

УДК 581.1

## РОЛЬ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ *VaCPK1* И *VaCPK26* В ОТВЕТЕ *Vitis amurensis* (*in vitro*) И *Arabidopsis thaliana* (*in vivo*) НА ВОЗДЕЙСТВИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

© 2019 г. А. С. Дубровина<sup>1</sup>, К. В. Киселев<sup>1</sup>, \*<sup>1</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения  
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

\*e-mail: kiselev@biosoil.ru

Поступила в редакцию 14.04.2018 г.

После доработки 11.07.2018 г.

Принята к публикации 27.07.2018 г.

Кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK или CPK) участвуют в защите растений от абиотических стрессов, однако свойства и функции CDPK мало изучены. Виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr. представляет большой интерес для исследований, поскольку обладает высоким уровнем устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды. Известно, что при воздействии на *V. amurensis* солевого и, в меньшей степени, осмотического и холодового стрессов значительно активируется транскрипция генов *VaCPK1* и *VaCPK26*. В настоящей работе исследовано влияние конститутивной экспрессии рекомбинантных генов *VaCPK1* и *VaCPK26* на устойчивость культур клеток *V. amurensis* и растений *Arabidopsis thaliana* к солевому, осмотическому и температурному стрессу. Установлено, что экспрессия рекомбинантного *VaCPK26*, а также в меньшей степени *VaCPK1* приводит к повышению накопления биомассы культурами клеток *V. amurensis* в 1.2–1.7 раза и выживаемости растений *A. thaliana* в 1.2–2.1 раза в условиях солевого стресса. Кроме того, *VaCPK26*-экспрессирующие линии *A. thaliana* проявили небольшую устойчивость к воздействию засухи и характеризовались повышенной экспрессией некоторых стресс-индуцируемых защитных генов, вовлеченных в формирование устойчивости к солевому стрессу и обезвоживанию. Полученные данные свидетельствуют о том, что гены *VaCPK1* и *VaCPK26* могут действовать как позитивные регуляторы ответа растений на солевой стресс.

**Ключевые слова:** *Vitis amurensis*, *Arabidopsis thaliana*, кальций-зависимые протеинкиназы, абиотические стрессы, солевой стресс, устойчивость растений, трансгенные растения.

DOI: 10.1134/S0016675819030056

Одной из основных причин низкой урожайности и выживаемости растений является воздействие абиотических стрессовых факторов, таких как неблагоприятные температуры, засоление почвы, засуха или токсичные концентрации тяжелых металлов. Изучение молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости растений к воздействию абиотического стресса особенно актуально на сегодняшний день. Установлено, что для формирования устойчивости растения к абиотическим стрессам необходимо множество биохимических и физиологических изменений. Одной из первых и наиболее важных физиологических реакций клеток растения на воздействие абиотического стресса, а также других сигналов является открытие кальциевых каналов [1]. Изменения условий окружающей среды приводят к возрастанию концентрации катионов кальция в цитоплазме, что в свою очередь ведет к дальнейшей передаче полученной инфор-

мации благодаря образованию комплексов кальция со специальными белками-сенсорами внутриклеточного кальция, такими как кальмодулин (CaM) и кальмодулин-подобные белки (CML), кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK) и кальций/кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CCaMK), кальцийнейрин-В-подобные белки (CBL) и взаимодействующие с ними киназы (CIPK) [1, 2].

Ca<sup>2+</sup>-зависимые протеинкиназы (CDPK или CPK) обладают способностью связывать кальций и Ser/Thr протеинкиназной активностью и, таким образом, с помощью фосфорилирования белковых мишеней передают сигнал о внешнем воздействии. CDPK состоит из N-терминального вариативного домена, каталитического киназного домена и активационного домена (CAD домен), который включает псевдосубстратный сегмент и CaM-подобный кальций-связывающий сегмент, имеющий специальные области связывания каль-

ция, называемые EF-мотивами [3]. При связывании кальция с СДПК происходит изменение конформации и активация фермента [3]. При воздействии абиотических стрессов на растение СДПК связываются с ионами кальция и фосфорилируют белковые мишени, участвующие в поддержании мембранного потенциала, вторичном метаболизме, в иммунных реакциях у растений [4, 5].

Кальций-зависимые протеинкиназы (СДПК) известны как мультигенное семейство ферментов, различные представители которого вовлечены в сложную и комплексную регуляцию защитного ответа растений против неблагоприятных условий окружающей среды как биотической, так и абиотической природы [5, 6]. Один и тот же представитель семейства СДПК обладает способностью как стимулировать соответствующую цепочку защитных реакций растения в ответ на один тип стрессового сигнала, так и ингибировать защитный ответ растения на стрессовый стимул иной природы [7]. Экспрессия некоторых генов СДПК и активность соответствующих белков может значительно изменяться в ответ на воздействие абиотических и биотических стрессовых факторов, а идентифицированные белковые мишени многих СДПК (например, мембранные каналы, НАДФН-оксидаза, транскрипционные факторы) выполняют важные функции в ответе растений на эти стрессовые воздействия, такие как регуляция устьичных движений, окислительных реакций и экспрессии генов [5, 6].

Ранее нами была проведена работа по выявлению генов СДПК, участвующих в ответе винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. на различные абиотические стрессовые условия, включающие воздействие водного дефицита, солевого стресса, маннитол-индуцированного осмотического стресса, низких и высоких температур [8]. Установлено, что экспрессия 10 генов *VaCPK* значительно изменялась в ответ на воздействие того или иного абиотического стрессового фактора. Экспрессия генов *VaCPK1* и *VaCPK26*, принадлежащих к I подсемейству СДПК, увеличивалась в значительной степени после воздействия нескольких типов абиотического стресса, а именно солевого стресса (в 3.7–30.3 раз) и, в меньшей степени, холодового стресса (в 1.7–10.7 раз), а также осмотического стресса (в 1.7–5.8 раз) [8]. Ранее в результате нескольких независимых трансформаций были получены каллусные клеточные линии *V. amurensis* 19-I, -II, -III, -IV, экспрессирующие рекомбинантный ген *VaCPK1*, и клеточные линии 18-II, 18-III, 18-IV и 18-VI, экспрессирующие рекомбинантный ген *VaCPK26*, а также контрольная клеточная линия КА0, трансформированная вектором, не несущим генов *VaCPK* и содержащим только селективный маркер *nptII*. Анализ экспрессии экзогенных и эндогенных генов *VaCPK1* и *VaCPK26* в культурах клеток винограда *V. amu-*

*rens*, проведенный с помощью ПЦР РВ, показал значительный уровень экспрессии рекомбинантных *VaCPK1* и *VaCPK26* в линиях КА18-II-V и КА19-I-IV, в то время как уровень экспрессии эндогенных *VaCPK1* и *VaCPK26* не был изменен [9]. Полученные клеточные линии продуцировали значительно больше количества стильбенов, которые являются ценными защитными метаболитами фенольной природы, что может свидетельствовать о том, что продукты данных генов участвуют в передаче также и биотических стрессовых сигналов [9]. Цель настоящей работы – изучение влияния конститутивной экспрессии рекомбинантных генов *VaCPK1* или *VaCPK26* на устойчивость культур клеток *V. amurensis* и растений *Arabidopsis thaliana* к различным абиотическим стрессовым факторам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Растительный материал и условия роста.* Контрольная каллусная культура клеток КА-0 и клеточные линии *V. amurensis* КА18-II, -III, -IV, -V и КА19-I, -II, -III, -IV, несущие рекомбинантные гены *VaCPK26* (КС488323) и *VaCPK1* (КС488321), соответственно, под контролем двойного CaMV 35S промотора, получены методом ко-культивации клеточной суспензии *V. amurensis* со штаммом *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90, содержащим бинарные векторные конструкции pZP-RCS2-*nptII* (контрольный вектор), pZP-RCS2-*VaCPK1-nptII* и pZP-RCS2-*VaCPK26-nptII* как описано ранее [9]. Для получения трансгенных культур клеток были использованы векторные системы pSAT1a и pZP-RCS2-*nptII* [9, 10]. Каллусные клеточные культуры культивировали в стандартных химических пробирках объемом 15 мл на твердой среде W<sub>Б/А</sub> [11], содержащей 2 мг/л БАП и 0.5 мг/л АНУ, в темноте при 24°C с периодом субкультивации 30 дней.

*A. thaliana* выращивали в горшках, используя коммерчески доступный универсальный почвенный грунт, в климатической камере (Panasonic MLR-352, Япония) при температуре 22°C, 16 ч день/8 ч ночь, освещенностью ~120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Для получения трансгенных растений *Arabidopsis thaliana* L. ecotype Columbia, экспрессирующих гены *VaCPK1* и *VaCPK26*, использовали метод погружения соцветий в суспензию агробактерий [12]. Для обработки *A. thaliana* дикого типа использовали штаммы *A. tumefaciens* GV3101::pMP90, содержащие бинарные векторные конструкции pZP-RCS2-*nptII* (“пустой” вектор), pZP-RCS2-*VaCPK1-nptII* и pZP-RCS2-*VaCPK26-nptII* [9]. Для дальнейшей работы отбирали гомозиготные по инсерции Т-ДНК линии *A. thaliana* с помощью исследования сегрегации растений поколения T<sub>2</sub> (расщепление потомства индивидуального растения T<sub>1</sub> по признаку

Таблица 1. Праймеры, используемые в работе

Назначение праймеров (ГенБанк)	Последовательность праймеров
Анализ экспрессии трансгена <i>VaCPK1</i>	VaCPK1-real-s 5'CAATGATGGCCGCATAGATTAT; pSAT1-real-a 5'GAGAGACTGGTGATTTTTGCG
Анализ экспрессии трансгена <i>VaCPK26</i>	VaCPK26-real-s 5'TATGATGCAAAAGGGCAATGC; pSAT1-real-a (см. выше)
Анализ экспрессии гена <i>AtActin 2</i> (NM_112764)	AtActin-real-s 5'GATTCAGATGCCCAAGTC; AtActin-real-a 5'TACCGTACAGATCCTTCCTG
Анализ экспрессии гена <i>AtGapdh</i> (NM_111283.4)	AtGapdh-real-s 5'TTGGTGACAACAGGTCAAGCA; AtGapdh-real-a 5'AACTTGTCGCTCAATGCAAT

устойчивости к канамицину в соотношении 3 : 1) и поколения T<sub>3</sub> (отсутствие расщепления по признаку устойчивости в потомстве растений T<sub>2</sub>) на среде с канамицином. Для проведения дальнейших экспериментов использовали T<sub>3</sub> поколение растений *A. thaliana*, которые содержали одну инсерцию целевой генетической конструкции. Доказательство трансгенности и определение количества вставок проводили с помощью ПЦР-РВ, используя праймеры VaCPK1-real-s, VaCPK26-real-s и pSAT1-real-a (табл. 1), в соответствии с опубликованной методикой [13].

**Воздействие абиотических стрессов.** Для анализа воздействия абиотических стрессовых факторов на устойчивость культур клеток, экспрессирующих рекомбинантные гены *VaCPK1* и *VaCPK26*, исследовали влияние холодового и теплового стресса на рост трансгенных клеточных культур (культивирование в течение 30 сут при температурах 16 и 33°C), влияние солевого стресса (культивирование в течение 30 сут при 24°C на питательных средах, содержащих 60 или 120 мМ NaCl) и влияние маннитол-индуцированного осмотического стресса (культивирование в течение 30 сут при 24°C на питательных средах, содержащих 200 и 300 мМ маннитола) согласно ранее опубликованной методике [14–16]. Для экспериментов использовали каллусные агрегаты клеточных культур, начальный вес которых составил 0.16 г, и выращивали в течение 30 сут. Повторность 10-кратная для каждого эксперимента.

Для анализа воздействия абиотических стрессовых факторов на выживаемость *VaCPK1*- и *VaCPK26*-экспрессирующих линий *A. thaliana* индуцировали солевой стресс с помощью однократ-

ного полива растений раствором NaCl в концентрации 350 мМ до полного промокания земли, тепловой стресс индуцировали при 45°C в течение 3.5 ч, для имитации условий засухи растения не поливали в течение 4 нед, а для анализа морозоустойчивости растения выдерживали в морозильной камере при –10°C в течение 1.5 ч согласно ранее описанной методике [14–16]. Эффект воздействия тестируемых абиотических стрессовых факторов определяли путем подсчета живых растений через 7 сут после воздействия стрессовых факторов. Данные получены из шести независимых экспериментов для каждого стрессового воздействия. В каждом независимом эксперименте для контрольной и *VaCPK1*- и *VaCPK26*-экспрессирующих линий использовали по два контейнера, в которые высаживали по 10 7-суточных проростков на контейнер для каждого стрессового воздействия.

**Выделение и анализ нуклеиновых кислот.** Тотальную РНК выделяли методом, оптимизированным для работы с тканями растений, богатыми вторичными метаболитами, используя хлорид лития [17]. Комплементарную ДНК (кДНК) получали, используя 1.5 мкг тотальной РНК, с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс М, Россия). Для проведения обратной транскрипции использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей однократный ОТ-буфер, по 0.25 мМ каждого из 4 dNTP, 0.2 мкМ олиго-(dT)<sub>15</sub> праймера, 200 ед. активности М-MLV-ревертазы. Реакцию проводили при 37°C в течение 1.5 ч [18, 19].

Для анализа экспрессии генов *VaCPK1* и *VaCPK26* в *A. thaliana* был проведен ПЦР анализ с регистрацией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ) по методу SYBR Green с использова-

нием праймеров *VaCPK1-real-s*, *VaCPK26-real-s* и *pSAT1-real-a* (табл. 1), комплементарных 3'-концевой белок-кодирующей нуклеотидной последовательности *VaCPK1/26* и последовательности терминатора 35S *CaMV* в составе вектора *pSAT1a*. ПЦР-РВ проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1× *Taq*-буфер В, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 250 мкМ dNTP, 1 единицу активности *Taq*-ДНК-полимеразы, 0.5 мкл (15 нг) кДНК, 0.25 мкМ каждого из праймеров для анализируемого гена (*Real-time PCR Kit*, Синтол, Россия) и 1× *EvaGreen* флуоресцентный краситель (*Biotium*, Хейвард, США). Условия проведения ПЦР: 2 мин при 95°C с последующими 50 циклами, включающими 10 с при 95°C и 25 с при 62°C. Гены *VaActin 1* (DQ517935), *VaGAPDH* (XM\_002263109.3), *AtActin 2* (NM\_112764) и *AtGAPDH* (NM\_111283.4) использовали в качестве эндогенного контроля для нормализации и обсчета данных по методу  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [20]. Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Последовательности праймеров для анализа экспрессии стресс-маркерных генов и условия ПЦР опубликованы ранее [14, 16]. Данные ПЦР-РВ получены из двух независимых экспериментов и представлены как среднее  $\pm$  С.О. Для образцов кДНК каждого эксперимента было сделано восемь аналитических повторностей на каждую пробу (четыре были нормализованы к гену *Actin*, четыре к *GAPDH*).

**Статистический анализ.** Результаты обрабатывали при помощи программы *Statistica*, версия 10. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (С.О.). Значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Уровень значимости 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Устойчивость культур клеток V. amurensis, экспрессирующих рекомбинантные гены VaCPK1 и VaCPK26, к абиотическим стрессам*

Для изучения влияния экспрессии рекомбинантных генов *VaCPK1* и *VaCPK26* на ростовые характеристики и устойчивость к абиотическим стрессам культур клеток *V. amurensis* использовали независимо трансформированные каллусные клеточные линии *V. amurensis*, несущие целевые гены *VaCPK1* (линии 19-III и 19-IV) и *VaCPK26* (линии 18-II и 18-V) под контролем двойного *CaMV 35S* промотора и показавшие наиболее высокий уровень экспрессии рекомбинантных *VaCPK1* и *VaCPK26*. Клеточные линии были получены нами ранее [9].

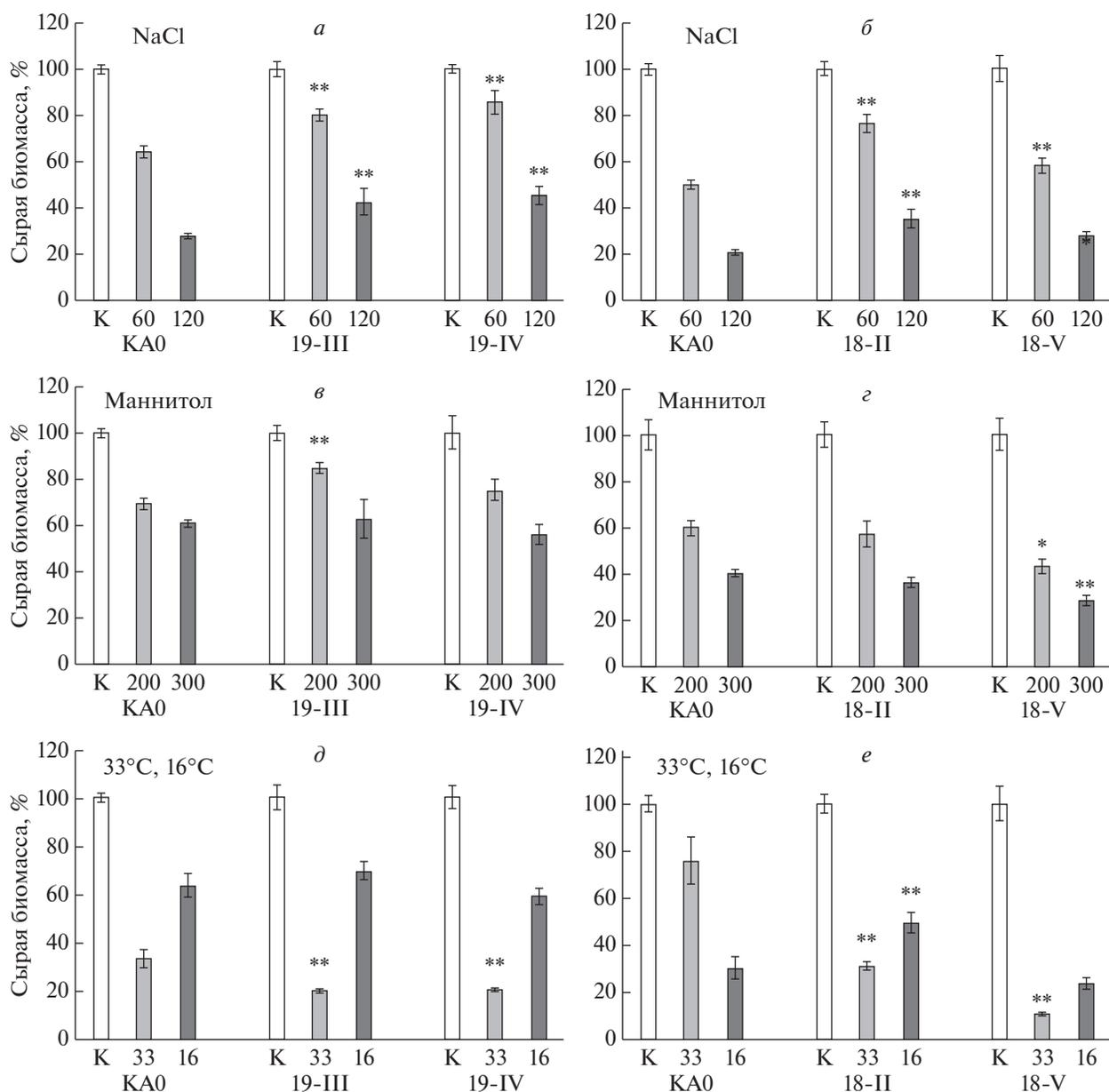
Установлено, что клеточные линии, экспрессирующие рекомбинантные гены *VaCPK1* и *VaCPK26*, были более устойчивы к солевому

стрессу по сравнению с контрольной культурой клеток КА0 (рис. 1,а, б). В условиях маннитол-индуцированного осмотического стресса линия 18-V проявила большую чувствительность по сравнению с устойчивостью линии КА0 (рис. 1,з), в то время как линия 19-III проявляла, напротив, устойчивость к данному типу стресса по сравнению с контролем КА0 (рис. 1,в). В условиях холодового стресса только линия 18-II была более устойчива по сравнению с клетками КА0 (рис. 1,в, е). При этом экспрессия рекомбинантных генов *VaCPK1* и *VaCPK26* привела к значительному снижению устойчивости исследуемых линий КА18 и КА19 к тепловому стрессу (рис. 1,д, е).

### *Устойчивость VaCPK1- и VaCPK26-экспрессирующих линий A. thaliana к абиотическим стрессам*

С помощью метода цветочного погружения получены четыре гомозиготные по введенному трансгену линии *A. thaliana*, экспрессирующие рекомбинантный ген *VaCPK1* (1-1, 1-2, 1-3, 1-4), и четыре гомозиготные по введенному трансгену линии, экспрессирующие рекомбинантный ген *VaCPK26* (26-1, 26-2, 26-3, 26-4). Также получена контрольная линия растений КА0, трансформированная контрольным вектором, содержащим только ген *nptII*, используемый в качестве селективного маркера. Методом ПЦР-РВ показано, что рекомбинантные гены *VaCPK1* и *VaCPK26* экспрессировались во всех полученных линиях растений *A. thaliana* (рис. 2). В последующих экспериментах были использованы линии 1-2, 1-4, 26-1 и 26-3, поскольку в этих линиях была детектирована наибольшая экспрессия гена *VaCPK26*.

Для дальнейшего изучения функций генов *VaCPK1* и *VaCPK26* проводили анализ выживаемости *VaCPK1*- и *VaCPK26*-экспрессирующих растений в условиях засоления почвы (NaCl 350 mM), засухи (отсутствие полива в течение 4 нед), высокотемпературного стресса (45°C в течение 3.5 ч) и заморозков (-10°C в течение 1.5 ч). Полученные линии *A. thaliana* 26-1 и 26-3, экспрессирующие ген *VaCPK26*, показали значительно более высокую выживаемость в условиях солевого стресса по сравнению с растениями "дикого типа" и контрольной линией КА0 (рис. 3,б). Линии *A. thaliana*, экспрессирующие ген *VaCPK1*, также показали более высокую выживаемость в условиях солевого стресса, однако данные отличия были достоверны только для линии 1-4 (рис. 3,а). Важно отметить, что устойчивость к солевому стрессу наблюдалась в линиях 1-4, в которой была наиболее высокая экспрессия перенесенного гена *VaCPK1* (рис. 2,а). Анализ устойчивости растений к условиям засухи показал, что линии *A. thaliana*, экспрессирующие ген *VaCPK26*, характеризовались более высокой выживаемостью по сравне-



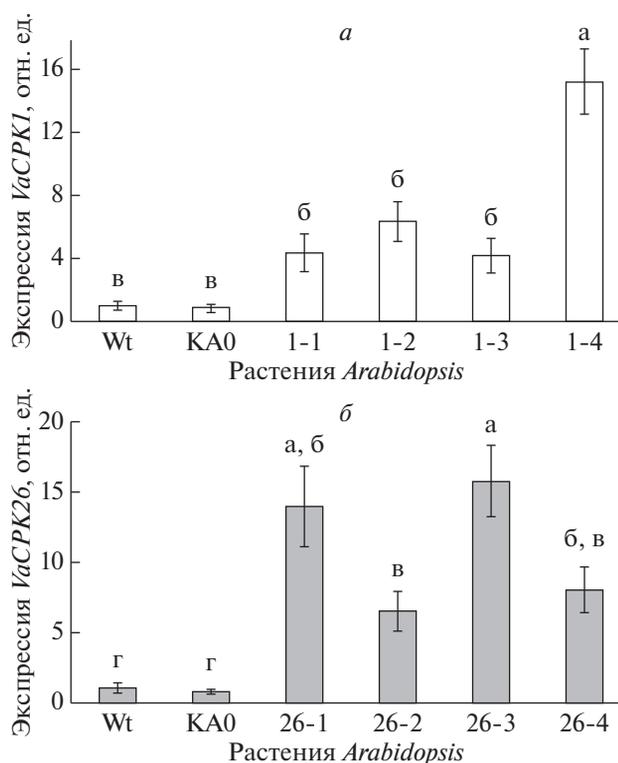
**Рис. 1.** Накопление сырой биомассы клеточными линиями *V. amurensis*, экспрессирующими рекомбинантные гены *VaCPK1* и *VaCPK26*, в условиях абиотического стресса в течение 30 сут культивирования. (а, б) – под влиянием солевого стресса при 60 и 120 мМ NaCl, (в, г) – осмотического стресса при 200 и 300 мМ маннитола, (д, е) – теплового и холодового стрессов при 33 и 16°C. KA0 – контрольная клеточная культура *V. amurensis*, экспрессирующая только селективный ген *nptII* (устойчивость к Km); KA18-II и KA18-V – клеточные линии *V. amurensis*, экспрессирующие рекомбинантные гены *VaCPK26* и *nptII*; KA19-III и KA19-IV – клеточные линии *V. amurensis*, экспрессирующие рекомбинантные гены *VaCPK1* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  С.О. \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$  по сравнению с накоплением биомассы клеточной линией KA0 в соответствующих условиях культивирования.

нию с выживаемостью контрольной линии KA0, однако статистически достоверным это увеличение было только для линии 26-3 (рис. 3,з). Линии *A. thaliana*, экспрессирующие ген *VaCPK1*, не проявили более высокой выживаемости в условиях засухи (рис. 3,в). В условиях заморозков и теплового стресса не наблюдалось изменений в выживаемости как для *VaCPK1*-, так и *VaCPK26*-транс-

генных линий *A. thaliana* по сравнению с контрольной линией KA0 (рис. 3,д, е, ж, з).

#### Экспрессия стресс-индуцируемых защитных генов в *A. thaliana*

Для изучения механизма участия гена *VaCPK26* в устойчивости к солевому стрессу и за-



**Рис. 2.** Экспрессия рекомбинантных генов *VaCPK1* (а) и *VaCPK26* (б) в *A. thaliana*, определенная с помощью ПЦР-РВ. Wt – *A. thaliana* дикого типа; KA0 – линии *A. thaliana*, трансформированные только геном *nptII*; 1-1, 1-2, 1-3 и 1-4 – линии *A. thaliana*, трансформированные геном *VaCPK1* и *nptII*; 26-1, 26-2, 26-3 и 26-4 – линии *A. thaliana*, трансформированные геном *VaCPK26* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  С.О. Достоверно различающиеся между собой величины (при  $p < 0.05$ ) обозначены разными буквами.

сухе в линиях *A. thaliana* 26-1 и 26-3, экспрессирующих ген *VaCPK26*, нами был проведен анализ экспрессии 23 стресс-индуцируемых генов *A. thaliana*, которые по данным литературы активно вовлечены в ответ растения на солевой стресс и засуху: *AtABA1*, *AtABA2*, *AtABF3*, *AtABI1*, *AtABI2*, *AtABI3*, *AtABI4*, *AtABI5*, *AtCAT1*, *AtCBF1*, *AtCOR47*, *AtCOR15*, *AtCSD1*, *AtCSD2*, *AtDREB1A*, *AtNHX1*, *AtP5CS*, *AtRab18*, *AtRD22*, *AtRD26*, *AtRD29A*, *AtRD29B* и *AtSOS1* [14, 16]. Экспрессию данных стресс-ассоциированных генов не исследовали в *VaCPK1*-экспрессирующих линиях *A. thaliana*, поскольку статистически достоверная устойчивость к солевому стрессу наблюдалась только в одной линии.

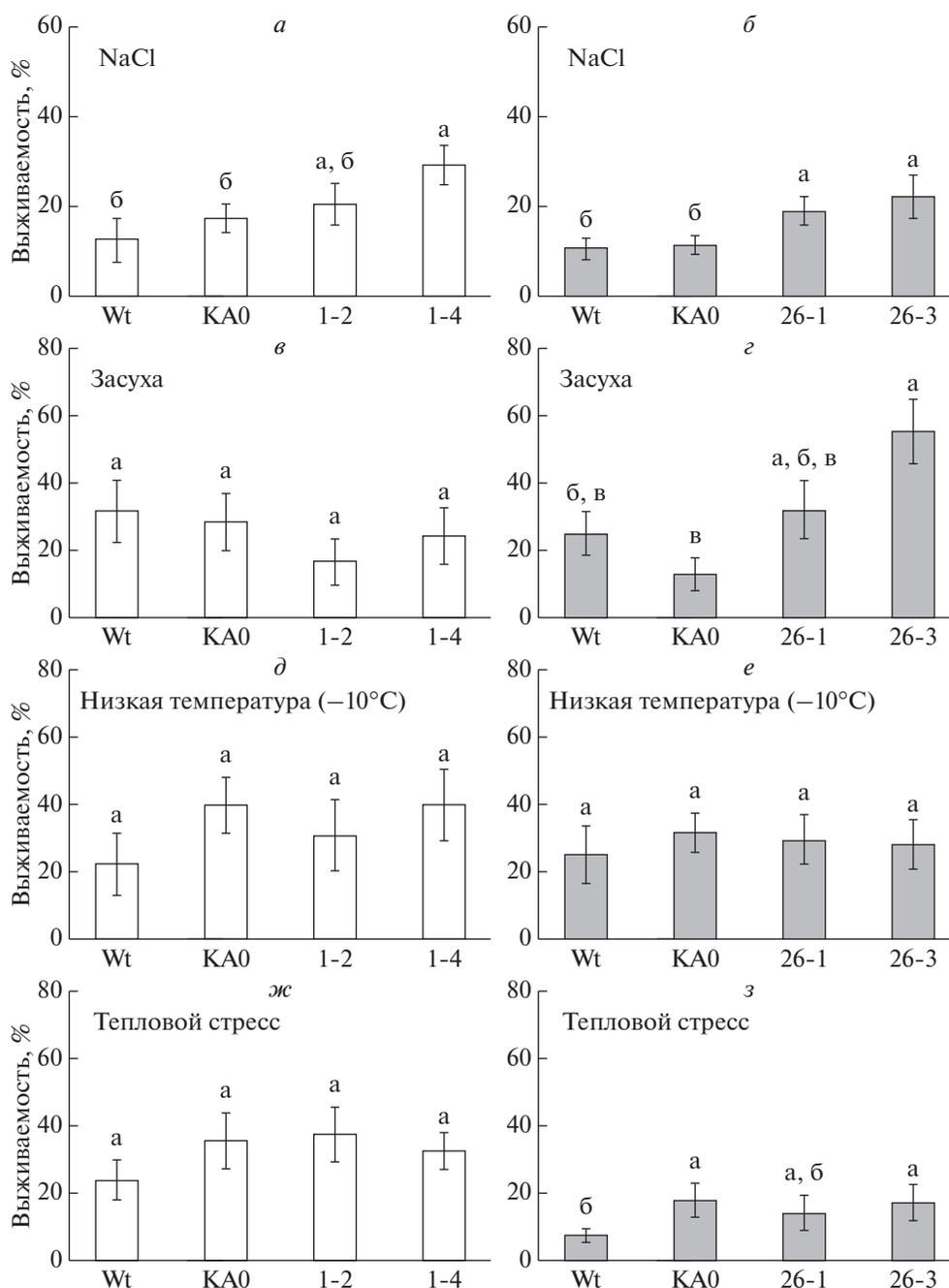
С помощью метода ПЦР-РВ показано, что в нормальных условиях культивирования без стрессовых воздействий в линиях 3-недельного *A. thaliana*, экспрессирующего ген *VaCPK26*, увеличена экспрессия генов *ABI3*, *ABI5*, *COR15* и *RD26* (рис. 4, а, б, в, д). Гены *ABI3* и *ABI5* вовлече-

ны в регуляцию передачи сигнала абсцизовой кислоты (АБК) – регулятора адаптации растений к таким абиотическим стрессам, как высыхание, засоление и низкая температура [21]. Продуктом гена *COR15* являются дегидрин [22], который характеризуется высокой гидрофильностью. Во время обезвоживания клеток под действием водного стресса дегидрины за счет высокой гидрофильности препятствуют потере клеткой воды при засухе, засолении и заморозках. *RD26* (NAC domain transcriptional regulator superfamily protein) – это ген транскрипционного фактора NAC (No Apical Meristem), индукцию которого вызывает дефицит воды и солевой стресс [23]. Только после продолжительного солевого стресса экспрессия этих генов в диком типе и контрольной линии KA0 достигла уровня, характерного для *VaCPK26*-экспрессирующих линий. Кроме того, при солевом стрессе в *VaCPK26*-экспрессирующих линиях *A. thaliana* наблюдалось значительное увеличение экспрессии гена *CSD1*, в то время как в контрольных растениях значимого увеличения транскрипции *CSD1* не было детектировано (рис. 4, з). *CSD1* – это хлоропластная Cu/Zn-супероксид дисмутаза, которая относится к антиоксидантным ферментам, способным детоксифицировать активные формы кислорода, образующиеся в ответ на абиотический стресс, в том числе вследствие солевого воздействия [24].

Установлено, что под воздействием засухи в линиях *A. thaliana*, экспрессирующих *VaCPK26*, наблюдался достоверно более высокий уровень транскрипции генов *CBF1*, *DREB1A* и *RAB18* в сравнении с диким типом и линией KA0 (рис. 5). *CBF1* и *DREB1A* известны как транскрипционные факторы, регулирующие DRE-опосредованную (dehydration-responsive element) транскрипцию ряда защитных генов под воздействием холодового стресса, обезвоживания и засоления и активирующие АБК-независимый путь защиты от стресса [25, 26]. Также была активирована экспрессия гена дегидрина *RAB18*. Более того, в нормальных условиях культивирования в линиях *A. thaliana*, экспрессирующих *VaCPK26*, была повышена экспрессия гена *CSD1*, кодирующего хлоропластную Cu/Zn-супероксид дисмутазу (рис. 5, з).

## ОБСУЖДЕНИЕ

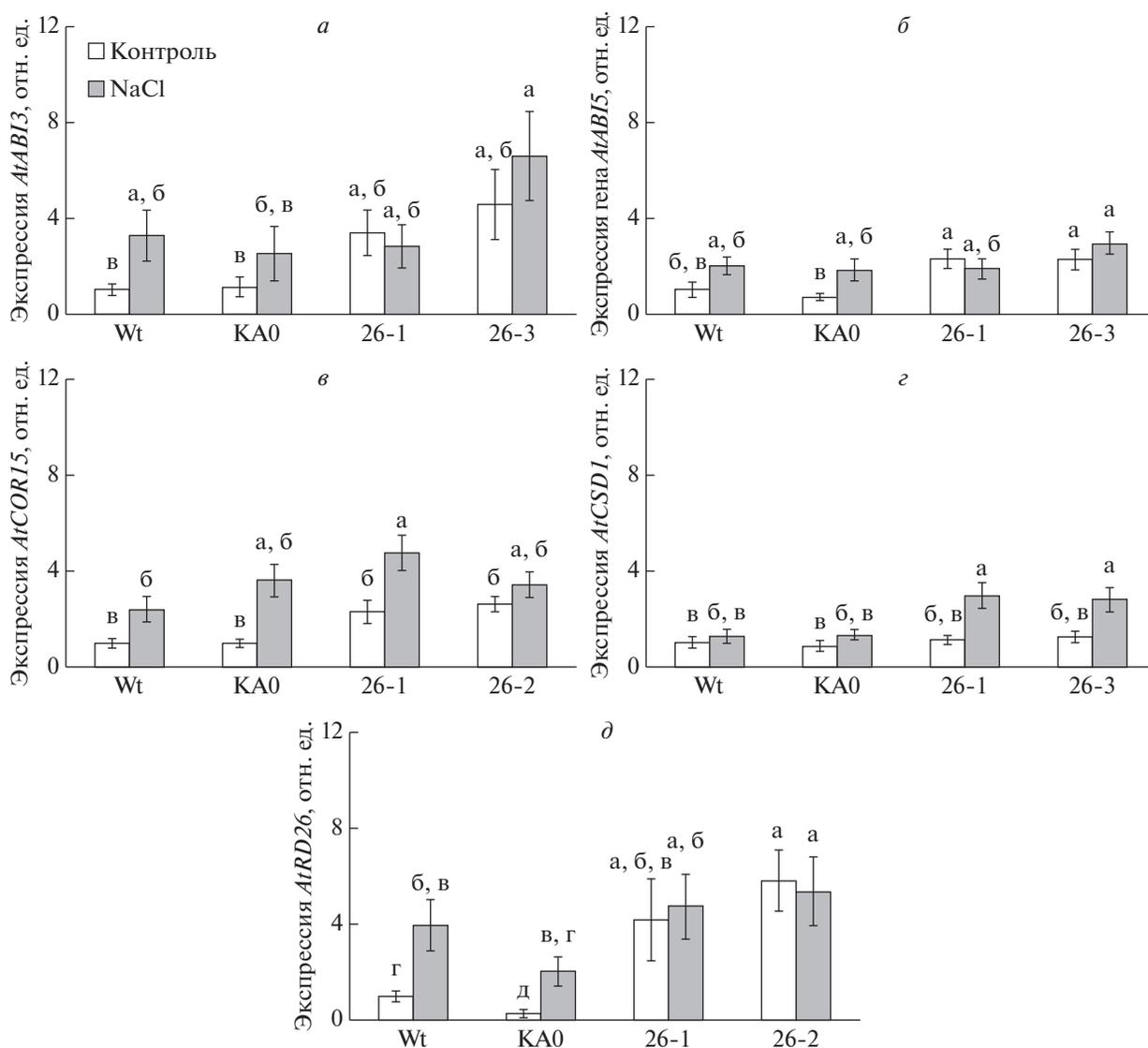
Известно, что дикий виноград *V. amurensis* обладает высоким адаптационным потенциалом и высоким уровнем устойчивости к абиотическим стрессам, в особенности к холодовому стрессу, заморозкам и грибковым заболеваниям [27], и исследование молекулярно-генетических механизмов адаптации *V. amurensis* к абиотическим стрессам является актуальной задачей. Установлено, что уровень транскрипции различных генов *CDPK* *V. amurensis* значительно изменяется в ответ на



**Рис. 3.** Выживаемость *VaCPK1*- и *VaCPK26*-экспрессирующих линий *A. thaliana* под воздействием солевого стресса (а, б), засухи (в, г), низкотемпературного стресса (д, е) и теплового стресса (ж, з). Wt – *A. thaliana* дикого типа; KA0 – линии *A. thaliana*, трансформированные только геном *nptII*; 1-2 и 1-4 – линии *A. thaliana*, трансформированные геном *VaCPK1* и *nptII*; 26-1 и 26-3 – линии *A. thaliana*, трансформированные геном *VaCPK26* и *nptII*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  С.О. Достоверно различающиеся между собой величины (при  $p < 0.05$ ) обозначены разными буквами.

воздействие не только холодого стресса, но и многих других абиотических стрессовых факторов [8], в том числе показано, что гены I подсемейства CDPK *VaCPK1* и *VaCPK26* в значительной степени активируются в ответ на солевой стресс. Транскрипция *VaCPK1* также возрастала в

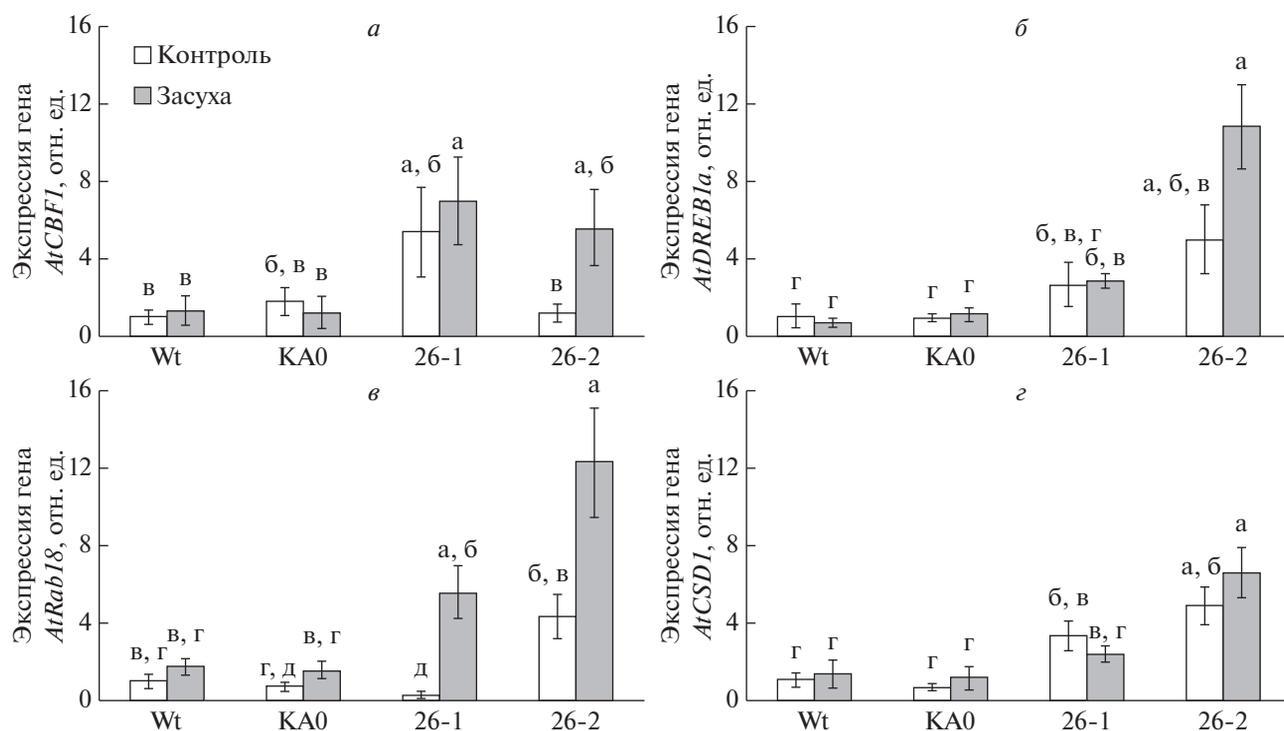
ответ на осмотический стресс, а *VaCPK26* – на воздействие холодого стресса. Ранее нами были исследованы функции генов *CPK3a*, *CPK9*, *CPK13*, *CPK20*, *CPK21* и *CPK29* *V. amurensis* в защите от абиотического стресса, с помощью анализа накопления биомассы культурами клеток



**Рис. 4.** Экспрессия стресс-индуцируемых генов *ABI3*, *ABI5*, *COR15*, *CSD1* и *RD26* в стандартных условиях и при засолении почвы у *VaCPK26*-трансформированных линий *A. thaliana* (линии 26-1 и 26-3), контрольной *nptII*-трансформированной линии *A. thaliana* (линия KA0) и *A. thaliana* дикого типа (Wt). Тотальную РНК выделяли из 3-недельных растений *A. thaliana*, культивируемых в стандартных условиях и в присутствии 350 мМ NaCl в течение 20 ч. Данные представлены как среднее  $\pm$  С.О. Достоверно различающиеся между собой величины (при  $p < 0.05$ ) обозначены разными буквами.

*V. amurensis* и выживаемости линий *A. thaliana*, экспрессирующих соответствующие рекомбинантные *VaCPK*, в условиях абиотического стресса. Установлено, что ген *VaCPK20* (I подсемейство CDPK) вовлечен в адаптацию *V. amurensis* к холодному стрессу, заморозкам и засухе [13], в то время как сходный набор экспериментов не выявил участия гена *VaCPK3a* (I подсемейство CDPK) в адаптации к температурному стрессу, засухе и солевому стрессу [16]. Исследование участия трех генов из II подсемейства CDPK *VaCPK9*, *VaCPK21* и *VaCPK29* в ответе *V. amurensis* на различные типы абиотического стресса показало вовлечен-

ность *VaCPK21* в ответ на солевой стресс [14], а *VaCPK29* – в ответ на тепловой и осмотический стресс [15], в то время как сверхэкспрессия гена *VaCPK9* не привела к значимым изменениям устойчивости клеток *V. amurensis* к абиотическому стрессу [16]. Показано, что ген *VaCPK13*, принадлежащий к III подсемейству CDPK, не участвует в формировании устойчивости винограда к абиотическим стрессам [28]. В настоящей работе установлено, что экспрессия рекомбинантного гена *VaCPK26*, а также в меньшей степени *VaCPK1*, принадлежащих к I подсемейству CDPK, приводит к повышению устойчивости к солевому



**Рис. 5.** Экспрессия стресс-индуцируемых генов *CBF1*, *CSD1*, *DREB1A*, *RAB18* и *RD29A* под влиянием условий засухи у *VaCPK26*-трансформированных линий *A. thaliana* (линии 26-1, и 26-3), контрольных *nptII*-трансформированных линий *A. thaliana* (линия KA0) и *A. thaliana* дикого типа (Wt). Недельные проростки арабидопсиса были высажены в контейнеры с обильно политым грунтом, после чего *A. thaliana* выращивали в течение 4 нед, регулярно поливая (контроль, белые столбцы) или не поливая (засуха, серые столбцы). Тотальную РНК выделяли из 5-недельных растений *A. thaliana*. Данные представлены как среднее  $\pm$  С.О. Достоверно различающиеся между собой величины (при  $p < 0.05$ ) обозначены разными буквами.

стрессу как *V. amurensis*, так и *A. thaliana*. Кроме того, *VaCPK26*-экспрессирующие линии *A. thaliana* проявили небольшую устойчивость к воздействию условий засухи по сравнению с устойчивостью контрольной культуры клеток, трансформированной “пустым” вектором. Таким образом, полученные данные указывают на то, что гены *VaCPK1* и *VaCPK26* вовлечены в формирование устойчивости растений к солевому стрессу и возможна вовлеченность *VaCPK26* в адаптацию к условиям засухи. Таким образом, принадлежность к тому или иному подсемейству СДПК не определяет тип стрессового воздействия, в ответ на который вовлечен тот или иной *VaCPK*, а воздействие одного и того же стрессового стимула может привлекать несколько различных *VaCPK*. Гены *VaCPK20* и *VaCPK29*, а также исследуемые в настоящей работе *VaCPK1* и *VaCPK26* проявили вовлеченность в ответ на различающийся набор абиотических стрессовых воздействий, в то время как ген *VaCPK21*, так же как *VaCPK1* и *VaCPK26*, вовлечен в адаптацию к солевому стрессу.

В пользу вовлеченности *VaCPK1* и *VaCPK26* в формирование устойчивости растений к солевому стрессу и условиям засухи свидетельствуют дан-

ные, показывающие, что линии *A. thaliana*, экспрессирующие *VaCPK26*, проявляют повышенную экспрессию некоторых генов стресс-индуцируемых транскрипционных факторов (*AtDREB1a*, *AtCBF1*, *AtRD26*), регуляторов АБК ответа (*AtABI3*, *AtABI5*), дегидринов (*AtCOR15*, *AtRAB18*) и супероксиддисмутазы (*AtCSD1*), активация которых происходит и необходима для защиты растений от солевого стресса и засухи, а также других стрессовых воздействий (рис. 4, 5). *DREB1A* и *CBF1* известны как транскрипционные факторы, активирующие АБК-независимый путь защиты от холодного стресса, обезвоживания и засоления [25, 26]. Солевой стресс, обезвоживание и АБК – известные индукторы экспрессии стресс-ассоциированных генов дегидринов *COR15* и *RAB18*, а также регуляторного белка *RD26* [29–32]. Супероксиддисмутазы *CSD1* относится к группе антиоксидантных ферментов, экспрессия которых, как правило, возрастает при любых стрессовых воздействиях, в том числе при засолении и засухе [24]. Экспрессия рекомбинантного гена *VaCPK26* также привела к повышению экспрессии некоторых генов группы *ABI*, которые кодируют белки, регулирующие АБК сигнальный путь [33]. Таким образом, анализ экспрессии ге-

**Таблица 2.** Сравнение выведенной аминокислотной последовательности гена *VaCPK1* (*VaCDPK3b*, номер в GenBank KC488321) и *VaCPK26* (*VaCDPK3d*, номер в GenBank KC488323) с наиболее близкими гомологами из *Vitis vinifera*, *Vitis pseudoreticulata*, *Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa*

Белки CDPK (ГенБанк)	VaCPK1 I, % (S, %)	VaCPK26 I, % (S, %)
VaCPK1 (KC488321)	—	63 (75)
VaCPK26 (KC488323)	63 (75)	—
VvCPK1 (XP_002264440)	98 (98)	63 (77)
VvCPK26 (XM_002282994)	63 (76)	99 (99)
VpCPK2 (AKO82460)	63 (75)	98 (99)
TcCPK26 (XP_007043083)	63 (76)	90 (95)
AtCPK1 (NP_196107)	70 (78)	61 (71)
AtCPK2 (AAB03244)	65 (75)	57 (68)
AtCPK26 (NP_001190949)	60 (72)	85 (93)
AtCPK6 (OAP08681)	62 (75)	83 (91)
OsCPK26 (XP_015635476)	61 (73)	76 (83)

Примечание. Идентичность (I, %) и схожесть (S, %) аминокислотных последовательностей определена с помощью специализированной программы NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), используя алгоритм blastp (protein-protein BLAST).

нов, контролируемых различными путями ответа растения на абиотические стрессы, показал вовлеченность экспрессии гена *VaCPK26* в индукцию транскрипции генов как АБК-зависимого, так и АБК-независимого защитного ответа у трансгенных растений, что могло способствовать повышению устойчивости *VaCPK26*-трансгенных растений к солевому стрессу. Исследование экспрессии соответствующего набора стресс-ассоциированных генов в линиях *A. thaliana*, экспрессирующих рекомбинантные *VaCPK20*, *VaCPK21* и *VaCPK29*, показало повышенные уровни экспрессии различающихся наборов анализируемых генов [13–15].

Анализ гомологии выведенных аминокислотных последовательностей *CPK1* и *CPK26* *V. amurensis* с последовательностями *CPK* *A. thaliana* показал наибольшую идентичность с *AtCPK1*, *AtCPK6* и *AtCPK26*, а также с некоторыми секвенированными CDPK пшеницы и риса (табл. 2). Известно, что *AtCPK1* вовлечена в защиту *A. thaliana* против биотического стресса, вызванного грибковыми патогенами [34], а *AtCPK6* является позитивным регулятором ответа *A. thaliana* на солевой и осмотический стресс [35], что согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании для *VaCPK26*, которая является близким гомологом. В настоящее время нет сведений о функциях *AtCPK26*, *TcCPK26* и *OsCPK26* в защите растений от стрессов. На сегодняшний день проведено достаточно много работ, где исследовалось влияние конститутивной экспрессии и/или, напротив, нокаута различных рекомбинантных CDPK из арабидопсиса, риса, тополя, кукурузы и некоторых других видов растений на уровень устойчивости этих растений к различным

типам абиотического стресса [7, 35–41]. В большинстве случаев наблюдали значительное повышение устойчивости растений, активно экспрессирующих рекомбинантные CDPK (например, *OsCPK12*, *AtCPK6*, *AtCPK10*, *OsCPK9*, *PeCPK10*), в то время как мутантные растения проявляли, наоборот, более высокую чувствительность к исследуемым типам абиотического стресса по сравнению с контрольными [7, 35–38]. Однако для некоторых CDPK, таких как *AtCPK21*, *AtCPK23*, *ZmCPK1*, показана, наоборот, более высокая чувствительность при конститутивной экспрессии и стрессоустойчивость при нокауте, что свидетельствует о том, что эти представители семейства являются негативными регуляторами формирования устойчивости растений к абиотическим стрессам [39–41].

В настоящей работе показано, что ген *VaCPK26* является регуляторным геном, участвующим в формировании устойчивости винограда к солевому стрессу и, в меньшей степени, засухе через активацию АБК-зависимых и АБК-независимых сигнальных систем. Близкий к нему по выведенной аминокислотной последовательности ген *VaCPK1* проявляет схожие свойства, но в меньшей степени придает устойчивость к солевому стрессу.

Авторы благодарны О.А. Алейновой и В.С. Христенко за помощь в получении трансгенных культур клеток винограда и растений арабидопсиса. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00284).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Медведев С. С.* Кальциевая сигнальная система растений // Физиол. раст. 2005. Т. 52. С. 282–305. doi 10.1007/s11183-005-0038-1
2. *Hashimoto K., Kudla J.* Calcium decoding mechanisms in plants // Biochimie. 2011. V. 93. P. 2054–2059. doi 10.1016/j.biochi.2011.05.019
3. *Liese A., Romeis T.* Biochemical regulation of *in vivo* function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK) // Biochim. et Biophys. Acta – Mol. Cell Res. // 2013. V. 7. P. 1582–1589. doi 10.1016/j.bbamcr.2012.10.024
4. *Harper J.F., Harmon A.* Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection // Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. P. 555–566. doi 10.1038/nrm1679
5. *Schulz P., Herde M., Romeis T.* Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development // Plant Physiol. 2013. V. 163. P. 523–530. doi 10.1104/pp.113.222539
6. *Boudsoq M., Sheen J.* CDPKs in immune and stress signaling // Trends Plant Sci. 2013. V. 18. P. 30–40. doi 10.1016/j.tplants.2012.08.008
7. *Asano T., Hayashi N., Kobayashi M. et al.* A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK12* oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance // Plant J. 2012. V. 69. P. 26–36. doi 10.1111/j.1365-313X.2011.04766.x
8. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S.* Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* // J. Plant Physiol. 2013. V. 170. P. 1491–1500. doi 10.1016/j.jplph.2013.06.014
9. *Aleynova O.A., Dubrovina A.S., Kiselev K.V.* Activation of stilbene synthesis in cell cultures of *Vitis amurensis* by calcium-dependent protein kinases *VaCPK1* and *VaCPK26* // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2017. V. 130. P. 141–152. doi 10.1007/s11240-017-1210-y
10. *Tzfira T., Tian G.W., Lacroix B. et al.* PSAT vectors: A modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants // Plant Mol. Biol. 2005. V. 57. P. 503–516. doi 10.1007/s11103-005-0340-5
11. *Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P.* Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. P. 647–655. doi 10.1007/s00253-008-1788-4
12. *Zhang X., Henriques R., Lin S.S. et al.* Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method // Nature Protocols. 2006. V. 1. P. 641–646. doi 10.1038/nprot.2006.97
13. *Ma L., Chung W.K.* Quantitative analysis of copy number variants based on real-time LightCycler PCR // Current Protocols in Human Genet. 2014. V. 80. P. 1–10. doi 10.1002/0471142905.hg0721s80
14. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A.* *VaCPK20*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., mediates cold and drought stress tolerance // J. Plant Physiol. 2015. V. 185. P. 1–12. doi 10.1016/j.jplph.2015.05.020
15. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A.* *VaCPK21*, a calcium-dependent protein kinase gene of wild grapevine *Vitis amurensis* Rupr., is involved in grape response to salt stress // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2016. V. 124. P. 137–150. doi 10.1007/s11240-015-0882-4
16. *Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A.* The calcium-dependent protein kinase gene *VaCPK29* is involved in grapevine responses to heat and osmotic stresses // Plant Growth Regulat. 2017. V. 82. P. 79–89. doi 10.1007/s10725-016-0240-5
17. *Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Shumakova O.A. et al.* Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, *CDPK3a*, in leaves, stems, grapes, and cell cultures of wild-growing grapevine *Vitis amurensis* Rupr. // Plant Cell Reports. 2013. V. 32. P. 431–442. doi 10.1007/s00299-012-1375-0
18. *Киселев К.В., Алейнова О.А., Тюнин А.П.* Экспрессия генов транскрипционных факторов MYB R2R3 в растениях и клеточных культурах *Vitis amurensis* Rupr. с различным содержанием резвератрола // Генетика. 2017. Т. 53. № 4. С. 460–467. doi 10.1134/S1022795417040093
19. *Тюнин А.П., Киселев К.В., Zhuravlev Y.N.* Effects of 5-azacytidine induced DNA demethylation on methyltransferase gene expression and resveratrol production in cell cultures of *Vitis amurensis* // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2012. V. 111. P. 91–100. doi 10.1007/s11240-012-0175-0
20. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408. doi 10.1006/meth.2001.1262
21. *Zhang H., Liu W.Z., Zhang Y. et al.* Identification, expression and interaction analyses of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes in canola (*Brassica napus* L.) // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 211. doi 10.1186/1471-2164-15-211
22. *Ingram J., Bartels D.* The molecular basis of dehydration tolerance in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 377–403. doi 10.1146/annurev.arplant.47.1.377
23. *Fujita M., Fujita Y., Maruyama K. et al.* A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway // Plant J. 2004. V. 39. P. 863–876. doi 10.1111/j.1365-313X.2004.02171.x
24. *Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K.* Cell signaling during cold, drought, and salt stress // Plant Cell. 2002. V. 14. P. S165–S183. doi 10.1105/tpc.000596
25. *Kasuga M., Liu Q., Miura S. et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor // Nature Biotechnol. 1999. V. 17. P. 287–291. doi 10.1038/7036
26. *Akhtar M., Jaiswal A., Taj G. et al.* DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants // J. Genet. 2012. V. 91. P. 385–395. doi 10.1007/s12041-012-0201-3
27. *Liu L., Li H.* Review: Research progress in amur grape, *Vitis amurensis* Rupr. // Canad. J. Plant Sci. 2013. V. 93. P. 565–575. doi 10.4141/CJPS2012-202
28. *Христенко В.С., Дубровина А.С., Алейнова О.А., Киселев К.В.* Влияние сверхэкспрессии гена  $Ca^{2+}$ -зависимой протеинкиназы *VaCDPK13* на устойчивость культур клеток винограда амурского *Vitis*

- amurensis* к абиотическим стрессам // Вестн. КрасГАУ. 2015. Т. 2. С. 132–138.
29. Lang V., Palva E.T. 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. 1992. V. 20. P. 951–962. doi 10.1007/BF00027165
  30. Fujita M., Fujita Y., Maruyama K. et al. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway // Plant J. 2004. V. 39. P. 863–876. doi 10.1111/j.1365-313X.2004.02171.x
  31. Msanne J., Lin J., Stone J.M., Awada T. Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes // Planta. 2011. V. 234. P. 97–107. doi 10.1007/s00425-011-1387-y
  32. Liu D., Li W., Cheng J., Hou L. Expression analysis and functional characterization of a cold-responsive gene *COR15A* from *Arabidopsis thaliana* // Acta Physiol. Plantarum. 2014. V. 36. P. 2421–2432. doi 10.1007/s11738-014-1615-8
  33. Finkelstein R.R., Rock C.D. Abscisic acid biosynthesis and response // Arabidopsis Book. 2002. V. 1. P. e0058. doi 10.1199/tab.0058
  34. Coca M., San Segundo B. AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis* // Plant J. 2010. V. 63. P. 526–540. doi 10.1111/j.1365-313X.2010.04255.x
  35. Xu J., Tian Y.S., Peng R.H. et al. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis* // Planta. 2010. V. 231. P. 1251–1260. doi 10.1007/s00425-010-1122-0
  36. Zou J.J., Wei F.J., Wang C. et al. Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca<sup>2+</sup>-mediated stomatal regulation in response to drought stress // Plant Physiol. 2010. V. 154. P. 1232–1243. doi 10.1104/pp.110.157545
  37. Chen J., Xue B., Xia X., Yin W. A novel calcium-dependent protein kinase gene from *Populus euphratica*, confers both drought and cold stress tolerance // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 2013. V. 441. P. 630–636. doi 10.1016/j.bbrc.2013.10.103
  38. Wei S., Hu W., Deng X. et al. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. P. 133. doi 10.1186/1471-2229-14-133
  39. Ma S.Y., Wu W.H. AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses // Plant Mol. Biol. 2007. V. 65. P. 511–518. doi 10.1007/s11103-007-9187-2
  40. Franz S., Ehlert B., Liese A. et al. Calcium-dependent protein kinase CPK21 functions in abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant. 2011. V. 4. P. 83–96. doi 10.1093/mp/ssp064
  41. Weckwerth P., Ehlert B., Romeis T. ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the *Zea mays* CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling // Plant Cell and Environment. 2015. V. 38. P. 544–558. doi 10.1111/pce.12414

## The Role of Calcium-Dependent Protein Kinase Genes *VaCPK1* and *VaCPK26* in the Response of *Vitis amurensis* (*in vitro*) and *Arabidopsis thaliana* (*in vivo*) to Abiotic Stresses

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

<sup>a</sup>Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

\*e-mail: kiselev@biosoil.ru

Calcium-dependent protein kinases (CDPKs or CPKs) are involved in plant protection against abiotic stresses, but the properties and functions of CDPKs are poorly understood. The Amur grape *Vitis amurensis* Rupr. is of high interest for research, since it displays a high level of resistance to adverse environmental conditions. It is known that under the influence of salt stress and, to a lesser extent, osmotic and cold stresses, the transcription of the *VaCPK1* and *VaCPK26* genes is significantly increased. This study investigates the influence of constitutive expression of recombinant *VaCPK1* and *VaCPK26* genes on the resistance of *V. amurensis* cell cultures and *Arabidopsis thaliana* plants to salt, osmotic, and temperature stresses. It has been shown that overexpression of *VaCPK26*, and to a lesser extent *VaCPK1*, increased biomass accumulation by cell cultures of *V. amurensis* in 1.2–1.7 times and the survival of *A. thaliana* plants in the 1.2–2.1 times under salt stress conditions. In addition, *VaCPK26*-expressing lines of *A. thaliana* showed a slight degree of drought tolerance and exhibited increased expression of some stress-induced protective genes involved in salt stress and dehydration resistance. The findings suggest that the *VaCPK1* and *VaCPK26* genes may act as positive regulators of plant responses to salt stress.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, abiotic stresses, calcium-dependent protein kinases, plant tolerance, salt stress, transgenic plants, *Vitis amurensis*.