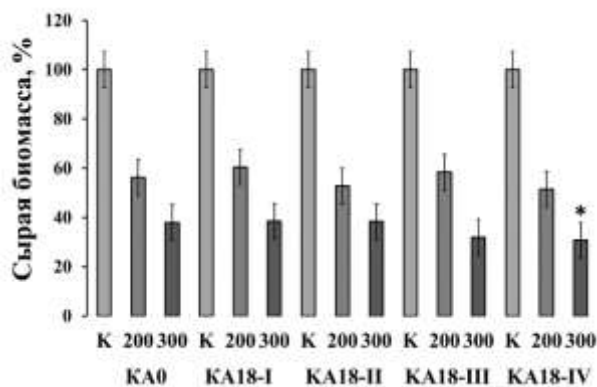


Рис. 11. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK26* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течении 30 дней. А – рост *VaCDPK26*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях. Б – накопление

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; КА0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; КА18-I, II, III, IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26*. Данные представлены как среднее значение \pm СО. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией КА0, культивируемой в соответствующих условиях.

На [рис. 12А](#) представлены данные по накоплению биомассы *VaCDPK29*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* в стандартных условиях в течение 30 дней культивирования. Накопление биомассы трансгенными клеточными линиями КА0, КА10-I, II, III, IV значительно не отличалось после 30 дней культивирования.

Анализ влияния абиотических стрессов на рост *VaCDPK29*-трансгенных клеточных линий показал, что рост трансгенных клеточных линий был сопоставим с ростом контрольной клеточной линии КА0 при солевом стрессе ([рис. 12Б](#)). Биомасса трансгенных клеточных линий КА10-I, II, III, IV была сопоставима с биомассой контрольной клеточной линии КА0 под влиянием холодового стресса ([рис. 12В](#)). Линия КА10-II оказалась не устойчивой к тепловому стрессу в сравнении с КА0, в то время как две клеточные линии КА10-III и КА10-IV были устойчивы в значительной степени, а линия КА10-I устойчива только в небольшой степени. Возможно, это связано с тем, что именно в линиях КА10-III и КА10-IV наблюдается наибольшая экспрессия трансгена *VaCDPK29*. Таким образом, экспрессия трансгена *VaCDPK29* коррелирует с ростом клеточных линий в условиях теплового стресса. Мы предполагаем, что устойчивость растений к тепловому стрессу зависит от уровня экспрессии гена *VaCDPK29* и обеспечивается только высоким уровнем экспрессии ([рис. 12Г](#)). Также исследовано влияние осмотического стресса на рост трансгенных клеточных линий *V. amurensis*, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK29*. Так, накопление сырой биомассы четырех трансгенных клеточных линий КА10 (КА10-I, II, III и IV) при 200

мМ маннитола и трех трансгенных клеточных линий (KA10-I, II, IV) при 300 мМ было достоверно выше биомассы контрольной клеточной линии. Вышеизложенное дает основание полагать, что трансгенные клеточные линии устойчивы к добавлению маннитола в сравнении с KA0 (рис. 12Д).

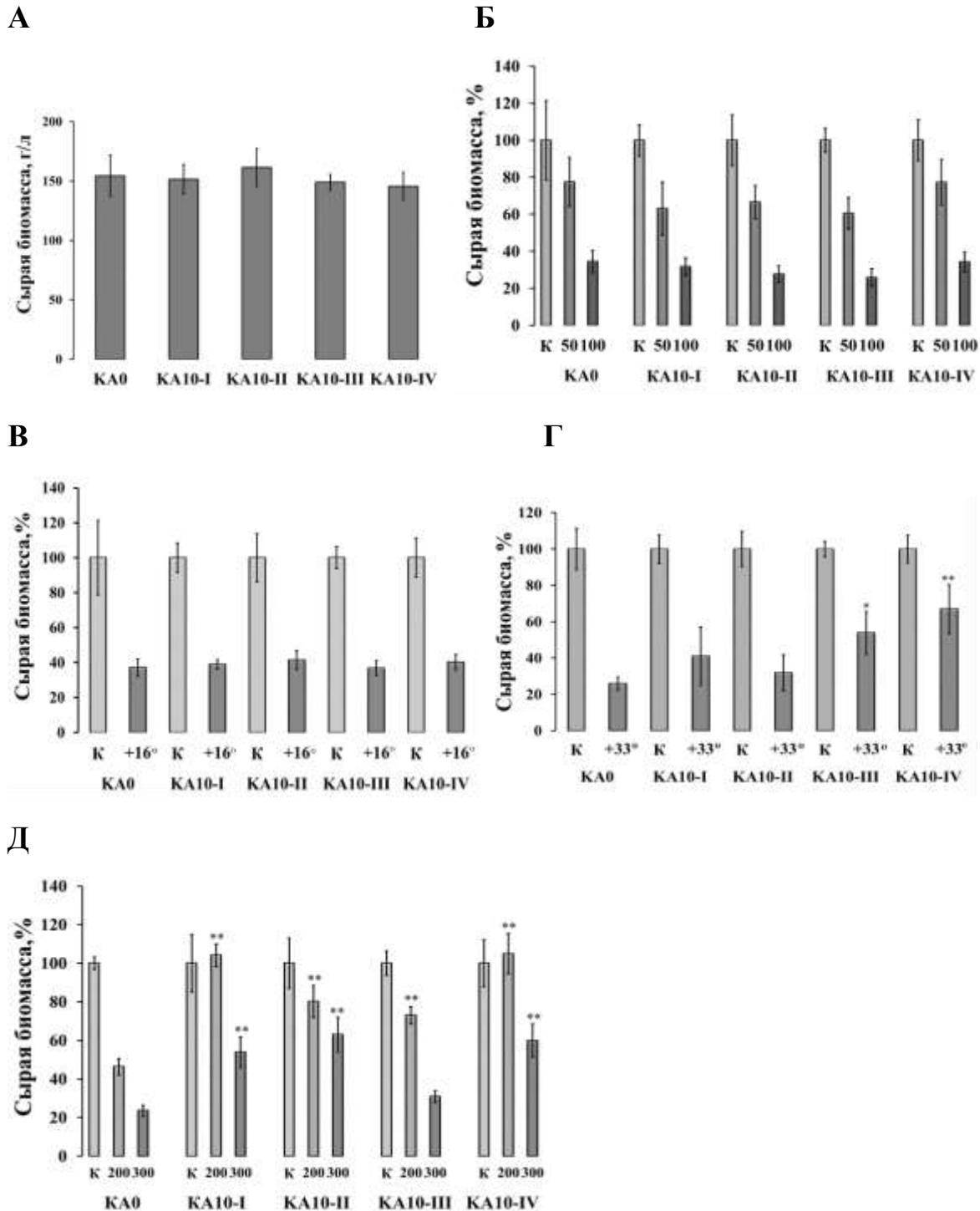


Рис. 12. Влияние сверхэкспрессии гена *VaCDPK29* на рост клеточных линий *V. amurensis* в контрольных условиях и под воздействием абиотических стрессов при культивировании в течение 30 дней. А – рост *VaCDPK29*-трансгенных клеточных линий в стандартных условиях; Б – накопление

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; КА0 – контрольная клеточная линия, трансформированная геном *nptII*; КА10-I, II, III, IV – трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29*. Данные представлены как среднее значение \pm СО. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ 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 холодовому (*VaCDPK20*), солевому (*VaCDPK21* и *VaCDPK26*), тепловому (*VaCDPK29*) и осмотическому стрессам (*VaCDPK29*).

3.4. Получение трансгенных растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK*

Трансгенные растения арабидопсиса получали методом цветочного погружения. Для получения растений, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20*, *21*, *26*, *29* мы трансформировали растения дикого типа *A. thaliana* штаммами КА09, КА07, КА18, КА10 *A. tumefaciens*, содержащими бинарные вектора с генами *VaCDPK20*, *21*, *26*, *29* соответственно и геном *nptII* под контролем 2*35S CaMV промотора. Для получения контрольной линии растений КА0 мы трансформировали растения дикого типа *A. thaliana* штаммом КА0 *A. tumefaciens*, несущим только ген *nptII* под контролем 2*35S CaMV промотора в составе бинарного вектора. С помощью селекции на канамицине отобрали гомозиготные по введенным трансгенам *VaCDPK20*, *21*, *26*, *29* линии растений *A. thaliana* – 09-1, 09-11, 09-20; 07-1, 07-3, 07-10; 18-1, 18-2, 18-3, 18-4; 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 соответственно. Проверку

экспрессии трансгенов *VaCDPK20*, *21*, *26*, *29* в растениях *A. thaliana* осуществляли методом ПЦР РВ.

Трансген *VaCDPK20* экспрессировался в линиях 09-1, 09-11 и 09-20 арабидопсиса (рис. 13А). При этом наибольший уровень экспрессии трансгена *VaCDPK20* наблюдался в линии 09-20 (Рис. 13А). Трансген *VaCDPK21* экспрессируется во всех полученных линиях арабидопсиса, 07-1, 07-3 и 07-10 наибольший уровень экспрессии гена *VaCDPK21* наблюдался в линии 07-3 (Рис. 13Б). Трансген *VaCDPK26* также активно экспрессировался во всех полученных линиях, а наибольший уровень экспрессии гена *VaCDPK26* отмечен в линии 18-3 (Рис. 13В). Трансген *VaCDPK29* активно экспрессируется во всех полученных линиях 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 (Рис. 13Г).

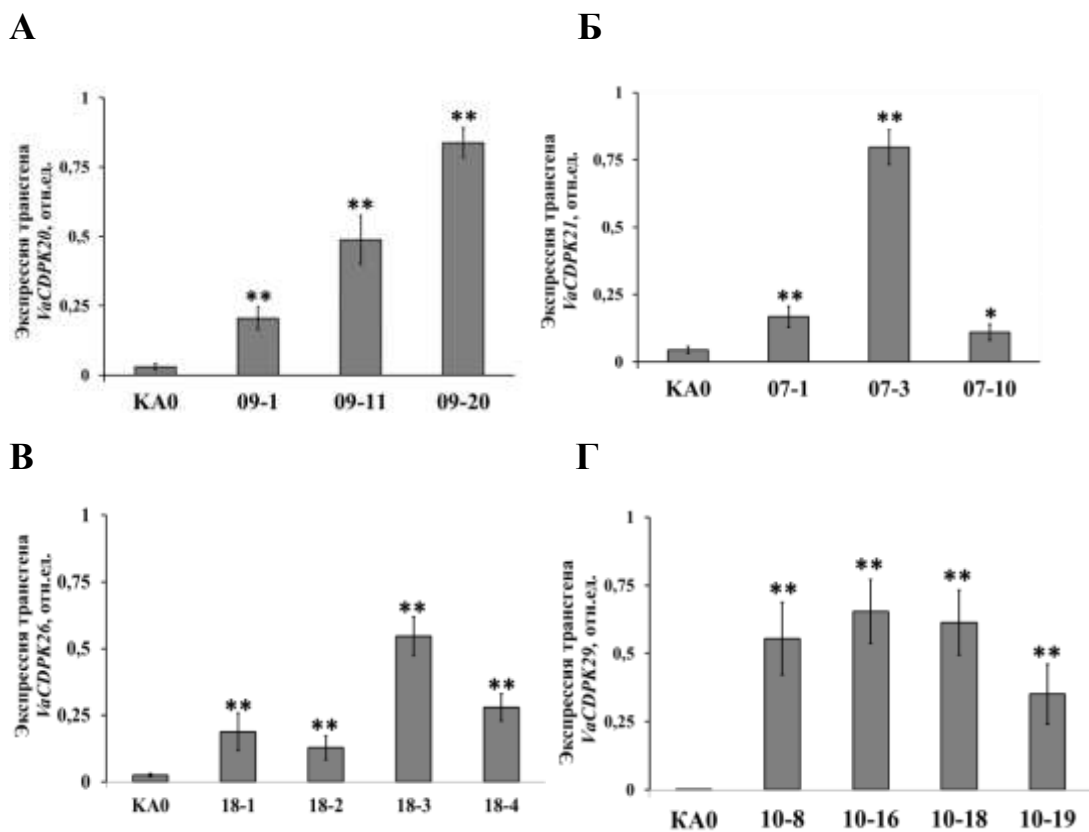


Рис. 13. Экспрессия генов *VaCDPK* в трансгенных растениях *A. thaliana*. А – экспрессия трансгена *VaCDPK20* в растениях 09-1, 09-11, 09-20 (Т₃ поколение). Б – экспрессия трансгена *VaCDPK21* в растениях *A. thaliana*. 07-1, 07-3, 07-10. В – экспрессия трансгена *VaCDPK26* в растениях 18-1, 18-2, 18-3, 18-4. Г – экспрессия трансгена *VaCDPK29* в растениях 10-8, 10-16, 10-18, 10-19.

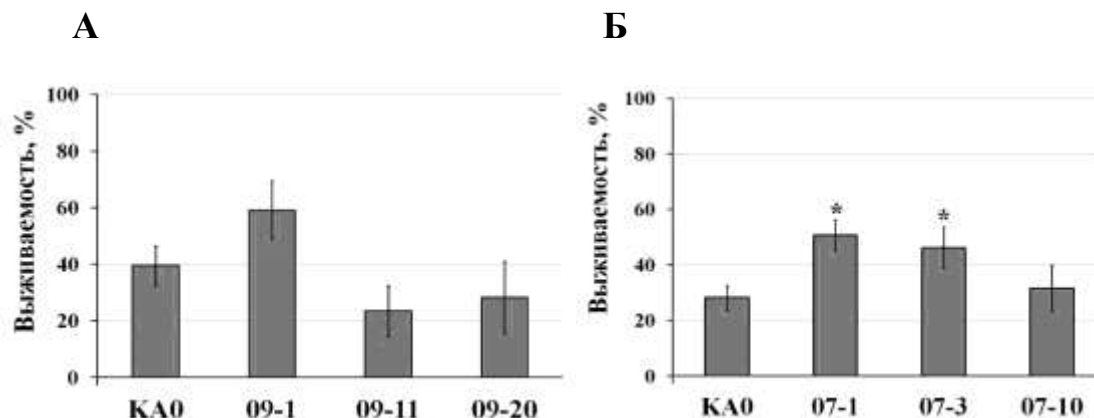
18, 10-19. КА0 – контрольная линия арабидопсиса, содержащая ген *nptII* (устойчивость к Km). Данные представлены как среднее значение \pm CO. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с уровнем флуоресценции для КА0.

3.5. Устойчивость *VaCDPK*-трансгенных растений *A. thaliana* к абиотическим стрессам

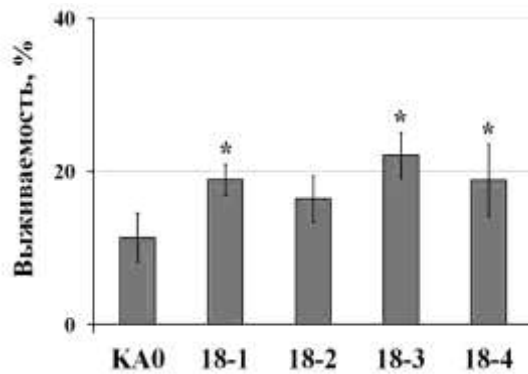
После получения трансгенных гомозиготных линий *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29*, мы изучили влияние сверхэкспрессии генов *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29* на устойчивость трансгенных растений к различным абиотическим стрессовым факторам (солевой стресс, высокие и низкие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

Результаты проведенных экспериментов при солевом стрессе показали, что выживаемость всех трансгенных линий арабидопсиса (07-1, 07-3 и 07-10), сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, была выше выживаемости КА0 (рис. 14Б). Необходимо отметить, что для этих линий 07-1, 07-3 и 07-10 уровень выживаемости в условиях солевого стресса (рис. 14Б) коррелировал с уровнем экспрессии трансгена (рис. 5В).

Установлено, что выживаемость большинства трансгенных линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*, была достоверно выше выживаемости контрольной линии арабидопсиса КА0 в условиях солевого стресса (рис. 14В). Выживаемость трансгенных линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (рис. 14А) и *VaCDPK29* (рис. 14Г) была сопоставима с выживаемостью контрольной линии арабидопсиса КА0.



В



Г

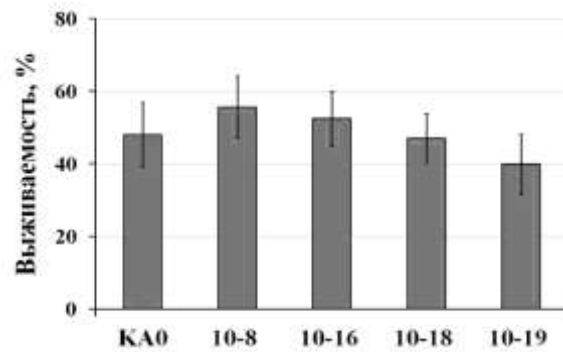
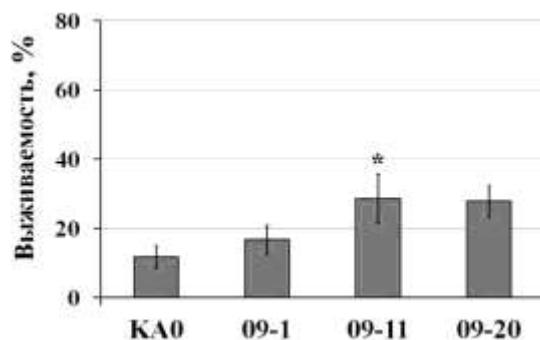


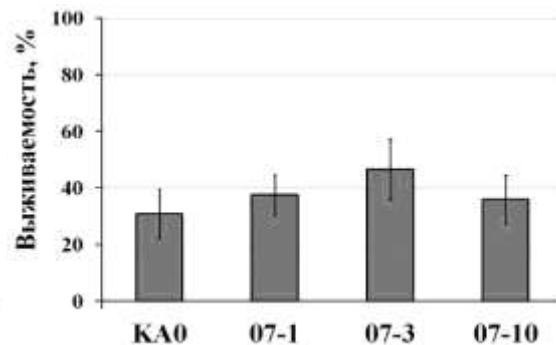
Рис. 14. Влияние солевого стресса на выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (А), *VaCDPK21* (Б), *VaCDPK26* (В) и *VaCDPK29* (Г). KA0 – контрольная линия растений; 09-1, 09-11, 09-20 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20* и *nptII*. 07-1, 07-3, 07-10 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21* и *nptII*. 18-1, 18-2, 18-3, 18-4 – трансгенные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26* и *nptII*. 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение \pm CO. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с KA0.

Данные показали, что при холодовом стрессе выживаемость трех трансгенных линий 09-1, 09-11 и 09-20 арабидопсиса была выше относительно выживаемости KA0 (рис. 15А). Результаты проведенных экспериментов показали, что выживаемость линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK21* (07-1, 07-3 и 07-10), *VaCDPK26* (18-1, 18-2, 18-3 и 18-4) и *VaCDPK29* (10-8, 10-16, 10-18 и 10-19) статистически не отличалась от выживаемости KA0 (рис. 15Б – Г).

А



Б



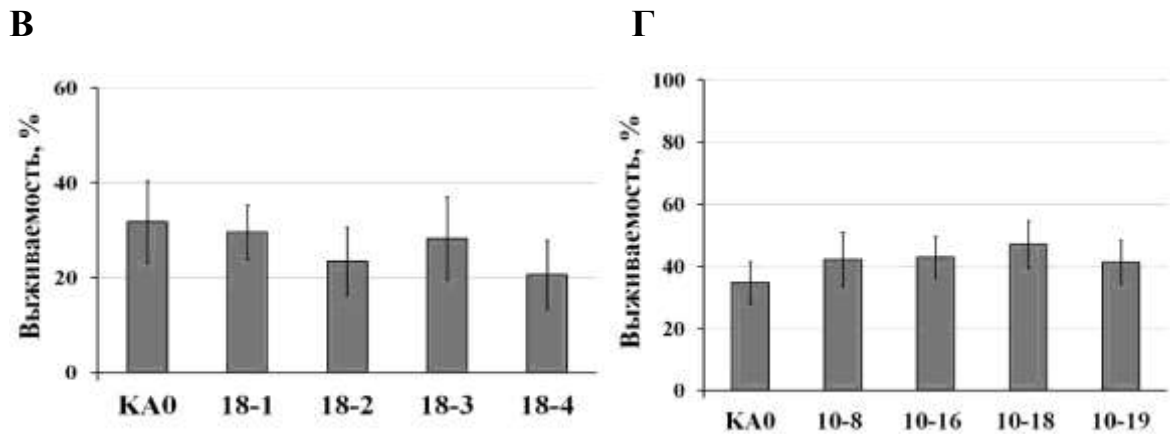
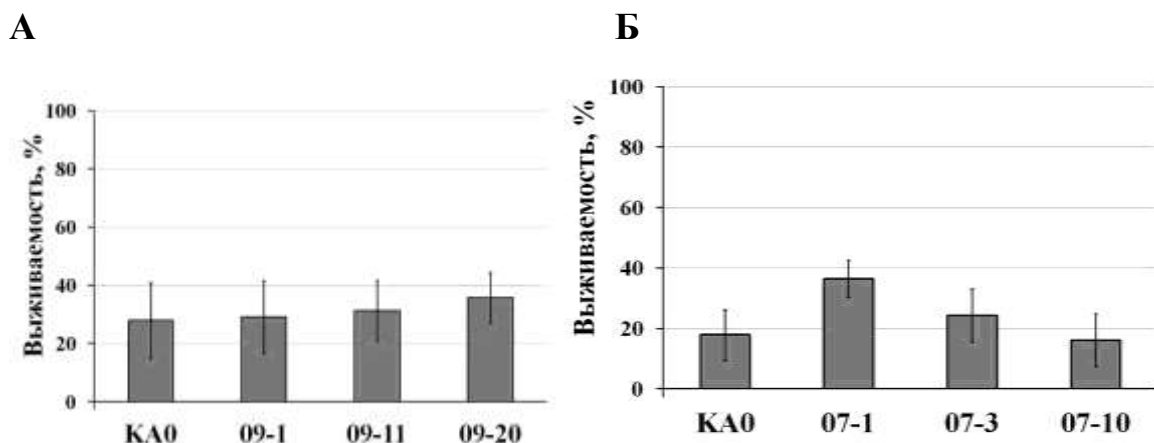
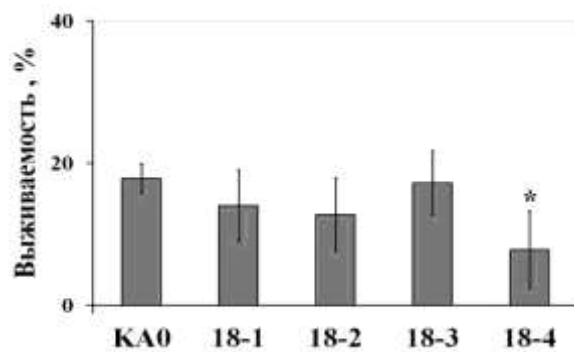


Рис. 15. Влияние низкотемпературного стресса на выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (А), *VaCDPK21* (Б), *VaCDPK26* (В) и *VaCDPK29* (Г). КА0 – контрольная линия растений; 09-1, 09-11, 09-20 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20* и *nptII*. 07-1, 07-3, 07-10 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21* и *nptII*. 18-1, 18-2, 18-3, 18-4 – трансгенные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26* и *nptII*. 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение \pm СО. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению КА0.

Данные проведенных экспериментов по влиянию теплового стресса показали, что выживаемость большинства линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (09-1, 09-11 и 09-20), *VaCDPK21* (07-1, 07-3 и 07-10) и *VaCDPK26* (КА18-1, 18-2, 18-3 и 18-4) была сопоставима с выживаемостью контроля КА0 (рис. 16 А–В). Выживаемость всех линий арабидопсиса, сверхэкспрессирующих *VaCDPK29*, была выше выживаемости КА0, из них выживаемость линий 10-16 и 10-18 статистически выше выживаемости контрольной линии арабидопсиса КА0 (рис. 16 Г).



В



Г

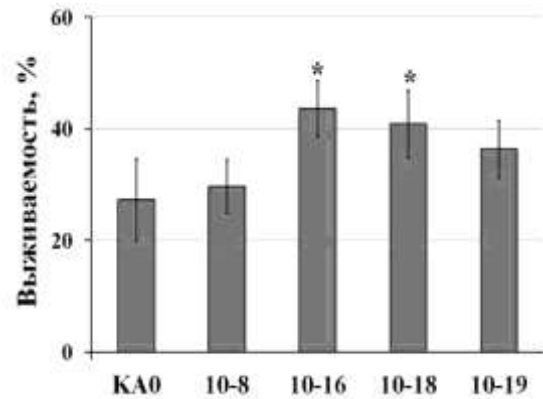


Рис. 16. Влияние теплового стресса на выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (А), *VaCDPK21* (Б), *VaCDPK26* (В) и *VaCDPK29* (Г). КА0 – контрольная линия растений; 09-1, 09-11, 09-20 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20* и *nptII*; 07-1,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

Данные показывают, что выживаемость при дефиците воды всех линий сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (Рис. 17А) и *VaCDPK26* (Рис. 17В), была выше по сравнению с контрольной линией арабидопсиса КА0. Выживаемость всех линий (09-1, 09-11, 09-20), трансгенных по гену *VaCDPK20*, и трех линий (18-2, 18-3, 18-4) из четырех, трансгенных по гену *VaCDPK26*, достоверно выше в сравнении с КА0 (рис. 17 А, В). Выживаемость большинства линий, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK29* и *VaCDPK21*, была на одном уровне с выживаемостью контрольной линии арабидопсиса КА0 (рис. 17 Б, Г).

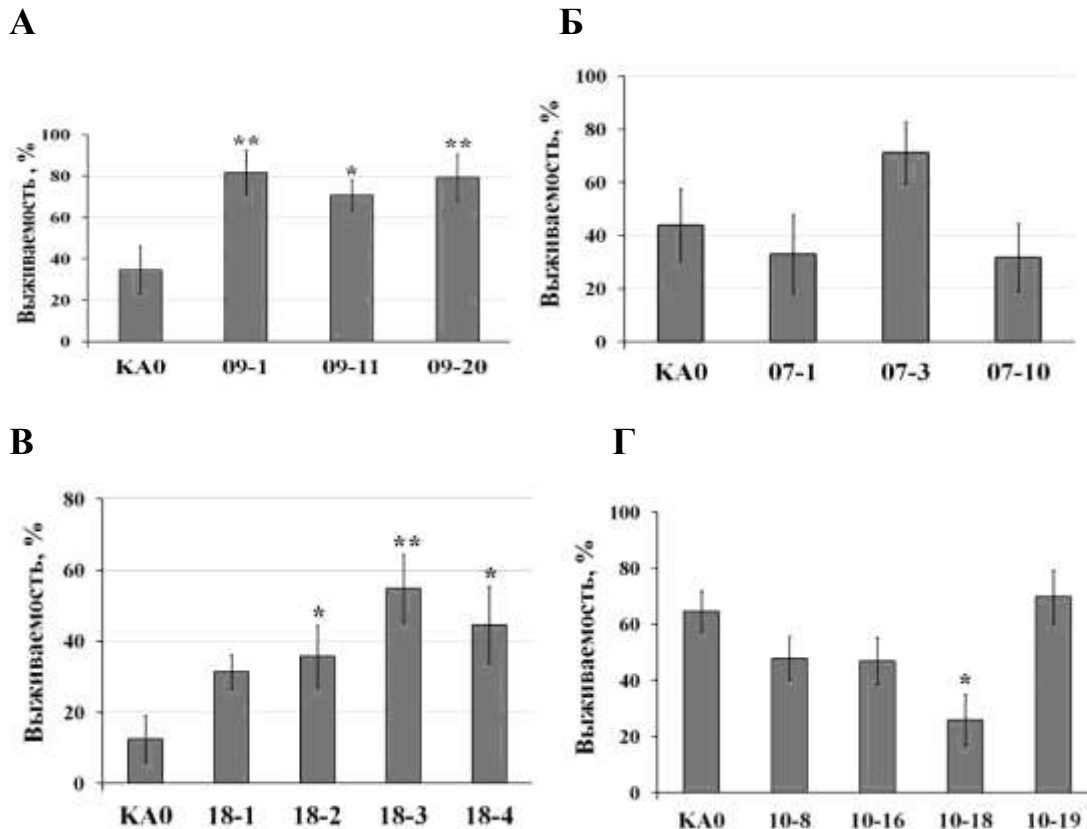


Рис. 17. Влияние дефицита воды на выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20* (А), *VaCDPK21* (Б), *VaCDPK26* (В) и *VaCDPK29* (Г). KA0 – контрольная линия растений; 09-1, 09-11, 09-20 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK20* и *nptII*; 07-1, 07-3, 07-10 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21* и *nptII*; 18-1, 18-2, 18-3, 18-4 – трансгенные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK26* и *nptII*; 10-8, 10-16, 10-18, 10-19 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK29* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение \pm CO. ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по сравнению с KA0.

Для подтверждения влияния гена *VaCDPK21* на устойчивость *V. amurensis* к солевому стрессу мы поставили эксперимент на проростках арабидопсиса. Для этого семена трансгенных линий арабидопсиса 07-1, 07-3 и 07-10, а также KA0 высадили в чашки Петри с агаром на среду MS, а затем через 5 дней перенесли на твердую агаризованную среду, содержащую NaCl 300 мМ. На третий день культивирования проростков на среде с NaCl проводили подсчет зеленых растений. Данные проведенного эксперимента

показали, что выживаемость растений *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, выше выживаемости КА0 (рис. 18).

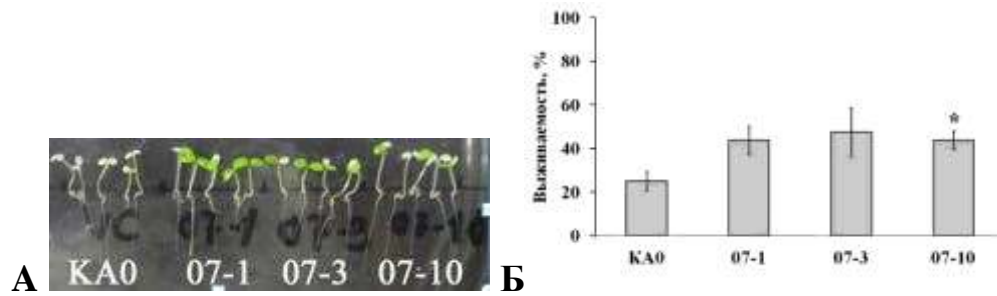


Рис. 18. Эффект солевого стресса (NaCl 300 мМ). КА0 – контрольная линия арабидопсиса, 07-1, 07-3, 07-10 – трансгенные линии арабидопсиса, сверхэкспрессирующие ген *VaCDPK21*. А – На фотографии представлены проростки арабидопсиса, которые в течение трех дней росли в чашке Петри со средой MS, содержащей 300 мМ NaCl. Б – Выживаемость проростков. Данные представлены как среднее значение \pm СО. * $p < 0.05$ по сравнению с КА0.

3.6. Влияние сверхэкспрессии генов *CDPK V. amurensis* на экспрессию стресс-индуцируемых и антиоксидантных генов в растениях *A. thaliana*

С целью детального изучения функций генов *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* в ответе растений на абиотические стрессы, была проанализирована экспрессия 27 стресс-индуцируемых маркерных генов в растениях *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих гены *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26*, *VaCDPK29*, с помощью метода ПЦР РВ в контрольных условиях и под действием абиотических стрессов (рис. 19 – 24). В данной работе представлен анализ экспрессии тех стресс-индуцируемых генов, экспрессия которых значительно изменялась в трансгенных растениях. Таким образом, мы изучали экспрессию ряда стресс-индуцируемых генов (*AtRD22*, *AtRD26*, *AtRD29A*, *AtRD29B*, *AtCBF1*, *AtCOR47*, *AtCOR15*, *AtABF3*, *AtKIN1*, *AtLEA*, *AtP5CS*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtABA2*, *AtLPT3*, *AtRab18*), генов ионных транспортеров (*AtNHX1*, *AtSOS1*), антиоксидантных генов (*AtCSD1*, *AtCSD2*, *AtCAT1*), а также генов, вовлеченных в регуляцию биосинтеза АБК (*AtABI1*, *AtABI2*, *AtABI3*, *AtABI4* и *AtABI5*).

Результаты экспериментов с трансгенными клеточными линиями винограда и растениями арабидопсиса, сверхэкспрессирующими ген *VaCDPK20*, продемонстрировали, что ген *VaCDPK20* вовлечен в ответ *V. amurensis* к холодovому стрессу и засухе. Для получения расширенных данных об участии гена *VaCDPK20* в сигнальных путях, обуславливающих устойчивость к холодovому стрессу и засухе, мы оценили экспрессию стресс-индуцируемых генов в контрольной линии арабидопсиса КА0 и трех линиях *A.thaliana*, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20* под действием засухи, холодovого стресса и при контрольных условиях (рис. 19, 20). Холодovый стресс индуцировал экспрессию большинства анализируемых генов, ассоциированных со стрессами, как в контрольной линии арабидопсиса КА0, так и в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20* (рис. 19). Данные, полученные в ходе проведенных экспериментов, показали, что экспрессия генов *AtLEA*, *AtCOR47*, *AtNHX1*, *AtSOS1*, *AtKIN1*, *AtCSD1*, *AtRD29A* и *AtABF3* была выше в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20*, в сравнении с контрольной линией растений КА0 сразу после холодovого воздействия и один час после холодovого воздействия (рис. 19). Экспрессия других анализируемых стресс-маркерных генов значительно не отличалась в растениях, трансгенных по гену *VaCDPK20*, в сравнении с контрольной линией растений КА0 в стандартных условиях.

Нами также была проанализирована экспрессия стресс-ассоциированных генов в пятинедельных растениях арабидопсиса в условиях засухи (5 недель без полива) и в стандартных условиях (полив раз в неделю). Данные проведенных экспериментов показали, что транскрипция всех проанализированных генов, кроме *AtDREB2A* и *AtRD26* (рис. 20С, Т), значительно увеличивалась во всех *VaCDPK20*-трансгенных линиях арабидопсиса в условиях засухи, в то время как экспрессия лишь 8 генов (*AtKIN1*, *AtP5CS*, *AtRD29A*, *AtSOS1*, *AtABF3*, *AtDREB2A*, *AtRD26* и *AtCAT*)

значительно увеличивалась в контрольной линии растений КА0 при тех же условиях (рис. 20 Б, Г, Д, З, С, Т, П).

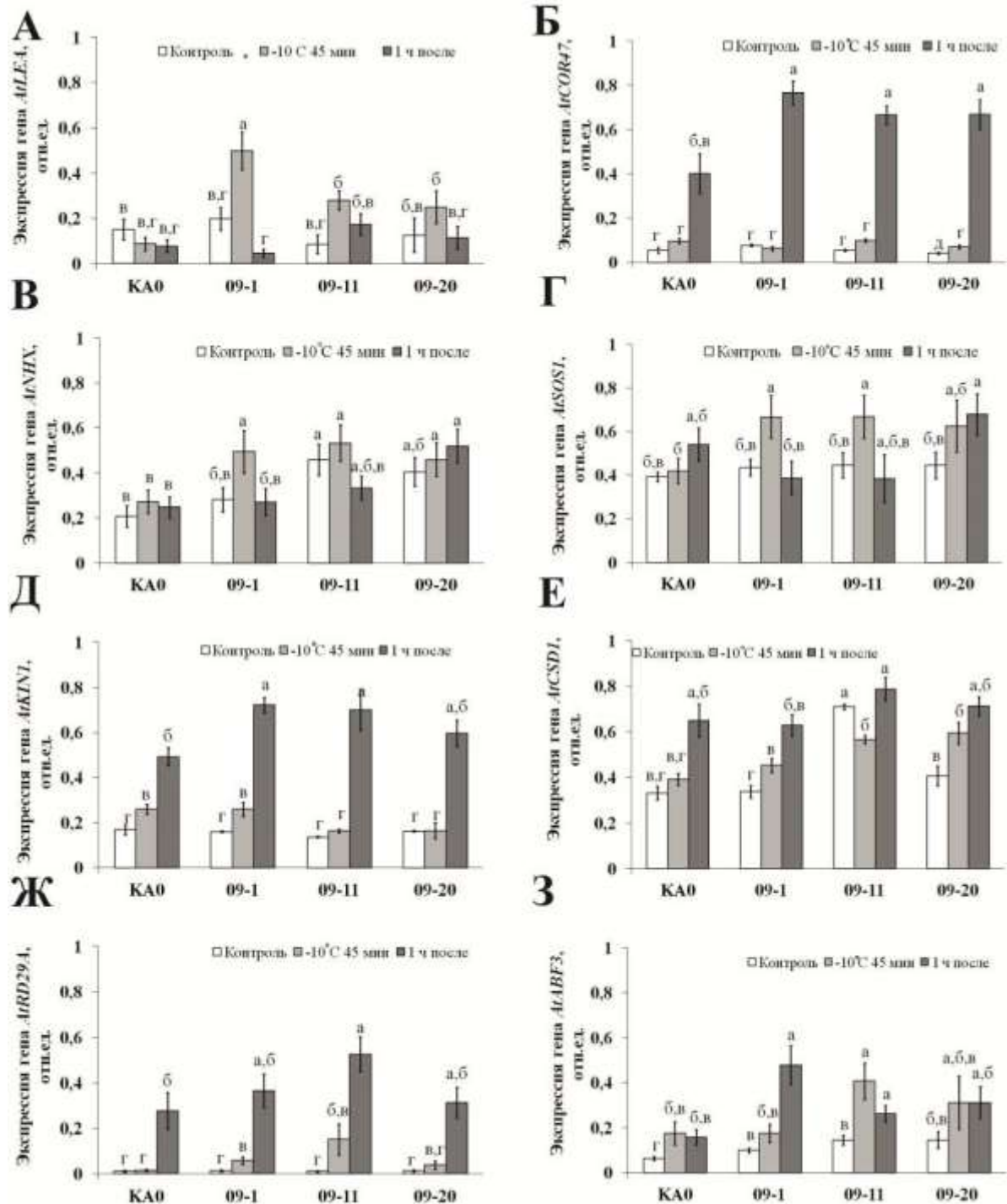


Рис. 19. Экспрессия стресс-индуцируемых генов *AtLEA* (А), *AtCOR47* (Б), *AtNHX1* (В), *AtSOS1* (Г), *AtKIN1* (Д), *AtCSD1* (Е), *AtRD29A* (Ж) и *AtABF3* (З) в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20*, в сравнении с контрольными растениями арабидопсиса (КА0) в стандартных условиях культивирования (+22°C, белые колонки), сразу после холодового воздействия (-10°C 45 минут светло-серые колонки) и 1 час после холодового

воздействия (темно-серые колонки). Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличались.

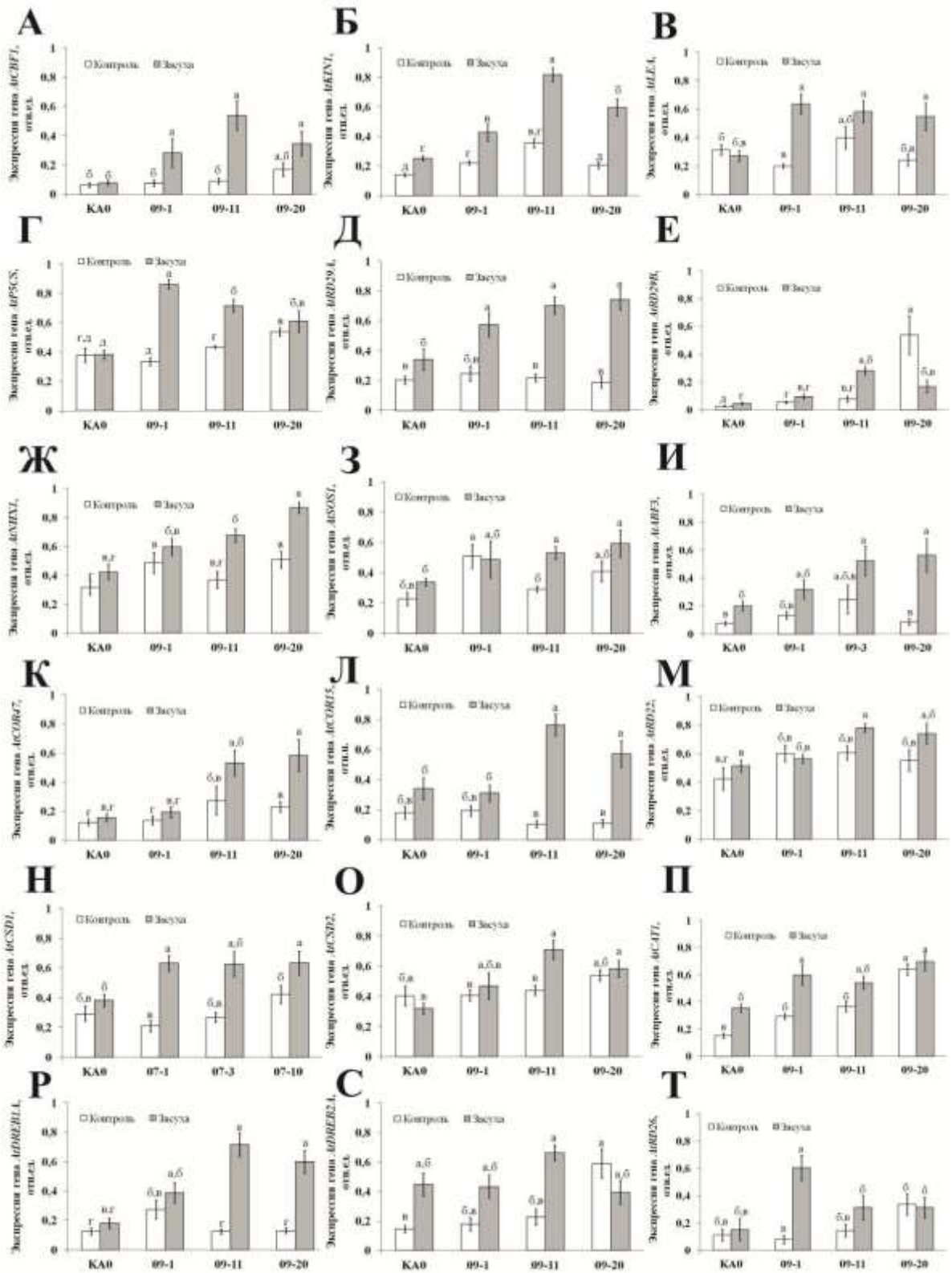


Рис. 20. Экспрессия стресс-индуцируемых генов *AtCBF1* (А), *AtKIN1* (Б), *AtLEA* (В), *AtP5CS* (Г), *AtRD29A* (Д), *AtRD29B* (Е), *AtNHX1* (Ж), *AtSOS1* (З), *AtABF3* (И), *AtCOR47* (К), *AtCOR15* (Л), *AtRD22* (М), *AtCSD1* (Н), *AtCSD2* (О),

AtCAT1 (П), *AtDREB1A* (Р), *AtDREB2A* (С), *AtRD26* (Т) в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK20*, в сравнении контрольной линией (КА0) при в стандартных условиях (белые колонки) и во время условий засухи (серые колонки). Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличались.

После ряда экспериментов с трансгенными клеточными линиями и растениями, сверхэкспрессирующими ген *VaCDPK21*, оказалось, что ген *VaCDPK21* влияет на устойчивость растений *A.thaliana* и клеточных линий *V. amurensis* к солевому стрессу. Для получения дополнительных сведений об участии гена *VaCDPK21* в устойчивости *V. amurensis* к солевому стрессу мы провели анализ экспрессии стресс-ассоциированных генов *A. thaliana* в трехнедельных трансгенных растениях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21* и контрольной линии арабидопсиса КА0 с помощью метода ПЦР РВ (рис. 21). Установлено, что после 20 часов воздействия солевого стресса значительно увеличивался уровень экспрессии восьми стресс-индуцируемых генов, а именно *AtCOR15*, *AtCOR47*, *AtCAT1*, *AtCSD1*, *AtNHX1*, *AtKIN1*, *AtRD26*, *AtRD29B* в растениях, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, в сравнении с контролем (рис. 21).

Результаты серии экспериментов с *VaCDPK26*-трансгенными клеточными линиями *V. amurensis* и растениями *A. thaliana* демонстрируют, что ген *VaCDPK26* влияет на устойчивость как растений, так и клеточных линий *V. amurensis* к солевому стрессу и засухе. Для получения расширенных данных об участии гена *VaCDPK26* в сигнальных путях, обуславливающих устойчивость к солевому стрессу и засухе мы оценили экспрессию стресс-индуцируемых генов *A. thaliana* в контрольной линии арабидопсиса КА0 и четырех линиях *A. thaliana*, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK26*, под действием солевого стресса, дефицита воды и при контрольных условиях (рис. 22, 23).

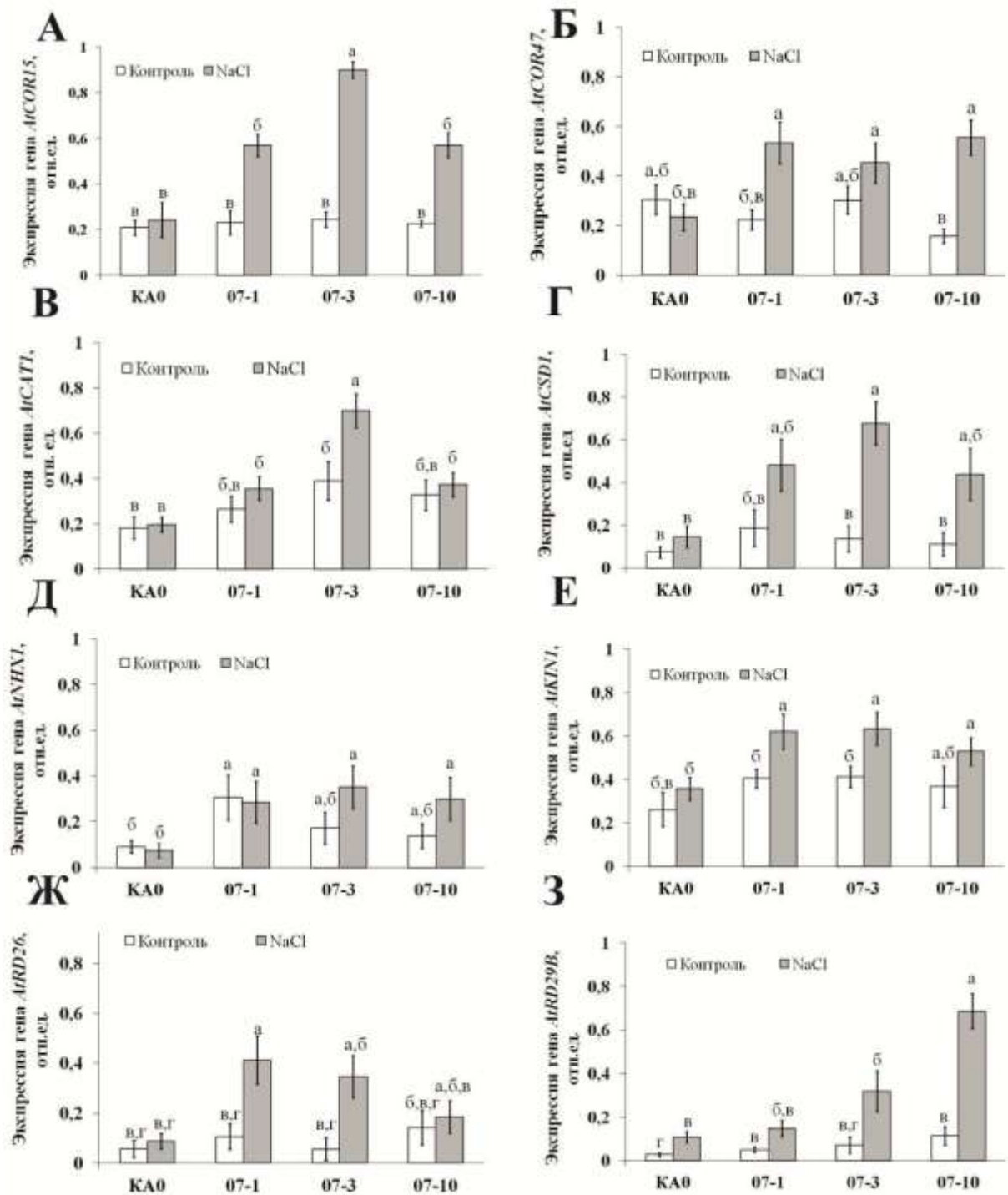


Рис. 21. Экспрессия стресс-индуцируемых генов *AtCOR15* (А), *AtCOR47* (Б), *AtCAT1* (В), *AtCSD1* (Г), *AtNHX1* (Д), *AtKIN1* (Е), *AtRD26* (Ж), *AtRD29B* (З) в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих *VaCDPK21*, в сравнении контрольной линией арабидопсиса (KA0) в стандартных условиях (белые колонки) и при солевом стрессе (серые колонки). Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличались.

При солевом стрессе в *VaCDPK26*-трансгенных растениях по сравнению с контрольной линией наблюдалось достоверное увеличение экспрессии трех из 27 анализируемых генов: увеличивалась экспрессия гена *AtCSD1* (в трех линиях, рис. 22В); *AtDREB1A* (в двух линиях рис. 22Г); *AtRD26* (в двух линиях, рис. 22Д). Кроме того, экспрессия генов *AtABI3* и *AtCOR15* в контрольных условиях без стрессовых воздействий была выше во всех трансгенных линиях, чем в контрольной (рис. 22А, Б).

В условиях засухи в трансгенных растениях по сравнению с контрольной линией, наблюдалось достоверное увеличение экспрессии 10 из 27 анализируемых генов (рис. 23). Достоверно увеличивалась экспрессия гена *AtABA1* (в двух линиях, рис. 23А); *AtABI2* (в трех линиях рис. 23Б); *AtCBF1* (в трех линиях, рис. 23В); *AtCSD1* (в двух линиях, рис. 23Г); *AtCSD2* (в двух линиях, рис. 23Д); *AtDREB1a* (в четырех линиях, рис. 23Е); *AtDREB2a* (в двух линиях, рис. 23Ж); *AtRab18* (в трех линиях, рис. 23З); *AtRD26* (в двух линиях, рис. 23И); *AtRD29A* (в двух линиях, рис. 23К).

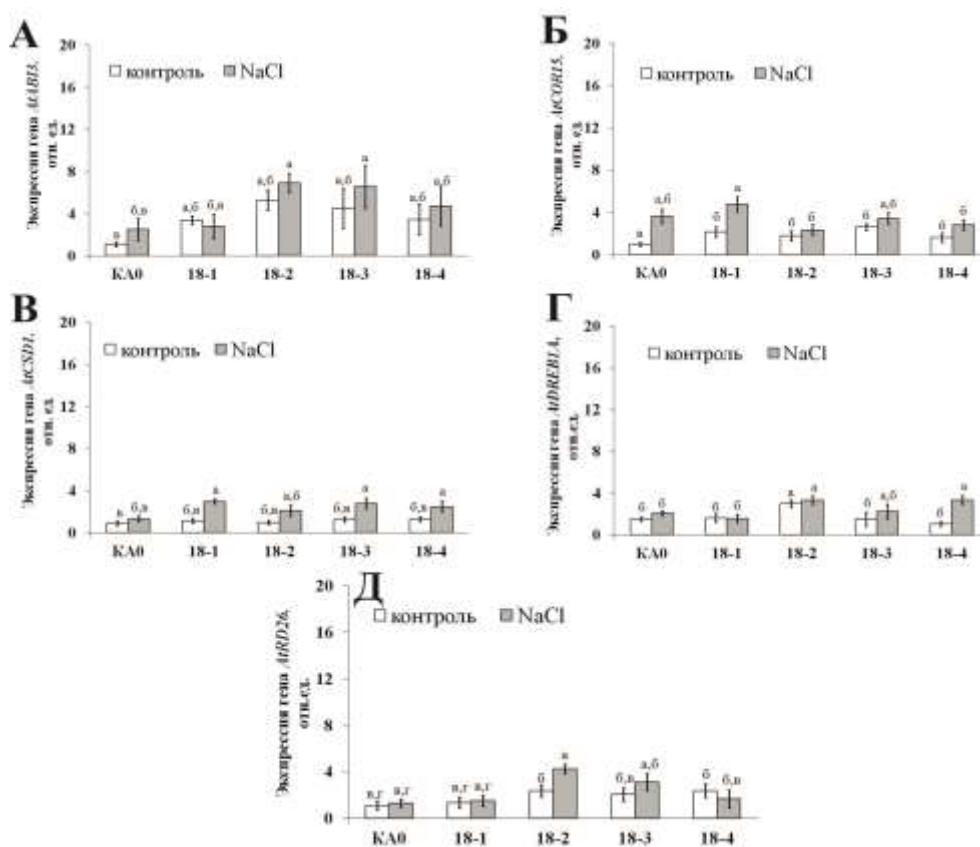


Рис. 22. Экспрессия стресс-индуцируемых генов *AtABI3* (А), *AtCOR15* (Б), *AtCSD1* (В), *AtDREB1A* (Г), *AtRD26* (Д) в линиях арабидопсиса,

сверхэкспрессирующего ген *VaCDPK26* в сравнении контрольной линией арабидопсиса (КА0) в контрольных условиях (белые колонки) и при солевом стрессе (серые колонки). Данные представлены как среднее значение \pm СО. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличались.

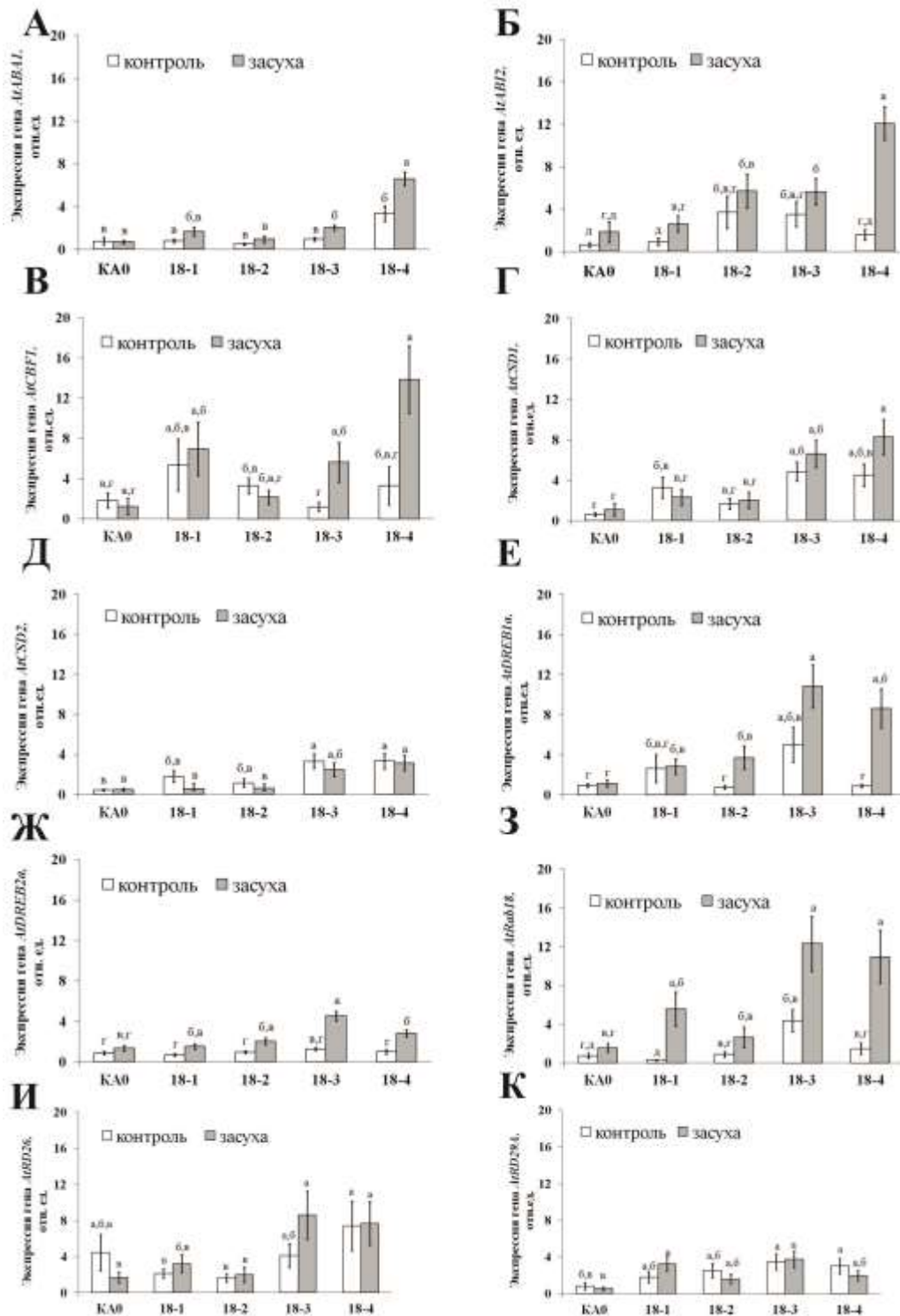


Рис. 23. Экспрессия стресс-индуцируемых генов *AtABA1* (А), *AtABI2* (Б), *AtCBF1* (В), *AtCSD1* (Г), *AtCSD2* (Д), *AtDREB1a* (Е), *AtDREB2a* (Ж), *AtRab18* (З), *AtRD26* (И), *AtRD29A* (К) в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих

ген *VaCDPK26* в сравнении контрольной линией арабидопсиса (КА0) в контрольных условиях (белые колонки) и во время засухи (серые колонки). Данные представлены как среднее значение \pm СО. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличались.

В ходе проведенных экспериментов обнаружено, что ген *VaCDPK29* влияет на устойчивость растений *A.thaliana* и клеточных линий *V. amurensis* к воздействию высоких температур и осмотического стресса. Для установления более точных механизмов работы гена *VaCDPK29* мы проанализировали экспрессию стресс-маркерных генов в контрольной линии арабидопсиса КА0 и в растениях, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK29* (рис. 24). В стандартных условиях культивирования все линии показали сходный уровень экспрессии стресс-маркерных генов, за исключением генов *AtRD29A* (линия 10-19) и *AtCSD2* (линия 10-18) в сравнении с контролем и другими линиями (рис. 24В, 3). Тенденция увеличения экспрессии наблюдалась при тепловом стрессе для генов *AtABF3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD29A* и *AtRD29B* во всех четырех *VaCDPK29*-трансгенных линиях по сравнению с контрольной линией КА0 *A. thaliana* (рис. 24А-Д).

В линиях арабидопсиса, трансгенных по гену *VaCDPK29*, наибольший уровень транскрипции проявил ген *AtDREB2A* (рис. 24Б), который активно экспрессируется при тепловом стрессе (Sakuma et al., 2006a; Schramn et al., 2008). В контрольной линии растений КА0 экспрессия генов *AtABF3*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD29A* и *AtRD29B* значительно не изменялась (рис. 24 А-Д). В ответ на тепловой стресс число транскриптов гена *AtCSD1* значительно увеличивалось в линиях 10-18 и 10-19 в сравнении с экспрессией в этих же линиях в стандартных условиях, а экспрессия гена *CSD2* отличался снижением экспрессии при тепловом стрессе как в контрольной линии КА0, так и в четырех *VaCDPK29*-трансгенных линиях относительно экспрессии в стандартных условиях (рис. 24 3). Таким образом, ген *VaCDPK29* участвует в адаптации растений к тепловому стрессу посредством регуляции экспрессии

стресс-индуцируемых генов *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD29A*, *AtRD29B* и *AtABF3*.

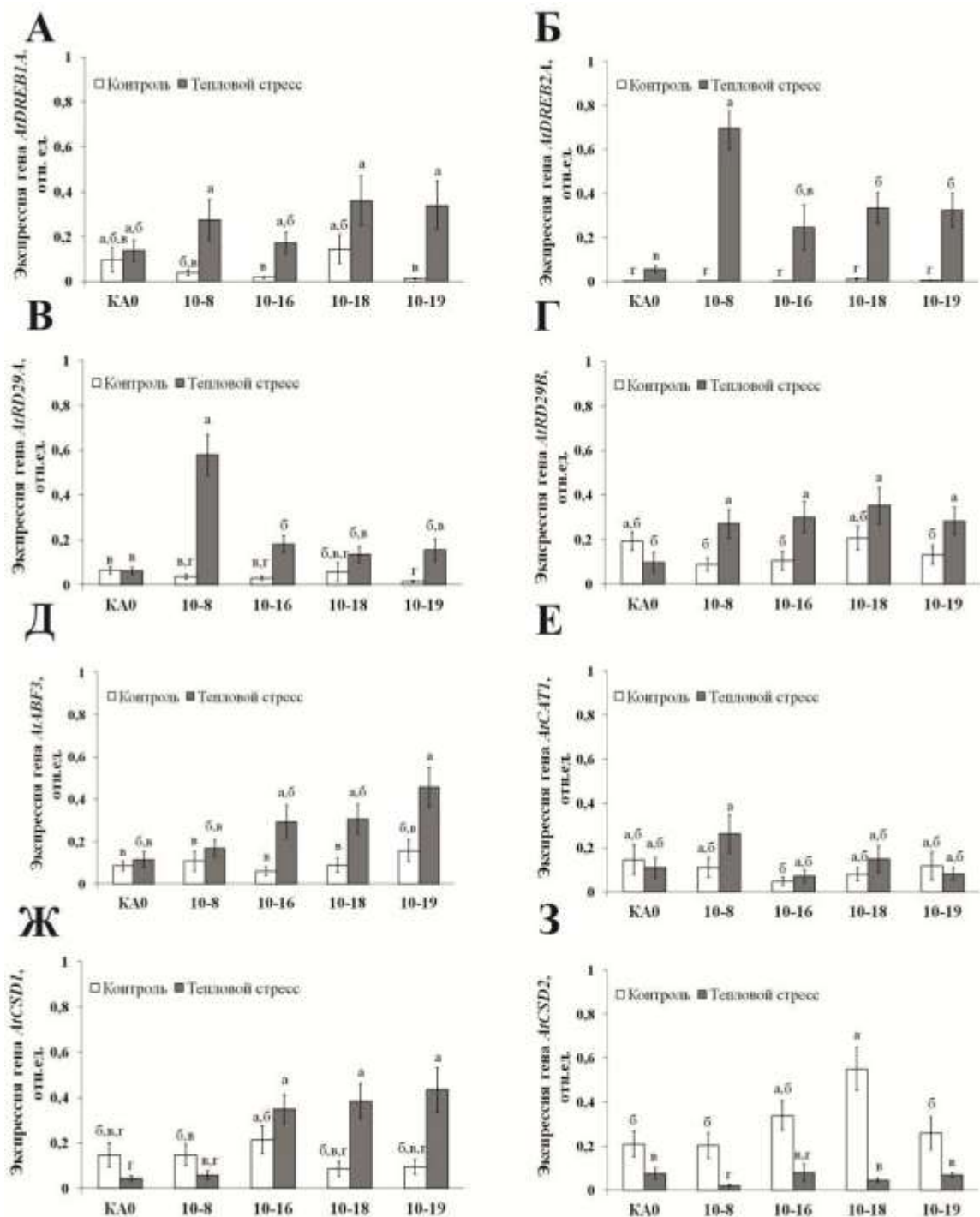


Рис. 24. Экспрессия стресс-индуцируемых генов *AtDREB1A* (А), *AtDREB2A* (Б), *AtRD29A* (В), *AtRD29B* (Г), *AtABF3* (Д), *AtCAT1* (Е), *AtCSD1* (Ж) и *AtCSD2* (З) в линиях арабидопсиса, сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK29*, в сравнении контрольной линией арабидопсиса (КА0) в контрольных условиях (+22°C, белые колонки) и после теплового стресса

(+45°C, 1.5 часа, серые колонки). Данные представлены как среднее значение \pm СО. Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значения, отмеченные одинаковыми буквами, статистически не отличались.

3.6. Анализ гомологии аминокислотных последовательностей

VaCDPK20, VaCDPK21, VaCDPK26, VaCDPK29.

Для установления предположительных функций генов *VaCDPK* нами был проведен анализ гомологии аминокислотных последовательностей VaCDPK20, VaCDPK21, VaCDPK26, VaCDPK29 с представителями семейства CDPK из *Oriza sativa*, *Populus trichocarpa*, *V. vinifera*, *V. pseudoreticulata*, *A. thaliana*.

Анализ гомологии аминокислотных последовательностей показал высокую идентичность между **VaCDPK20** и CDPK других растений, таких как AtCDPK1, AtCDPK2, AtCDPK20, OsCDPK27, PtCDPK2, PtCDPK16 и PtCDPK17 (табл. 6); **VaCDPK21** и AtCDPK9, AtCDPK21, AtCDPK23, AtCDPK33, OsCDPK19, PtCDPK18, PtCDPK19, VvCDPK12 и VvCDPK17 (табл. 7); **VaCDPK26** и AtCDPK6, AtCDPK26, OsCDPK26, OsCDPK13, TcCDPK26, VpCDPK2, VvCDPK26 (табл. 8); **VaCDPK29** и AtCDPK9, AtCDPK21, AtCDPK29, OsCDPK1, OsCDPK15, VvCDPK15, PtCDPK19, PtCDPK23, PtCDPK24 (табл. 9).

Табл. 6. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей гена *VaCDPK20* (KC488320) с другими известными CDPK растений.

	Белки CDPK (GenBank)	I,%	S,%
1	AtCDPK1 (NM_120569)	73	81
2	AtCDPK2 (NM_111902)	79	88
3	AtCDPK20 (NM_129449)	75	84
4	VvCDPK8(VIT_08s0032g00780)	99	99
5	OsCDPK27 (LOC_Os12g30150)	81	91
6	PtCDPK2 (POPTR_0008s01530)	76	86
7	PtCDPK16(POPTR_0006s21390)	76	85
8	PtCDPK17(POPTR_0016s06590)	77	85

I – аминокислотная идентичность; S – аминокислотная гомология.

Табл. 7. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей VaCDPK21 (KC488318) с другими известными CDPK растений.

	Белки CDPK (GenBank)	I,%	S,%
1	AtCDPK9 (NM112932)	80	91
2	AtCDPK21 (NM 116710)	75	85
3	AtCDPK33 (NM 103952)	78	88
4	OsCDPK19 (AP004269)	84	93
5	PtCDPK18 (POPTR_0004s01530)	75	100
6	PtCDPK19 (POPTR_0021s00750)	86	86
7	VvCDPK12(VIT_10s0116g0180)	86	89
8	VvCDPK17(VIT_19s0090g0041)	79	99
9	ZmCDPK9(GRMZM2G168706_)	75	94
10	ZmCDPK25(GRMZM2G154489)	80	90

I – аминокислотная идентичность; S – аминокислотная гомология.

Табл. 8. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей гена VaCDPK26 (KC488323) с другими известными CDPK растений.

	Белки CDPK (GenBank)	I, %	S, %
1	AtCDPK6 (OAP08681)	83	91
2	AtCDPK26 (NP_001190949)	85	93
3	OsCDPK26 (XP_015635476)	76	83
4	OsCDPK13 (Q9FXQ3)	76	84
5	TcCDPK26 (XP_007043083)	90	95
6	VpCDPK2 (AKO82460)	98	99
7	VvCDPK26 (XM_002282994)	99	99

I – аминокислотная идентичность; S – аминокислотная гомология.

Табл. 9. Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей гена VaCDPK29 (KC488317) с другими известными CDPK растений.

	Белки CDPK (GenBank)	I,%	S,%
1	AtCDPK9 (NM_112932)	70	85
2	AtCDPK21 (NM_116710)	69	82
3	AtCDPK29 (NM_202421)	68	81
4	OsCDPK1 (LOC_Os01g43410)	67	83

5	OsCDPK15 (GB acc. no AC137608)	68	84
6	VvCDPK15 (VIT_18s0001g00990)	98	98
7	PtCDPK19 (POPTR_0021s00750)	73	87
8	PtCDPK23 (POPTR_0002s01850)	72	81
9	PtCDPK24 (POPTR_0005s26640)	74	83

I – аминокислотная идентичность; S – аминокислотная гомология.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Ca²⁺-зависимые протеинкиназы у растений представлены мультигенными семействами. Так, у культурного винограда *V. vinifera* описано почти 20 генов *CDPK* (Zhang et al., 2015). Ранее нами было описано 13 генов *CDPK* у винограда амурского (Dubrovina et al., 2013). Затем 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 исследования влияния сверхэкспрессии выбранного гена на устойчивость трансгенных клеток винограда к абиотическим стрессам. В случае если эксперименты на культуре клеток *in vitro* подтверждали результаты, полученные ранее на лианах винограда, то далее получали *CDPK*-трансгенные растения *A. thaliana* и исследовали устойчивость полученных растений к 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 холодovому 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* (табл. 6). Известно, что *AtCDPK1* и *AtCDPK2* играют ключевую роль в устойчивости растений к биотическим стрессам (Coca and San Segundo, 2010; Gao et al., 2013). Более того, нами ранее (Dubrovina et al., 2010) было показано, что экспрессия этих генов увеличивалась в ответ на низкие температуры и дефицит воды в растениях *A.thaliana*, что указывает на вовлеченность этих гомологов арабидопсиса на адаптацию растений к этим стрессовым воздействиям и подтверждает данные, полученные нами для *CDPK20 V. amurensis*. К сожалению, точные биологические функции *AtCDPK20*, *OsCDPK27*, *PtCDPK2*, *PtCDPK16* и *PtCDPK17* пока остаются неизвестными.

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 холодovому стрессу, в то время как гены *AtCBF1*, *AtP5CS*, *AtRD29B*, *AtCOR15*, *AtRD22*, *AtCSD2*, *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtRD26* не вовлечены, вероятно, в увеличение устойчивости к холодovому 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 засуху.

Таким образом, сверхэкспрессия гена *VaCDPK20* ведет к увеличению уровня транскрипции определенных стресс-индуцируемых генов в ответ на холодовой стресс 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* (табл. 7), из них наибольшую степень гомологии имели *VvCDPK12* и *VvCDPK17* *V. vinifera* и *V. pseudoreticulata* (Chen et al., 2013; Zhang et al., 2015) (табл. 7). Анализ с помощью технологии ДНК микрочипов, выполненного Chen с коллегами (2013a), и ПЦР РВ, выполненного Zhang с коллегами (2015) показали, что экспрессия генов *CDPK12* и *CDPK17* увеличивалась в ответ на солевой стресс у *V. vinifera* и *V. pseudoreticulata*. Таким образом, данные по гомологам CDPK из различных представителей семейства Vitaceae подтверждают предположение о том, что *VaCDPK21* вовлечен в устойчивость дикого винограда к солевому стрессу. Показано, что гомологи *VaCDPK21* из арабидопсиса (*AtCDPK21* и *AtCDPK23*) активируют SLAC1 и SLAN3 анионные каналы в ответ на воздействие АВА и действуют как позитивные регуляторы в АВА-индуцированном закрытии устьиц (Geiger et al., 2010). Ранее было отмечено, что отсутствие способности закрывать

устыща в условиях солевого стресса является главной причиной солевой чувствительности некоторых растений (Tester and Davenport, 2003). Хотя снижение устьичной проводимости не увеличивает, вероятно, продуктивность растений, однако может увеличивать выживаемость растений в условиях высоких концентраций солей. Franz с коллегами (2011) показали, что AtCDPK21 активируется *in vivo* в ответ на гиперосмотический стресс. Однако, в противоречие нашим данным – мутанты растений арабидопсиса *cpk21* и *cpk23* показали повышение устойчивости к осмотическому стрессу и засухе/соли соответственно и накапливали стресс-ассоциированные метаболиты, в то время как сверхэкспрессия генов *AtCDPK21* и *AtCDPK23* не оказывала позитивный эффект на устойчивость к солевому воздействию растений арабидопсиса (Ma and Wu 2007; Franz et al., 2011). Выживаемость мутантов *cpk21* не отличалась от выживаемости растений арабидопсиса дикого типа. Гены *AtCDPK21* и *AtCDPK23* выполняют функции негативных регуляторов в устойчивости растений к абиотическим стрессам. Биологические функции *AtCDPK9*, *AtCDPK33*, *OsCDPK19*, *PtCDPK18* и *PtCDPK19* в растениях остаются пока неизвестными.

Показано, что гомолог CDPK из арабидопсиса *AtCDPK21* активируют SLAC1 и SLAH3 каналы в ответ на воздействие АВА и действует как позитивный регулятор в АВА-индуцированном закрытии устьиц (Geiger et al., 2010). Исследование Franz с коллегами (2011) показало, что *AtCDPK21* активируется в *in vivo* в ответ на гиперосмотический стресс, однако сверхэкспрессия гена *AtCDPK21* в арабидопсисе не оказывала позитивные эффект на устойчивость к солевому и осмотическому стрессам, что дает основание полагать, что *AtCDPK21* действует как негативный регулятор в сигналинге абиотического стресса. В соответствии с исследованиями Zuo с коллегами (2013), экспрессия гена *PtCDPK19* увеличивалась в ответ на засуху. Биологические функции *AtCDPK9*, *AtCDPK29*, *OsCDPK1*, *OsCDPK15* и *PtCDPK24* в растениях остаются пока неизвестными.

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 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* не участвуют, вероятно, в механизмах, обеспечивающих устойчивость *VaCDPK21*-трансгенных растений арабидопсиса к солевому стрессу.

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 холодовому и низкотемпературному стрессу не наблюдается. Анализ гомологичных аминокислотных последовательностей показал высокую идентичность между *VaCDPK26* и различными представителями семейства CDPK из других растений (табл. 8). Интересно отметить, что экспрессия близких гомологов *VaCDPK26* у арабидопсиса (*AtCDPK6*) и риса (*OsCDPK13*) увеличивалась при солевом и осмотическом стрессе (Ray et al., 2007; Xu et al., 2010). Более того, как и в наших экспериментах, сверхэкспрессия гена *AtCDPK6* в клетках арабидопсиса увеличивала устойчивость к солевому стрессу и засухе (Xu et al., 2010).

С целью изучения участия гена *VaCDPK26* в устойчивости растений к солевому стрессу и засухе, проведенный нами анализ экспрессии ключевых стресс-маркерных генов *A. thaliana*, индуцируемых различными

абиотическими стрессами, 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. Интересно отметить, что гены *AtABA1* и *AtABI2* участвуют в биосинтезе АБК и передаче ее сигнала. Ранее было показано, что сверхэкспрессия *AtABA1* приводит к устойчивости растений к засолению и засухе (Xiong et al., 2002). Кроме того, сверхэкспрессия гена *VaCDPK26* приводит к увеличению экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов (*DREB1a*, *DREB2a*, *RD26* и *RD29A*), которые участвуют в устойчивости к засухе и засолению (Liu et al., 1998; Fujita et al., 2004; Msanne et al., 2011). Также показано, что накопление мРНК гена *AtRab18* резко возрастало при низких температурах, засухе или добавлении АБК (Welin et al., 1994). Таким образом, сверхэкспрессия гена *VaCDPK26* приводит к увеличению экспрессии стресс-маркерных генов, увеличивая тем самым устойчивость растений к водному дефициту и осмотическому стрессам.

Сверхэкспрессия гена *VaCDPK29* улучшает 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*, как показано в табл. 9. *VaCDPK29* имеет высокую степень гомологии с *VvCDPK15 V. vinifera* (Chen

et al., 2013a; Zhang et al., 2015). Экспрессия *VpCDPK15* увеличивалась в растениях *V. pseudoreticulata* в ответ на температурные стрессы и солевой стресс (Zhang et al., 2015). Данные Zhang с коллегами (2015) по экспрессии гена *VpCDPK15* в ответ на абиотические стрессы не противоречат нашему предположению о том, что ген *VaCDPK29* вовлечен в устойчивость растений к высокотемпературному стрессу.

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 винограда, 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехина Н. Д., Балнокин Ю. В., Гавриленко В. Ф. Физиология растений. М. "Academia". 2005, 640 с.
2. Березина Н.А., Афанасьева Н.Б. Экология растений. М. Академия. 2009, 400 с.
3. Бильданова Л.Л., Салина Е.А., Шумный В.К. (2012) Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 16 (1).
4. Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютикова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. (2009) Трансгенные растения, толерантные к абиотическим стрессам // *Цитология и генетика*. 2: 72 – 93.
5. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. Учебник. Изд. 2-е, перераб. и доп. М. Высш. шк. 2006, 742 с.
6. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. М.: Высш. шк. 1990, 124 с.
7. Медведев С.С. (2005) Кальциевая сигнальная система растений // *Физиология растений*. 1: 1 – 24.
8. Медведев С.С. Физиология растений. Издательство Санкт-Петербургского университета. 2004, 336 с.
9. Abdeen A., Schnell J., Miki B. (2010) Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor ABF3// *BMC Genom.* 11:69.
10. Agre P. (2006) The aquaporin water channels // *Proc Am Thorac Soc.* 3 (1): 5 – 13.
11. Aleynova-Shumakova O.A., Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., Kiselev K.V. (2014) *VaCDPK20* gene overexpression significantly increased resveratrol content and expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr // *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 5541 – 5549.
12. Aleynova O.A., Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Karetin Y.A., Kiselev K.V. (2015) Regulation of resveratrol production in *Vitis amurensis* cell cultures

- bycalcium-dependent protein kinases // *Appl Biochem Biotechnol.* 175: 1460 – 1476.
13. Asano T., Hayashi N., Kobayashi M., Aoki N., Miyao A., Mitsuhara I., Ichikawa H., Komatsu S., Hirochika H., Kikuchi S., Ohsugi R. (2012) A rice calcium-dependent protein kinase OsCDPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance // *Plant J.* 69:26 – 36.
14. Agarwal P.K., Jha B. (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling // *Biologia Plantarum.* 54: 201 – 212.
15. Badawi G. H., Kawano N., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kubo A., Tanaka K. (2004) Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit // *Physiol Plant.* 121: 231 – 238.2
16. Bartels D., Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants // *Crit Rev Plant Sci.* 24:23 – 58.
17. Bekesiova I., Nap J.P., Mlynarova L. (1999) Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* // *Plant Mol Biol Rep.* 17: 269 – 277.
18. Bennett M.D., Leitch I.J., Price H.J., Johnston J.S. (2003) Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of 125 Mb // *Ann Bot* // 91: 547 – 557.
19. Bootman M.D., Petersen O.H., Verkhratsky A. (2002) The endoplasmic reticulum is a focal point for co-ordination of cellular activity // *Cell Calcium.* 32: 231-234.
20. Boudsocq M., Sheen J. (2013) CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci* // 18: 30 – 40.
21. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* 1st Edition, 2012.

22. Cai R., Zhao Y., Wang Y., Lin Y., Peng X., Li Q., Chang Y., Jiang H., Xiang Y., Cheng B. (2014) Overexpression of a maize *WRKY58* gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice // *Plant Cell Tiss Org Cult.* 119: 565 – 577.
23. Chang W.J., Su H.S., Li W.J., Zhang Z.L. (2009) Expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, *LeCDPK2*, from tomato (*Solanum lycopersicum*) under heat and pathogen-related hormones // *Biosci Biotechnol Biochem.* 73(11):2427 – 2431.
24. Cheng S.H., Willmann M.R., Chen H.C., Sheen J. (2002) Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family // *Plant Physiol.* 129:469 – 485.
25. Chen Y., Chen D.F., and Wang S.L. (2008) Analyse on amino acids and nutrient elements content in the seed of *Vitis amurensis* // *For Sci Tech.* 5: 55 – 56.
26. Chen F., Fasoli M., Tornielli G.B., Dal Santo S., Pezzotti M., Zhang L., Cai B., Cheng Z.M. (2013a) The evolutionary history and diverse physiological roles of the grapevine calcium-dependent protein kinase gene family // *PLoS One.* 8: e80818.
27. Chen J., Xue B., Xia X., Yin W. (2013b) A novel calcium-dependent protein kinase gene from *Populus euphratica*, confers both drought and cold stress tolerance // *Biochem Biophys Res Commun.* 441(3):630 – 6.
28. Choi Y.S., Kim Y.M., Hwang O.J., Han Y.-J., Kim S., and Kim J.-I. (2013) Overexpression of *Arabidopsis* ABF3 gene confers enhanced tolerance to drought and heat stress in creeping bentgrass // *Plant Biotechnol Rep.* 7(2): 165 – 173.
29. Coca M., San Segundo B. (2010) AtCDPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis* // *Plant J.* 63: 526 – 540.
30. Coelho S.M., Peters A.F., Charrier B., Rozeb D., Destombe C., Valerob M., M. J. Cock. (2007) Complex life cycles of multicellular eukaryotes: new approaches based on the use of model organisms // *Gene.* 406: 152 – 70.

31. Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., Scheible W.R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 139: 5 – 17.
32. Das R., Pandey G.K. (2010) Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling // *Curr Genomics.* 11: 2 – 13.
33. DeFalco T.A., Bender K.W., Snedden W.A. (2010) Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signaling // *Biochem J.* 425: 27 – 40.
34. Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression // *Plant J.* 33: 751 – 763.
35. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S. (2013) Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis*// *J Plant Physiol.* 170 (17): 1491 – 500.
36. Evans N.H., McAinsh M.R., Hetherington A.M. (2001) Calcium oscillations in higher plants // *Curr Opin Plant Biol.* 4: 415 – 420.
37. Finkelstein R. (2013) Abscisic acid synthesis and response // *Arabidopsis Book*, 11: e0166.
38. Franz S., Ehlert B., Liese A., Kurth J., Cazale' A.C., Romeis T. (2011) Calcium-dependent protein kinase CDPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana* // *Mol Plant.* 4(1): 83 – 96.
39. Fujita M., Fujita Y., Maruyama K., Seki M., Hiratsu K., Ohme-Takagi M., Tran L.S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway // *Plant J.* 39: 863 – 876.
40. Gao C., Xing D., Li L., Zhang L. (2007) Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure // *Planta.* 227:755 – 767.
41. Gao X., Chen X., Lin W., Chen S., Lu D., Niu Y., Li L., Cheng C., McCormack M., Sheen J., Shan L., He P. (2013) Bifurcation of *Arabidopsis* NLR

immune signaling via Ca^{2+} -dependent protein kinases // *PLoS Pathog.* 9: e1003127.

42. Ge Y.X., Shen Y.J., Li X.H., Ai J., Zang P. (1997) Vistas in the research of the major economic characters of the germplasm resources of *Vitis amurensis*.

(1997) *Spec Wild Econ Anim Plant Res.* 4: 37 – 42.

43. Geiger D., Scherzer S., Mumm P., Marten I., Ache P., Matschi S., Liese A., Wellmann C., Al - Rasheid K.A., Grill E., Romeis T., Hedrich R. (2010) Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca^{2+}

Affinities // *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:8023 – 8028

44. Ghassemi F., Jakeman A., Nix H.A. (1995) Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies // *UNSW Press*, Sydney, Australia.

45. Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M., Thomashow M.F. (1998) Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression // *Plant J.* 16: 433 – 442.

46. Gonen T., Walz T. (2006) The structure of aquaporins // *Q Rev Biophys.* 39 (4): 361 – 96.

47. Guo S., Yin H., Zhang X., Zhao F., Li P., Chen S., Zhao Y., Zhang H. (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H^{+} - pyrophosphatase gene, SsVP, from the *halophyte Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis* // *Plant Mol Biol.* 60: 41 – 50.

48. Guo L., Yang H., Zhang X., Yang S. (2013) Lipid transfer protein 3 as a target of MYB96 mediates freezing and drought stress in *Arabidopsis* // *J Exp Bot.* 64 (6):1755 – 1767.

49. Hanana M., Deluc L., Fouquet R., Daldoul S., Léon C., Barrieu F., Ghorbel A., Mliki A., Hamdi S. (2008) Identification and characterization of "rd22" dehydration responsive gene in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *C R Biol.* 331(8):569 – 78.

50. Harmon A.C., Gribnov M., Harper J.F. (2000) CDPKs - a Kinase for Every Ca^{2+} Signal? // *Trends Plant Sc.* 5:54 – 159.
51. Harmon A.C., Gribskov M., Gubrium E., Harper J.F. (2001) The CDPK superfamily of protein kinases // *New Phytol.* 151:175 – 83.
52. He P.C., Wang Y.J., Wang G.Y., Pen Z.B., He C.C. (1991) The studies on the disease resistance of *Vitis* wild species originated in China // *Sci Agric Sin.* 24: 50 – 56.
53. Hong Z., Lakkineni K., Zhang K., Verma D. P. S. (2000) Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress // *Plant Physiol.* 122: 1129 – 1136.
54. Hsieh T.H., Lee J.T., Yang P.T., Chiu L.H., Charng Y.Y., Wang Y.C., Chan M.T. (2002) Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato // *Plant Physiol.* 129(3):1086 – 94.
55. Ingram J., Bartels D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47: 377 – 403.
56. Jeong M.J., Lee S.K., Kim B.G., Kwon T.R., Cho W.S., Park Y.T. 2006. A rice (*Oryza sativa* L.) MAP kinase gene, *OsMAPK44*, is involved in response to abiotic stresses // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 85:151 – 160.
57. Jiang S., Zhang D., Wang L., Pan J., Liu Y., Kong X., Zhou Y., Li D. (2013) A maize calcium-dependent protein kinase gene, *ZmCDPK4*, positively regulated abscisic acid signaling and enhanced drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* // *Plant Physiol Biochem.* 71:112 – 20.
58. Jaillon O., Aury J.M., Noel B., Policriti A., Clepet C., Casagrande A., Choisne N., Aubourg S., Vitulo N., Jubin C., Vezzi A., Legeai F., Hugueney P., Dasilva C., Horner D., Ugarte E., Cattonaro F., Anthouard V., Vico V., Del Fabbro C., Alaux M., Di Gaspero G., Dumas V., Felice N., Paillard S., Juman I., Moroldo M., Scalabrin S., Canaguier A., Le Clainche I., Malacrida G., Durand E., Pesole G., Laucou V., Chatelet P., Merdinoglu D., Delledonne M., Pezzotti

- M., Lecharny A., Scarpelli C., Artiguenave F., Pè M.E., Valle G., Morgante M., Caboche M., Adam-Blondon A.F., Weissenbach J., Quétier F., Wincker P. (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla // *Nature*. 449:463 – 7.
59. Kader J.C., Julienne M., Vergnolle C. (1984) Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts // *Eur J Biochem*. 139: 411 – 416.
60. Kang J.Y., Choi H.I., Im M.Y., Kim S.Y. (2002) *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling // *Plant Cell*. 14:343 – 357.
61. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor // *Nat Biotechnol*. 17:287 – 91.
62. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2007) The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // *J Biotechnol*. 128: 681 – 692.
63. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. (2009) Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 82: 647 – 655.
64. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N. (2011) Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine // *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 105: 65 – 72.
65. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Tyunin A.P. (2015) The methylation status of plant genomic DNA influences PCR efficiency // *J Plant Physiol*. 175:59 – 67.
66. Kim J.B., Kang J.Y., Kim S.Y. (2004) Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance // *Plant Biotechnol J*. 2:459 – 466.
67. Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. (1995) Overexpression of A1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline

Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants // *Plant Physiol.* 108: 1387 – 1394.

68. Kiyosue T., Yoshiba Y., Yamaguchi -Shinozaki K., Shinozaki K. (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 8:1323 – 1335.

69. Klimecka M., Grazyna M. (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases // *Acta Biochim Pol.* 54: 213 – 33.

70. Klueva N.Y., Maestri E., Marmioli N., Nguyen H.T. (2001) Mechanisms of Thermotolerance in Crops // *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress.* 177-181.

71. Komatsu S., Yang G., Khan M., Onodera H., Toki S., Yamaguchi M. (2007) Overexpression of calcium-dependent protein kinase 13 and calreticulin interacting protein 1 confers cold tolerance on rice plants // *Mol Genet Genomics.* 277:713 – 723.

72. Kurkela S., Franck M. (1990) Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene // *Plant Mol Biol.* 1: 137 – 44.

73. Lang V., Palva E.T. (1992) The expression of a rab-related gene, rab18, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *Plant Mol Biol.* 20(5):951 – 62.

74. Larkindale J., Hall J.D., Knight M.R., Vierling E. (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance // *Plant Physiol.* 138: 882 – 897.

75. Lee J., Rudd J.J. (2002) Calcium Dependent Protein Kinase: Versatile Plant Signalling Components Necessary for Pathogen Defense // *Trends Plant Sci.* 7: 97 – 98.

76. Leung J., Merlot S., Giraudat J. (1997) The *Arabidopsis* abscisic acid-insensitive 2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction // *Plant Cell.* 9: 759 – 60.

77. Li J.M., He P.C. (2000) Study on important wine making quality character of Chinese wild *Vitis* // *Sci Agric Sin.* 33:17 – 23.
78. Li Z. (2009) The isolation and identification of yeasts from the course of spontaneous fermentation of *V. amurensis* Rupr. grape // MSc thesis, North East Forestry University, Heilongjiang, China.
79. Li H.W., Zang B.S., Deng X.W., Wang X.P. (2011) Over expression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice // *Planta.* 234 :1007 – 18.
80. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* 25: 402 – 408.
81. Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature- responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 10:1391 – 1406.
82. Liu G., Chen J., Wang X. (2006) VfCDPK1, a gene encoding calcium-dependent protein kinase from *Vicia faba*, is induced by drought and abscisic acid // *Plant Cell Environ.* 29: 2091 – 2099.
83. Liu S., Zheng L., Xue Y., Zhang Q., Wang L., Shou H. (2010) Overexpression of *OsVPI* and *OsNHX1* increases tolerance to drought and salinity in rice // *J Plant Biol.* 53: 444 – 452.
84. Liu P., Yang G.D., Li H., Zheng C.C., Wu C.A. (2010) Overexpression of *NHX1* in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high salinity and drought conditions // *Acta Physiol Plant.* 32: 81 – 90.
85. Liu H., Zhou X., Dong N., Liu X., Zhang H., Zhang Z. (2011) Expression of a wheat MYB gene in transgenic tobacco enhances resistance to *Ralstonia solanacearum*, and to drought and salt stresses // *Funct Integr Genomics.* 11: 431 – 443.

86. Ma S.Y., Wu W.H. (2007) AtCDPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses // *Plant Mol Biol.* 65(4):511 – 518.
87. Ma L., Zhou E., Gao L., Mao X., Zhou R., Jia J. (2008) Isolation, expression analysis and chromosomal location of P5CR gene in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *S Afr J Bot.* 74: 705 – 712.
88. Meyerowitz E.M. (2001) Prehistory and History of Arabidopsis Research // *Plant Physiol.* 125:15 – 19.
89. Molinari H.B.C., Marur C.J., Bessalho F.J.C., Kobayashi K., Pileggi M., Leite R.P. (2004). Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb 9 *Poncirus trifoliata* L. Raf) overproducing proline // *Plant Sci.* 167: 1375 – 1381.
90. Morgan J.M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants // *Annu Rev Plant Physiol.* 35:299 – 319.
91. Moriwaki T., Yamamoto Y., Aida T., Funahashi T., Shishido T., Asada M. (2008) Overexpression of the *Escherichia coli* catalase gene, *katE*, enhances tolerance to salinity stress in the transgenic indica rice cultivar, BR5 // *Plant Biotechnol Rep*, 2:41 – 46.
92. Msanne J., Lin J., Stone J.M., Awada T. (2011) Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes // *Planta.* 234: 97 – 107.
93. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Kakubari Y., Yamaguchi- Shinozaki K., Shinozaki K. (1999) Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* 461: 205 – 210.
94. Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R., Salinas J. (2004) CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis* // *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:3985 – 90.
95. Otero AS. (2000) NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction // *J Bioenerg Biomembr* // 32: 269 – 275.

96. Prashanth S.R., Sadhasivam V., Parida A. (2008) Overexpression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance // *Transgenic Res.* 17: 281 – 291.
97. Puhakainen T., Hess M.W., Makela P., Svensson J., Heino P., Palva E.T. (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis* // *Plant Mol Biol.* 54: 743 – 753.
98. Ray S., Agarwal P., Arora R., Kapoor S., Tyagi A.K. (2007) Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) // *Mol Genet Genomics.* 278:493 – 505.
99. Reddy V.S., Reddy A.S. (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants // *Phytochemistry.* 65: 1745 – 1776.
100. Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F., Lund S.T. (2006) An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development // *BMC Plant Biol.* 6:27.
101. Rensink W.A., Buell C.R. (2004) *Arabidopsis* to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species // *Plant Physiol.* 135: 622 – 629.
102. Rhodes D., Samaras Y. (1994) Genetic control of osmoregulation in plants // *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation.* 416.
103. Sakuma Y., Maruyama K., Qin F., Osakabe Y., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006a) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression // *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:18822 – 18827.
104. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2006b) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression // *Plant Cell.* 18: 1292 – 1309.

105. Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto K., Izui K. (2000) Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants // *Plant J.* 23:319 – 327.
106. Schramm F., Larkindale J., Kiehlmann E., Ganguli A., English G., Vierling E., von Koskull-Doring P. (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of *Arabidopsis* // *Plant J.* 53: 264 – 274.
107. Sheen J. (1996) Ca-dependent protein kinase and stress signal transduction in plants // *Science.* 274: 1900 – 1902.
108. Si J., Wang J.H., Zhang L.J., Zhang H., Liu Y.J., An L.Z. (2009) CbCOR15, a cold-regulated gene from alpine *Chorispora bungeana*, confers cold tolerance in transgenic tobacco // *J Plant Biol.* 52: 593 – 601.
109. Song R.G., Zheng Y.C., Lu W., Shen Y.J., Fan S.T., Yang Y.M., Li X.H. and Lin X.G. (2008) Genetic analysis of resistance to *Plasmopara viticola* disease in progenies derived from interspecific hybridization with *Vitis amurensis* // *J Fruit Sci.* 25: 33 – 39.
110. Strizhov N., Abraham E., Okresz L., Blickling S., Zilberstein A., Schell J., Koncz C., Szabados L. (1997) Differential expression of two pyrroline-5-carboxylate synthetase genes controlling proline accumulation during salt stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis* // *Plant J.* 12: 557 – 569.
111. Székely G., Abrahám E., Csépló A., Rigó G., Zsigmond L., Csiszár J., Ayaydin F., Strizhov N., Jásik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. (2008) Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis // *Plant J.* 53(1): 11 – 28.
112. Su J., Wu R. (2004) Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis // *Plant Sci.* 166: 941 – 948.
113. Tang L., Kim M.D., Yang K.S., Kwon S.Y., Kim S.H., Kim J.S., Yun D.J., Kwak S.S., Lee H.S. (2008) Enhanced tolerance of transgenic potato plants

- overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses // *Transgenic Res.* 17(4): 705 – 15.
114. Tester M., Davenport R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants // *Ann Bot.* 91(5): 503 – 527.
115. Thomashow M.F. (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // *Plant Physiol.* 118: 1 – 8.
116. Trewavas A.J., Malhó R. (1998) Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network // *Curr Opin Plant Biol.* 1: 428 – 433.
117. Tzfira T., Tian G.W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y., Krichevsky A., Taylor T., Vainstein A., Citovsky V. (2005) pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants // *Plant Mol Biol.* 57: 503– 516.
118. Urao T., Katagiri T., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Shinozaki K. (1994) Two genes that encode Ca²⁺-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana* // *Mol Gen Genet.* 244: 331 – 340.
119. Vaseva I., Sabotic J., Sustar-Vozlic J., Meglic V., Kidric M., Demirevska K., Simova-Stoilova L. (2012) The response of plants to drought stress: the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function // Nova Siense Publishers Inc. 1 – 46.
120. Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants // *Annu Rev Plant Biol.* 42: 579 – 620.
121. Wan B., Lin Y., Mou T. (2007) Expression of rice Ca²⁺ -dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses // *FEBS Lett.* 581: 1179 – 1189.
122. Wang X., Tong H., Chen F., Gangemi D. (2010) Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract // *Food Chem.* 123: 1156 – 1162.

123. Wang C., Jing R., Mao X., Chang X., Li A. (2011) TaABC1, a member of the activity of bcl complex protein kinase family from common wheat, confers enhanced tolerance to abiotic stresses in *Arabidopsis* // *J Exp Bot.* 62: 1299 – 1311.
124. Wang H., Wang H., Shao H., Tang X. (2016) Recent Advances in Utilizing Transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology // *Front Plant Sci.* 7: 67.
125. Warming E., Balfour I.B., Groom P., Vahl M. (2014) Ecology of plants. Oxford University Press, London: 336.
126. Wei S., Hu W., Deng X., Zhang Y., Liu X., Zhao X., Luo Q., Jin Z., Li Y., Zhou S., Sun T., Wang L., Yang G., He G. (2014) A rice calcium-dependent protein kinase OsCDPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility // *BMC Plant Biol.* 14:133.
127. Witcombe J.R., Hollington P.A., Howarth C.J., Reader S., Steele K.A. (2008) Breeding for abiotic stresses for sustainable agriculture // *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 363:703 – 716.
128. Wyn Jones R. G., Pollard A. (1983) Proteins, enzymes and inorganic ions // *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series.* 15: 528 – 562.
129. Xiong L., Schumaker K. S., Zhu J.-K.. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress // *The Plant Cell.* 14:165 – 183.
130. Xiong L., Yang Y. (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase // *The Plant Cell.* 5: 745 – 759.
131. Xiong Y., Zhang W.M. (2007) Research and utilization of cold resistance of chinese wild *Vitis* // *J Anhui Agric Sci.* 35: 3238 – 3239.
132. Xiong A.S., Jiang H.H., Zhuang J., Peng R.H., Jin X.F., Zhu B., Wang F., Zhang J., Yao Q.H. (2013) Expression and function of a modified AP2/ERF transcription factor from *Brassica napus* enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis* // *Mol Biotechnol.* 53: 198 – 206.
133. Xu J., Tian Y.S., Peng R.H., Xiong A.S., Zhu B., Jin X.F., Gao F., Fu X.Y., Hou X.L., Yao Q.H. (2010) AtCDPK6, a functionally redundant and positive

- regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis* // *Planta*. 231: 1251 – 1260.
134. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses // *Annu Rev Plant Biol*. 57: 781 – 803.
135. Yue Y., Zhang M., Zhang J., Duan L., Li Z. (2012) *SOS1* gene overexpression increased salt tolerance in transgenic tobacco by maintaining a higher K^+/Na^+ ratio // *J Plant Physiol*. 169(3): 255 – 261.
136. Zhao J., Gao Y., Zhang Z., Chen T., Guo W., Zhang T. (2013) A receptor like kinase gene (GbRLK) from *Gossypium barbadense* enhances salinity and drought-stress tolerance in *Arabidopsis* // *BMC Plant Biol*. 13: 110.
137. Zhang W.Y., Li C.S. (2006a) Prevention Methods against the Precipitate in Amur Grape Wine // *Liquor Making Sci Tech*. 6: 74 – 75.
138. Zhang X., Henriques R., Lin S.S., Niu Q.W., Chua N.H. (2006b) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method // *Nat Protoc*. 1: 641 – 646.
139. Zhang H., Liu W.Z., Zhang Y., Deng M., Niu F., Yang B., Wang X., Wang B., Liang W., Deyholos M.K., Jiang Y.Q. (2014) Identification, expression and interaction analyses of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes in canola (*Brassica napus* L.) // *BMC Genom*. 15: 211.
140. Zhang K., Han Y.T., Zhao F.L., Hu Y., Gao Y.R., Ma Y.F., Zheng Y., Wang Y.J., Wen Y.Q. (2015) Genome-wide identification and expression analysis of the CDPK gene family in grape, *Vitis* spp // *BMC Plant Biol*. 15: 164
141. Zhu B., Su J., Chang M. C., Verma D. P. S., Fan Y. L., Wu R. (1998) Overexpression of a pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice // *Plant Sci*. 139: 41 – 48.
142. Zhu X., Gong H., Chen G., Wang S., Zhang C. (2005) Different solute levels in two spring wheat cultivars induced by progressive field water stress at different developmental stages // *J Arid Environ*. 62: 1 – 14.

143. Zou J.J., Wei F.J., Wang C., Wu J.J., Ratnasekera D., Liu W.X., Wu W.H. (2010) Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CDPK10 functions in abscisic acid- and Ca^{2+} -mediated stomatal regulation in response to drought stress // *Plant Physiol.* 154(3): 1232-1243.
144. Zuo R., Hu R., Chai G., Xu M., Qi G., Kong Y., Zhou G. (2013) Genomewide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*) // *Mol Biol Rep.* 40: 2645 – 2662.