

Научная статья
УДК 577.21:57.045
DOI: 10.37102/0869-7698_2022_225_05_2

Устойчивость к холодовому стрессу растений *Nicotiana tabacum*, трансформированных геном *AtCPK1 Arabidopsis thaliana*

Г.Н. Веремейчик✉, О.А. Тихонова

Галина Николаевна Веремейчик
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия
gala-vera@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0549-2801>

Ольга Андреевна Тихонова
студент
Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия
olga.tikhonova.kam@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6794-7085>

Аннотация. Исследован эффект избыточной экспрессии одного из важнейших сенсоров кальция – кальций-зависимой протеинкиназы (CDPK) на устойчивость к холодовому стрессу растений *Nicotiana tabacum* L. В работе использован ген *AtCPK1* арабидопсиса – одной из наиболее изученных изоформ растительных CDPK. Помимо нативной формы гена *AtCPK1* использованы полученные ранее мутантные формы: неактивная (изоформа Na, мутация КJM4) и постоянно-активная кальций-независимая (изоформа Ci, мутация КJM23). Данными формами гена методом агробактериальной трансформации были трансформированы растения табака. Нами показано, что экспрессия нативной формы гена приводит к значительному увеличению устойчивости трансгенных растений как к длительному воздействию холода, так и к воздействию холода при прорастивании семян по сравнению с контрольными растениями. Мутация КJM23 усиливает этот эффект, мутация КJM4 полностью его нивелирует.

Ключевые слова: кальций-зависимая протеинкиназа, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, абиотический стресс, холодовой стресс, *AtCPK1*

Для цитирования: Веремейчик Г.Н., Тихонова О.А. Устойчивость к холодовому стрессу растений *Nicotiana tabacum*, трансформированных геном *AtCPK1 Arabidopsis thaliana* // Вестн. ДВО РАН. 2022. № 5. С. 17–24. http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_2.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководителю лаборатории биоинженерии члену-корреспонденту РАН, доктору биологических наук В.П. Булгакову за поддержку и наставничество.

Финансирование. Грант РФФ, № 20-16-00016 (Булгаков В.П.).

© Веремейчик Г.Н., Тихонова О.А., 2022

Cold stress tolerance of *Nicotiana tabacum* plants transformed with the *AtCPK1* gene of *Arabidopsis thaliana*

G.N. Veremeichik, O.A. Tikhonova

Galina N. Veremeichik

Candidate of Sciences in Biology, senior researcher
Federal Scientific Center of the East Asia
Terrestrial Biodiversity, FEB RAS, Vladivostok, Russia
gala-vera@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0549-2801>

Olga A. Tikhonova

Student
Far-East State University, Vladivostok, Russia
olga.tikhonova.kam@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6794-7085>

Abstract. We studied the effect of an over expression of one of the important calcium sensors, calcium-dependent protein kinase (CDPK), on cold stress tolerance in *Nicotiana tabacum* L. plants. In this work, we used *AtCPK1* gene of *Arabidopsis thaliana* – one of the most studied isoform of CDPK plant. In addition to the native form of the *AtCPK1* gene, its mutant forms, inactive (Na isoform, KJM4 mutation) and regularly active, independent of the presence of calcium ions (Ci isoform, KJM23 mutation), were used. Those gene forms transformed tobacco plants by agrobacterial transformation method. We have shown that the expression of the native form of the gene leads to a significant increase in resistance of the transgene plants both to prolonged exposure of cold and to exposure of cold during germination of seeds as compared to the control plants has been greatly increased. A mutation of KJM23, increases this effect, a mutation of KJM4 completely eliminates this effect.

Keywords: calcium-dependent protein kinase, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, abiotic stress, cold stress, *AtCPK1*

For citation: Veremeichik G.N., Tikhonova O.A. Cold stress tolerance of *Nicotiana tabacum* plants transformed with the *AtCPK1* gene of *Arabidopsis thaliana*. *Vestnik of the FEB RAS*. 2022;(5):17–24. (In Russ.). http://dx.doi.org/10.37102/0869-7698_2022_225_05_2.

Acknowledgments. The authors are grateful to the Head of the Laboratory of Bioengineering, RAS corresponding member, Doctor of Biological Sciences V.P. Bulgakov for support and mentorship.

Funding. Financial support was provided by the Russian Science Foundation, RSF grant No. 20-16-00016 (V.P. Bulgakov).

Введение

Повышение устойчивости растений к холоду – важное направление в селекции и генетической инженерии растений. В растениеводстве для повышения холодоустойчивости растений применяют прививание теплолюбивых растений на более холодоустойчивые, внесение калийных удобрений в почву при заморозках, а также процедуру закаливания растений, когда проросшие семена перед посевом

выдерживают при чередующихся через 12 ч низких (1–5 °С) и более высоких (10–20 °С) температурах.

Основным инструментом генетической инженерии растений является трансформация каким-либо геном, экспрессия которого улучшает свойства растения. Одним из примеров таких регуляторных элементов являются гены кальций-зависимых протеинкиназ (CDPK). Изменение токов ионов кальция в растительной клетке является одним из основных сигналов стрессового внешнего воздействия. Увеличение внутриклеточной концентрации кальция приводит к инактивации аутоингибиторного домена CDPK, что обеспечивает фосфорилирующую способность фермента [1]. За счет фосфорилирования CDPK активирует активность других ферментов, запуская реакцию на негативное внешнее воздействие. Таким образом, CDPK передают сигнал о внешнем воздействии с помощью фосфорилирования белковых мишеней, например, мембранных каналов, НАДФН-оксидаз, транскрипционных факторов. Эти ферменты вовлечены в регуляцию защитного ответа растений на биотический и абиотический стресс, вызванный действием окружающей среды [2, 3].

В настоящей работе использовался ген протеинкиназы *Arabidopsis thaliana AtCPK1*. Данный фермент локализуется в масляных тельцах и пероксисомах и играет потенциальную роль в регуляции пероксисомных функций, таких как метаболизм липидов и окислительный стресс [4]. Являясь регулятором врожденной иммунной системы у арабидопсиса, *AtCPK1* участвует в зависимом от салициловой кислоты сигнальном пути и модулирует экспрессию генов защиты и устойчивости к болезням [5]. Клетки *Rubia cordifolia* и *Vitis amurensis*, модифицированные *AtCPK1*, имели повышенную продукцию вторичных метаболитов, таких как резвератрол или антрахиноны [6, 7].

Ранее были получены [8] мутантные формы *AtCPK1*, которые в данной работе использовались для изучения роли *AtCPK1* в устойчивости растений к холоду. Помимо нативной формы гена *AtCPK1* (Ак, от англ. «*Arabidopsis kinase*»), растения были трансформированы неактивной формой (мутация КJM4, изоформа Na, от англ. «*Notactive*») и независимой от присутствия ионов кальция постоянно активной формой (мутация КJM23, изоформа Ci, от англ. «*Calcium independent*»). Ранее мы показали, что экспрессия нативной изоформы Ак в растениях *Nicotiana tabacum* L. приводит к значительному повышению устойчивости к солевому стрессу как при прорастании семян, так и при длительном выращивании трансгенных растений-микрорклонов [9]. При этом экспрессия мутантной формы Ci усиливает устойчивость, в то время как растения, трансформированные формой Na, не отличаются от контрольных по уровню устойчивости к солевому стрессу.

Материалы и методы

В работе использовались 4 линии растений табака *N. tabacum*: Nt – не-трансгенная линия; Na – растения табака, трансформированные неактивной мутантной формой (мутация КJM4, изоформа Na, *Notactive*); Ак – трансформированные нативной формой гена *AtCPK1*; Ci – трансформированные независимой от присутствия ионов кальция постоянно активной мутантной формой (мутация КJM23, изоформа Ci, *Calcium independent*). Растения выращивали методом микрореклонального размножения *in vitro* на среде MS/2, а также использовали гомозиготные семена контрольного и трансгенных растений 3-го поколения.

Повышение устойчивости растений к холоду при трансформации геном *AtCPK1* арабидопсиса оценивалось двумя методами. При исследовании первым методом двухнедельные растения-микрклоны, выращенные *in vitro* на среде MS/2, подвергались действию холодового стресса в климатостате в течение 30 дней при следующих параметрах культивирования: фотопериод 16/8 ч, освещенность днем 3000–5000 люкс, температура 12 °С, влажность 70 %. Контрольные растения росли в идентичных условиях, но при температуре 24 °С. После 30 дней пребывания в климатической камере растения фотографировали и взвешивали для оценки прироста биомассы. При оценке вторым методом семена табака проращивали в течение 10 дней на влажной фильтровальной бумаге в 24-луночных планшетах (Corning) при холодовом стрессе (12 °С) и комфортной температуре (24 °С) в климатостате (КС-200, Россия) со следующими параметрами: фотопериод 16/8 ч, освещенность днем 3000–5000 люкс, влажность 70 %. Оценивали процент проросших семян от их общего количества и длину проростков.

Эксперименты повторяли три раза, в каждом из них использовали 20 биологических повторностей. Полученные данные были обработаны в программе Statistica 10.0 (StatSoftInc., США) и представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего; межгрупповой анализ проводили в ANOVA, при $P < 0,05$ различия считали достоверными.

Результаты и обсуждение

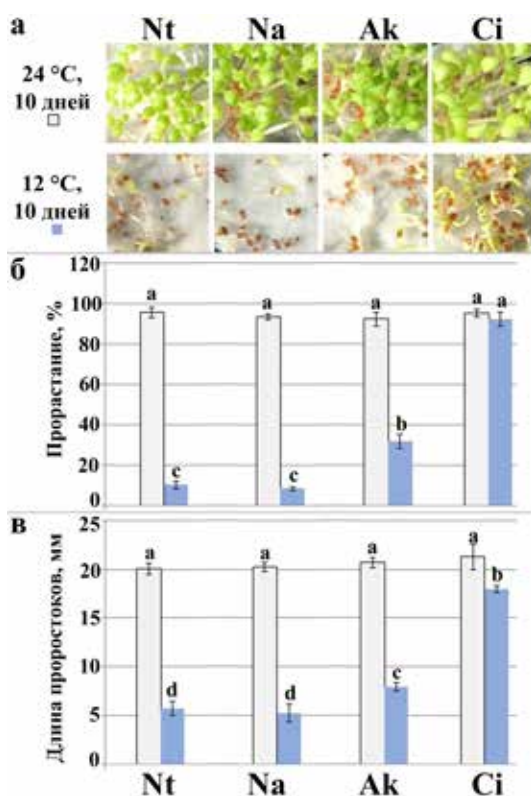
Целью работы было исследование влияния избыточной экспрессии гена *AtCPK1* на устойчивость к холодовому стрессу трансгенных растений и семян *N. tabacum*, а также выявление эффекта мутаций в аутоингибиторном домене *AtCPK1* неактивной (Na) и постоянно активной (Ci) изоформ гена в сравнении с диким типом (Ak).

Влияние холодового стресса на проращивание семян табака

Устойчивость табака к холодовому стрессу при исследовании данным методом выражалась в проращивании наибольшего числа семян при температуре 12 °С, они сравнивались с контрольными семенами, проращиваемыми при 24 °С. На рис. 1 можно видеть разницу между семенами, проращиваемыми в холодовом стрессе или при комфортной температуре. Под действием холодового стресса не изменилось проращивание только у семян, трансформированных изоформой Ci; у не-трансгенных и трансформированных изоформой Na семян значительно снизилось количество проросших, а для семян табака с нативной формой гена отмечается их снижение примерно наполовину. Также визуально можно заметить уменьшение длины проростков в сравнении с семенами, проращиваемыми при температуре 24 °С. На рис. 1, б показано влияние холода на процент проращивания семян. При температуре 24 °С разницы между контрольными и модифицированными различными изоформами гена *AtCPK1* растениями табака не обнаружено. Под действием холодового стресса процент проросших семян снижается на 90 % для линий Nt и Na, на 60 % – для линии Ak, в то время как для линии Ci снижения не наблюдается.

Также было выполнено измерение и сравнение длин проростков семян табака при проращивании в контрольных условиях и холодовом стрессе (рис. 1, в).

Рис. 1. Влияние холодого стресса (12 °С в течение 10 дней) на прорастание семян контрольной и трансгенных линий табака: *a* – репрезентативный вид; *б* – влияние холода на процент прорастания семян; *в* – влияние холода на длину проростков. Nt – семена контрольной нетрансгенной линии *N. tabacum*; Na – семена трансгенной линии, трансформированной мутантной неактивной формой *AtCPK1*; Ak – семена трансгенной линии, трансформированной нативной формой гена *AtCPK1*; Ci – семена трансгенной линии, трансформированной мутантной постоянно-активной формой гена *AtCPK1*. Эксперимент повторен 3 раза, данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего; буквы над планками погрешностей обозначают статистически достоверную разницу ($P < 0,05$, LSD Фишера)



Уменьшение длины семядолей имеет сходную с прорастанием закономерность: растение табака с неактивной протеинкиназой *AtCPK1* не отличается от нетрансгенного растения и имеет наиболее сильное уменьшение длины проростка, а растение табака, модифицированное геном фермента с постоянной активностью, меньше всех подвержено действию холодого стресса.

Влияние холодого стресса на рост двухнедельных растений табака

Проверка взрослых растений на устойчивость к холодому стрессу также проводилась в климатостате при следующих параметрах: фотопериод 16/8 ч; освещенность днем 3000–5000 люкс; температура 12 °С или 24 °С, влажность 70 %. В таких условиях визуально оценивали длину побега и толщину стеблей, размер листьев по прошествии 30 дней, а также взвешивали растения до начала эксперимента и по его окончании.

Внешне растения, подверженные действию холодого стресса в течение 30 дней, заметно отличаются от контрольных растений, выращенных при температуре 24 °С, которые имеют более вытянутые стебли и черенки, а также листья большего размера (рис. 2, *a, б*). Кроме того, было показано, что прирост биомассы растений Nt и Na снижен более чем в 4 раза при воздействии холода, в то время как рост растений Ak и Ci при холодом стрессе достоверно выше (рис. 2, *в*).

Таким образом, мы показали, что избыточная экспрессия нативной формы гена *AtCPK1* арабидопсиса в растениях табака значительно увеличивает устойчивость к холодому стрессу по сравнению с контрольными растениями. При этом неактивная изоформа *AtCPK1*-Na полностью нивелирует данный эффект,

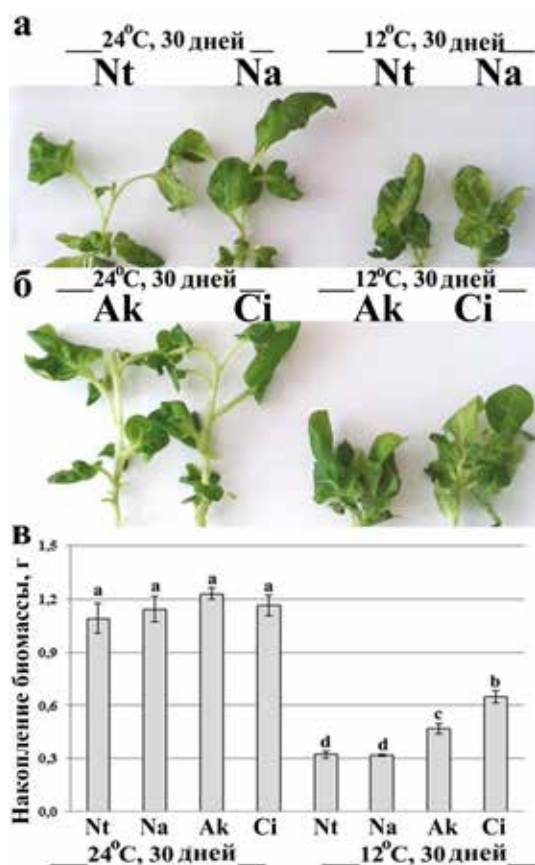


Рис. 2. Влияние холодного стресса (12 °С в течение 30 дней) на микроклоны контрольной и трансгенных линий табака: а, б – репрезентативный вид; в – влияние холода на накопление биомассы. Nt – растения-микроклоны контрольной нетрансгенной линии *N. tabacum*; Na – растения-микроклоны трансгенной линии, трансформированной мутантной неактивной формой *AtCPK1*; Ak – растения-микроклоны трансгенной линии, трансформированной нативной формой гена *AtCPK1*; Ci – растения-микроклоны трансгенной линии, трансформированной мутантной постоянно-активной формой гена *AtCPK1*. Эксперимент повторен 3 раза, данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего; буквы над планками погрешностей обозначают статистически достоверную разницу ($P < 0,05$, LSD Фишера)

устойчивость к холодному воздействию растений табака, трансформированных изоформой Na, не отличается от таковой у контрольных растений как при длительном культивировании, так и при проращивании семян. Мутация изоформы Ci обеспечивает трансгенным растениям повышенную устойчивость к холоду, при которой растения имеют прирост биомассы и процент проросших семян, близкие к таковым у контрольных растений, не подверженных действию холода.

Выводы

В ходе работы было исследовано действие холодного стресса на накопление биомассы при длительном выращивании растений и прорастание семян *N. tabacum* дикого типа и модифицированных нативным геном *AtCPK1* и его мутантными формами – неактивной и постоянно активной. Показано, что избыточная экспрессия данного гена оказывает воздействие на устойчивость растений к холодному стрессу, в особенности при их трансформации мутантной постоянно-активной изоформой *AtCPK1-Ci*.

Повышение устойчивости сельскохозяйственных растений к абиотическим стрессам (засухе, засоленности почв, заморозкам) – важная для современного растениеводства задача, и показанный в данной работе эффект может быть одним из путей ее решения. Не менее важны исследования молекулярного механизма, обеспечивающего устойчивость растений при избыточной экспрессии генов CDPK растений. Как показано ранее [9, 10], устойчивость к солевому и холодному

стрессам модулируется через систему метаболизма активных форм кислорода при непосредственном участии CDPK.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Harmon AC, Yoo B-C, McCaffery C. Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain // *Biochemistry*. 1994. N 33. P. 7278–7287. <https://doi.org/10.1021/bi00189a032>.
2. Schulz P, Herde M., Romeis T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development // *Plant Physiology*. 2013. N 163. P. 523–530.
3. Boudsocq M., Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling // *Trends Plant Sci*. 2013. N 18. P. 30–40.
4. Dammann C., Ichida A., Hong B., Romanowsky S.M., Hrabak E.M., Harmon A.C., Pickard B.G., Harper J.F. Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis* 1 // *Plant Physiology*. 2003. N 132. P. 1840–1848.
5. Coca M., Segundo B.S. AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis* // *The plant journal*. 2010. N 63. P. 526–540.
6. Veremeichik G.N., Grigorchuk V.P., Shkryl Y.N., Bulgakov D.V., Silantieva S.A., Bulgakov V.P. Induction of resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* cells by heterologous expression of the *Arabidopsis* constitutively active, Ca²⁺-independent form of the *AtCPK1* gene // *Process Biochemistry*. 2017. N 54. P. 144–155.
7. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Makhazen D.S., Silantieva S.A., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P. Increase of anthraquinone content in *Rubia Cordifolia* cells transformed by native and constitutively active forms of the *AtCPK1* gene // *Plant Cell Reports*. 2016. N 35. P. 1907–1916.
8. Harper J.F, Huang J.F, Lloyd S.J. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain // *Biochemistry*. 1994. N 33. P. 7267–7277. <https://doi.org/10.1021/bi00189a031>
9. Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Silantieva S.A., Gorpenchenko T.Y., Brodovskaya E.V., Yatsunskaya M. S., Bulgakov V.P. Managing activity and Ca²⁺ dependence through mutation in the Junction of the AtCPK1 coordinates the salt tolerance in transgenic tobacco plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021. N 165. P. 104–113.
10. Dong H, Wu C, Luo C, Wei M, Qu S, Wang S. Overexpression of MdCPK1a gene, a calcium dependent protein kinase in apple, increase tobacco cold tolerance via scavenging ROS accumulation // *PLoS One*. 2020. N 19;15(11):e0242139.

REFERENCES

1. Harmon AC, Yoo B-C, McCaffery C. Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*. 1994;(33):7278-7287. <https://doi.org/10.1021/bi00189a032>.
2. Schulz P, Herde M., Romeis T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiology*. 2013;(163):523-530.
3. Boudsocq M., Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci*. 2013;(18):30-40.
4. Dammann C., Ichida A., Hong B., Romanowsky S.M., Hrabak E.M., Harmon A.C., Pickard B.G., Harper J.F. Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis* 1. *Plant Physiology*. 2003;(132):1840-1848.
5. Coca M., Segundo B.S. AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis*. *The plant journ*. 2010;(63):526-540.
6. Veremeichik G.N., Grigorchuk V.P., Shkryl Y.N., Bulgakov D.V., Silantieva S.A., Bulgakov V.P. Induction of resveratrol biosynthesis in *Vitisamurensis* cells by heterologous expression of the *Arabidopsis* constitutively active, Ca²⁺-independent form of the *AtCPK1* gene. *Proc. Biochemistry*. 2017;(54):144-155.
7. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Makhazen D.S., Silantieva S.A., Mishchenko N.P., Vasileva E.A., Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P. Increase of anthraquinone content in *Rubia Cordifolia* cells transformed by native and constitutively active forms of the *AtCPK1* gene. *Plant Cell Reports*. 2016;(35):1907-1916.
8. Harper J.F, Huang J.F, Lloyd S.J. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry*. 1994;(33):7267-7277. <https://doi.org/10.1021/bi00189a031>.

9. Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Silantieva S.A., Gorpenchenko T.Y., Brodovskaya E.V., Yatsunskaya M.S., Bulgakov V.P. Managing activity and Ca^{2+} dependence through mutation in the Junction of the AtCPK1 coordinates the salt tolerance in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2021;(165):104-113.

10. Dong H, Wu C, Luo C, Wei M, Qu S, Wang S. Overexpression of MdCPK1a gene, a calcium dependent protein kinase in apple, increase tobacco cold tolerance via scavenging ROS accumulation. *PLoS One*. 2020;(19;15(11)):e0242139.