

Экспрессия сплайсированных вариантов мРНК
генов кальций-зависимых
протеинкиназ *CPK21* и *CPK26* в винограде
амурском *Vitis amurensis* Rupr. под воздействием
абиотических стрессов

Огнева З.В., Алейнова О.А., Супрун А.Р., Ананьев А.А.,
Дубровина А.С., Киселев К.В.

Федеральный научный центр биоразнообразия
наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН

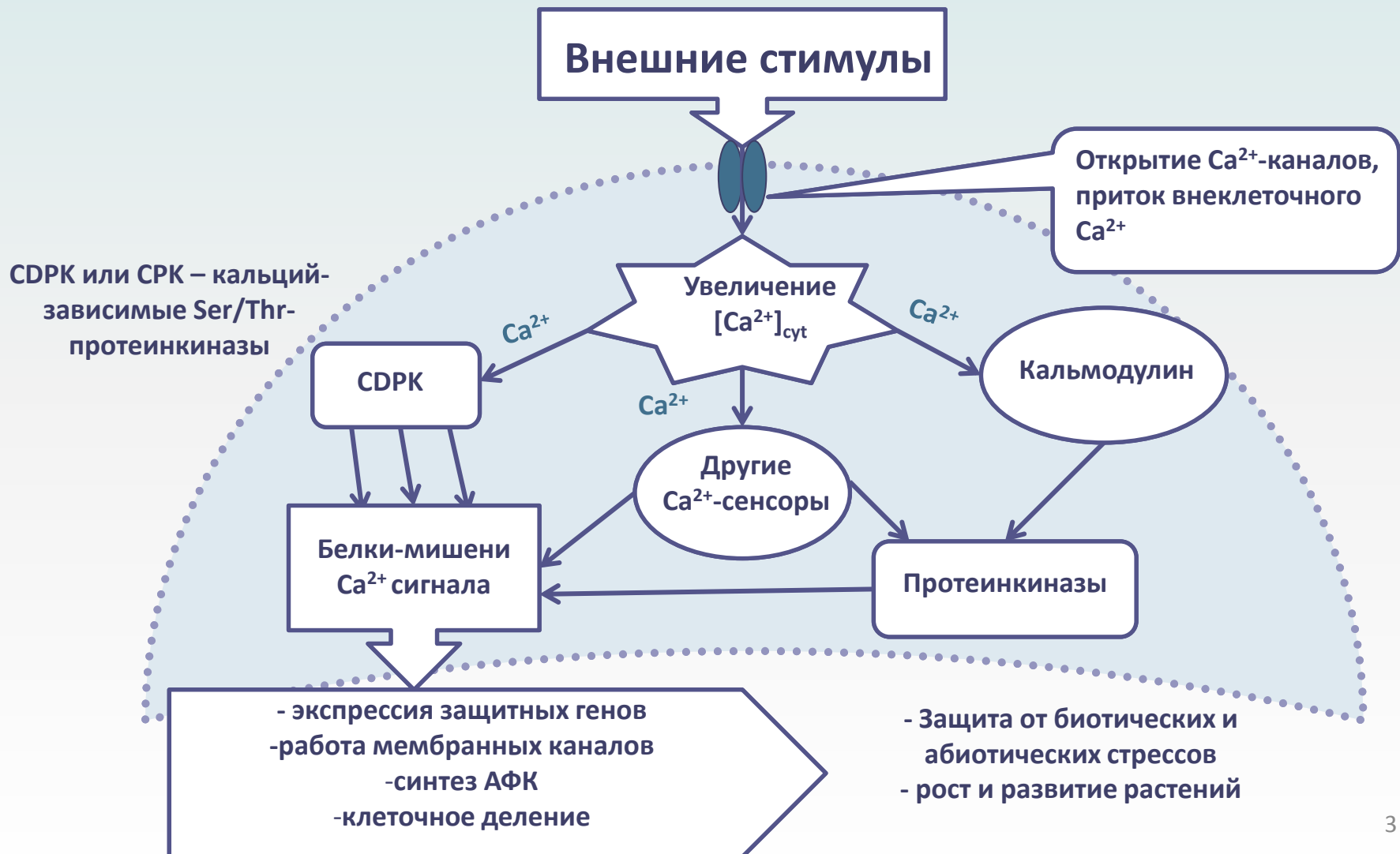
e-mail: zlata.v.ogneva@gmail.com

Казань, 2019

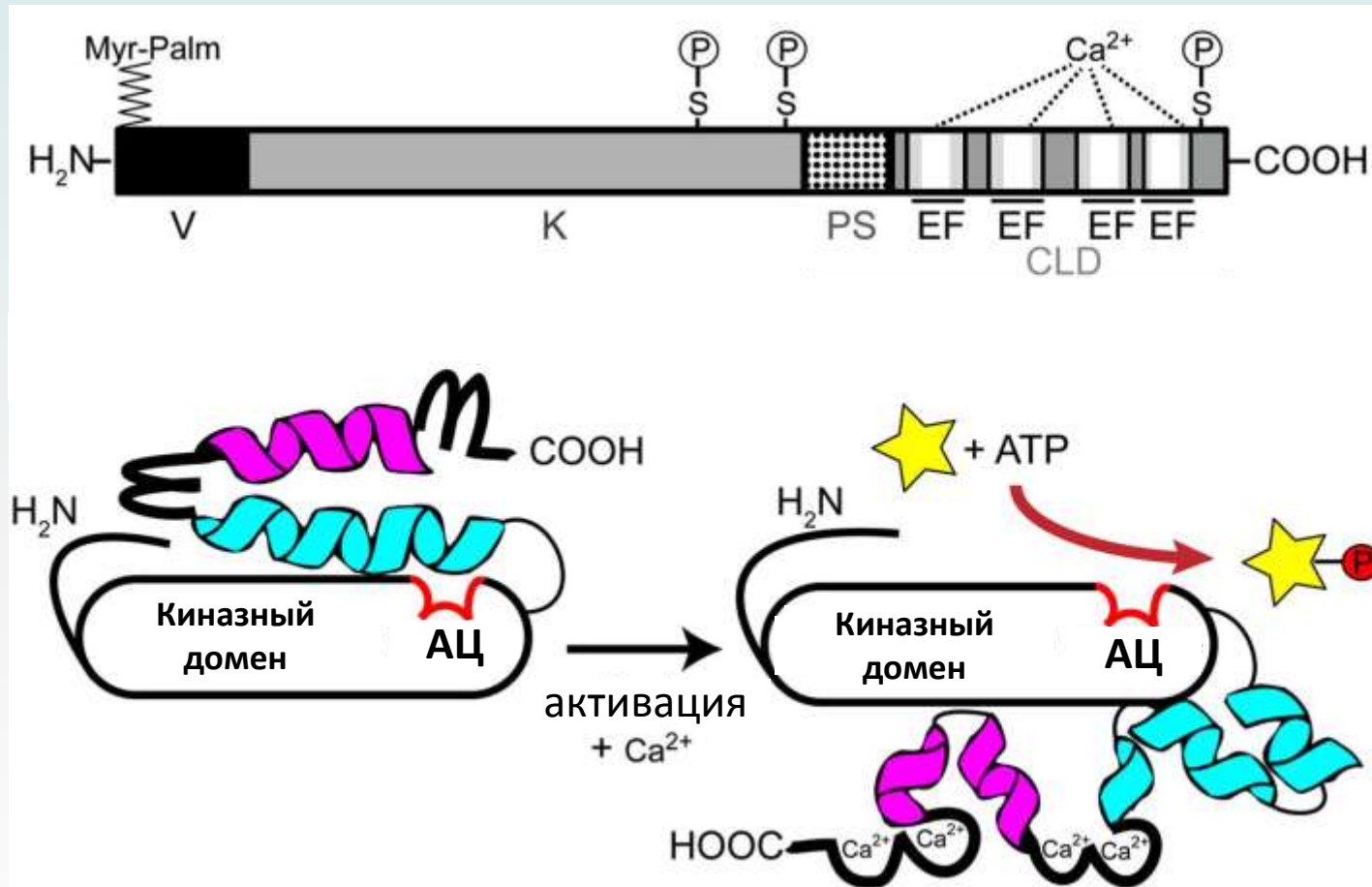
Воздействие абиотического стресса на растения



Кальциевая сигнальная система растений



Строение и функционирование CDPK в клетках растений



Philipp Schulz et al. *Plant Physiol.* 2013;163:523-530

Семейство CDPK

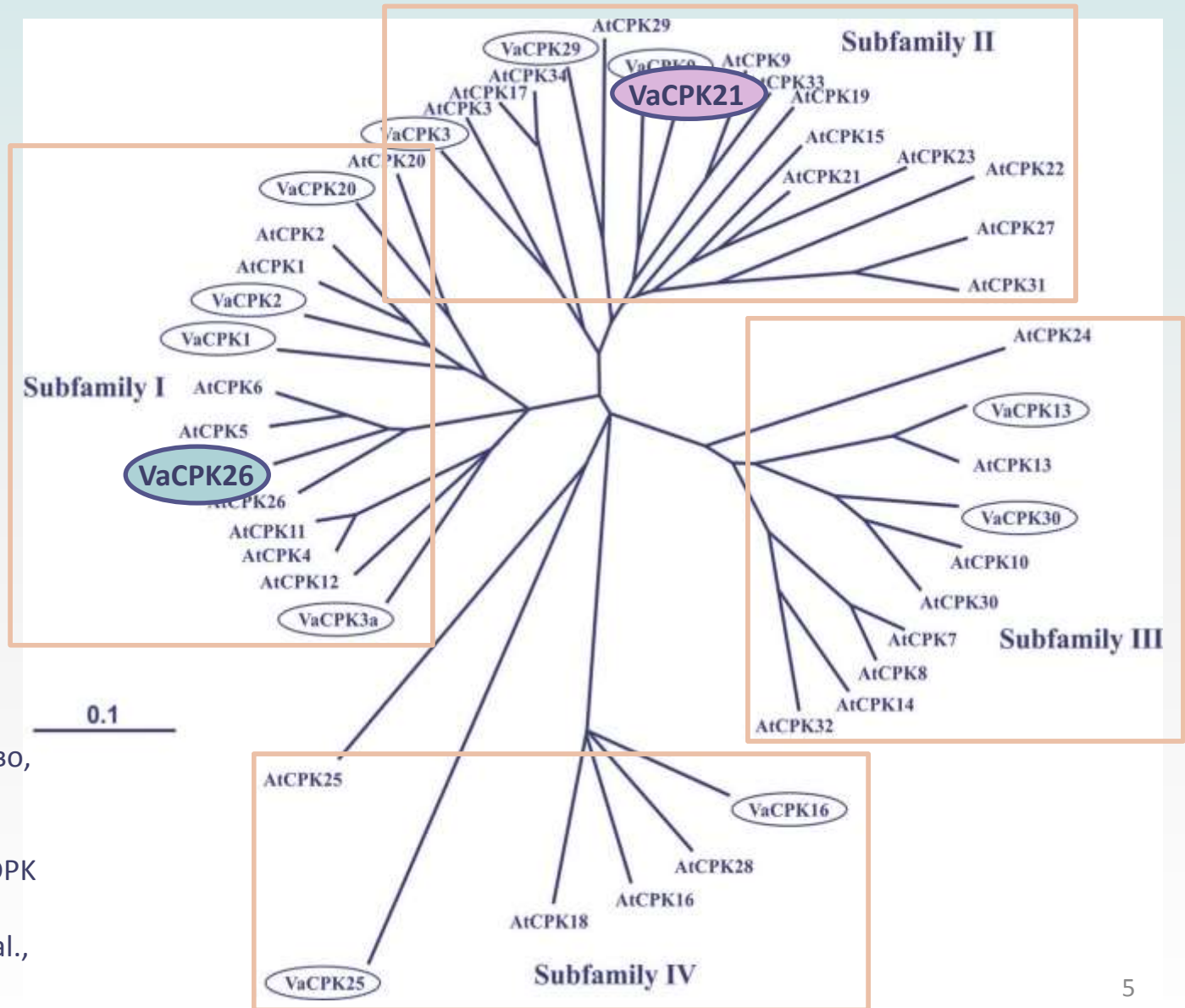


Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.

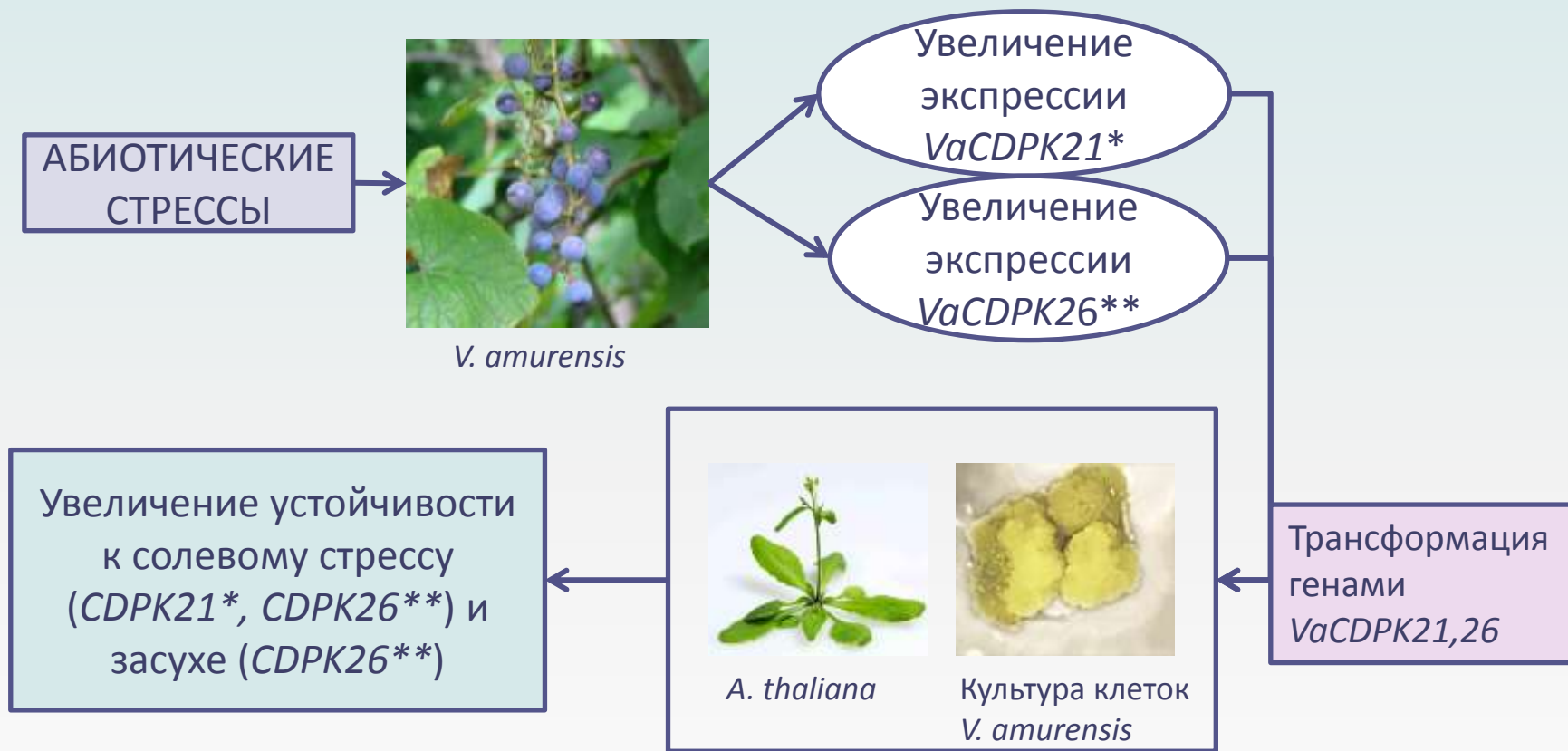


Vitis amurensis Rupr.

Филогенетическое дерево, построенное на основе аминокислотных последовательностей CDPK *Arabidopsis thaliana* и *V. amurensis* (Dubrovina et al., 2013).



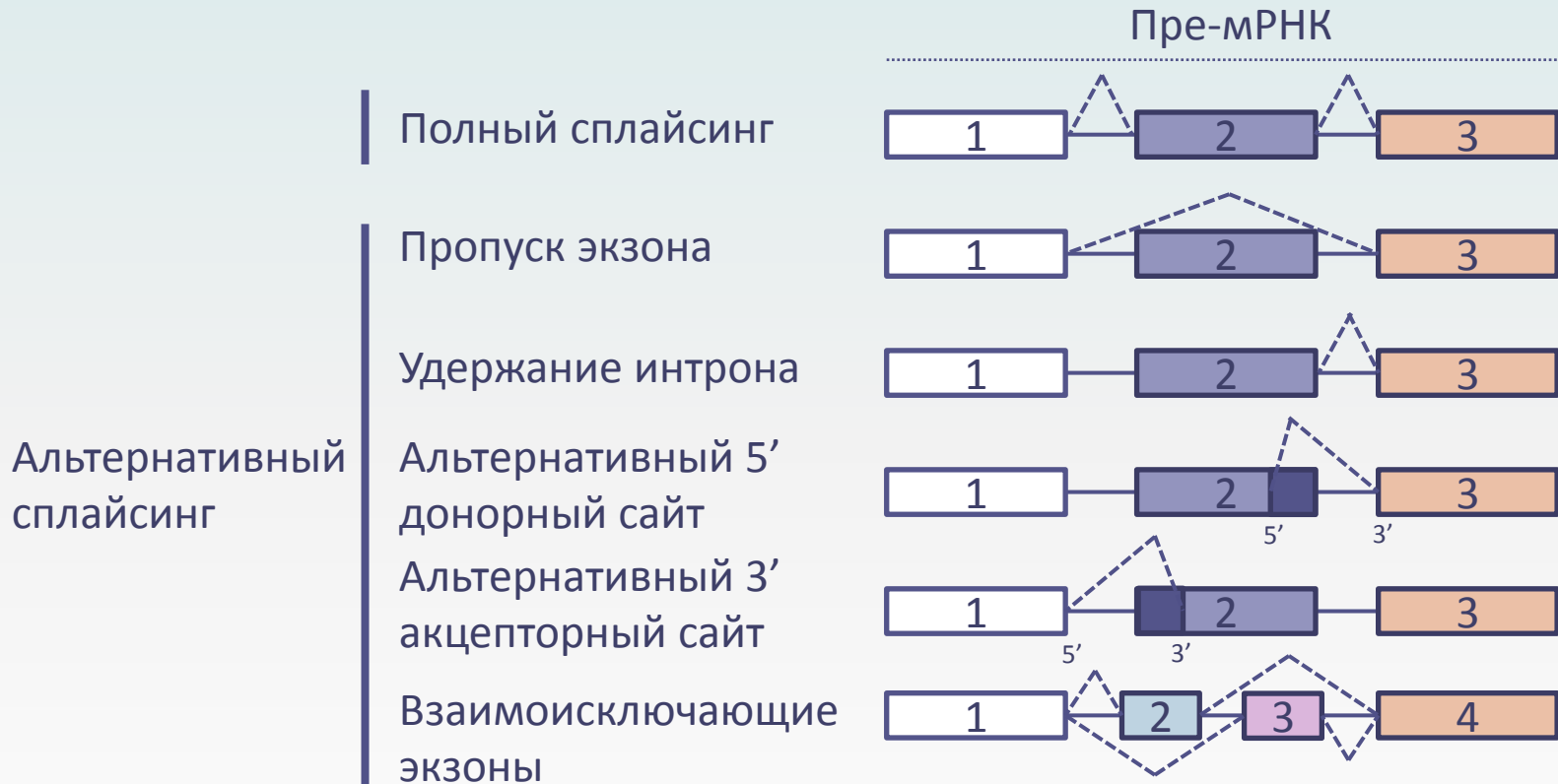
Роль *CDPK21* и *CDPK26* в устойчивости к абиотическим стрессам



* Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Khristenko V.S., Aleynova O.A. 2016. *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. - Vol.127. N.1. P.137-150.

** Дубровина А.С., Киселев К.В. 2019. Роль генов кальций-зависимых протеинкиназ *VaCPK1* и *VaCPK26* в ответе *Vitis amurensis* (*in vitro*) и *Arabidopsis thaliana* (*in vivo*) на воздействие абиотических стрессов // RUSSIAN JOURNAL OF GENETICS. – Vol.55. N.3. P.300-311.

Типы сплайсинга у растений



Цель настоящей работы – определить, подвергаются ли гены *CDPK 21* и *26* винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. альтернативному сплайсингу при воздействии абиотических стрессов, а также изучить участвует ли альтернативный сплайсинг в регуляции экспрессии генов *CDPK 21* и *26* при воздействии абиотических стрессов.

Материалы и методы

Черенки *V. amurensis*

Контроль

NaCl
400mM

+37°C

+5°C

Водный
дефицит



6 часов
12 часов

Выделение РНК,
получение кДНК

РНК → кДНК

RT ThermoScript™

Клонирование

pJET1.2/blunt

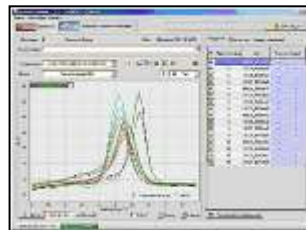
Секвенирование

ABI 3130 Genetic Analyzer



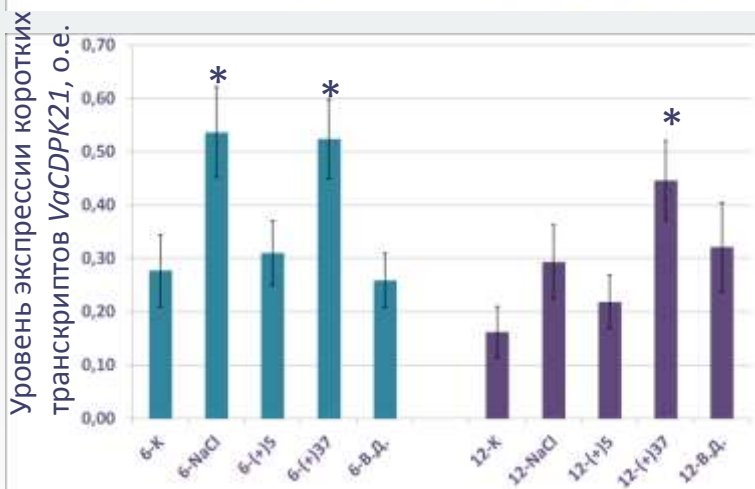
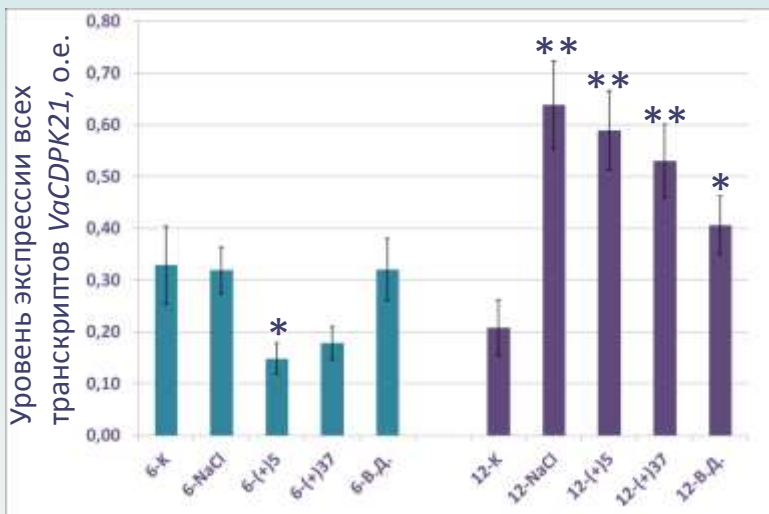
ПЦР-РВ

DT-Prime 4,
ДНК-технология

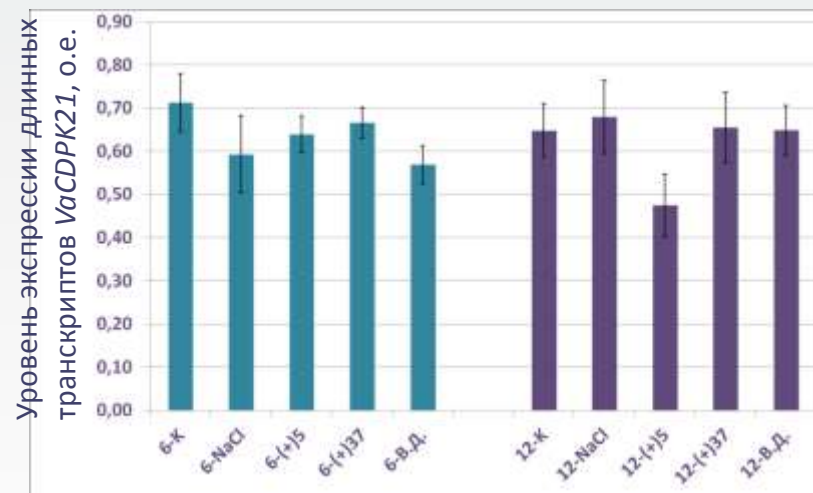


Анализ полученных
данных

Уровень экспрессии *VaCDPK21*

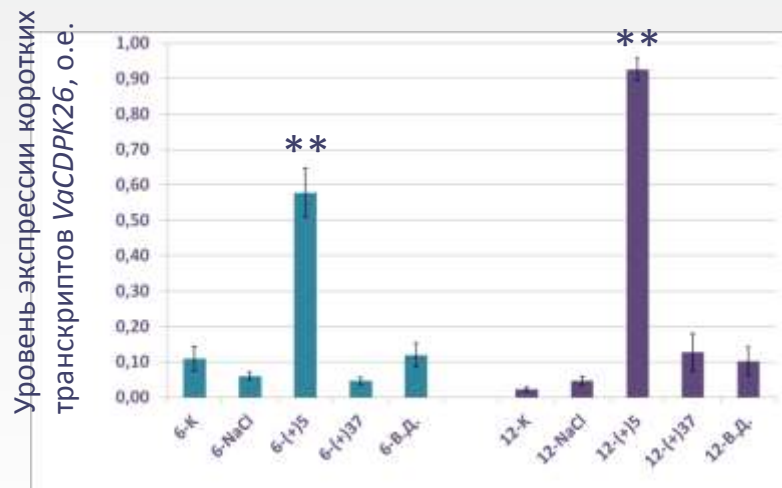
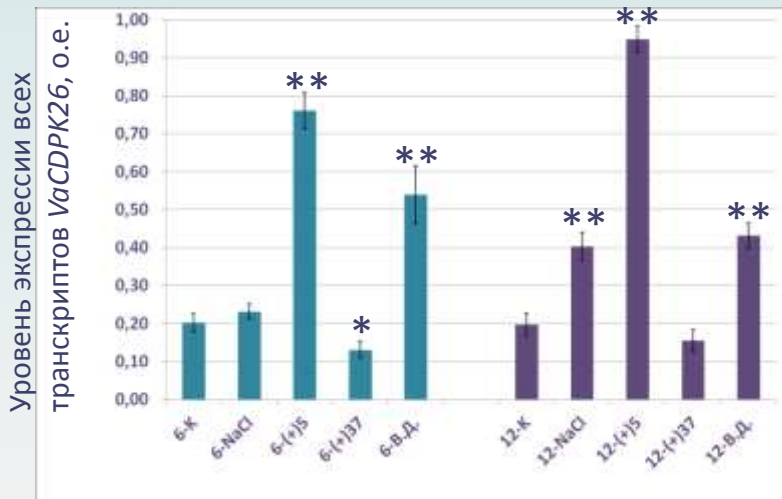


	полноразмерные	короткие CDPK	длинные CDPK
Контроль 12ч	55	0	0
NaCl 12ч	48	0	0
+5 12ч	0	0	0
+37 12ч	38	2	1
ВД 12ч	5	0	0
Всего:			
149	146	2	1



Экспрессия транскриптов гена *VaCDPK21* в ответ на абиотические стрессы: NaCl - соль, (+)37 - высокие и (+5) - низкие температуры, В.Д. - водный дефицит. Уровни транскрипции были проанализированы у черешков лианы дикого винограда *Vitis amurensis* спустя 6 и 12 часов после обработки стрессом. Данные показаны как среднее значение \pm стандартная ошибка, рассчитанные по двум независимым экспериментам, и были проверены с помощью t-теста Стьюдента. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с значениями экспрессии транскриптов контрольных растений.

Уровень экспрессии *VaCDPK26*

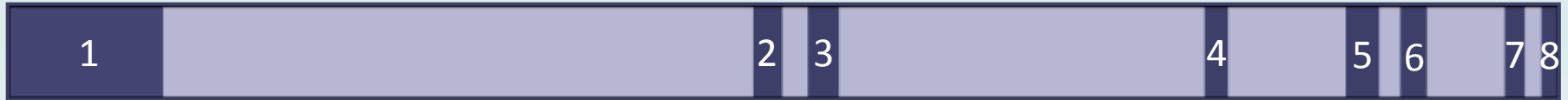


	полноразмерные	короткие СРК	длинные
Контроль 12ч	31	0	0
NaCl 12ч	36	0	0
+5 12ч	36	5	0
+37 12ч	42	0	0
ВД 12ч	33	0	0
Всего:	183	5	0

Экспрессия транскриптов гена *VaCDPK26* в ответ на абиотические стрессы: NaCl - соль, (+)37 - высокие и (+5) - низкие температуры, В.Д. - водный дефицит. Уровни транскрипции были проанализированы у черешков лианы дикого винограда *Vitis amurensis* спустя 6 и 12 часов после обработки стрессом. Данные показаны как среднее значение \pm стандартная ошибка, рассчитанные по двум независимым экспериментам, и были проверены с помощью t-теста Стьюдента. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с значениями экспрессии транскриптов контрольных растений.

Предполагаемые белки CDPK21

Полная последовательность гена *CDPK21*



Схематичное представление белка CDPK21



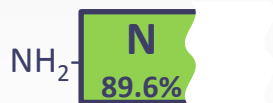
Последовательность короткой кДНК *CDPK21-short*



Делеция 89 н. в первом экзоне



Сбой рамки считывания



Последовательность длинной кДНК *CDPK21-long*



Удержание пятого интрона 103 н.



Сбой рамки считывания

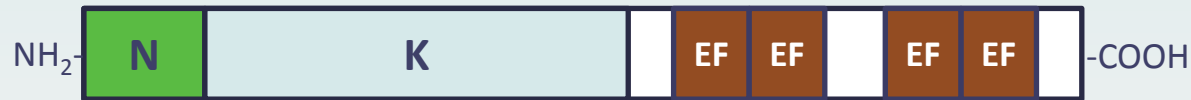


Предполагаемые белки CDPK26

Полная последовательность гена *CDPK26*



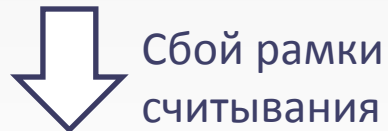
Схематичное представление белка CDPK26



Последовательность короткой кДНК *CDPK26-1a*



Пропуск второго экзона 144 н.,
делеция одного нуклеотида в 6
интроне



Последовательность короткой кДНК *CDPK21-1b*



Пропуск второго экзона 144 н.



Выводы

- Установлено, что ген *CDPK21* подвергается альтернативному сплайсингу, в результате чего образуются два альтернативных транскрипта:

VaCDPK21-short – в выведенной аминокислотной последовательности которого отсутствуют важные домены (киназный и кальмодулин-подобный),

VaCDPK21-long – в последовательности которого отсутствуют важные домены (кальций-связывающие EF-мотивы).

- Установлено, что ген *CDPK26* подвергается альтернативному сплайсингу, в результате чего образуются два вида альтернативных транскриптов:

VaCDPK26-1a – в выведенной аминокислотной последовательности которого отсутствуют важные домены (участок киназного домена и кальций-связывающие EF-мотивы).

VaCDPK26-1b – в выведенной аминокислотной последовательности которого отсутствует важный участок киназного домена.

- Показано, что наибольшее количество альтернативных транскриптов генов *CDPK21* и *CDPK26* и наивысший уровень их экспрессии был обнаружен при обработке растений высоко и низкотемпературными стрессами, соответственно, что свидетельствует об активном участии альтернативного сплайсинга в ответе на эти абиотические стрессы.