

УДК 581.1

## ЕКСПРЕСІЯ СИГНАЛЬНОГО ГЕНА *uidA* ПІД КОНТРОЛЕМ ФРАГМЕНТІВ ПРОМОТОРА *Arx2* В *ARABIDOPSIS THALIANA* ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

Р.Ю. ПИРІЖОК, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2  
e-mail: ra.volkov@gmail.com, irina.panchuk@gmail.com

*Делеційний аналіз промотора був використаний для картування елементів відповідальних за індукцію гена аскорбат пероксидази 2 (Arx2) Arabidopsis thaliana за дії сольового стресу. Різні фрагменти промотора поєднували з сигнальним геном uidA, отримані конструції переносили в рослини Arabidopsis thaliana за допомогою Agrobacterium. Трансгенні рослини обробляли розчинами 50 чи 100 мМ NaCl. Після обробки промотор Arx2 активувався в замикаючих клітинах продихів, гідатодах, а також у васкулярних та мезофільних тканинах листків. Ідентичний характер експресії спостерігали і після обробки 10 чи 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, що вказує на участь Ca-залежних сигнальних шляхів в індукції Arx2. Механічне пошкодження листків суттєво посилювало індукцію Arx2 в умовах сольового стресу. Тканиноспецифічність транскрипції Arx2 контролюється різними частинами промотора.*

*Ключові слова: Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., аскорбат пероксидаза, регуляція транскрипції, соловий стрес.*

**Вступ.** Рослини постійно зазнають впливу стресових чинників абіотичної та біотичної природи. За дії різних форм абіотичного стресу (світловий стрес або надмірна інсоляція, соловий, високо- та низькотемпературний стреси, посуха) в рослинних клітинах зростає продукція активних форм кисню (АФК), до яких належать синглетний кисень (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), супероксидний аніон-радикал (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), пероксид водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), гідроксильний радикал (•OH) тощо [1–4]. Найстабільнішим із АФК є H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, який завдяки цьому та здатності проходити через мембрани має великий радіус дії та може пошкоджувати макромолекули декількох сусідніх клітин [5]. Збільшення концентрації АФК у рослинних тканинах призводить до оксидативного стресу, що полягає в окисному порушенні ліпідів, білків і нуклеїнових кислот [1]. У рослин внутрішньоклітинний рівень H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> та інших АФК контролюється антиоксидантними ферментами [3] та низькомолекулярними сполуками [2, 6, 7].

Аскорбат пероксидази (APX, EC 1.11.1.11), гваякол пероксидази (POD, EC 1.11.1.7) та каталази (CAT, EC 1.11.1.6) є головними ферментами рослинної клітини, що знешкоджують H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3, 8]. Вважається, що у зелених тканинах рослин основною групою антиоксидантних ферментів, які утилізують H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> є APX [8]. APX локалізовані в різних клітинних компартментах і розщеплюють H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, використовуючи аскорбат як відновник [8–10]. Встановлено, що у різних видів рослин загальна активність APX змінюється у відповідь на посуху, світловий,

© Р.Ю. ПИРІЖОК, Р.А. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК, 2009

температурний та сольовий стреси [7, 11, 12].

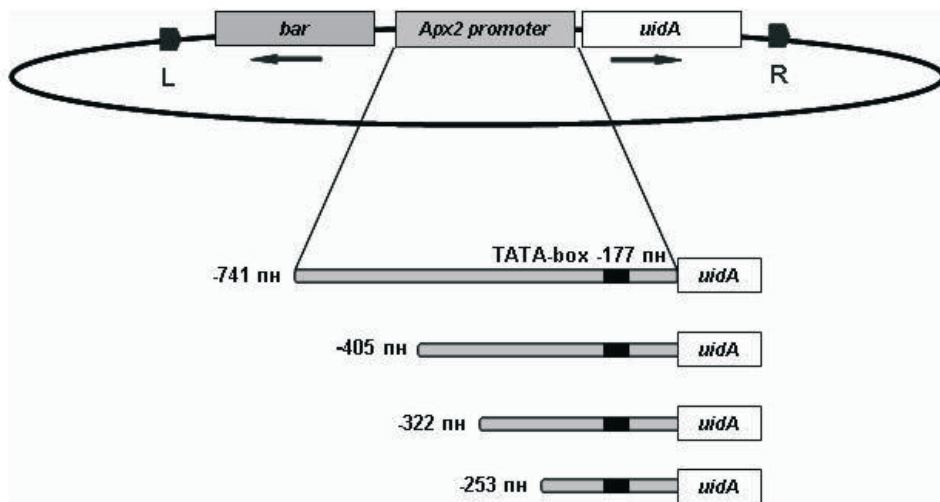
У рослин APX кодуються мультигенною родиною, яка в *Arabidopsis thaliana* (L.) Neunh. налічує 9 генів, що кодують цитозольні (APX1, APX2, APX6), хлоропластні (стромальна sAPX та тилакоїдна tAPX), мітохондріальну (APX7) та пероксисомальні (APX3, APX4, APX5) ізоформи [3, 10, 11, 13, 14]. Наявність декількох ізоформ APX вказує на їх індивідуальну спеціалізацію, яка пов'язана з функціонуванням у різних клітинних компартментах, диференційною експресією в онтогенезі [8–10, 12]. На відміну від інших членів цієї мультигенної родини, *Arx2* (At3g09640) являє собою типовий стресовий ген, який майже не транскрибується за нормальних умов культивування *A. thaliana*. Проте рівень транскрипції гена *Arx2* різко зростає за дії надмірної інсоляції [15], підвищених температур [12] та, меншою мірою – при механічному пошкодженні тканин [16]. У літературі є також вказівки на те, що транскрипція гена *Arx2* може відбуватись у відповідь на холододовий, осмотичний та сольовий стреси [17–19].

Механізм стресової індукції гена *Arx2* та участь у цьому різних ланцюгів передачі сигналів залишається вивченими лише фрагментарно. Встановлено, що рівень транскрипції *Arx2* змінюється залежно від окисно-відновного статусу пулу пластохінону (PQ) у хлоропластах, внутрішньоклітинної концентрації  $H_2O_2$  та абсцизової кислоти (ABA) [15, 16, 20]. Вважається, що експресія *Arx2* контролюється транскрипційними факторами з групи HSF (Heat Shock Transcription Factor) [12] та *Zat10* [18]. Проте все ще залишається незрозумілим, які саме ділянки промотора *Arx2* відповідають за індукцію цього гена у відповідь на різні стресові впливи. Не з'ясованою залишається і тканинспецифічність стресової відповіді.

Раніше нами було встановлено, що промотор гена *Arx2* складається як мінімум із двох функціональних ділянок, одна з яких, що знаходиться на відстані між -322 та -253 пн вище старт-кодону, забезпечує індукцію промотора в умовах теплового стресу, тоді як проксимальна частина промотора виконує енхансерну функцію [21]. Для більш поглибленого розуміння структурно-функціональної організації промотора *Arx2* ми вирішили дослідити його індукцію за дії інших форм абіотичного стресу, пов'язаних із зростанням внутрішньоклітинного рівня  $H_2O_2$ , зокрема – за дії сольового стресу.

### Матеріали і методи

Для дослідження структурно-функціональної організації промотора *Arx2* було використано набір трансгенних ліній *A. thaliana*, які містять сигнальний ген *uidA*, що кодує фермент  $\beta$ -глюкоронідазу (GUS, EC 3.2.1.31), під контролем окремих ділянок промотора *Arx2*. Повномірний промотор гена *Arx2*, який являє собою ділянку розміром 741 пн перед старт-кодоном, було ампліфіковано за допомогою ПЛР із застосуванням термостабільної ДНК-полімерази hot-start *Pfu*-polymerase та клоновано у бактеріальному векторі pLitmus38 [21]. Отриманий клон було використано для створення серії делецій промотору розміром 405, 322 та 253 пн перед старт-кодоном. Ідентичність всіх ділянок промотора була підтверджена контрольним секвенуванням. Кожний з фрагментів промотора було “зшити” із сигнальним геном GUS (рис. 1) у складі бінарного вектора pGPTV-BAR [22] та трансформовано у *A. thaliana* (екотип C24) за допомогою *Agrobacterium* [23]. Попередній скринінг рослин-трансформантів проводили у двотижневому віці шляхом тестування на стійкість до гербіциду БАСТА. Остаточну перевірку позитивних



**Рис. 1.** Структура рекомбінантних конструктів на основі бінарного вектора pGPTV-BAR, які були застосовані для дослідження будови промотора *Arx2*. Потенційний TATA-бокс знаходиться на відстані -177 пн від старт-кодону *Arx2*. Сигнальний ген *uidA* кодує β-глюкоронідазу (GUS), а селективний ген *bar* забезпечує стійкість трансгенних рослин до гербіциду BASTA

трансформантів на присутність та інтактність відповідної ділянки промотора здійснювали за допомогою ПЛР. Враховуючи, що рівень індукції трансформованого промотора може залежати від місця інтеграції у геном та можливого зниження рівня експресії внаслідок сайленсінга, для кожного варіанта рекомбінантного конструкту було досліджено як мінімум три незалежні трансгенні лінії *A. thaliana*.

Рослини вирощували в культивацийній кімнаті у ґрунті за температури 19–20 °С, відносної вологості повітря 60–70 % в умовах 16-годинного світлового дня. Освітленість 2000 люкс. Для індукції стресової відповіді перед стресовою обробкою рослини продовжували культивувати за 28 °С протягом 3 дб [12].

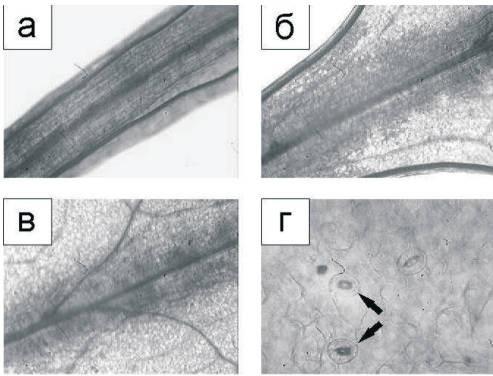
Рослини на стадії 4–6 листків піддавали сольовому стресу. Стресову обробку проводили в темряві протягом 4, 8 або 16 год у 0,5-кратному поживному середовищі Мурасіге-Скуга із додаванням 50 і 100 мМ NaCl або 10 і 50 мМ CaCl<sub>2</sub>. Для проведення сольового стресу в рослин відріза-

ли корені та занурювали місце зрізу в розчин солі. У попередніх дослідах було встановлено, що застосування більш високих концентрацій солей призводило до втрати тургору та загибелі рослин протягом 2 год. Контрольні рослини інкубували на середовищі Мурасіге-Скуга без додавання NaCl та CaCl<sub>2</sub>.

Експресію сигнального гена *uidA* у тканинах *A. thaliana* виявляли цитохімічно з використанням хромогенного субстрату X-GlcA (5-бромо-4-хлоро-індоліл-β-D-глюкуронова кислота). Для цього рослини після стресової обробки занурювали в фарбуючий розчин, що містив 50 мМ Na-фосфат (pH 7,0), 1 мМ X-GlcA, 0,15 % Тритон X-100, 0,5 мМ K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0,5 мМ K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, піддавали вакуум-інфільтрації та витримували в термостаті за 37 °С протягом 24 год до появи синього забарвлення в тканинах, де відбулась експресія конструкту *Arx2::uidA* [24]. Відхлорофілу рослини відмивали 70 % розчином етанолу. Зразки зберігали в 70% розчині етанолу.

### Результати та обговорення

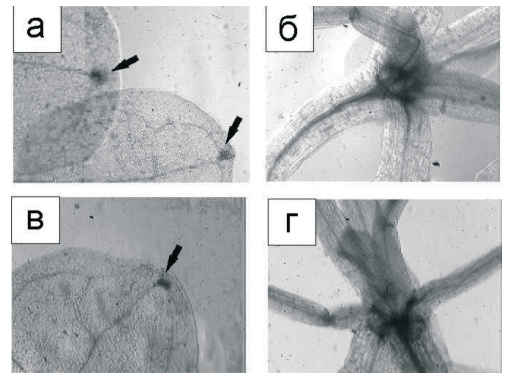
На першому етапі наших експериментів було досліджено вплив підвищених концентрацій NaCl на експресію гена *Arx2*. Отримані результати свідчать, що сольовий стрес призводить до індукції *Arx2* у тканинах надземної частини *A. thaliana*. Зокрема, повнорозмірний промотор гена *Arx2* забезпечує експресію репортерного гена *uidA* у провідних тканинах та мезофілі основи розетки, черешків та листків *A. thaliana* (рис. 2).



**Рис. 2.** Характер експресії сигнального гена *uidA* під контролем повномірного промотора *Arx2* у тканинах листків *A. thaliana* (а-в – різні частини листової пластинки, г – продихи) після обробки 100 mM NaCl протягом 16 год

У рослин, які містили ген *uidA* під контролем фрагментів промотора *Arx2* розміром -405, -322 та -253 пн також виявлено індукцію репортерного гена за дії сольового стресу. Зокрема, у варіанті досліду з фрагментом промотора -405 пн для двох із трьох протестованих ліній було знайдено експресію конструкту *Arx2::uidA* у мезофілі та провідних тканинах листків після впливу 50 та 100 mM NaCl. При дослідженні трансгенних рослин *A. thaliana*, що містили сигнальний ген під контролем фрагмента промотора -322 пн, експресію було знайдено у гідатодах сім'ядоль і листків та у провідних тканинах стебла і листків. При цьому нам вдалося виявити лінію 32-10,

у якої стрес-залежна експресія у провідних тканинах центральної частини розетки була виражена навіть краще, ніж у лінії з повномірним промотором (рис. 3). У клітинах продихів та у мезофілі листків експресії не спостерігалось. Найменший з досліджених фрагментів промотору – 253 пн забезпечував експресію лише у гідатодах сім'ядоль і листків. Отже, експресія *Arx2* у різних тканинах залежить від різних ділянок промотора, що вказує на імовірне залучення різних сигнальних шляхів.



**Рис. 3.** Характер експресії сигнального гена *uidA* під контролем фрагмента промотора *Arx2* розміром 322 пн у гідатодах листків та провідних тканинах пагонів *A. thaliana* (лінія 32-10) після обробки 50 mM NaCl (а, б) або 10 mM CaCl<sub>2</sub> (в, г) протягом 4 год

Відомо, що в умовах сольового стресу клітина транспортує надлишок іонів Na<sup>+</sup> у вакуолі, в той час як іони Ca<sup>2+</sup>, які локалізовані у вакуолях, – у цитозоль. Вихід іонів Ca<sup>2+</sup> у цитозоль призводить до активації Ca-залежних сигнальних шляхів і в кінцевому рахунку – до змін у транскрипції ряду генів. Проте індукція генів сольового стресу може також відбуватись шляхом активації Ca-незалежних сигнальних шляхів [25]. Для того, щоб встановити, чи виявлена нами індукція *Arx2* за дії сольового стресу пов'язана з активацією Ca-залежних сигнальних шляхів, на наступному етапі наших досліджень було перевірено, як обробка *A. thaliana* солями Ca впливає на тран-

скрипцію цього гена. Встановлено, що при обробці  $\text{CaCl}_2$  інтенсивність та характер тканиноспецифічної експресії сигнального гена у дослідах з фрагментами промотора різного розміру була практично такою, як і в дослідах з  $\text{NaCl}$  (рис. 3). Отже, отримані нами дані вказують на участь  $\text{Ca}$ -залежних сигнальних шляхів у індукції *Arx2* за дії сольового стресу.

Слід зазначити, що в окремих випадках для всіх досліджених фрагментів промотора ми спостерігали підсилення експресії репортерного гена *uidA* у листках і сім'ядолях рослин *A. thaliana*, які під час маніпуляцій протягом експерименту зазнали механічного пошкодження. Раніше було встановлено, що за дії світлового стресу поранення підсилювало приблизно в 10 разів експресію *Arx2* у листках *A. thaliana* [16]. При цьому індукція *Arx2* за дії лише поранення (тобто за відсутності надмірного освітлення) була настільки малою, що її вдалось довести лише з використанням ПЛР. Отримані нами дані вказують, що підсилення експресії *Arx2* має місце також і в умовах сольового стресу, що вказує на спільність регуляції стресової відповіді за дії світлового та сольового стресів.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що промотор *Arx2* забезпечує високий рівень експресії сигнального гена в умовах теплового стресу за 37 °С. Вивчення тканиноспецифічності експресії показало, що в рослин *A. thaliana* на стадії 4 листків тепловий стрес активує промотор гена *Arx2* у першу чергу в меристемах кореня та пагона, у примордіях і у всіх клітинах наймолодших листків та в замикаючих клітинах продихів листків і стебла, а також у гідатодах та васкулярних тканинах пагона і кореня. У рослин, які містили ген *uidA* під контролем -405, -322 та -253 пн фрагментів промотора *Arx2* також відбувалась індукція сигнального гена за дії теплового

стресу, але абсолютний рівень активності GUS різко знижувався зі зменшенням розміру промоторного фрагмента [21]. На відміну від сольового, тепловий стрес не викликав достовірної індукції репортерного гена під контролем -253 пн фрагмента промотора *Arx2*. Це дозволило припустити, що промоторні елементи, які забезпечують термозалежну індукцію *Arx2*, мають знаходитись у ділянці промотора між -322 та -253 пн вище старт-кодону, але для забезпечення високого рівня експресії гена *Arx2* необхідна присутність повного промотора, що вказує на енхансерну функцію його проксимальної частини [21]. В цілому, інтенсивність експресії *Arx2* у різних тканинах відрізняється за дії різних форм абіотичного стресу.

Як отримані нами, так і наявні в літературі дані свідчать, що індукція промотора *Arx2* має місце за дії світлового, сольового, теплового та механічного стресів. Спільною рисою всіх цих видів стресу є підвищення внутрішньоклітинного рівня  $\text{H}_2\text{O}_2$  [4, 16, 25]. Відповідно, складається враження, що індукція гена *Arx2* залежить саме від цього параметру. На підтвердження такої точки зору можна також привести дані, що в умовах надмірної інсоляції експресія *Arx2* у васкулярних тканинах пов'язана з підвищенням рівня  $\text{H}_2\text{O}_2$  у клітинах, які оточують судинні пучки листка [26]. Індукція *Arx2* у травмованих тканинах листків *A. thaliana* на світлі відбувається внаслідок порушення електронно-транспортного ланцюга в хлоропластах, що призводить до посилення генерації  $\text{H}_2\text{O}_2$  [16]. Нами також було доведено, що  $\text{H}_2\text{O}_2$  є індуктором *Arx2*, а зростання внутрішньоклітинного рівня  $\text{H}_2\text{O}_2$  є передумовою ефективною експресії *Arx2* за дії теплового стресу [4]. Існує припущення, що стрес-індуковане тканиноспецифічне зростання рівня внутрішньоклітинного  $\text{H}_2\text{O}_2$  може бути частиною системного сиг-



нального шляху, який індукує стійкість рослин до різних стресових факторів навколишнього середовища [5, 9].

Згідно наявним даним експресія *Arx2* має різну тканинспецифічність при тепловому, сольовому та світловому стресі, хоча при всіх цих видах стресу індукція *Arx2* пов'язана зі зростанням внутрішньоклітинного рівня  $H_2O_2$ . Для пояснення різниці у тканинспецифічній експресії гена *Arx2* можна висунути два припущення: (1) рівень  $H_2O_2$  за дії різних форм стресу зростає лише у певних тканинах, і саме там спостерігається індукція *Arx2*; (2) рівень  $H_2O_2$  зростає у всіх тканинах, які зазнали дії стресу, але індукція *Arx2* відбувається по різному, залежно від експресії у різних тканинах необхідних для цього компонентів сигнальних ланцюгів (наприклад, транскрипційних факторів). Враховуючи наше спостереження, що безпосередня обробка рослин *A. thaliana* розчином  $H_2O_2$  викликала індукцію *Arx2* лише у гідатодах та васкулярних тканинах листків та сім'ядоль, але не в меристемі та замикаючих клітинах продихів [21], можна зробити висновок, що підвищення рівня  $H_2O_2$  є необхідною, але не достатньою умовою індукції *Arx2*. Проте для остаточного розуміння механізмів регуляції тканинспецифічної експресії *Arx2* необхідні подальші дослідження, зокрема – по вивченню характеру генерації  $H_2O_2$  у різних тканинах за дії різних форм стресу.

### Висновки

В умовах сольового стресу відбувається індукція промотора *Arx2* в листках *A. thaliana*, що вказує на участь ферменту *APX2* у відповіді рослинної клітини на дію засолення. Індукція *Arx2* за дії сольового стресу пов'язана з активацією Са-залежних сигнальних шляхів. Експресія *Arx2* у різних тканинах контролюється різними ділянками промотора.

### Подяки

Частина використаних у дослідженні трансгенних ліній *A. thaliana* було отримано авторами у співробітництві з проф. Ф. Шофлем (Тюбінген, Німеччина).

### Перелік літератури

1. *Apel K., Hirt H.* Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant. Biol.* – 2004. – Vol. 55. – P. 373–399.
2. *Foyer C., Noctor G.* Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses // *The Plant Cell.* – 2005. – Vol. 17. – P. 1866–1875.
3. *Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F.* Reactive oxygen gene network of plants // *Trends Plant Sci.* – 2004. – Vol. 9, № 10. – P. 490–498.
4. *Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schüffli F.* Heat stress-induced  $H_2O_2$  is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // *Plant. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 61, № 4–5. – P. 733–746.
5. *Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Miszalski Z.* The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses // *Acta Biochimica Polonica.* – 2007. – Vol. 54, № 1. – P. 39–50.
6. *Ball L., Accotto G.-P., Bechtold U., Creissen G., Funck D., Jimenez A., Kular B., Leyland N., Mejia-Carranza J., Reynolds H., Karpinski S., Mullineaux P.M.* Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* – 2004. – Vol. 16. – P. 2448–2462.
7. *Sairam R.K., Tyagi A.* Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants // *Current science.* – 2004. – Vol. 86, № 3. – P. 407–421.
8. *Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K.* Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // *Journal of Experimental Botany.* – 2002. – Vol. 53, № 372. – P. 1305–1319.

9. Dabrowska G., Kata A., Goc A., Szechynska-Hebda M., Skrzypek E. Characterization of the plant ascorbate peroxidase family // *Acta Biologica Cracoviensia*. – 2007. – Vol. 49/1. – P. 7–17.
10. Panchuk I.I., Zentgraf U., Volkov R.A. Expression of the *Apx* gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* // *Planta*. – 2005. – Vol. 222. – P. 926–932.
11. Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V., Mittler R. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, № 49. – P. 34197–34203.
12. Panchuk I.I., Volkov R.A., Schüffli F. Heat stress-and heat shock transcription factor- dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. – 2002. – Vol. 129. – P. 838–853.
13. Narendra S., Venkataramani S., Shen G., Wang J., Pasapula V., Lin Y., Korniyeyev D., Holaday S., Zhang H. The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroximal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development // *Journal of Experimental Botany*. – 2006. – Vol. 57, № 12. – P. 3033–3042.
14. Pnueli L., Liang H., Rozenberg M., Mittler R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic Ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants // *The Plant Journal*. – 2003. – № 34. – P. 187–203.
15. Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G., Mullineaux P. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress // *The Plant Cell*. – 1997. – Vol. 9. – P. 627–640.
16. Chang C. C.-C., Ball L., Fryer M.J., Baker N.R., Karpinski S., Mullineaux P.M. Induction of ascorbate peroxidase 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis // *The Plant Journal*. – 2004. – № 38. – P. 499–511.
17. Hong C.-Y., Hsu Y.T., Tsai Y.-C., Kao C.H. Expression of ascorbate peroxidase 8 in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings in response to NaCl // *Journal of Experimental Botany*. – 2007. – Vol. 58, № 12. – P. 3273–3283.
18. Mittler R., Kim Y.S., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J.-K. Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress // *FEBS Letters*. – 2006. – № 580. – P. 6537–6542.
19. Zimmerman P., Hirsch-Hoffman M., Henning L., Grissem W. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 136. – P. 2621–2632.
20. Rossel J.B., Walter P.B., Hendrickson L., Chow W.S., Poole A., Mullineaux P.M., Pogson B.J. A mutation affecting ascorbate peroxidase 2 gene expression reveals link between responses to high light and drought tolerance // *Plant, Cell and Environment*. – 2006. – № 29. – P. 269–281.
21. Панчук І.І., Пиріжок Р.Ю., Волков Р.А. Експресія сигнального гена *GUS* під контролем промотору *APX2* у трансгенних рослинах арбідопсису // *Геном рослин: Збірник наукових праць V Міжнародної конференції 13–16 жовтня 2008 р.* / Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН (Україна). – Одеса. – 2008. – С. 108–110.
22. Becker D., Kemper E., Schell J., Masteron R. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 20. – P. 1195–1197.
23. Bechtold N., Ellid J., Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // *C.R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* – 1993. – Vol. 316. – P. 1194–1199.
24. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. *GUS* fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO J.* – 1987. – № 6. – P. 3901–3907.

25. Zhu J.-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress // Current opinion in plant biology. – 2003. – Vol. 6. – P. 441–445.
26. Fryer M.J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P.M., Baker N.R. Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves // The Plant Journal. – 2003. – № 33. – P. 691–705.

Представлено М.В. Кучуком  
Надійшла 25.08.2009

ЕКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНОГО ГЕНА *uidA*  
ПОД КОНТРОЛЕМ ФРАГМЕНТОВ ПРОМОТОРА  
*Apx2* У *ARABIDOPSIS THALIANA* В УСЛОВИЯХ  
СОЛЕВОГО СТРЕССА

Р.Ю. Пырижок, Р.А. Волков, И.И. Панчук

Черновицкий национальный университет имени  
Юрия Федьковича

Украина, 58012, Черновцы, ул. Коцюбинского 2  
e-mail: ra.volkov@gmail.com,  
irina.panchuk@gmail.com

Делеционный анализ промотора был использован для картирования элементов ответственных за индукцию гена аскорбат пероксидазы 2 (APX2) *Arabidopsis thaliana* под действием солевого стресса. Различные фрагменты промотора сливали с сигнальным геном *uidA*, полученные конструкции переносили в растения *Arabidopsis thaliana* с помощью *Agrobacterium*. Трансгенные растения обрабатывали растворами 50 или 100 мМ NaCl. После обработки промотор *Apx2* активировался в замыкающих клетках устьиц, гидатодах, а также в васкулярных и мезофильных тканях листьев. Идентичный характер экспрессии наблюдался и после обработки 10 или 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, что указывает на участие Ca-зависимых сигнальных путей в индукции *Apx2*. Механичес-

кое повреждение листьев существенно усиливало индукцию *Apx2* под воздействием солевого стресса. Тканеспецифичность транскрипции *Apx2* контролируется различными частями промотора.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., аскорбат пероксидаза, регуляция транскрипции, солевой стресс.

EXPRESSION OF REPORTER GENE *uidA*  
UNDER CONTROL OF *Apx2* PROMOTER  
FRAGMENTS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*  
UPON SALT STRESS

R. Yu. Pyrizhok, R.A. Volkov, I.I. Panchuk

Fedkovich National University of Chernivtsy  
Ukraine, 58012, Chernivtsy, Kotsubynskoho str. 2  
e-mail: ra.volkov@gmail.com,  
irina.panchuk@gmail.com

Promoter deletion analysis was applied for mapping of sequence elements responsible for the induction of the gene coding for ascorbate peroxidase 2 (APX2) of *Arabidopsis thaliana* upon salt stress. Different fragments of *Apx2* promoter were fused with the reporter gene *uidA* and resultant constructs were transferred in *Arabidopsis thaliana* plants via *Agrobacterium*. Transgenic plants were treated with 50 or 100 mM NaCl solutions. After treatment the *Apx2* promoter was activated in the guard cells, girdatods and in vascular and mesophilic tissues of leaves. The same expression pattern was also observed after application of 10 and 50 mM CaCl<sub>2</sub> indicating involvement of the Ca-dependent signaling pathway in the induction of *Apx2*. Wounding of leaves significantly enhance the induction of *Apx2* upon salt stress. Tissue-specificity of *Apx2* transcription appears to be under the control of different promoter elements.

Key words: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ascorbate peroxidase, regulation of transcription, salt stress.