

УДК 577.2.08

## НИЗКИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ СТИМУЛИРУЮТ АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ ГЕНА *CPK26* ВИНОГРАДА *Vitis amurensis*

© 2025 г. К. В. Киселев<sup>1, \*</sup>, А. С. Дубровина<sup>1</sup>, З. В. Огнева<sup>1</sup>, О. А. Алейнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии, ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

\*e-mail: kiselev@biosoil.ru

Поступила в редакцию 13.03.2025 г.

После доработки 18.04.2025 г.

Принята к публикации 28.04.2025 г.

Изучено участие альтернативного сплайсинга (AS) в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессам при участии гена кальций-зависимой протеинкиназы (CPK) *VaCPK26*, отвечающего за устойчивость винограда *Vitis amurensis* Rupr. к засолению почвы и засухе. Изучен уровень транскрипции *VaCPK26* в листьях винограда под воздействием различных факторов окружающей среды. При низкотемпературном воздействии, в дополнение к полноразмерному транскрипту *VaCPK26*, был получен короткий сплайсированный транскрипт *VaCPK26s1*, у которого отсутствовал второй экзон из семи, входящих в состав полноразмерного *VaCPK26*. Рекомбинантный *VaCPK26* повышал устойчивость клеток винограда к солевому стрессу и засухе, а сверхэкспрессия сплайсированного транскрипта *VaCPK26s1* в культурах клеток винограда *V. amurensis* не влияла на устойчивость к тестируемым стрессам. Результаты показали, что AS может приводить к потере свойств транскриптов *VaCPK26*, характерных для исходной полноразмерной формы под воздействием абиотического стресса. Полученная информация важна для полного понимания биологических функций CPK и альтернативного сплайсинга растений в ответе на стресс.

**Ключевые слова:** абиотический стресс, виноград, кальций, протеин-киназа, холод, экзон

DOI: 10.7868/S3034574X25050081

У растений, как и у других эукариот, пре-матричные РНК (пре-мРНК) состоят из некодирующих сегментов (интронов) и кодирующих сегментов (экзонов). Во время обработки РНК интроны удаляются, а экзоны соединяются вместе с образованием зрелых матричных РНК (мРНК). Альтернативный сплайсинг (AS) — это сложный процесс, при котором кодирующие и некодирующие области гена по-разному перестраиваются сплайсосомами в разных местах сплайсинга [1]. Это приводит к образованию множества транскриптов мРНК, генерируемых из одной и той же молекулы пре-мРНК.

Недавние исследования показали, что AS гораздо более распространен в растениях, чем в животных клетках, как считалось ранее. Полногеномное картирование транскриптома *Arabidopsis thaliana* показало, что до 61% интронсодержащих генов подвергаются AS [2, 3]. AS играет центральную роль в реакции растений на стрессы окружающей

среды и различные сигналы развития [4–6]. AS влияет на экспрессию многих генов, участвующих в сигнальных путях, включая факторы транскрипции, убиквитинлигазы, протеинкиназы и гены, связанные с защитой растений от патогенов и абиотических стрессов.

Протеинкиназы являются важнейшими регуляторами передачи сигналов в растениях, однако относительно мало известно о том, как AS модулируют их активность и функции. Сообщалось лишь о нескольких случаях AS в растительных протеинкиназах [7–9].

Каскады митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) являются сигнальными путями, которые играют важную роль в регуляции клеточных реакций на различные раздражители, включая стресс, факторы роста и гормоны. Эти каскады состоят из ряда протеинкиназ, каждая из которых фосфорилирует и активирует следующую, усиливая сигнал. Ген *OsMAPK5* в рисе продуцирует два диф-

ференцированно сплайсированных транскрипта, в результате чего образуются изоформы с различными белковыми последовательностями [10]. Ген *ZmMIK* у кукурузы, кодирующий GSK-подобный *ZmMAP4K*, подвергается AS для получения по меньшей мере четырех зрелых транскриптов мРНК. Эти изоформы обладают различной киназной активностью [11].

Киназа AtAUR2 у *A. thaliana* имеет вариант сплайсинга, AtAUR2S, в котором отсутствует часть киназного домена. AtAUR2S теряет способность фосфорилировать гистон H3, но сохраняет функцию связывать гистоны [7]. В результате AS гена *OsBWMK1* в рисе образуются изоформы с контрастной субклеточной локализацией. Эти изоформы играют различную роль в гормональных сигнальных путях [8]. Ген *AtMPK13* у *A. thaliana* синтезирует три варианта сплайсированных транскриптов. Полноразмерный *AtMPK13* полностью сплайсирован, в то время как *AtMPK13-14* и *AtMPK13-15* сохраняют четвертый и пятый интроны соответственно. У *AtMPK13-14* и *AtMPK13-15* отсутствует как киназная активность, так и взаимодействие с вышестоящими MAPKK, что позволяет предположить, что сплайсинг регулирует функции [9].

Другой важной киназой, участвующей в передаче сигналов в растениях, является кальций-зависимая протеинкиназа (СРК). СРК представляют собой семейство  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых Ser/Thr- протеинкиназ, которые играют важную роль в регуляции различных клеточных процессов у растений, зеленых водорослей и простейших [12, 13]. СРК имеют консервативную структурную организацию (классифицированную в соответствии с EC 2.7.1.37) с N-концевым варибельным доменом, каталитическим киназным доменом, аутоингибирующим доменом и кальмодулинподобным  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающим доменом с мотивами "EF-hand", которые опосредуют связывание  $\text{Ca}^{2+}$  [14, 15]. При низких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  аутоингибирующий домен сдерживает фосфорилирование, поддерживая СРК в неактивном состоянии [16]. При поступлении  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулинподобный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий домен связывает  $\text{Ca}^{2+}$  и вызывает конформационные изменения, которые высвобождают аутоингибирование и активируют киназный домен.

Отдельные изоформы СРК выполняют разнообразные функции и участвуют в многочисленных сигнальных сетях, включая иммунные реакции, реакции на стресс и процессы развития. Они регулируют различные клеточные процессы, такие как удлинение стебля растений [17], закрытие устьиц в ответ на засуху [18], образование активных форм кислорода (АФК) в условиях стресса [19, 20]. СРК кодируются мультигенными семействами с различным количеством генов у разных видов растений.

Анализ полногеномного секвенирования у риса *Oryza sativa*, *A. thaliana* и *Populus trichocarpa* выявил 31, 34 и 30 генов СРК соответственно [21–23]. Различные изоформы СРК демонстрируют различные паттерны экспрессии, субклеточную локализацию и чувствительность к уровням  $\text{Ca}^{2+}$ , что способствует их разнообразным функциональным ролям [15].

Ранее было показано AS на пяти генах СРК. Например, ген СРК печеночницы имеет два почти идентичных экзона, которые альтернативно сплайсированы в две разные мРНК, что позволяет предположить отсутствие независимого сплайсинга интрона между ними [24]. AS гена *OsCPK2* в рисе приводит к образованию изоформ с различной киназной активностью и реакцией на стрессовые условия [25].

Ранее у дикорастущего винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. было описано несколько атипичных вариантов транскриптов *VaCPK3a* и *VaCPK9*, содержащих небольшие делеции или вставки в киназном домене [26]. Модифицированные транскрипты *VaCPK3a* были экспрессированы в *Escherichia coli* для анализа протеинкиназной активности *in vitro*. Полученные данные показали, что синтез коротких вариантов транскриптов *VaCPK3aSF2* и *VaCPK3aSF3* может привести к получению модифицированных протеинкиназ с уменьшенной активностью фосфорилирования [27]. Далее на винограде *V. amurensis* детально была исследована экспрессия гена *VaCPK21*, который повышает устойчивость клеток винограда и растений *A. thaliana* к засолению [28]. Под высокотемпературным стрессом появлялись короткие (потеря некоторых экзонов) и длинные (удержание интрона) транскрипты *VaCPK21*, которые обладали другими свойствами, по сравнению с канонической *VaCPK21*. Например, сверхэкспрессия коротких *VaCPK21* транскриптов не придавала устойчивость к абиотическим стрессам, а при сверхэкспрессии длинной *VaCPK21L* формы клетки винограда были более устойчивы как к засолению, так и (появилось новое свойство устойчивости) к осмотическому стрессу, вызванному маннитолом [29].

В новом исследовании был изучен AS у другой СРК винограда *VaCPK26*, которая придает устойчивость к осмотическому стрессу и засолению почвы [30].

## МЕТОДИКА

**Растительный материал и культуры клеток растений.** Дикорастущие растения винограда *V. amurensis* для экспериментов собирали в летний период в 13.00–14.00 ч в солнечную погоду в окрестностях Владивостока. Далее молодые лианы разрезали на черенки длиной по 15–20 см с одним целым листом для экспериментов. В контроле черенки винограда помещали на 12 ч в стакане на 100 мл со стерильной фильтрованной водой в климатическую камеру

(MLR-352, “Panasonic”, Япония) на 16/8-часовой световой/темный фотопериод, интенсивность света 70 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>, 22°C. Для солевого стресса черенки винограда помещали на 12 ч в солевой раствор (350 мМ NaCl). Для создания температурного стресса, в отличие от контрольных условий, меняли настройки в климатической камере: для пониженных и повышенных температур до 5°C и 37°C соответственно. Для создания дефицита воды черенок винограда оставляли в камере (70 мкмоль м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>, 22°C) на фильтровальной бумаге на 12 ч без полива.

Каллусные культуры V7 были получены в 2017 г. из молодых стеблей дикорастущих растений *V. amurensis* близ Владивостока, как описано ранее [31]. Клетки V7 выращивали в течение 30–32 сут в темноте на модифицированной среде Мурасиге и Скуга W<sub>Б/А</sub> [31] с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина, 2 мг/л α-нафталинуксусной кислоты и 8 г/л агара [31]. Данные о свежей биомассе были получены в результате трех независимых экспериментов и являются средними значениями для 10 технических повторов для каждого независимого эксперимента, представленными в виде среднего ± стандартной ошибки.

В культурах клеток V7 винограда с помощью маннитола (0.2 и 0.3 М) индуцировали осмотический стресс, с помощью хлорида натрия (NaCl, 0.05 и 0.1 М) индуцировали солевой стресс, а при выращивании клеток винограда при 16°C и 33°C индуцировали низко- и высокотемпературный стрессы. Выбранный температурный режим мягче,

чем приведенный выше для черенков винограда, потому что клетки в культуре были более чувствительные и при снижении температуры ниже 16°C или повышении выше 33°C чернели и погибали.

**Выделение нуклеиновых кислот и количественный ПЦР.** Экстракцию на основе цетилтриметиламмония бромид (ЦТАВ) использовали для выделения тотальной РНК, как описано [31]. кДНК получали с использованием набора для ПЦР с обратной транскрипцией MMLV с oligo(dT)<sub>15</sub> (RT-PCR, “Евроген”, Россия), как описано [31].

Уровни транскриптов мРНК трансгенов определяли с помощью ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ). Полученные результаты ПЦР РВ обсчитывали методом 2<sup>-ΔΔCT</sup> [32] с использованием двух внутренних контролей, включая *VaGAPDH* (ГенБанк XM\_002263109) и *VaActin1* (ГенБанк DQ517935), как описано [30]. Праймеры, предназначенные для ПЦР РВ *VaGAPDH-realS/A* и *VaActin1-realS/A*, приведены в табл. 1.

Реакции ПЦР РВ проводили в объеме 20 мкл с использованием набора для ПЦР в реальном времени (“Евроген”), как описано [30], содержащего 1 × Taq-буфер, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.2 мМ каждого dNTP, 0.2 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера, 1 × SybrGreen I краситель для ПЦР в реальном времени, 1 мкл кДНК и 1 ед. ДНК-полимеразы Taq (“Евроген”). Анализ проводили на термоциклере DTrime 4M1 (“ДНК-технология”, Россия), запрограммированном на начальную стадию денатурации продолжительностью 2 мин при

**Таблица 1.** Последовательность праймеров, используемых для амплификации последовательностей *VaCDPK26* и *VaCDPK26s1*

Название	Последовательность праймера, 5'-3'
VaCPK26-nachS	ATGGGCAACACATGCCGGGGA
VaCPK26-konA	СТААААAGCTCCTGGTGCATCTC
VaCPK26-realS	TGCTATGATGCAAAAGGGCAATG
VaCPK26-realA	СТААААAGCTCCTGGTGCATCTC
VaCPK26s1S	CAAGGATTATTGTAGGGGTTGTC
VaCPK26s1A	АТТССТГТТГAGТТТCTGGTTTAAА
VaCPK26-SacI	GCTCGAGCTCATGGGCAACACATGCCGGGGA
VaCPK26-KpnI	TCGAGGTACCCTAAAAGCTCCTGGTGCATCTC
VaGAPDH-realS	CACTGAAGATGATGTTGTTTCC
VaGAPDH-realA	GCTATTCCAGCCTTGGCAT
VaActin1-realS	GTATTGTGCTGGATTCTGGTGAT
VaActin1-realA	AGCAAGGTCAAGACGAAGGATAG

95°C, за которой следовали 50 циклов по 10 с при 95°C и 25 с при 62°C.

**Сверхэкспрессия *VaCDPK26* и *VaCDPK26s1* транскриптов в клетках винограда.** Для создания конструкции для трансформации растительных клеток полноразмерные последовательности гена *VaCDPK26* (KC488323) и транскрипта *VaCDPK26s1* были амплифицированы методом ПЦР с использованием праймеров *VaCPK26-nachS* и *VaCPK26-konA*, подобранных к 5'- и 3'-концовым кодирующим последовательностям, представленным в табл. 1 Для амплификации транскрипта *VaCDPK26* и *VaCDPK26s1* мы использовали кДНК, полученную из листа винограда *V. amurensis* после воздействия низкой температуры (12 ч при 5°C).

Полученные ПЦР-продукты, *VaCDPK26* и *VaCDPK26s1*, были субклонированы в pJET1.2 с использованием набора CloneJET PCR Cloning ("ThermoFisher Scientific", США) и секвенированы с использованием генетического анализатора ABI 3130 ("Applied Biosystems", США) в соответствии с инструкциями производителя. Затем проводили ПЦР с прямым праймером, содержащим сайт рестрикции *Sac* I, и обратным праймером, содержащим сайт рестрикции *Kpn* I (табл. 1).

*VaCDPK26* и *VaCDPK26s1* были клонированы в вектор pSAT1 [33] по сайтам *Sac* I и *Kpn* I. Затем экспрессионная кассета из pSAT1 с генами *VaCDPK26* или *VaCDPK26s1* была клонирована в вектор pZP-RCS2-*nptII* [33] с использованием сайтов *PalAI* (*Asc*I). Конструкция pZP-RCS2-*nptII* также содержала ген неомидин фосфотрансферазы (*nptII*). Все трансгены в использованных векторах находились под контролем промотора вируса двойной мозаики цветной капусты (CaMV 35S). Конструкции для сверхэкспрессии *VaCDPK26* (pZP-RCS2-*VaCDPK26-nptII* или pZP-RCS2-*VaCDPK26s1-nptII*) или пустого вектора (pZP-RCS2-*nptII*) были перенесены в штамм *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101::pMP90), который использовался для трансформации суспензионной культуры V7 *V. amurensis* [30].

Множественное выравнивание последовательностей было выполнено с использованием программного обеспечения ClustalX2 [34]

**Статистическая обработка полученных результатов.** Для анализа экспрессии гена *VaCDPK26* мы провели два независимых эксперимента с десятью техническими повторами (пять реакций ПЦР РВ, нормализованных к одному внутреннему контрольному гену, и пять реакций ПЦР РВ – ко второму гену в каждом независимом эксперименте). Для анализа массы каллусной ткани были проведены три независимых эксперимента с десятью техническими повторениями в каждом эксперименте. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка (SE) и были оценены с помощью *t*-критерия Стьюдента или односто-

ронного дисперсионного анализа (ANOVA), за которым следовал тест множественного сравнения Tukey HSD, выполненный в Excel с использованием программного обеспечения XLSTAT, где значение  $p < 0.05$  было статистически значимым.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Разнообразие и экспрессия сплайсированных вариантов гена *VaCPK26* в условиях абиотических стрессов.** Используя праймеры на начало и конец кодирующей последовательности гена *VaCPK26*, из кДНК листьев винограда, подвергнутых различным стрессовым воздействиям (засоление, низкие и высокие температуры, водный дефицит) были клонированы и секвенированы 183 последовательности транскриптов гена *VaCPK26* (табл. 2). Всего были получены и проанализированы последовательности от 31 до 42 клонированных транскриптов гена *VaCPK26*. Важно отметить, что полная последовательность депонированная в Генбанке *VaCPK26* (3d, KC488323) была отмечена в табл. 2 как "стандартная". Если в последовательности отсутствовали какие-то участки белок-кодирующей последовательности, то такую последовательность называли "короткая" (табл. 2).

Все клонированные последовательности гена *VaCPK26* с кДНК, полученной в нормальных условиях (31 последовательность), под действием NaCl (36 последовательностей), высокой температуры (42 последовательности) и водного дефицита (33 последовательности), имели стандартную структуру: 1686 нуклеотидов, 561 аминокислот (табл. 2). Только среди 41 клонированной последователь-

**Таблица 2.** Количество транскриптов гена *Vitis amurensis VaCPK26*, клонированных из РНК, выделенной из листьев черенков винограда *V. amurensis*, полученных при пониженной (5°C) и повышенной температурах (37°C), дефиците воды (WD), а также в контрольных условиях (Контроль)

Действующий фактор	Стандартная*	Короткая**
Контроль	31	0
NaCl	36	0
5°C	36	5
37°C	42	0
WD	33	0
Общее количество клонов	178 (97.3%)	5 (2.7%)

\* Стандартная – последовательность полностью соответствует последовательности гена *VaCPK26* (Генбанк, KC488323).

\*\* Короткая – последовательность, в которой отсутствовали какие-то участки белок-кодирующей последовательности.

ности с кДНК, полученной из ДНК листьев под воздействием низких температур, появилось 5 коротких транскриптов *VaCPK26s1* (12.2% от всех секвенированных последовательностей). Все *VaCPK26s1* транскрипты отличались отсутствием 144 нуклеотидов (48 аминокислот), в итоге вся последовательность *VaCPK26s1* включала 1542 нуклеотида (513 аминокислот), рамка считывания при этом не сбивалась (рис. 1). Ген *VaCPK26* состоит из 7 экзонов. В последовательности *VaCPK26s1* полностью отсутствовал второй экзон, что являлось пропуском экзона – одним из наиболее распространенных видов альтернативного сплайсинга [5]. 48 аминокислот отсутствовало в районе киназного домена (выпадают VIII и IX субдомены) (рис. 1), поэтому с матрицы *VaCPK26s1* возможна трансляция с получением белка, у которого отсутствует часть киназного домена (рис. 2).

Далее с помощью количественного ПЦР с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР РВ) и специфических праймеров мы проанализировали накопление транскриптов всех известных форм гена *VaCDPK26* (рис. 3а) и накопление отдельных транскриптов альтернативного варианта *VaCDPK26s1* (рис. 3б). Было показано, что суммарная экспрессия гена *VaCDPK26* достоверно возрастала в 3.8–4.7 раза при низкой температуре, в 2.1–2.7 раза при водном дефиците, в 1.2–2.0 раза при солевом стрессе (рис. 3а).

Важно отметить, что при использовании специфических праймеров для транскрипта *VaCDPK26s1* наибольшее количество транскриптов *VaCDPK26s1* было характерно для проб кДНК, полученных после 6 и 12 ч низкотемпературного стресса (рис. 3б). Эти результаты подтвердили данные, полученные с помощью клонирования полноразмерных ПЦР продуктов (табл. 2).

**Сверхэкспрессия сплайсированных вариантов гена *VaCPK26* в культурах клеток винограда *V. amurensis*.** После процедуры агробактериальной трансформации и отбора трансгенных клеток винограда *V. amurensis* была изучена транскрипция трансгенов *VaCPK26* и *VaCPK26s1* в полученных линиях (рис. 4). Всего было получено две клеточные линии винограда по полноразмерной форме *VaCDPK26* 26-I и 26-II и три линии по сплайсированной форме *VaCPK26s1* 26s1-I, 26s1-II, 26s1-III. В качестве контроля использовали клеточную линию КА-0, полученную в результате трансформации пустым вектором, несущим в своей последовательности только ген *nptII*. Во всех независимо полученных линиях культур клеток винограда *V. amurensis* трансгены активно экспрессировались, трансген *VaCDPK26* сильнее всего экспрессировался в линии 26-I, в линии 26-II в 2.3 раза меньше (рис. 4а). Трансген *VaCPK26s1* сильнее всего экспрессировался в линии культур клеток 26s1-II, экспрессия

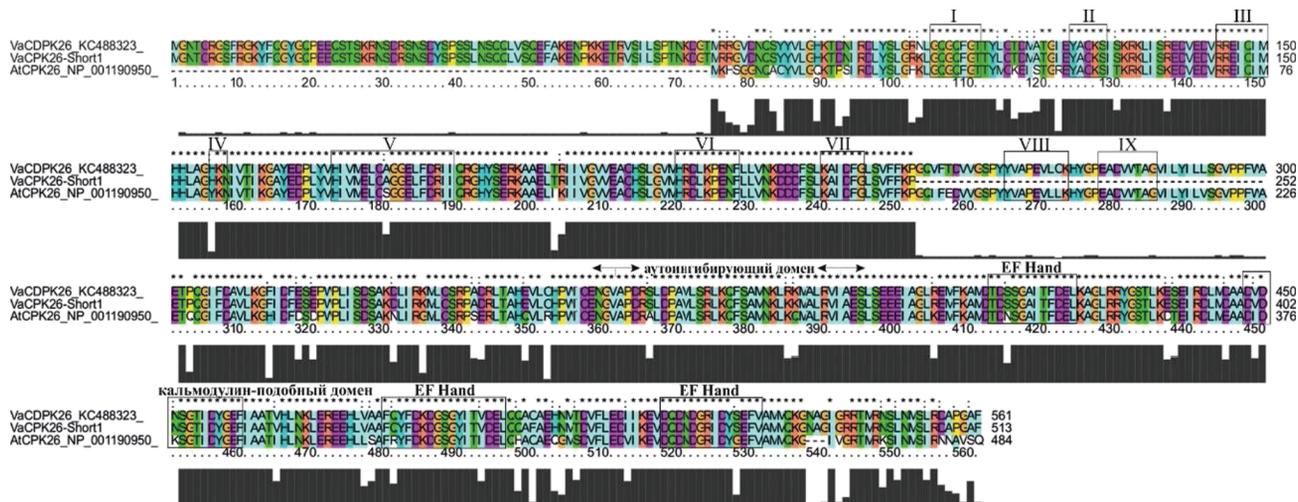


Рис. 1. Доменный анализ аминокислотных последовательностей *VaCPK26* (KC488323), *VaCPK26s1* и *AtCPK26* из *Arabidopsis thaliana* (NP\_001190950). Римскими цифрами обозначены субкаталитические домены киназного домена.

VaCDPK26				
N-концевой вариабельный домен	Киназный домен	Аутоингибирующий домен	Ca <sup>2+</sup> -связывающий домен	C-концевой домен
VaCDPK26s1				
N-концевой вариабельный домен	Киназный домен	Аутоингибирующий домен	Ca <sup>2+</sup> -связывающий домен	C-концевой домен

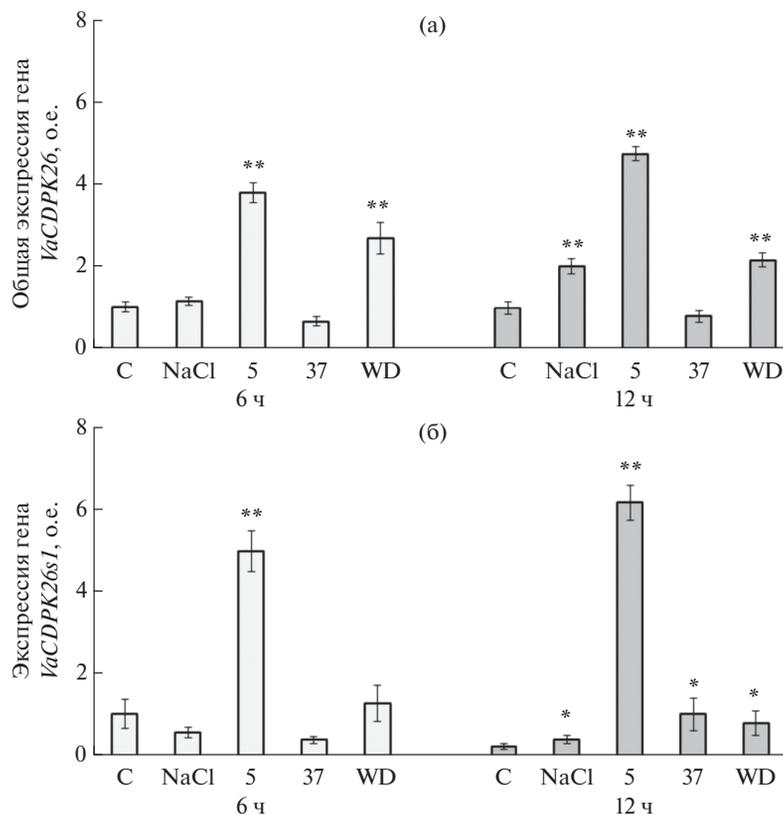
Рис. 2. Доменный анализ полученных аминокислотных последовательностей *VaCPK26* и *VaCPK26s1*.

*VaCPK26s1* в линиях 26s1-I и 26s1-III была достоверно в 3.5–5.4 раза ниже (рис. 4б).

Далее, после доказательства активной транскрипции трансгена *VaCPK26* в полученных клеточных линиях, была проанализирована устойчивость клеток к абиотическим стрессам: водному дефициту, солевому стрессу, низким и высоким температурам (рис. 5). Используя маннитол (0.2 и 0.3 М), инду-

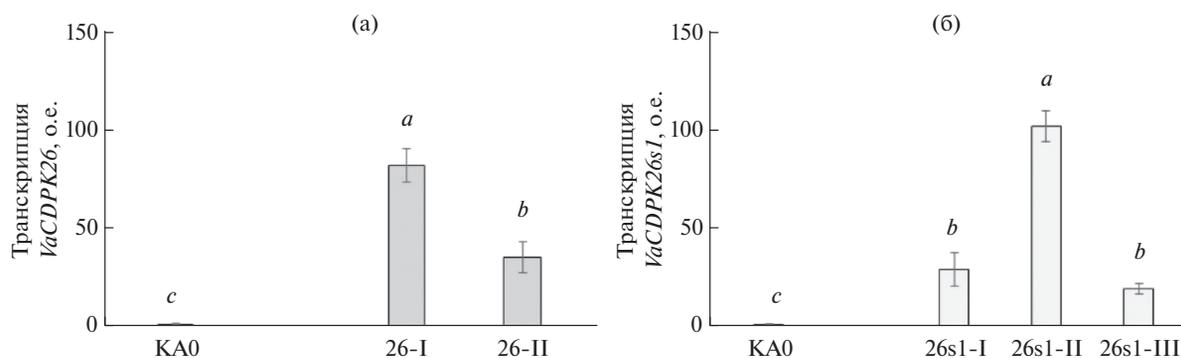
цировали осмотический стресс (рис. 5а), используя хлорид натрия (NaCl, 0.05 и 0.1 М) индуцировали солевой стресс (рис. 5б), а при выращивании клеток винограда при 16°C и 33°C индуцировали низко- и высокотемпературный стресс (рис. 5в).

Было показано, что трансформация полноразмерным транскриптом гена *VaCPK26* увеличивала устойчивость к осмотическому стрессу (рис. 5а, б)

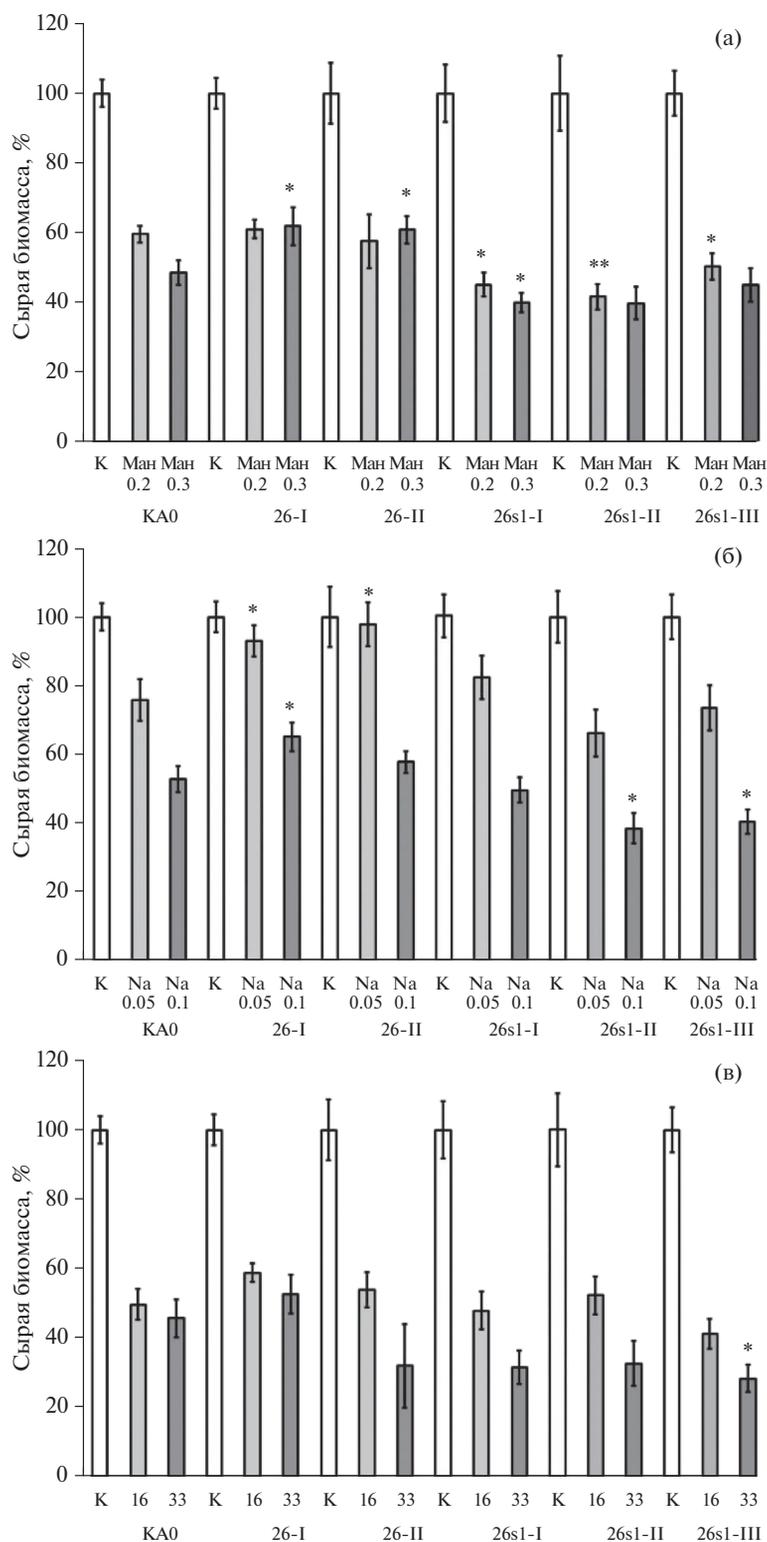


**Рис. 3.** Количественная оценка общего уровня транскриптов гена *VaCDPK26* (а) и короткого транскрипта *VaCDPK26s1* (б) в листьях черенков винограда *Vitis amurensis*, после обработки солевым стрессом (NaCl), холодовым (5) и высокотемпературным воздействием (37), дефицитом воды (WD) и в контрольных условиях (С).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (парный  $t$ -критерий Стьюдента) по сравнению со значениями уровня транскриптов в контрольных условиях (С). Отн.ед. — относительные единицы.



**Рис. 4.** Количественное определение уровней общей экспрессии *VaCDPK26* (а) и *VaCDPK26s1* (б) транскриптов в трансгенных линиях винограда *Vitis amurensis* KA0, 26-I, 26-II, 26s1-I, 26s1-II и 26s1-III. Статистически значимым считалось значение  $p < 0.05$ . Отн. ед. — относительные единицы.



**Рис. 5.** Накопление свежей биомассы в течение 30 сут в клеточных линиях KA0, 26-I, 26-II, 26s1-I, 26s1-II и 26s1-III под влиянием осмотического (а), солевого (б), холодowego (в) и теплового (в) стрессов: KA0 – клетки, сверхэкспрессирующие только ген селективного маркера *nptII*; 26-I, 26-II – клетки, сверхэкспрессирующие полноразмерный ген *VaCPK26* и ген *nptII*; 26s1-I, 26s1-II и 26s1-III – клетки, сверхэкспрессирующие сплайсированный транскрипт *VaCDPK26s1* и ген *nptII*. Статистическая значимость рассчитана с помощью *t*-критерия Стьюдента. \*\* –  $p < 0.01$  и \* –  $p < 0.05$  для *VaCDPK26* или *VaCDPK26s1* трансгенных клеток в сравнении со значениями накопления биомассы в контрольной культуре клеток KA0.

и засолению питательной среды (рис. 5б), что подтвердили результаты, полученные ранее [30].

Наиболее интересным было изучить устойчивость клеток винограда, сверхэкспрессирующих сплайсированный вариант гена *VaCPK26* — *VaCDPK26s1*. Было показано, что все трансгенные линии, сверхэкспрессирующие транскрипт *VaCDPK26s1*, росли достоверно хуже при осмотическом, солевом, высоко- и низкотемпературном температурном стрессе, в сравнении с клетками, сверхэкспрессирующими полноразмерный *VaCPK26* и с контрольными клетками КА0 (рис. 5), но эти различия в росте были в пределах статистической ошибки.

Таким образом, сверхэкспрессия модифицированной формы транскрипта *VaCDPK26s1* не придавала устойчивости при осмотическом и солевом стрессах, как полноразмерная форма транскрипта *VaCDPK26*. Это может свидетельствовать об отсутствии или слабой киназной активности сплайсированной формы *VaCDPK26s1*, которая не передает дальнейший сигнал устойчивости к стрессам клеткам растений. Также в *VaCDPK26s1*-трансгенных клетках винограда отсутствовала устойчивость к пониженным температурам, несмотря на активацию уровня транскрипции *VaCDPK26s1* в условиях низкотемпературного стресса. Возможно, полученная форма транскрипта *VaCDPK26s1* участвует в других сигнальных сетях, необходимых растению, но это требует дальнейших исследований.

\* \* \*

Альтернативный сплайсинг (AS) — это процесс, который позволяет одному гену генерировать множество различных транскриптов мРНК. Изменяя структуру и последовательность кодируемых белков, AS может модулировать их активность, субклеточную локализацию и взаимодействие полученных новых белков с другими компонентами сигнальных путей. Анализ литературных данных и полученных результатов в данной работе на примере гена *VaCDPK26* говорит о том, что чаще всего AS приводит к потере свойств, характерных для исходной формы, которая появляется в результате канонического сплайсинга. Однако в то же время есть примеры, когда AS приводит к появлению новых свойств, не характерных для канонических транскриптов (например *VaCPK21L*). Таким образом, AS оказывает существенное влияние на работу многих генов растений и особенности этого влияния требуют отдельных исследований.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Основная часть исследования выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00078, <https://rscf.ru/project/22-74-00078>. Хранение и поддержание клеток винограда выпол-

нены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012200181-4).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tognacca R.S., Rodríguez F.S., Aballay F.E., Cartagena C.M., Servi L., Petrillo E. // J. Exp. Bot. 2023. V. 74. P. 2251–2272. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac431>
2. Filichkin S.A., Priest H.D., Givan S.A., Shen R., Bryant D.W., Fox S.E., Wong, W.K., Mockler T.C. // Genome Research. 2010. V. 20. P. 45–58. <https://doi.org/10.1101/gr.093302.109>
3. Marquez Y., Brown J.W., Simpson C., Barta A., Kalyana M. // Genome Research. 2012. V. 22. P. 1184–1195. <https://doi.org/10.1101/gr.134106.111>
4. Carvalho R.F., Feijão C.V., Duque P. // Protoplasma. 2013. V. 250. P. 639–650. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0448-9>
5. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Zhuravlev Y.N. // BioMed Res. Int. 2013. V. 2013. P. 264314. <https://doi.org/10.1155/2013/264314>
6. Alhabsi A., Ling Y., Crespi M., Reddy A.S.N., Mahfoz M. // Ann. Rev. Plant Biol. 2025. V. 76. P. 687–717. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-083123-090055>
7. Kurihara D., Kawabe A., Matsunaga S., Nakagawa K., Fujimoto S., Uchiyama S., Fukui K. // Plant and Cell Physiology. 2007. V. 48. P. 369–374. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp1064>
8. Koo S.C., Yoon H.W., Kim C.Y., Moon B.C., Cheong Y.H., Han H.J. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 360. P. 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.052>
9. Lin W.Y., Matsuoka D., Sasayama D., Nanmori T. // Plant Science. 2010. V. 178. P. 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.01.006>
10. Xiong L.Z., Yang Y.N. // Plant Cell. 2003. V. 15. P. 745–759. <https://doi.org/10.1105/tpc.008714>
11. Castells E., Puigdomènech P., Casacuberta J.M. // Plant Mol. Biol. 2006. V. 61. P. 747–756. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0046-3>
12. Harper J.F., Breton G., Harmon A. // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 263–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141627>

13. *Dekomah S.D., Bi Z., Dormatey R., Wang Y., Haider F.U., Sun C., Yao P., Bai J.* // *Frontiers in Genetics*. 2022. V. 13. P. 996203.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.996203>
14. *Roberts D.M., Harmon A.C.* // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1992. V. 43. P. 375–414.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002111>
15. *Klimecka M., Muszyńska G.* // *Acta Biochimica Polonica*. 2007. V. 54. P. 219–233.  
[https://doi.org/10.18388/abp.2007\\_3242](https://doi.org/10.18388/abp.2007_3242)
16. *Harper J.F., Huang J.F., Lloyd S.J.* // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 7267–7277.  
<https://doi.org/10.1021/bi00189a031>
17. *Kohler B., Blatt M.R.* // *Plant Journal*. 2002. V. 32. P. 185–194.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01414.x>
18. *Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H.* // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 1065–1080.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.048884>
19. *Matschi S., Werner S., Schulze W.X., Legen J., Hilger H.H., Romeis T.* // *Plant Journal*. 2013. V. 73. P. 883–896.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12090>
20. *Wang C.T., Song W.* // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 1659–1666.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-012-1208-3>
21. *Cheng S.H., Willmann M.R., Chen H.C., Sheen J.* // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 469–485.  
<https://doi.org/10.1104/pp.005645>
22. *Asano T., Tanaka N., Yang G., Hayashi N., Komatsu S.* // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 356–366.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci035>
23. *Ray S., Agarwal P., Arora R., Kapoor S., Tyagi A.K.* // *Mol. Genet. Genomics*. 2007. V. 278. P. 493–505.  
<https://doi.org/10.1007/s00438-007-0267-4>
24. *Nishiyama R., Mizuno H., Okada S., Yamaguchi T., Takenaka M., Fukuzawa H., Ohyama K.* // *Plant Cell Physiol.* 1999. V. 40. P. 205–212.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029529>
25. *Kawasaki T., Okumura S., Kishimoto N., Shimada H., Higo K., Ichikawa N.* // *Plant Journal*. 1999. V. 18. P. 625–632.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00493.x>
26. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Veselova M.V., Isaeva G.A., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N.* // *J. Plant Physiol.* 2009. V. 166. P. 1194–1206.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.01.006>
27. *Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Kiselev K.V., Novikova G.V.* // *Acta Physiologiae Plantarum*. 2014. V. 36. P. 1727–1737.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-014-1547-3>
28. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A.* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2016. V. 124. P. 137–150.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-015-0882-4>
29. *Aleynova O.A., Dubrovina A.S., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V.* // *Plant Cell, Tiss. Org. Culture*. 2024. V. 159. P. 77.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-024-02931-1>
30. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V.* // *Russian Journal of Genetics*. 2019. V. 55. P. 319–329.  
<https://doi.org/10.1134/S1022795419030049>
31. *Kiselev K.V., Ogneva Z.V., Aleynova O.A., Suprun A.R., Anan'ev A.A., Nityagovsky N.N., Dubrovina A.S.* // *Horticulturae*. 2023. V. 9. P. 513.  
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9040513>
32. *Livak K.J.; Schmittgen T.D.* // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
33. *Tzfira T., Tian G.W., Lacroix B., Vyas S., Li J., Leitner-Dagan Y. et al.* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 57. P. 503–516.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-005-0340-5>
34. *Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. et al.* // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. P. 2947–2948.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

## Low Temperatures Stimulate Alternative Splicing of the *CPK26* Gene in *Vitis amurensis* Grapes

K. V. Kiselev<sup>a,\*</sup>, A. S. Dubrovina<sup>a</sup>, Z. V. Ogneva<sup>a</sup>, and O. A. Aleynova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Federal Scientific Center of the Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Biotechnology, Vladivostok, 690022 Russia*

\**e-mail: kiselev@biosoil.ru*

Alternative splicing (AS) is a non-canonical gene splicing process that allows a single gene to synthesise multiple protein isoforms and enhance a variety of protein functions. In this study, the involvement of AS in the generation of plant resistance to abiotic stresses was investigated using the *VaCPK26* calcium-dependent protein kinase (CPK) gene, which is responsible for the resistance of *Vitis amurensis* Rupr. grapes to soil salinity and drought. The level of *VaCPK26* transcription in grape leaves was studied under the influence of different environmental factors. Under low temperature exposure, in addition to the full-length *VaCPK26* transcript, a short-spliced *VaCPK26s1* transcript was obtained that lacked the 2nd exon of the 7 that make up the full-length *VaCPK26*. Recombinant *VaCPK26* increased the resistance of grape cells to salt stress and drought, and overexpression of the spliced *VaCPK26s1* transcript in *V. amurensis* grape cell cultures had no effect on resistance to the stresses tested. These results show that AS can lead to the loss of properties of spliced transcripts characteristic of the original full-length form, which is important for a complete understanding of the biological functions of CPK and alternative splicing.

*Keywords:* abiotic stress, grapes, calcium, protein kinase, cold, exon