УДК 57.023 581.1

ІСАЄНКОВ С.В., КРАСНОПЬОРОВА О.Є., БЛЮМ Я.Б.
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: stan.isayenkov@gmail.com

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА ПРОТОННО-НАТРІЄВОГО ОБМІННИКУ HvNHX2 ЯЧМЕНЮ В РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ ПОКРАЩУЄ ПОКАЗНИКИ СОЛЕСТІЙКОСТІ

Подальше збільшення дефіциту води, деградація та виснаження сільськогосподарських земель є однією із глобальних проблем людства. Для того щоб забезпечити зростаючі потреби населення Землі у продуктах харчування, необхідно збільшити продуктивність сільського господарства та використовувати земельні ділянки, що були до цього не придатними для ведення землеробства [1]. Однією із найбільших проблем сучасного сільського господарства є вторинне засолення ґрунтів внаслідок неправильної технології зрошування земель. Внаслідок такого нераціонального природокористування більше ніж 800 мільйонів гектарів світових ґрунтів страждають від надмірного засолення [2]. Окрім того, близько 69 % світового врожаю пшениці страждає від негативного впливу через засолення та дефіциту води. Продуктивність сільського господарства на ґрунтах, що страждають від надмірного засолення можна підняти шляхом впровадження нових сільськогосподарських культур, що мають високі показники солестійкості. Для солестійкості рослин існує ціла низка підходів.

Одним із найбільш перспективних напрямків у покращені солестійкості рослин є застосування мембранних транспортерів моновалентних катіонів для депозитування токсичних іонів, зокрема Na^+, у центральну вакуоль рослинної клітини [3]. Тому вивчення функцій вакуолярних протонно-натрієвих обмінників родини NHX, що відповідають за транспорт моновалентних катіонів у вакуоль є надзвичайно важливим.

Вакуолярні антипортери родини NHX були знайдені у багатьох рослин. Здебільшого рослини мають декілька ізоформ таких протеїнів [4–6]. AtNHX1 із арабідопсису є одним із головних детермінантів стійкості рослин до сольового стресу [7]. Оверекспресія чи експресія різних генів NHX в рослинах демонструє значне підвищення солестійкості рослин [7–11]. Геном ячменю, кодує 4 транспортери родини NHX [7, 12–15]. Слід зазначити, що ячмінь має високий ступінь толерантності до засолення, тому використання протонно-натрієвих обмінників родини NHX із цієї рослини є досить перспективним. Було показано, що експресія генів, які кодують протонно-натрієві обмінники родини NHX із ячменю, можуть значно підвищити солестійкість рослин [7, 14, 15].

Метою цієї роботи було вивчення впливу експресії гена, що кодує протонно-натрієвий обмінник NHX2, на показники солестійкості рослин тютюну.

Матеріали і методи

Клон HvNHX2 був люб'язно наданий кандидатом біологічних наук Олексієм Бабаковим із Інституту фізіології рослин імені Тімірязєва (Москва, Росія). Кодуюча послідовність HvNHX2 (ГенБанк, номер AY247791) була ампліфікована за допомогою ПЛР. На основі нуклеотидної послідовності кодуючої ділянки гена *HvNHX2* була сконструйована пара специфічних праймерів, що містили у собі специфічні attB сайти розпізнавання BP-клонази для Gateaway клонування:

HvNHX2(Gate)_for GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGCCCGATTTGGGGC:

HvNHX2(Gate)_rev GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACTACGGTTTTCTGCCTCTG.

Кодуюча послідовність гена HvNHX2 без стоп кодону довжиною 1639 пн була ампліфікована із використанням Phusion polymerase (Finnzymes, Espoo, Фінляндія) відповідно до рекомендацій компанії виробника. Програма ПЛР ампліфікації мала наступні параметри: 95°C 30 с; 36 циклів: 95 °C 10 с, 64 °C 10 с; 72 °C 30 с; 72 °C 10 хв.

Ампліфікований ПЛР фрагмент виділяли із агарозного гелю та використовували для подальшої реакції BP- рекомбінації із вектор призначення (Destination vector). Реакцію BP-рекомбінації проводили наступним чином: До 6 мкл ампліфікованого ПЛР *HvNHX2*- фрагмента (10 нг/мкл) додавали 1 мкл донорного вектора pDONOR207 (150 нг). Додавали 1 мкл TE buffer, (pH 8,0). До 8 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл BP- кло-

© ІСАЄНКОВ С.В., КРАСНОПЬОРОВА О.Є., БЛЮМ Я.Б.

нази (BP Clonase™ II, Invitrogen, США). Реакцію інкубували при 25 °С протягом 18 годин. Для зупинки реакції та подальшої трансформації компетентних клітин кишкової палички до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнази К та інкубували при 37 °С протягом 10 хв.

Для клонування послідовності *HvNHX2* кДНК у вектор призначення (Destination vector) проводилась реакція LR-рекомбінації. Де до 6 мкл створеного за допомогою BP рекомбінації Entry-клону (100нг) додавали 1 мкл вектор призначення pGWB2 та 1 мкл ТЕ-буферу (pH 8,0). До 8 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл суміші ферментів LR Clonase ™ II та перемішували пікетуванням. Реакцію інкубували при 25 °С протягом 18 годин. Для зупинки реакції до реакційної суміші додавали 1 мкл протеїнази К та інкубували при 37 °С протягом 10 хв.

Для трансформації тютюну використовували конструкцію на основі бінарного вектора pGWB2, що містив 35S промоторну касету із вставкою кодуючої послідовності *HvNHX2* та селективні маркерні гени стійкості до гігроміцину та канаміцину. Для агробактеріальної трансформації використовували експланти молодого листя *N. tabacum* розміром 1,5–2,5 $см^2$. Попередньо пошкодженні листочки тютюну інокулювати в суспензії бактерії протягом 5–10 хвилин. Надлишок агробактерії видаляли шляхом промокання листових експлантів на фільтрувальному папері. Після цього листові експланти тютюну висаджували на середовище для ко-культивації MSR (MS + БАП (1 мг/л) та НУК (0,1 мг/л)) на 28 °С у темноті на дві доби. Після кокультивації із агробактерією листові диски відмивали у стерильній воді та давали добре просушитись на фільтрувальному папері. Відмиті від агробактерії експланти висаджували для подальшої регенерації на MSS середовище (MS + БАП (1 мг/л), НУК (0,1 мг/л), та селективний агент (канаміцин 100мкг/мл)). Для агробактеріальної трансформації було використано штами GV 3101.

Загальну РНК виділяли із тканин тютюну за допомогою TRIzol-реагенту (Invitrogen, США) відповідно до інструкцій компанії виробника. Кількісний аналіз РНК здійснювали методом спектрофотометрії. Інтактність отриманої РНК визначали шляхом електрофорезу у 1 % агарозному гелі.

Синтез кДНК проводили за допомогою системи SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, США) відповідно до рекомендацій компанії - виробника.

Експресію *HvNHX2* визначали за допомогою ПЛР на матриці синтезованої кДНК. Для проведення ПЛР реакції до 50 мкл реакційної суміші, що містила у собі 1xTaq ПЛР буфер, 200 мкМ дНТП суміші, та 0,5мкл Taq-полімерази (Promega, США), додавали 3 мкл реакційної суміші зворотної транскрипції. Програма ПЛР ампліфікації мала наступні параметри: 95 °С 4 хв; 35 циклів: 95 °С 30 с, 55 °С 30 с, 72 °С 30 с; 72 °С 7 хв. Та специфічних праймерів до HvNHX2: HvNHX2_for gtcattctgctctgcaccaa; HvNHX2_rev catagcaccgagcgtgatta

Для адаптації рослин до атмосфери відкритого повітря регенеранти переносили на рідке гідропонне середовище Хогленда, що готували за наступним прописом:

Макроелементи -202 г/л KNO_3, 472 г/л $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 493 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 80 г/л NH_4NO_3, 15 г/л Fe III хелат. Мікроелементи – 2,86 г/л H_3BO_3, 1,81 г/л $MnCl_2 \cdot 4H2O$, 0,22 г/л $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,051 г/л $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,12 г/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 (pH 6,0).

Для проведення експериментів на солестійкість дослідні рослини тютюну віком 3 тижні висаджували на рідке середовище Хогленда після інкубації рослин протягом 1 тижня. Частину рослин переносили на рідке середовище, що додатково містило 250 мМ NaCl. Інкубацію рослин на високих концентраціях NaCl проводили протягом 4 тижнів. Для визначення приросту та ваги свіжих тканин, рослини1 раз на тиждень видаляли із гідропонного рідкого середовища із різним вмістом NaCl. Надлишки рідини видаляли за допомогою фільтрувального паперу. Масу рослин вимірювали за допомогою аналітичних вагів. Після вимірювання ваги рослини переміщували назад у рідке середовище культивування. Експерименти проводили для чотирьох незалежних ліній рослин в контрольних умовах та умовах сольового стресу.

Відносний приріст кожної рослини розраховували за формулою: RGR = (ln W2 – ln W1)/(t2–t1), Де: ln = натуральний логарифм; t1 = перший час виміру (дні); t2 = другий час виміру(дні); W1 = свіжа вага рослини при першому часі виміру (грами); W2 = свіжа вага рослини при другому часі виміру (грами).

Окрім розрахунку відносного приросту кожної рослини, проводилася оцінка виживання рослин після кожного тижня інкубації на контрольному середовищі та середовищі із високим вмістом NaCl. Експерименти повторювали тричі.

HvNHX2 0 мМ NaCl | HvNHX2 250 мМ NaCl | HvNHX2 250 мМ NaCl | контроль 250 мМ NaCl

Рис. 1. Токсичні ефекти дії високих концентрацій NaCl на рослини тютюну. Рослини після 4 тижнів інкубації на середовищі із 250 мМ NaCl

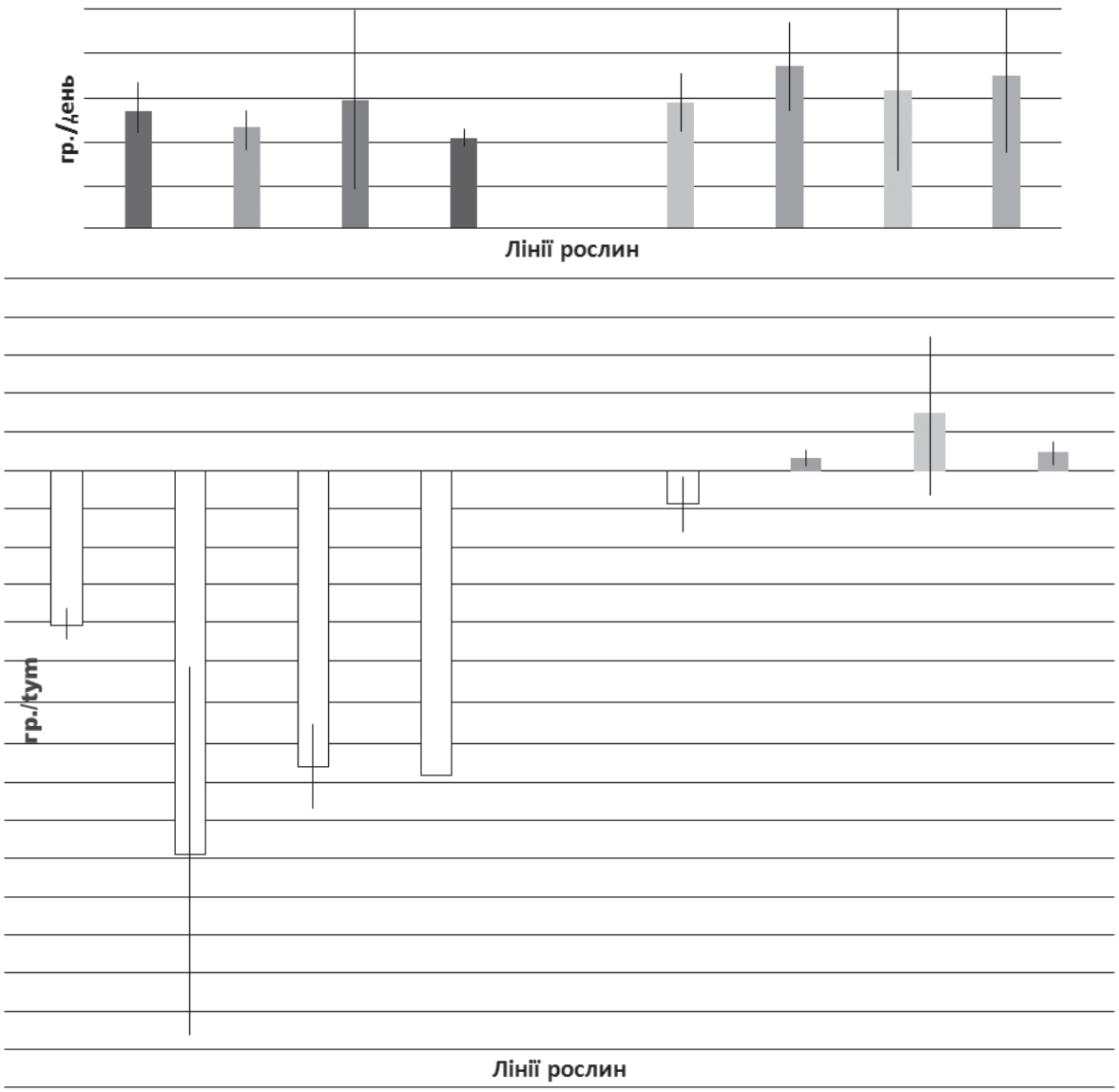

Рис. 2. Відносний приріст рослин тютюну, що були трансформовані HvNHX2, за день при культивації на різних типах середовища. А – приріст на звичайному середовищі Хогленда. Б – приріст на середовищі, що містило 250 мМ NaCl. Лінії рослин марковані літерою с є контрольними буз вставки *HvNHX2*. Лінії рослин марковані літерою n трансформанти, що демонструють експресію гена *HvNHX2*

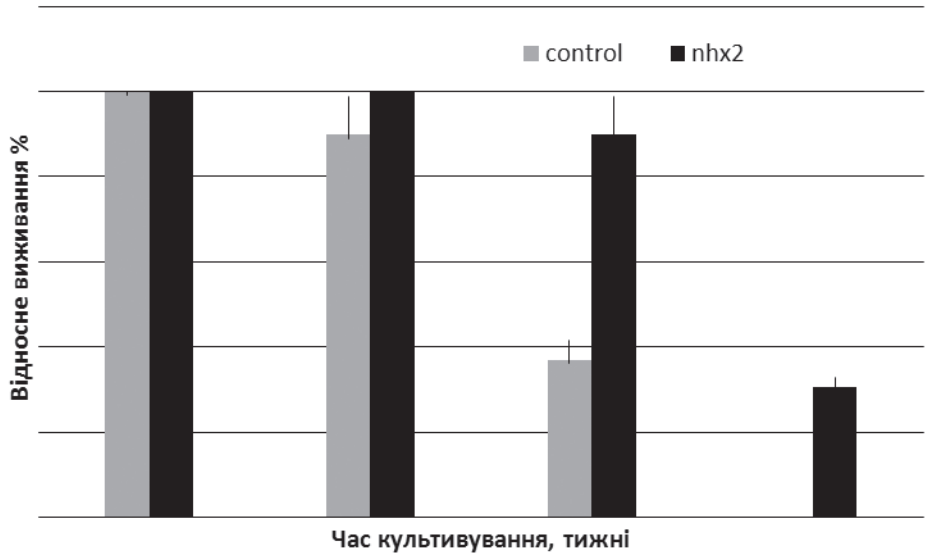

Рис. 3. Виживання рослин тютюну протягом чотирьох тижнів на високих концентраціях NaCl. Control – контрольні рослини без *HvNHX2* гена. *Nhx2* – рослини, що демонструють експресію гена *HvNHX2*

Результати та обговорення

У ході аналізу експресії привнесеного гена в трансформанти тютюну було отримано та проаналізовано 17 трансгенних ліній тютюну стійких до канаміцину. Перевірка експресії гена HvNHX2 в трансформованих рослинах, що мали стійкість до антибіотика, методом ЗТ-ПЛР дозволила ідентифікувати 9 незалежних ліній рослин, що мали стабільний рівень експресії цього трансгена. У подальшому відібрані лінії рослин, що експресують HvNHX2 були використані для фізіологічних тестів оцінки солестійкості. Рослини висаджували на гідропонне середовище із вмістом NaCl.

У ході проведення цих експериментів було виявлено, що трансформовані рослини здатні виживати на середовищі із 250 мМ NaCl, яке було летальним для контрольних рослин (рис. 1). У ході проведення цього експерименту деякі лінії трансформантів демонстрували дуже незначний приріст у масі (рис. 2). Проте контрольні рослини, що не містили ген HvNHX2 швидко втрачали вагу та гинули (рис. 2). Окрім того після культивації рослин із 250 мМ NaCl протягом 4 тижнів виживання HvNHX2- трансформантів становили близько 38. На відміну від HvNHX2- трансформантів, лінії контрольних рослин повністю гинули через 4 тижні культивації на середовищі із високим вмістом NaCl (рис. 3).

Висновки

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що привнесення гена протонно-натрієвого обмінника ячменю HvNHX2 у геном тютюну, значно підвищувало параметри солестійкості трансформантів. Було показано, що на відміну від контрольних рослин, що експресують *HvNHX2*, здатні виживати на середовищі із 250 мМ NaCl протягом 4 тижнів. Така концентрація NaCl є летальною для рослин дикого типу. Таким чином, запропонований нами підхід підвищення солестійкості рослин, шляхом експресії генів протонно-натрієвих обмінників родини NHX, має гарні перспективи для широкого застосування у майбутньому біотехнологічному покращенні сільськогосподарських рослин та для використання групи цих генів для подальшої молекулярної селекції.

ЛІТЕРАТУРА

1. O'Leary J.W. Adaptive Components of salt tolerance // In: Handbook of plant and crop physiology. – Mohammad Pessarakli, ed. Marcel Dekker: Inc. NY, 1995. – P. 577–585.
2. FAO. FAO Land and Plant Nutrition Management Service [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush. – 2008.
3. Ісаєнков С.В. Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу рослин // Цитологія і генетика. – 2012. – 46, № 5. – С. 50–71.
4. Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na+/H+ antiport in *Arabidopsis* // Science. – 1999. – 285. – P. 1656–1658.
5. Xue Z.Y., Zhi D.Y., Xue G.P., Zhang H., Zhao Y.X., Xia G.M. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na+/H+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na+ // Plant Sci. – 2004. – 167. – P. 849–859.
6. Zhang H.X., Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit // Nat. Biotechnol. – 2001. – 19. – P. 765–768.
7. Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H., Tanaka Y. Function, intracellular localization and the importance of salt tolerance of a vacuolar Na+/H+ antiporter from rice // Plant and Cell Physiol. – 2004. – 45. – P. 146–159.
8. Chen Z.H., Pottosin I.I., Cuin T.A., Fuglsang A.T.,Tester M., Jha D., Zepeda-jazo I., Zhou M., Palmgren G., Newman A., Shabala S. Root plasma membrane transporters controlling K+/Na+ homeostasis in salt-stressed barley // Plant Physiol. – 2007. – 145. – P. 1714–1725.
9. Yokoi S., Quintero F.J., Cubero B., Ruiz M.T., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Pardo J.M. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na+/H+ antiporters in the salt stress response // Plant J. – 2002. – 30. – P. 529–539.
10. Rodriguez-Rosales M.P., Jiang X., Galvez F.J., Aranda M.N., Cubero B., Venema K. Overexpression of the tomato K+/H+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization // New Phytol. – 2008. – 179. – P. 366–377.
11. Jiang X., Leidi E.O., Pardo J.M. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? // Plant Signaling & Behavior. – 2010. – 5. – P. 792–795
12. Vasekina A.V., Yershov P.V., Reshetova O.S., Tikhonova T.V., Lunin V.G., Trofimova M.S., Babakov A.V. Vacuolar Na+/H+ antiporter from barley: Identification and response to salt stress // Biochemistry (Moscow). – 2005. – 70, N 1. – P. 100–107.
13. Roslyakova T., Lasareva E., Kononenko N., Babakov A. New Isoform HvNHX3 of Vacuolar Na+/H+–antiporter in Barley: Expression and Immunolocalization // Biochemistry (Moscow) – 2009. – 74, N 5. – P. 549–556
14. Bayat F.,Shiran B., Belyaev D.V., Yur'eva N.O., Sobol'kova G.I., Alizadeh H., Khodambashia M., Babakov A.V. Potato plants bearing a vacuolar Na+/H+ antiporter HvNHX2 from Barley are characterized by improved salt tolerance // Russian J. Plant Phys. – 2010. – 57, N 5. – P. 696–606.
15. Bayat F., Shiran B., Belyaev D.V. Overexpression of HvNHX2, a vacuolar Na+ /H+ antiporter gene from barley, improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana // AJCS. – 2011 – 5, N 4. – P. 428–432.

ISAYENKOV S.V., KRASNOPEROVA O.E., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. of Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a, e-mail: stan.isayenkovo@gmail.com

THE EXPRESSION OF GENE ENCODING NA+/H+ EXCHANGER HVNHX2 FROM BARLEY IMPROVES THE SALT TOLERANS IM TOBACCO

Aims. In this study, the gene encoding HvNHX2, a vacuolar Na+/H+ exchanger from barley was transferred to tobacco plants by *Agrobacterium*-mediated transformation in order to evaluate the improvement of salt tolerance. ***Methods***. Gateaway cloning, RT-PCR and PCR, *in vitro* plant culture and transformation, physiological tests were combined to evaluate efficiency of transformation and ability to tolerate high salt concentrations. ***Results***. The significant improvement salt tolerance were detected in transgenic tobacco lines after expression of *HvNHX2* gene in these plants. The *HvNHX2* expressing plants are able to survive on lethal for the wild type concentrations of NaCl (250 mM). ***Conclusions.*** Suggested approach to improve the salt tolerance of plants by gene expression one of key Na+/H+ antiporter has a great potential for the further application in plant biotechnology and molecular breeding.

Keywords: salt tolerance, tobacco, Na+/H+ exchanger, plant transformation, HvNHX2, plant biotechnology.