

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *PgCDPK2ds1* НА ПРОДУКЦИЮ РЕЗВЕРАТРОЛА В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ВИНОГРАДА АМУРСКОГО (*VITIS AMURENSIS MEYER*)*

Исследовано влияние вставки регуляторного гена кальциевой сигнальной системы гена кальций-зависимые протеинкиназы *PgCDPK2ds1* из женьшеня *Panax ginsens Meyer*. на биосинтез резвератрола в культурах клеток винограда амурского (*Vitis amurensis Rupr*).

В полученных *PgCDPK2ds1*-трансгенных клеточных линиях винограда продукция резвератрола была в 1,2–5,8 раза выше, чем в контрольной культуре клеток винограда. Эти результаты впервые свидетельствуют о том, что кальций-зависимые протеинкиназы участвуют в регуляции биосинтеза резвератрола в клетках винограда.

Ключевые слова: виноград амурский, кальций-зависимые протеинкиназы, резвератрол, культура клеток.

О.А. Shumakova, K.V. Kiselyov

THE GENE *PgCDPK2DS1* EXPRESSION INFLUENCE ON RESVERATROL PRODUCTION IN CELLULAR CULTURES OF THE AMUR GRAPES (*VITIS AMURENSIS MEYER*)

The influence of the calcic alarm system regulatory gene introduction, gene calcium – dependent protein kinase by *PgCDPK2ds1* from *Panax ginsens Meyer ginseng* on resveratrol biosynthesis in culture cells of Amur *Vitis amurensis Rupr.* grapes is researched.

In the received *PgCDPK2ds1*-transgene grape cellular lines, resveratrol production was 1,2–5,8 times higher than in grape cell control culture. These results testify for the first time that calcium-dependent protein kinase participates in resveratrol biosynthesis regulation in grape cells.

Key words: *Vitis amurensis Meyer*, calcium-dependent protein kinase, resveratrol, cell culture.

Введение. Виноград амурский (*Vitis amurensis Rupr.*), произрастающий на территории Приморского края России, является источником стильбенов. Самый ценный и известный из них – это *транс*-резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен). Резвератрол обладает широким спектром биологической активности, обладает превентивными свойствами против нескольких форм злокачественных образований – рака желудочно-кишечного тракта [1, 2], рака кожи [3], предотвращает развитие рака молочной железы [4], также резвератрол препятствует инвазии и метастазированию [5]. Помимо этого резвератрол обладает антибактериальной [6] и противовирусной активностью [7, 8].

В настоящее время встает вопрос о получении резвератрола в промышленных масштабах, однако получение резвератрола из растительного сырья представляется экономически невыгодным, потому что содержание его крайне низкое. Для создания организмов, активно продуцирующих резвератрол, необходимо изучить молекулярные механизмы регуляции биосинтеза этого стильбена.

В настоящее время регуляторы биосинтеза стильбенов полностью не изучены, но установлено, что некоторые вторичные мессенджеры, особенно катионы Ca^{2+} , вовлечены в регуляцию биосинтеза стильбенов [9]. У растений сенсорами цитоплазматического кальция могут быть кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK). Секвенирование геномов двух таксономически далеких видов *Oryza sativa* и *Arabidopsis thaliana* показало, что эти растения содержат 27 и 34 гена *CDPK* соответственно. Это может свидетельствовать о наличии разнообразных функций белков семейства *CDPK*. Например, недавно показано, что увеличение накопления фитоалексинов коррелирует с повышением активности *CDPK* [10]. Также известно, что в женьшене *Panax ginsens Meyer*. повышение экспрессии гена *PgCDPK2d* коррелирует с увеличением продукции гинзенозидов – биологически активных веществ «корня жизни» [11, 12]. Учитывая все вышесказанное, **целью настоящей работы** было изучить влияние экспрессии гена женьшеня *PgCDPK2ds1* на продукцию резвератрола в культуре клеток винограда амурского.

* Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Дальневосточного отделения Российской академии наук.

Материалы и методы исследований

Растительный материал и клеточные культуры. В нашей работе для изучения влияния экспрессии гена *PgCDPK2ds1* на продукцию резвератрола решили использовать для агробактериальной трансформации клеточную культуру *V. amurensis* V2 с содержанием резвератрола (0,001% от сухой массы). Каллусная культура V2 получена в 2002 году из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis* Rupr. (*Vitaceae*), которое было собрано на Дальнем Востоке (юг Приморского края) и определено в отделе ботаники Биолого-почвенного института ДВО РАН [13].

Компоненты питательных сред. Для проведения экспериментов использовали агаризованную питательную среду W_{ВА} [14] с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2 мг/л α-нафтилуксусной (АНУ) кислоты, которую разливали в пробирки 200*20 мм по 15 мл. Интервал субкультивирования составлял 35–40 дней в темноте при 24±1°C.

Определение содержания стильбенов в образцах ткани *V. amurensis*. Определение качественного и количественного содержания стильбенов производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в Горно-таежной станции ДВО РАН, куда были переданы образцы высушенной ткани векторной культуры клеток винограда KA-0 и *PgCDPK2ds1*-трансгенных клеточных линий *V. amurensis* KA-01-I, KA-01-II и KA-01-III в соответствии с методикой, описанной ранее [13]. Количество резвератрола определяли путем сравнения со стандартом резвератрола (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США).

Получение последовательности гена *PgCDPK2ds1*. Для получения нуклеотидной последовательности гена *PgCDPK2ds1* экстрагировали тотальную РНК из клеточных культур женьшеня *P. ginseng* на 30–35 день культивирования при помощи метода с использованием LiCl, оптимизированного для работы с тканями растений, богатыми вторичными метаболитами [15]. кДНК получали, используя 1–3 мкг тотальной РНК (предварительно обработав ДНКазой, Fermentas, Вильнюс, Литва), с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс М, г. Москва, Россия). Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей 10x ОТ буфер, по 0,24 мМ каждого из dNTP, 0,2 мкМ олиго-(dT)₁₅ праймера, 200 единиц активности M-MLV-ревертазы. Реакцию проводили при 37°C в течение 1,5 ч.

Получение трансгенных клеток винограда *V. amurensis*, сверх экспрессирующих гены *PgCDPK2ds1*. Для создания генетических конструкций для трансформации клеточной культуры винограда амурского амплифицировали с кДНК культуры клеток женьшеня амурского ген *PgCDPK2ds1* (номер доступа в ГенБанк EU881984), используя пару праймеров 5'-ATG GGW AAY TGY TGY MG и 5'-СТА TTC AGT TTC TGC CC. Полученные ампликоны гена *PgCDPK2ds1* были выделены из геля при помощи набора Glass Milk (Силекс, г. Москва, Россия) и клонированы в вектор pTZ57R/T согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Вильнюс, Литва). Затем, используя пару праймеров 5'-GCT AAG CTT ATG GGT ATT GTT GTC GCA CGT, содержащий в своей последовательности сайт рестрикции для рестриктазы Hind III, и 5'-AGC GGA TCC СТА TTC AGT TTC TGC CCA AAA TGG, содержащий сайт для рестриктазы BamH I, амплифицировали полную последовательность *PgCDPK2ds1*. В качестве матрицы использовали предварительно полученную генетическую конструкцию pTZ57-PgCDPK2ds1. Полученный ПЦР продукт перенесли по рестрикционным сайтам Hind III и BamH I в вектор pSAT1 [16]. В этой конструкции ген *PgCDPK2ds1* находился под контролем двойного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (35S CaMV). После перенесли кассету, содержащую *PgCDPK2ds1*, из pSAT1 в вектор pZP-RCS2-nptII [16], используя сайт для рестрикции рестриктазы PalA I. Далее генетическая конструкция pZP-RCS2-*PgCDPK2ds1* была перенесена в агробактерии *A. tumefaciens* GV3101. Рестриктазы, используемые в данном исследовании, были заказаны из СибЭнзим, г. Новосибирск, Россия, полимеразы и реактивы для ПЦР из Силекс (Москва, Россия).

Суспензионную культуру клеток винограда *V. amurensis* V2 трансформировали полученным штаммом агробактерий по методике, описанной ранее [13]. После трансформации каллусы культивировали в течение трех месяцев в присутствии 250 мг/л цефотаксима для подавления роста агробактерий. Отбор трансгенных клеток проводили при помощи селекции на канамицине (15–20 мг/л) в течение 5 месяцев.

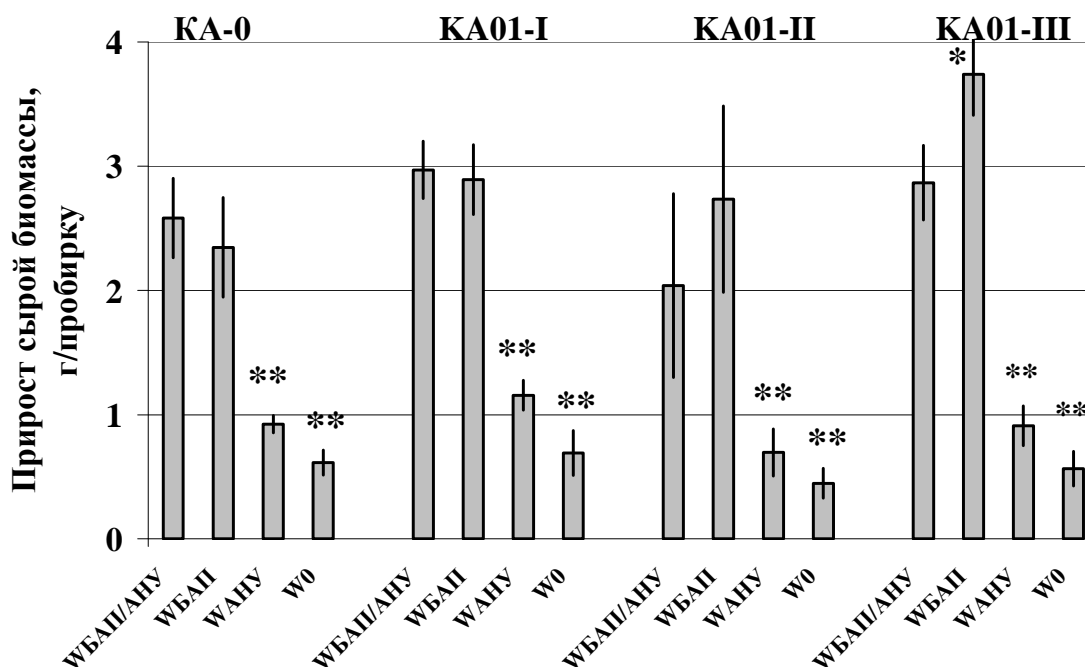
Проверка трансгенности полученных клеточных линий винограда. Трансгенность полученных линий была доказана по наличию вставки гена *nptII* с помощью праймеров 5'-GAG GCT ATT CGG СТА TGA CTG; 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA по условиям, описанным ранее [13]. Отсутствие сигнала после ПЦР на ген *virB2* служило доказательством того, что агробактерий не было в анализируемых пробах. ПЦР на ген *virB2* проводили с использованием праймеров 5'-AAT GCG CGT GAT ATC GAG CTG CG; 5'-ATA СТА CCG CCA GTG AGC GTT TGG.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы Statistica, версия 10.0. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка. Полученные

данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0,05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

Результаты и их обсуждение. Для изучения функций *PgCDPK2ds1* в растении были получены векторная культура клеток винограда КА-0, несущая только ген устойчивости к канамицину, и три клеточные линии клеток винограда (КА-01-I, КА-01-II и КА-01-III), экспрессирующие ген *PgCDPK2ds1*. Было показано, что культура клеток КА-0 и клеточные линии КА-01-I, КА-01-II и КА-01-III несут ген устойчивости к канамицину *nptII*, что свидетельствует о факте вставки генетической конструкции, содержащей ген *PgCDPK2ds1* в клетки винограда амурского. Кроме того, отсутствие сигнала на ген *virB2* говорит о том, что в образцах нет примеси клеток агробактерий, и полученный сигнал на *nptII* идет именно с ДНК винограда.

Трансгенные клеточные линии, сверхэкспрессирующие *PgCDPK2ds1*, имели светлый серо-зеленый цвет, в то время как векторная культура КА-0, сверхэкспрессирующая ген устойчивости к канамицину, имела желто-зеленую окраску, характерную для нетрансформированной культуры клеток винограда. Прирост сырой биомассы векторной и *PgCDPK2ds1*-трансгенных клеточных линий винограда был сходен: наблюдалось достоверное ингибирование при культивировании на питательных средах, содержащих только АНУ или не содержащих фитогормоны (рис.). Однако стоит отметить, что прирост сырой биомассы клеточной линии КА-01-III на средах, содержащих только БАП, был достоверно в 1,3 раза выше, чем при культивировании данной линии на средах, содержащих БАП и АНУ (рис.).



Прирост сырой биомассы культур клеток винограда КА-0, КА-01-I, КА-01-II и КА-01-III:
W_{БАП/АНУ} – прирост клеток винограда на питательных средах, содержащих фитогормоны БАП и АНУ;
W_{БАП} – с добавлением в питательные среды 0,5 мг/л БАП; *W_{АНУ}* – с добавлением 2 мг/л АНУ;
W₀ – питательные среды без фитогормонов. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ от значений в культуре клеток КА-0

Далее с помощью ВЭЖХ было определено содержание резвератрола во всех культурах клеток, используемых в работе: КА-0, КА-01-I, КА-01-II и КА-01-III. Содержание резвератрола во всех трех *PgCDPK2ds1*-трансгенных клеточных линиях было выше, чем в векторной культуре КА-0. Наивысшее содержание резвератрола было в клеточной линии КА-01-II: $0,052 \pm 0,005$ % от сухого веса ткани, что в 5,8 раза достоверно выше, чем в векторной культуре КА-0 (табл.). Содержание резвератрола в двух других *PgCDPK2ds1*-трансгенных культурах винограда КА-01-I и КА-01-III была в 1,2–1,8 раза выше, чем в векторной культуре КА-0 (см. табл.).

Содержание резвератрола в культуре клеток КА-0 и в клеточных линиях КА-01-I, КА-01-II и КА-01-III

Клеточная линия	Состав питательной среды			
	W _{БАП/АНУ}	W _{БАП}	W _{АНУ}	W ₀
КА-0	0,009 ±0,001	0,008 ±0,002	0,007 ±0,001	0,003 ±0,001
КА-01-I	0,016 ±0,002*	0,014 ±0,005	0,005 ±0,002	0,006 ±0,002
КА-01-II	0,052 ±0,005**	0,040 ±0,003*	0,023 ±0,010*	0,012 ±0,007
КА-01-III	0,011 ±0,002	0,022 ±0,009	0,007 ±0,001	0,003 ±0,001

Примечания: W_{БАП/АНУ} – содержание резвератрола в клетках винограда, культивируемых на питательных средах, содержащих фитогормоны БАП 0,5 мг/л и АНУ 2 мг/л; W_{БАП} – на средах с добавлением 0,5 мг/л БАП; W_{АНУ} – с добавлением 2 мг/л АНУ; W₀ – на питательных средах без фитогормонов, % от сух. веса. * P < 0,05, ** P < 0,01 от значений в культуре клеток КА-0.

Заключение. Ранее было показано, что увеличение экспрессии гена *PgCDPK2ds1* коррелировало с увеличением продукции гинзенозидов в клеточных культурах женьшеня [14]. Полученные в ходе нашей работы результаты свидетельствуют о том, что белковый продукт гена *PgCDPK2ds1* способен достоверно увеличивать биосинтез резвератрола (в 1,2–5,8 раза) в клеточных культурах винограда *V. amurensis*. Степень увеличения биосинтеза резвератрола при трансформацией геном *PgCDPK2ds1* клеток винограда была значительно ниже, чем при трансформацией генами *rol* из *Agrobacterium rhizogenes* [13, 17]. Таким образом, в работе впервые показана связь биосинтеза резвератрола с кальциевой сигнальной системой растений через экспрессию генов кальций-зависимых протеинкиназ.

Литература

1. Athar M., Back J., Tang X. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2007. – Vol. 224. – P. 274–283.
2. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol / Z. Li [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2002. – Vol. 23. – P. 1531–1536.
3. Kimura Y., Okuda H. Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice // *The Journal of Nutrition*. – 2001. – Vol. 131. – P. 1844–1849.
4. Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling / X. He [et al.] // *Cancer letters*. – 2011. – Vol. 301. – P. 168–176.
5. Resveratrol Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics in Human and Kras (G12D) Transgenic Mice by Inhibiting Pluripotency Maintaining Factors and Epithelial-Mesenchymal Transition / S. Shankar [et al.] // *Plos one*. – 2011. – Vol. 6. Article Number: e16530.
6. Chan M.M. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin // *Biochem Pharmacol*. – 2002. – Vol. 63. – P. 99–104.
7. Heredia A., Davis C., Redfield R. Synergistic inhibition of HIV-1 in activated and resting peripheral blood mononuclear cells, monocyte-derived macrophages, and selected drug-resistant isolates with nucleoside analogues combined with a natural product. Resveratrol // *J. Acq. Immune Def. Synd.* – 2000. – Vol. 25 – P. 246–255.
8. Effect of topically applied resveratrol on cutaneous herpes simplex virus infections in hairless mice / J.J. Docherty [et al.] // *Antiviral Res.* – 2004. – Vol. 61. – P. 19-26.
9. Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kin in BcPG1-elicited grapevine defenses // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2006. – Vol. 19. – P. 429–440.
10. Ramani S., Chelliah J. UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures // *BMC plant biology*. – 2007. – Vol. 7. – Article Number: 61. – DOI: 10.1186/1471-2229-7-61.
11. Кальций – зависимый механизм соматического эмбриогенеза в культурах клеток *Panax ginseng*, экспрессирующих онкоген *rolC* / К.В. Киселев [и др.] // *Молекулярная биология*. – 2008. – № 42. – С. 275–285.

12. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. CDPK gene expression in somatic embryos of *Panax ginseng* expressing rolC // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2009. – Vol. 99. – P. 141–149.
13. The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / K.V. Kiselev [et al.] // *Biotechnology J.* – 2007. – Vol. 128. – P. 681–692.
14. 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. – Vol. 82. – P. 647–655.
15. Bekesiova I., Nap J.P., Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* // *Plant molecular biology reporter.* – 1999. – Vol. 17. – P. 269–277.
16. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants / T. Tzfira [et al.] // *Plant molecular biology.* – 2005. – Vol. 57. – P. 503–516.
17. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in rolC transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* / A.S. Dubrovina [et al.] // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 727–736.



УДК 6 33.13 (571.51)

А.В. Бобровский, Л.П. Косяненко

ВЛИЯНИЕ КОЭФФИЦИЕНТОВ ВЫСЕВА НА СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В ЗЕРНЕ СОРТОВ ОВСА В ЛЕСОСТЕПИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ

В статье приведены результаты исследования влияния коэффициентов высева на содержание белка в зерне овса в лесостепи Красноярского края.

Результаты проведенных исследований показывают, что содержание белка в зерне овса определяется сортом и годом.

Ключевые слова: овес, семена, коэффициент высева, белок, лесостепь, Красноярский край.

A.V. Bobrovskiy, L.P. Kosyanenko

THE SOWING COEFFICIENT INFLUENCE ON THE OAT GRAIN PROTEIN CONTENT IN THE KRASNOYARSK KRAI FOREST – STEPPE

The research results of sowing coefficient influence on the oat grain protein content in the Krasnoyarsk Krai forest-steppe are given in the article.

The conducted research results show that the protein content in oat grain is determined by the sort and the year.

Key words: oat, seeds, sowing coefficient, protein, forest-steppe, Krasnoyarsk Krai.

Введение. Овес является одной из основных зерновых культур в Сибири и на Дальнем Востоке. Широкое распространение он получил благодаря ценным кормовым и пищевым качествам, стабильности урожая в сложных климатических условиях по сравнению с другими зерновыми культурами. Особую ценность представляет зерно овса. Оно служит незаменимым концентрированным кормом для лошадей, птицы, племенных животных. Переработанное зерно включают как обязательный компонент в комбикорма, предназначенные для молодняка [3]. Благодаря хорошей усвояемости белков и содержанию важнейших веществ, стимулирующих рост и повышающих жизненный тонус, зерно овса считают наиболее ценным из фуражных культур. По количеству белка овес занимает 3-е место после пшеницы и озимой ржи. Белок находится во всех частях зерновки. В среднем его содержание колеблется от 9 до 14 %, у отдельных сортов достигает 20 % [2], [4]. Однако содержание белка может колебаться в зависимости от места выращивания культуры. Для овса были получены данные, подтверждающие общую закономерность – чем суше условия пункта возделывания, тем больше белка накапливается в зерне [7]. Больше белка накапливают скороспелые сорта овса в сравнении со среднеспелыми [5].

Белок овса сбалансирован по аминокислотному составу и на 95–96% усваивается организмом. Употребление 100 г овсяных хлопьев практически покрывает дневную потребность человека в 7 из 10 незаменимых аминокислотах. В сравнении с эталоном (куриным яйцом) биологическая ценность овса равна 70, риса