

УДК 581.1

О.А. Шумакова, А.С. Дубровина, К.В. Киселев

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ Ca^{2+} -КАНАЛОВ (ВЕРАПАМИЛ) НА БИОСИНТЕЗ РЕЗВЕРАТРОЛА И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ CDPK В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВИНОГРАДА АМУРСКОГО *VITIS AMURENSIS RUPR**

В данной работе был показан эффект блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов верапамила (VER) на продукцию резвератрола и экспрессию генов кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK) в культуре клеток *Vitis amurensis Rupr.* При добавлении в питательные среды 0.75 мМ VER наблюдается достоверное снижение продукции резвератрола и увеличение экспрессии дополнительных форм CDPK в клетках винограда с повышенным содержанием резвератрола. Полученные результаты свидетельствуют о том, что CDPK участвуют в регуляции биосинтеза резвератрола в клетках винограда.

Ключевые слова: кальций-зависимые протеинкиназы, резвератрол, верапамил, культура клеток, виноград амурский (*Vitis amurensis Rupr.*).

О.А. Shumakova, A.S. Dubrovina, K.V.Kiselev

THE INFLUENCE OF VOLTAGE-DEPENDENT Ca^{2+} -CHANNEL BLOCKER (VERAPAMIL) ON THE BIOSYNTHESIS OF RESVERATROL AND EXPRESSION CDPK GENES IN THE AMUR GRAPE (*VITIS AMURENSIS RUPR.*) CELL CULTURES

The effect of voltage-dependent Ca^{2+} -channels blocker - verapamil (VER) - on the resveratrol production and the expression of calcium-dependent protein kinases (CDPK) genes in cell culture of Amur grape (*Vitis amurensis Rupr.*) is shown in the article. Treatment with the VER at a 0.75 mM concentration significantly decreased production of resveratrol and increased expression of additional forms of CDPK genes in grape cell culture with enhanced resveratrol accumulation. The received results prove that CDPK take part in the resveratrol biosynthesis regulation in the grape cells.

Key words: calcium-dependent protein kinases, resveratrol, verapamil, cell culture, Amur grape (*Vitis amurensis Rupr.*).

Введение. В настоящее время одним из перспективных и активно развивающихся направлений в биотехнологии является поиск альтернативных источников получения биологически активных веществ (БАВ). Большинство из этих веществ обладают ценными фармакологическими свойствами и поэтому являются важнейшими компонентами различных лекарственных препаратов.

Виноград содержит ряд БАВ, которые благоприятно воздействуют на организм человека. Среди таких веществ самое известное – это резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен). Резвератрол обладает антиопухольевой активностью, кардиопротективными, нейропротективными и гепатопротекторными свойствами [1–4]. Также этот стильбен является мощным активатором сиртуинов – белков, участвующих в процессах программированной клеточной гибели и дифференцировки [5]. Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких как тутовое дерево, арахис, клюква и голубика, но наибольшее его содержание характерно для винограда, в том числе и дикого винограда амурский *Vitis amurensis Rupr.*

Рынок получения и сбыта резвератрола находится в стадии формирования. Резвератрол получают из выращиваемых растений горца птичьего *Polygonum cuspidatum*, что является длительным и затратным процессом, поскольку необходимо вырастить взрослое растение, содержание резвератрола в котором не превышает десятых долей процента от сухой массы клеток. Это объясняет довольно высокую цену резвератро-

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

ла. Клеточные культуры имеют определенные преимущества перед традиционным растительным сырьем, так как продукт можно получать независимо от ареала распространения растения, сезона, погоды и почвенных условий. Если к тому же учесть быстрое истощение естественных сырьевых ресурсов, то преимущества использования клеточных технологий становятся очевидными. Однако содержание БАВ в клеточных культурах растений обычно ниже необходимого для использования этих культур в промышленном производстве фармакологически активных веществ, поэтому необходимо увеличить биосинтез БАВ с помощью методов биотехнологии. Для создания организмов, активно продуцирующих резвератрол, необходимо изучить молекулярные механизмы регуляции биосинтеза этого стильбена в клетках растений.

В настоящее время регуляторы биосинтеза стильбенов полностью не изучены, но показано, что несколько вторичных мессенджеров, особенно Ca^{2+} , активно вовлечены в регуляцию биосинтеза стильбенов [6–7]. К группе регуляторных белков растений, связывающих Ca^{2+} , относятся Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPK) [8]. Показано, что увеличение накопления фитоалексинов коррелирует с повышением активности CDPK [9].

Цель исследования. Проанализировать взаимосвязь изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$, биосинтеза резвератрола и экспрессии генов CDPK. Для этого мы исследовали влияние верапамила (VER) - ингибитора Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны L-типа на рост, биосинтез резвератрола и экспрессию генов CDPK в культурах клеток винограда с низким, средним и высоким содержанием этого стильбена.

Материалы и методы исследований

Растительный материал и клеточные культуры. В работе мы использовали культуры клеток *V. amurensis* с разным содержанием резвератрола: от низкого (0.003% от сухой массы клеток) в контрольной культуре клеток V2 до относительно высокого (до 0.3 % от сухой массы клеток) в *rolB*-трансгенных культурах. Контрольная культура клеток V2 была получена из стебля *V. amurensis*, *rolB*-трансгенные культуры клеток VB1 и VB2, полученные в результате обработки культуры V2 *Agrobacterium tumefaciens*, в состав T-ДНК которых входили маркерный ген *nptII* и ген *rolB*. [10].

Компоненты питательных сред. Для проведения экспериментов использовали агаризованную питательную среду $W_{в/а}$ [11] с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, которую разливали в пробирки 200*20 мм по 15 мл. Интервал субкультивирования составлял 30–35 дней в темноте при $24 \pm 1^\circ C$.

Обработка блокатором потенциал-зависимых мембранных Ca^{2+} -каналов. Верапамил (ICN Pharmaceuticals) растворяли в дистиллированной воде и добавляли в культуральные среды до измерения pH среды (исходный раствор 100 мг/мл). Рабочая концентрация 0,75 мМ. Эта концентрация была использована, потому что она была наиболее подходящей для ингибирования биосинтеза резвератрола в клетках винограда из ранее полученных результатов [12].

Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК (кДНК). Тотальная РНК экстрагировалась из клеточных культур на 35-е сутки культивирования по методике с LiCl [13], которая оптимизирована для работы с тканями растений, богатыми вторичными метаболитами. кДНК получали, используя 1–3 мкг тотальной РНК (предварительно обработав ДНКазой, Fermentas, Вильнюс, Литва), с помощью набора для обратной транскрипции (Силекс М, Москва, Россия). Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1х 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 часов.

Количественная и качественная оценка экспрессии генов CDPK. Большое количество генов CDPK и отсутствие информации о последовательности генов CDPK для *V. amurensis* не дало возможности применить в первую очередь такие стандартные молекулярно-биологические методы, как ПЦР с использованием специфических праймеров и ПЦР в реальном времени, поэтому мы анализировали экспрессию генов CDPK с помощью вырожденных праймеров и секвенирования полученных клонов [14]. Преимущество данного подхода заключается в том, что изучается экспрессия всего мультигенного семейства, поэтому можно определить долю экспрессии каждого гена в суммарной экспрессии генов семейства. Кроме того, есть возможность описать экспрессию новых генов, неизвестных ранее.

ПЦР генов *CDPK* проводили с вырожденными праймерами, разработанными на основе сравнения аминокислотных последовательностей генов *CDPK* разных подсемейств из разных видов растений (AF363784, AF072908, AB236787, D87707, AF418563, AF090835, AY312268, X96723, NM_106132, NM_101746, AY138479, AC097277, AY394009, U20626, AJ344154, AV042550, D84408, AY704444, AV051809, AV051808, AY247754, AY072802, U90262, U08140). Прямой праймер 5'- GGWGGWGARYTYTTYGA и обратный праймер 5'- TCDGCCCARAADGGDGG фланкируют продукт 362 п.н., $T_a = 54^\circ\text{C}$, время элонгации 22с. Полученные ампликоны *CDPK* были выделены из геля при помощи набора Glass Milk (Силекс, Москва) и клонированы в вектор pTZ57R/T согласно протоколу фирмы-производителя (Fermentas, Вильнюс, Литва).

Секвенирование ДНК. Клонированные ПЦР продукты *CDPK* были получены с использованием универсальных M13 праймеров и секвенированы с использованием Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perking-Elmer Biosystems, Остин, США), следуя протоколу и рекомендациям изготовителя. После очистки этанолом последовательности были идентифицированы на ABI 3130 Genetic Analyser (Perking-Elmer Biosystems).

Полученные нуклеотидные последовательности генов *CDPK V. amurensis* сравнивали с известными последовательностями этих генов из других организмов в программе NCBI BLAST. Номера секвенированных фрагментов *CDPK*, депонированных в ГенБанк: *VaCDPK1a* (EU305622), *VaCDPK1as* (EU643699), *VaCDPK1b* (EU643694), *VaCDPK1c* (EU643695), *VaCDPK1d* (EU305623), *VaCDPK1e* (EU643696), *VaCDPK2a* (EU309795), *VaCDPK3a* (EU309796), *VaCDPK3as* (EU643697), *VaCDPK3b* (EU643693), *VaCDPK3c* (KC488322), *VaCDPK3d* (KC488323), *VaCDPK1-L1-a* (EU327878).

Экспрессию отдельных генов *CDPK* оценивали количественно, основываясь на данных секвенирования о количестве клонов каждого транскрипта в исследуемых пробах и данных о суммарной экспрессии генов, полученных с помощью вырожденных праймеров. Относительные единицы рассчитывали по формуле: нормализованная к экспрессии гена актина *V. amurensis* суммарная экспрессия генов *CDPK* × % клонов каждого гена /100 [14].

Определение содержания стильбенов в образцах ткани *V. amurensis*. Определение качественного и количественного содержания стильбенов производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как описано ранее [15]. Количество резвератрола определяли путем сравнения со стандартом резвератрола (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США).

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. Мы предположили, что Ca^{2+} -сигнальная система вовлечена в регуляцию биосинтеза резвератрола. Поскольку ранее было показано, что увеличение накопления фитоалексинов коррелирует с повышением активности *CDPK* [9], мы решили проанализировать влияние изменения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ в клетке на биосинтез резвератрола и экспрессию генов *CDPK* в культуре клеток винограда амурского. Для этого мы культивировали каллусные культуры клеток *V. amurensis* с разным содержанием резвератрола на питательных средах с добавлением 0,75 мМ блокатора потенциал-зависимых мембранных Ca^{2+} -каналов (VER).

Нами было показано, что при добавлении в питательные среды 0,75 мМ VER наблюдается тенденция на снижение прироста сырой биомассы в культуре клеток V2 в 1,3 раза (табл.). Прирост *rolB*-трансгенных культур клеток винограда достоверно не изменялся при добавлении ингибитора Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны (табл.). Таким образом, рост *rolB*-трансгенных культур клеток винограда менее чувствителен к ингибитору Ca^{2+} -каналов по сравнению с контрольной культурой клеток.

Далее с помощью ВЭЖХ было определено содержание резвератрола во всех культурах клеток, обработанных VER (табл.). Достоверное уменьшение содержания резвератрола в 5.3 и 10.6 раз было в *rolB*-трансгенных каллусных культурах VB1 и VB2, растущих на питательных средах с добавлением 0.75 мМ VER. Мы предполагаем, что незначительное изменение содержания резвератрола в контрольной культуре клеток винограда амурского V2 при добавлении VER связано с тем, что в норме в культуре клеток V2 низкое содержание резвератрола. Поэтому продукция резвератрола в контрольной культуре клеток V2 при добавлении ингибитора Ca^{2+} -каналов достоверно не изменялась, а продукция резвератрола в *rolB*-трансгенных каллусных культурах клеток VB1 и VB2 достоверно ингибировалась в 5.3 и 9.8 раз, соответственно. Уменьшение продукции резвератрола при добавлении VER может свидетельствовать о том, что Ca^{2+} -сигнальная система

участвует в регуляции биосинтеза этого ценного стильбена. Чтобы подтвердить это предположение, мы решили проанализировать экспрессию генов *CDPK*, которые кодируют основные белки, связывающие ионы Ca^{2+} в растительной клетке.

Прирост сырой и сухой биомассы, содержание и продукция резвератрола клеточными культурами *V. amurensis*, обработанными 0.75 мМ VER

Культура	Сырая биомасса, г/л	Сухая биомасса, г/л	Резвератрол, % от сух. веса	Продукция резвератрола культурами, мг/л
V2	170.1 ±10.7	6.9 ±0.9	0.004 ±0.002	0.28 ±0.14
V2+VER	134.7 ±3.4	5.1 ±1.1	0.006 ±0.001	0.32 ±0.05
VB1	163.4 ±30.1	7.9 ±0.8	0.037 ±0.022*	2.95 ±1.74*
VB1+VER	158.8 ±29.4	8.0 ±1.2	0.007 ±0.001	0.56 ±0.08
VB2	40.7 ±10.7	4.5 ±0.5	0.243 ±0.038**	10.95 ±1.71*
VB2+VER	51.4 ±31.4	4.8 ±0.6	0.023 ±0.009	1.12 ±0.43

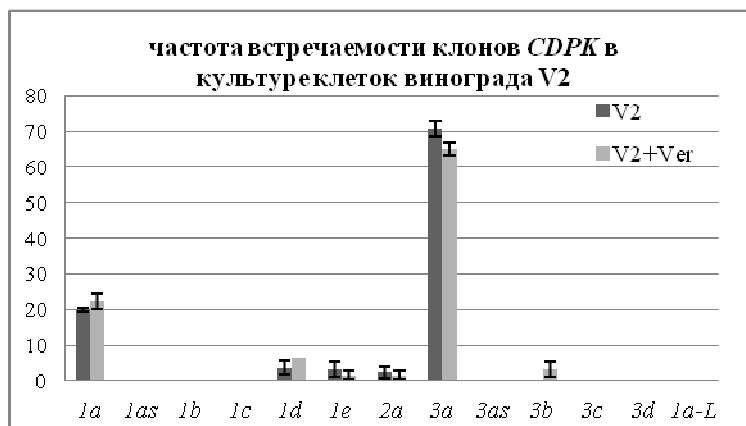
Для того чтобы проанализировать экспрессию генов *CDPK* в клеточных культурах *V. amurensis*, мы выполнили дизайн вырожденных праймеров к участку киназного домена *CDPK* (V, VI, VII, VIII и IX каталитические субдомены) на основе 24 известных последовательностей *CDPK* из разных растений. Известно, что сравнения аминокислотных последовательностей киназного домена генов *CDPK* достаточно для того, чтобы идентифицировать подсемейства генов *CDPK A. thaliana* [16]. Используя вырожденные праймеры методом ПЦР на кДНК из культур V2, VB1, VB2 и из каллусных клеток винограда, культивируемых на питательных средах с VER, мы получили ампликоны *CDPK* ожидаемого размера. В *rolB*-трансгенных культурах винограда VB1 и VB2 общая экспрессия генов *CDPK* была выше, чем в контрольной, однако в пределах доверительного интервала (рис.1). При обработке VER наблюдалась тенденция на снижение тотальной экспрессии *CDPK* во всех использованных в исследовании культурах клеток винограда амурского (рис.1). Ампликоны *CDPK* клонировали и секвенировали. Проанализировано 184, 111 и 234 клонов для V2, VB1 и VB2 культур клеток соответственно.



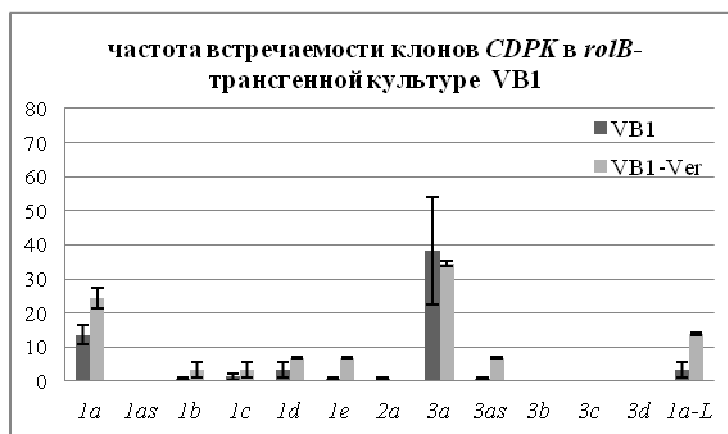
Рис. 1. Оценка суммарной экспрессии генов *CDPK* в культурах *V. amurensis*: V2 – векторная культура; VB1 и VB2 – *rolB*-экспрессирующие культуры

При анализе выведенных аминокислотных последовательностей генов *CDPK V. amurensis* в программе BioEdit *CDPK* разделились на три подсемейства, которые получили названия: *VaCDPK1*, *VaCDPK2* и *VaCDPK3*. Каждое подсемейство представлено несколькими транскриптами (выделено 13 отдельных транс-

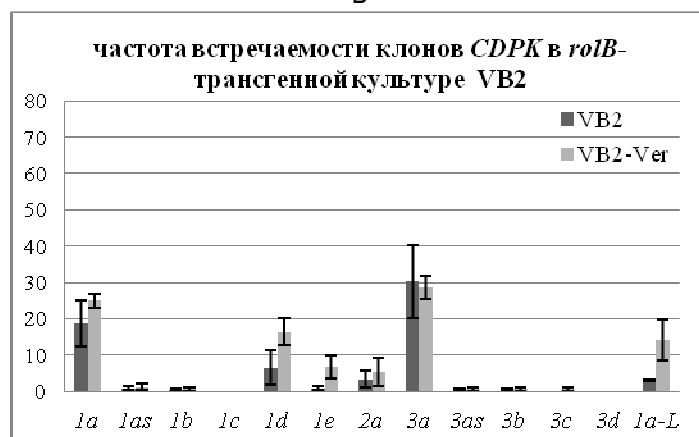
криптов). Нами показано, что в контрольной культуре клеток V2 в норме экспрессируется пять форм генов CDPK: CDPK1a, CDPK1d, CDPK1e, CDPK2a и CDPK3a (рис. 2,А). При добавлении блокатора потенциал-зависимых мембранных Ca²⁺-каналов экспрессия генов CDPK оставалась в пределах доверительного интервала, наблюдалась лишь тенденция на уменьшение экспрессии CDPK1e, CDPK2a, CDPK3a. Стоит отметить, что при обработке культуры клеток V2 VER появлялась экспрессия гена CDPK3b (рис. 2,А).



А



Б



В

Рис. 2. Число клонов (процентное содержание) различных транскриптов CDPK, полученных из кДНК культур клеток *V. vitifera* в норме и растущих на питательных средах с добавлением 0.75 мМ VER: А – контрольной культуры клеток V2; Б - rolB-трансгенной культуры клеток VB1; В - rolB-трансгенной культуры клеток VB2

Анализ частоты встречаемости клонов каждого транскрипта *CDPK* в VB1 культуре клеток винограда амурского со средним содержанием резвератрола показал, что в норме в *rolB*-трансгенной культуре экспрессируются те же формы, что и в контрольной культуре V2 (рис. 2,Б). Частота встречаемости клонов *CDPK1a*, *CDPK1e*, *CDPK2a* и *CDPK3a* в VB1 культуре была в среднем в 2 раза ниже по сравнению с частотой встречаемости транскриптов этих генов в культуре клеток винограда V2, но стоит отметить, что процентное содержание клонов гена *CDPK1d* достоверно не изменялось. Помимо экспрессирующихся транскриптов в культуре клеток со средним меньшим содержанием резвератрола в VB1 культуре клеток появлялись клоны следующих форм *CDPK*: *CDPK1b*, *CDPK1c*, *CDPK3as* и *CDPK1a-L*. При добавлении VER в питательные среды культуры клеток VB1 экспрессия генов *CDPK1b*, *CDPK1c*, и *CDPK3a* значительно не изменялась. Экспрессия генов *CDPK1a*, *CDPK1d*, *CDPK1e*, *CDPK3as* и *CDPK1a-L* достоверно увеличивалась при культивировании клеток винограда на питательной среде с добавлением VER (рис.2,Б).

В *rolB*-трансгенной культуре с наивысшим содержанием резвератрола VB2 в норме и в культуре VB2, которая культивировалась на питательной среде с добавлением 0,75 мМ VER, экспрессировалось 10 транскриптов *CDPK* из 13 известных (кроме *CDPK1c*, *CDPK3c* и *CDPK3d*). Экспрессия одиннадцатой формы – *CDPK3c*, появлялась в культуре клеток VB2, растущей на среде с добавлением ингибитора Ca²⁺-каналов плазматической мембраны (рис.2,В). Если сравнить частоту встречаемости экспрессирующихся клонов *CDPK* в контрольной культуре V2 с экспрессией *CDPK* VB2 культуры клеток винограда, то можно отметить, что процентное содержание всех присутствующих в V2 культуре клеток форм *CDPK*, за исключением *CDPK1a* и *CDPK3a*, значительно не изменялось в VB2 культуре клеток. Процентное содержание транскриптов *CDPK1a* и *CDPK3a* от общей экспрессии *CDPK* достоверно снижалось в 2 раза. Добавление VER в питательные среды культуры клеток винограда VB2 с высоким уровнем содержания резвератрола практически не изменяло процентное содержание транскриптов *CDPK*. Экспрессия генов *CDPK1d*, *CDPK1e* и *CDPK1a-L* достоверно увеличивалась при культивировании клеток винограда на питательных средах, содержащих VER. Частота встречаемости остальных транскриптов была в пределах ошибки эксперимента.

Таким образом, можно отметить, что в культурах клеток винограда со средним и высоким содержанием резвератрола экспрессируются дополнительные формы генов *CDPK*. Так, в норме в контрольной культуре клеток V2 встречается только пять форм клонов *CDPK*, в то время как в VB1 и VB2 культурах экспрессируется 9 и 10 форм соответственно. Постоянная экспрессия *CDPK1a*, *CDPK1d*, *CDPK1e*, *CDPK2a* и *CDPK3a* во всех трех культурах с разным содержанием резвератрола при уменьшении [Ca²⁺]_{цит} посредством добавления в питательные среды VER может свидетельствовать о том, что данные белки вовлечены в такие биохимические процессы, без которых существование клетки невозможно, так как клетка в первую очередь отдает недостающий Ca²⁺ именно этим формам *CDPK*. В случае снижения частоты встречаемости транскриптов *CDPK1a* и *CDPK3a* в VB2 трансгенной культуре можно предположить, что они вовлечены в процессы клеточного роста, так как прирост сырой биомассы VB2 в 4,2 раза ниже, чем в контрольной культуре клеток. Появление клонов в культурах клеток винограда с повышенным содержанием резвератрола или увеличение частоты встречаемости клонов при культивировании культур клеток винограда VB1 и VB2 на средах, содержащих VER транскриптов *CDPK1b*, *CDPK1c*, *CDPK1d*, *CDPK1e*, *CDPK3as* и *CDPK1a-L*, может свидетельствовать о том, что они вовлечены в регуляцию биосинтеза резвератрола. Вероятно, в растительной клетке при недостаточной [Ca²⁺]_{цит} включается программа по восполнению функции данных протеинкиназ, которая осуществляется посредством увеличения экспрессии *CDPK1b*, *CDPK1c*, *CDPK1d*, *CDPK1e*, *CDPK3as* и *CDPK1a-L*. А так как *CDPK* не могут осуществлять фосфорилирование субстрата без ионов Ca²⁺, даже при увеличении числа этих форм белков, прерывается каскад биохимических реакций, связанный с биосинтезом резвератрола, что ведет к снижению аккумуляции резвератрола в растительной клетке.

Заключение. Полученные в ходе нашей работы результаты свидетельствуют о том, что в культурах клеток винограда VB1 и VB2 с повышенным содержанием резвератрола появляется экспрессия дополнительных форм *CDPK*: *CDPK1b*, *CDPK1c*, *CDPK1d*, *CDPK1e*, *CDPK3as* и *CDPK1a-L*, что может свидетельствовать о том, что именно эти формы вовлечены в регуляцию биосинтеза резвератрола в клетках винограда амурского. Уменьшение содержания и продукции резвератрола на средах с блокатором потенциал-зависимых Ca²⁺ - каналов подтверждает вышеизложенное предположение. Таким образом, в нашей работе показана связь биосинтеза резвератрола с кальциевой сигнальной системой растений через экспрессию генов кальций-зависимых протеинкиназ.

Литература

1. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells / *N. Kawada* [et al.] // *Hepatology*. – 1998. – Vol. 27. – P. 1265–1274.
2. 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.
3. Reduction of blood cholesterol and ischemic injury in the hypercholesteremic rabbits with modified resveratrol, logevinex / *B. Juhaz* [et al.] // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2011. – Vol. 348. – P. 199–203.
4. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury / *C. Liu* [et al.] // *Brain research*. – 2011. – Vol. 1374. – P. 100–109.
5. *Denu J.* Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases // *Trends Biochem.* – 2003. – Vol. 28. – P. 41–48.
6. *Aziz M., Kumar R., Ahmad N.* Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms // *Int. J. Oncol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 17–28.
7. *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(4). – P. 429–440.
8. *Roberts D., Harmon A.* Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 43. – P. 375–414.
9. *Ramani S., Chelliah J.* UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures // *BMC Plant Biol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 61.
10. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells / *K. Kiselev* [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 128. – P. 681–692.
11. *Kiselev K., Dubrovina A., Bulgakov V.* 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.
12. Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in *CDPK* gene expression / *A. Dubrovina* [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 166. – P. 1194–1206.
13. *Bekesiova I., Nap J., Mlynarova L.* Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1999. – Vol. 17. – P. 269–277.
14. 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.
15. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol / *Z. Li* [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2002. – Vol. 23. – P. 1531–1536.
16. The CDPK superfamily of protein kinases / *A. Harmon* [et al.] // *New Phytol.* – 2001. – Vol. 151. – P. 175–183.

