

С. В. Ісаєнков, О. Е. Красноп'ярова

Експресія генів калієвих каналів родини ТРК та Na^+/H^+ обмінника родини ННХ ячменю за умов сольового та водного стресів

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

Досліджено вплив сольового та водного стресів на характер експресії генів, що кодують двопорові калієві канали родини ТРК та Na^+/H^+ обмінник HvNHX4, через різний проміжок часу. Показано, що конститутивний рівень експресії генів цих транспортних білків є надзвичайно низьким. Відмічено, що індукція експресії HvTPKb відбувається через 8 год після посадки проростків ячменю на середовище із 10% поліетиленгліколем (водний стрес). На відміну від HvTPKb, рівень експресії HvTPKc був надзвичайно низьким і не детектувався за допомогою ЗТ-ПЛР. Індукція експресії HvNHX4 відбувалася через 24 год інкубації на поживному середовищі із 500 мМ NaCl. Таким чином, показано, що сольовий та водний стреси можуть по-різному впливати на регуляцію експресії генів вищезазначених транспортерів.

Зростаючий дефіцит води та засолення ґрунтів є одними із головних факторів, що обмежують продуктивність сільського господарства та знижують біорізноманіття видів. Розвиток сольового чи водного стресу супроводжується порушенням осмотичного та іонного гомеостазу і виникненням вторинного оксидативного стресу [1]. Головним чинником негативних ефектів сольового та водного стресів є цитотоксичність іонів, а саме Na^+ та Cl^- . Na^+ є головним елементом, що засолює ґрунти та може накопичуватись у небезпечних для рослин концентраціях. Цитотоксичність Na^+ полягає в тому, що він порушує перебіг багатьох метаболічних процесів у клітині, і тому рослини еволюційно набули механізмів видалення цього елемента назовні чи у центральну вакуоль.

Виведення надлишкового Na^+ назовні клітини відбувається за рахунок дії Na^+/H^+ антипортерів системи SOS1 [1, 2]. Процес депозитування цього катіона у вакуоль здійснюється за допомогою Na^+/H^+ обмінників родини ННХ [3]. Іншим механізмом позбавлення цитотоксичних ефектів Na^+ є підтримання високої концентрації K^+ у цитоплазмі по відношенню до Na^+ [4, 5]. Транспортні білки, що відповідають за транспорт іонів K^+ в клітині, можуть відповідати саме за вищезгадані процеси. Зокрема, заслуговують на увагу калієві канали родини ТРК, що відповідають за транспорт K^+ між цитоплазмою та вакуолею чи іншими мембранними компартментами клітини [6, 7]. Нещодавно було показано, що рівень транскриптів гена *NtTPK1a* із тютюну підвищується при гіперосмотичних умовах, а експресія гена *TPK* каналу з тополі в клітинах тютюну підвищувала їх стійкість до сольового стресу [8, 9].

Метою цього дослідження було з'ясування впливу сольового, водного та осмотичного стресів на регуляцію та експресію генів двопорових калієвих каналів родини ТРК, а саме HvTPKb та HvTPKc, та гена Na^+/H^+ обмінника — HvNHX4.

Матеріали та методи. Експерименти проводили із проростками ячменю (сорт Ярослав) віком 7 днів, які пророщували на рідкому поживному середовищі Хогленда в гідропонній культурі. Для проведення експерименту проростки ячменю переносили на свіже середовище, що містило 500 мМ NaCl, 10% поліетиленгліколю з молекулярною масою 4000

(PEG 4000, “Fluka”, Швейцарія) чи звичайне середовище Хогленда (контроль). Для подальшого аналізу відбирали по п'ять рослин через 2, 8 та 24 год для кожного типу стресу і відразу заморожували в рідкому азоті.

Загальну РНК виділяли з тканин проростків ячменю за допомогою TRIzol-реагенту (“Invitrogen”, США) відповідно до інструкцій компанії виробника. Кількісний аналіз РНК здійснювали методом спектрофотометрії. Інтактність отриманої РНК визначали шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі.

Рівень транскриптів генів *HvTPKb*, *HvTPKc*, *HvNHX4* та гена α -тубуліну *HvTub α* оцінювали за допомогою ЗТ-ПЛР із використанням специфічних праймерів до кодуєчої послідовності кожного гена. Рівень експресії гена α -тубуліну був референтним [10].

Синтез кДНК проводили за допомогою системи SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (“Invitrogen”, США). Рівень експресії *HvTPKb*, *HvTPKc*, *HvNHX4* та *HvTub α* оцінювали за допомогою ПЛР. Для проведення ПЛР реакції до 50 мкл реакційної суміші, що містила в собі 1xTaq ПЛР буфер, 200 мкМ дНТП суміші, та 0,5 мкл Taq-полімерази (“Promega”, США), додавали 3 мкл реакційної суміші зворотної транскрипції. Програма ПЛР ампліфікації мала такі параметри: 95 °C 4 хв; 35 циклів: 95 °C 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 30 с; 72 °C 7 хв. Специфічні праймери до *HvTPKb*:

HvTPKb_for CAAGGGGAAATCCACGTTTA та

HvTPKb_rev TCTCATCGATCTTCCCCATC;

до *HvTPKc*:

HvTPKc_for TACAAGGACCGCCTCATCTT та

HvTPKc_rev ATTCGGCCCTTCTTGATGT;

до *HvNHX4*:

HvNHX4_for AGGACTTGGCTTGTCAGGAA та

HvNHX4_rev CCAACGTGTGACCAGCTATG;

до *HvTub α* :

HvTub α _for AATGCTGTTGGAGGTGGAAC та

HvTub α _rev GCTGCTCATGGTAAGCCTTC+.

Продукти ПЛР розділяли в 1% агарозному гелі за наявності бромистого етидію.

Рівень експресії в різних типах тканин визначали шляхом аналізу електрофореграм методом денситометрії за допомогою програми TotalLab (Великобританія).

Усі досліді виконували в трьох біологічних повтореннях.

Результати та обговорення. Проведені нами експерименти показують, що сольовий та водний стреси можуть по-різному регулювати експресію генів двопорових каналів родини ТРК та Na^+/H^+ обмінників родини NHX. Цікавим фактом є те, що конститутивний рівень експресії генів цих транспортних білків надзвичайно низький порівняно з геном α -тубуліну, що є референтним (рис. 1, 2). Вплив стресів, що спричиняють осмотичний шок, може індукувати підвищення рівня експресії для *HvTPKb* та *HvNHX4*.

Як показують результати наших досліджень, при дії водного та сольового стресів не спостерігається індукції експресії *HvTPKc*. Заслужовує на увагу те, що навіть сама індукція експресії *HvTPKb* та *HvNHX4* істотно відрізняється. Підвищення експресії *HvTPKb* відбувається при дії водного стресу (середовище з вмістом 10% поліетиленгліколю) через 8 год, тоді як індукція експресії *HvNHX4* — тільки при дії сольового стресу (500 мМ NaCl) через 24 год (див. рис. 1, 2). Тобто в першому випадку спостерігається формування швидкої відповіді протягом 8 год на дію водного стресу. Можна припустити, що індукція експресії *HvTPKb* при водному стресі необхідна для збагачення цитоплазми клітин іонами K^+ , що

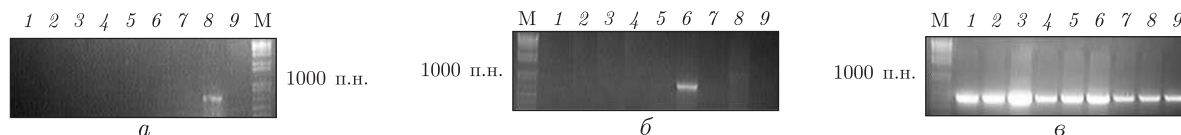


Рис. 1. Результати ЗТ-ПЛР аналізу експресії генів *HvTPKb*, *HvNHX4* та *HvTubα* в проростках ячменю за умов дії сольового та водного стресу через різний інтервал часу: *a* — профіль експресії *HvTPKb*; *б* — *HvNHX4*; *в* — *HvTubα*. М — маркер молекулярної маси ДНК; 1 — контроль 2 год; 2 — контроль 8 год; 3 — контроль 24 год; 4 — 10% PEG 4000 2 год; 5 — 10% PEG 4000 8 год; 6 — 10% PEG 4000 24 год; 7 — 500 мМ NaCl 2 год; 8 — 500 мМ NaCl 8 год; 9 — 500 мМ NaCl 24 год

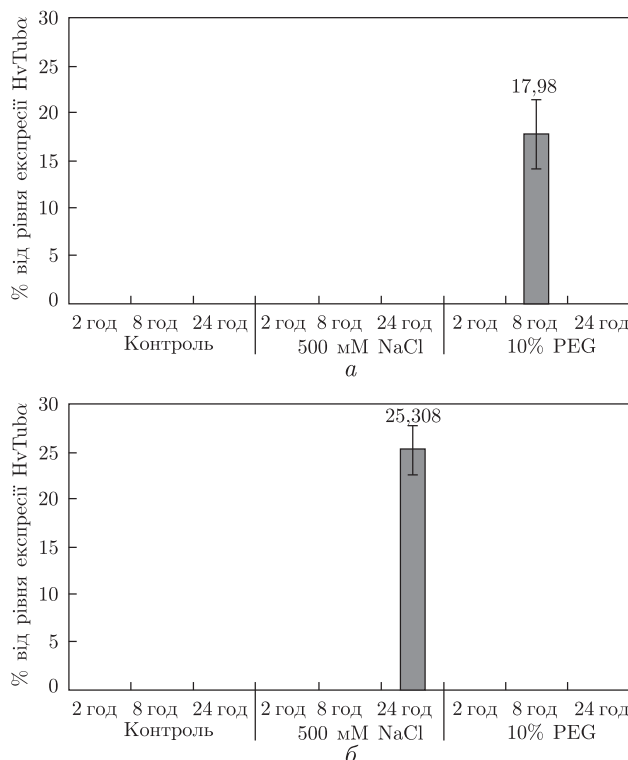


Рис. 2. Кількісний аналіз рівня експресії генів *HvTPKb* (*a*) та *HvNHX4* (*б*) за різних умов культивування проростків ячменю

має осмопротекторний ефект та мінімалізує негативний вплив інших цитотоксичних моновалентних катіонів на метаболічні процеси в клітині. Як було показано, експресія цього гена є тимчасовою і не спостерігається після 24 год культивування на середовищі із поліетингліколем. Можливо, що HvTPKb бере участь у первинній ланці формування відповіді рослин на дію водного стресу. Цілком ймовірно, що через 24 год функції протекції рослин від водного стресу будуть виконувати вже інші білки (див. рис. 1, 2).

На відміну від *HvTPKb*, експресія *HvNHX4* підвищувалася тільки після 24 год культивування на середовищі з підвищеним вмістом NaCl. Це може свідчити про те, що HvNHX4 бере участь у довготривалій регуляції сольового стресу у рослин. Участь Na^+/H^+ обмінників родини NHX у формуванні відповіді на дію сольового стресу була показана для багатьох представників цієї родини [1, 3]. Вірогідно, що HvNHX4 бере на себе роботу депозитування Na^+ у вакуоль чи інші мембранні компартменти клітини і, таким чином, зменшує концентрацію цього катіона в цитозолі, де проходять важливі метаболічні процеси.

Таким чином, індукторами експресії генів, що кодують HvTPKb, HvNHX4, є стреси різних типів. Підвищення експресії відбувається через різний проміжок часу, що вказує на відмінність процесів, у яких беруть участь ці транспортні білки. Відсутність індукції експресії *HvTPKc* свідчить про те, що двопоровий канал HvTPKc відіграє незначну роль або, навіть, не впливає на формування відповіді на дію водного чи солевого стресу. Розуміння процесів регуляції і експресії цих генів є важливим елементом для подальшого вивчення функцій, клітинної локалізації та фізіологічної ролі цих транспортних білків. Такі дослідження допоможуть у майбутньому використовувати гени двопорових каналів та Na⁺/H⁺ обмінників як молекулярні маркери для селекційних робіт та біотехнологічного покращення важливих агрохарактеристик сільськогосподарських рослин.

1. Isaenkov C. B. Фізіологічні та молекулярні аспекти солевого стресу рослин // Цитология и генетика. – 2012. – **5**. – P. 50–71.
2. Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K. Role of SOS1 as a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter that controls long distance Na⁺ transport in plant // Plant Cell. – 2002. – **14**. – P. 465–477.
3. Yokoi S., Quintero F. J., Cubero B. et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response // Plant J. – 2002. – **30**. – P. 529–539.
4. Zhu J.-K. Plant salt tolerance // Trends Plant Sci. – 2001. – **6**. – P. 66–71.
5. Maathuis F. J. M., Amtmann A. K. Nutrition and Na⁺ toxicity; the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios // Ann. Bot. – 1999. – **84**. – P. 123–133.
6. Gobert A., Isayenkov S., Voelker C. et al. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – **104**. – P. 10726–10731.
7. Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role // Plant Signal. Behav. – 2011. – **6**. – P. 1201–1204.
8. Hamamoto S., Marui J., Matsuoka K. et al. Characterization of a tobacco TPK-type K⁺ channel as a novel tonoplast K⁺ channel using yeast tonoplasts // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**. – P. 1911. – 1920.
9. Wang F., Deng S., Ding M. et al. Overexpression of a poplar two-pore K⁺ channel enhances salinity tolerance in tobacco cells // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2013. – **112**. – P. 19–31.
10. Mian A., Oomen R., Isayenkov S. et al. Over-expression of an Na⁺- and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance // Plant J. – 2011. – **68**. – P. 468–479.

ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України", Київ

Надійшло до редакції 19.11.2014

С. В. Исаенков, Е. Е. Красноперова

Експрессия генов калиевых каналов семейства ТРК и Na⁺/H⁺ обменника семейства NHX ячменя в условиях солевого и водного стрессов

Исследовано влияние солевого и водного стрессов на характер экспрессии генов, кодирующих двупоровые калиевые каналы семейства ТРК и Na⁺/H⁺ обменник HvNHX4, через разный интервал времени. Показано, что конститутивный уровень экспрессии генов этих транспортных протеинов очень низкий. Отмечено, что индукция экспрессии HvTPKb наблюдается через 8 ч после посадки проростков ячменя на среду, содержащую 10% полиэтиленгликоля (водный стресс). По сравнению с HvTPKb уровень экспрессии HvTPKc был чрезвычайно низкий и не детектировался с помощью ОТ-ПЦР. Индукция экспрессии HvNHX4 наблюдалась через 24 ч на культивационной среде, содержащей 500 мМ NaCl. Таким образом, показано, что солевой и водный стрессы могут по-разному влиять на регуляцию экспрессии генов указанных транспортных.

S. V. Isayenkov, E. E. Krasnoperova

The expression profiles of genes encoding the potassium TPK channels and NHX Na⁺/H⁺ exchanger in barley under salinity and water stress conditions

The influences of high salinity and water stresses on the gene expression profiles of genes encoding two-pore potassium TPK channels and NHX Na⁺/H⁺ exchanger through the time course are investigated. The constitutive gene expression levels of these genes were very low. After 8 hours of the barley shoots cultivation on a medium with 10% PEG 400 (water stress), the induction of HvTPKb gene expression is observed. In comparison with HvTPKb, the expression level of HvTPKc was extremely low. The induction of HvNHX4 expression occurred after 24 hours of cultivation on 500 mM NaCl. Thus, it is shown that the salinity and water stresses can differently regulate the expression profiles of genes encoding these transporters.