



УДК 57.023 581.1

С. В. Ісаєнков, А. Міан, Ф. Й. М. Маатхаус

Трансформація рису генами калієвих каналів родини ТРК покращує показники приросту маси рослин в умовах сольового та водного стресу

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

Досліджено характер відповіді рослин рису на дію водного стресу (16% поліетиленгліколь 4000), високих концентрацій NaCl, KCl та комбінації малих концентрацій KCl з високими NaCl при трансформації генами, що кодують вакуолярні калієві канали родини ТРК, а саме OsTRKa та OsTRKb. Показано, що рослини, трансформовані OsTRKa, більш стійкі до впливу високих концентрацій NaCl та KCl. Порівняно із OsTRKa трансформантами рослини рису, що були трансформовані геном OsTRKb, є більш стійкими до впливу водного стресу та високих концентрацій NaCl за наявності у середовищі культивування 50 мкМ KCl. Таким чином, встановлено, що трансформація рослин генами вакуолярних калієвих каналів родини ТРК з метою підвищення рівня експресії останніх покращує показники стійкості до дії високих концентрацій NaCl, KCl та дефіциту води. Стійкість трансформантів до дії сольового та водного стресу відрізняється за своїм характером і залежить від типу гена, що був додатково привнесений у геном рису.

Ключові слова: рис, ТРК, вакуолярні калієві канали, сольовий стрес, водний стрес.

Зростаючий попит на продукти харчування потребує підвищення ефективності світового сільського господарства та раціонального використання земельних та водних ресурсів [1, 2]. Одним із важливих завдань світового сільського господарства є можливість вирощування агрокультур на землях, що були не придатними для ведення землеробства. Засолення ґрунтів внаслідок недбалої іригації та дефіцит води — головні чинники, що обмежують продуктивність землеробства в багатьох куточках нашої планети. З огляду на такі факти, як зміна клімату та зростання населення Землі, проблеми деградації та засолення ґрунтів, збільшення дефіциту води буде лише зростати і набувати все більшої актуальності [3]. Таким чином, токсичність солей, осмотичний шок є одними із головних факторів, що обмежують продуктивність сільського господарства та знижують біорізноманіття видів. Рис є надзвичайно важливою агрокультурою для людства. Ця культура має високу чутливість

© С. В. Ісаєнков, А. Міан, Ф. Й. М. Маатхаус, 2015

до засолення та є вибагливою до води. Крім того, регіони, що залежать від рисової дієти, знають значного негативного впливу від надмірного засолення чи дефіциту води. Розвиток сольового чи водного стресу супроводжується порушенням осмотичного та іонного гомеостазу, появою вторинного оксидативного стресу [4]. Негативні ефекти сольового та водного стресів обумовлені цитотоксичністю 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. Одним із важливих механізмів мінімізації цитотоксичних ефектів Na^+ є підтримання високих концентрацій K^+ у цитоплазмі відносно Na^+ [5, 6]. Білки, що відповідають за клітинний транспорт K^+ , можуть брати участь у підтриманні оптимального для цитоплазми клітини Na^+/K^+ балансу. Калієві канали родини ТРК забезпечують транспорт K^+ між цитоплазмою та вакуолею чи іншими клітинними компартментами, оточеними мембраною [7, 8]. Існують дані, що вказують на участь цих каналів у регуляції осмотичного та сольового стресу [9, 10]. Цікавим фактом є те, що ТРК-канали рису (*OsTPKa* та *OsTPKb*) мають різну вакуолярну спеціалізацію. *OsTPKa* локалізується у тонопласті літичної вакуолі, а тонопласт протеїнових вакуоль містить *OsTPKb* [11].

Метою цього дослідження було спробувати підвищити стійкість рослин рису до сольового та осмотичного стресу шляхом трансформації рослин окремими генами вакуолярних калієвих каналів родини ТРК для підвищення їх експресії та порівняти ефекти, пов'язані із типом стресу та типом каналу.

Матеріали та методи. Експерименти проводили із трансформованими проростками рису (сорт *Nipponbare*) віком 4 тижні, що культивували на рідкому поживному середовищі (1,25 мМ KNO_3 ; 0,5 мМ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,5 мМ MgSO_4 ; 42,5 мкМ Fe-EDTA ; 0,625 мМ KH_2PO_4 ; 0,16 мкМ CuSO_4 ; 0,38 мкМ ZnSO_4 ; 1,8 мкМ MnSO_4 ; 45 мкМ H_3BO_3 ; 0,015 мкМ $(\text{NH}_4)_2\text{MO}_7\text{O}_{24}$; 0,01 мкМ CoCl_2 (рН 5,5–6,0)). Проростки з насіння регенерованих рослин, що не мали стійкості до гігроміцину, використовували як контроль. Через 4 тижні після проростання проростки рису розділяли на експериментальні групи та переносили на рідке поживне середовище, що містило високі та надвисокі концентрації солей Na^+ чи K^+ (25 мМ чи 50 мМ) або комбінацію із низького вмісту K^+ (50 мкМ) та високих концентрацій Na^+ (25 мМ чи 50 мМ), для моделювання різних типів сольового стресу та осмотичного шоку. Для моделювання середовища без K^+ солі KNO_3 та KH_2PO_4 були замінені на відповідні солі з Na^+ . Умови водного стресу створювали шляхом додавання до рідкого гідропонного середовища поліетиленгліколю з молекулярною масою 4000 у концентрації 16% (PEG 4000, "Fluka", Швейцарія). Групи рослин, де умови культивування не змінювалися, використовували як фізіологічний контроль та відбирали для аналізу разом із дослідними зразками.

Агробактеріальна трансформація рису генетичними конструкціями для підсилення експресії *OsTPKa* та *OsTPKb* проводилась як описано в роботі [12]. Клони кДНК із *OsTPKa* та *OsTPKb* були отримані з Центру геному рису (Rice Genome Resource Center (RGRC), Японія). Кодуючі послідовності генів калієвих каналів родини ТРК під контролем *CaMV-35S* промотору були клоновані в бінарний вектор pGreen0179 (<http://www.pgreen.ac.uk>) за допомогою рестрикції мультіклонального сайту рестриктазами *XhoI*, *SmaI* для *OsTPKa* чи *EcoRI*, *SmaI* для *OsTPKb* та подальшого лігування Т4-ДНК лігазою (NEB, Велика Британія). Трансгенні рослини відбирали методом ПЛР-аналізу геномної ДНК за допомогою праймерів, специфічних до послідовностей *CaMV-35S* промотору і кодуючих послідовностей *OsTPKa* та *OsTPKb*:

35S_for GCATGGGGATGAGGTTTTTA;



Рис. 1. Результати ПЛР-аналізу первинних трансформантів рису за допомогою праймерів, специфічних до CaMV-35S промотору та кодуючої послідовності *OsTPKa* чи *OsTPKb*: *a* — детекція *OsTPKa* трансформантів; *b* — детекція *OsTPKb* трансформантів.

1 — негативний контроль, без матриці; 2–8 — геномна ДНК із незалежних трансформованих ліній рису. М — молекулярний маркер

OsTPKa_rev CTGAGCAGATTGTGCTAG;

OsTPKb_rev ACGCAGGGAAGGCGGCGGGT.

Програма ПЛР ампліфікації мала такі параметри: 95 °C 4 хв; 40 циклів: 95 °C 30 с; 55 °C 30 с; 72 °C 60 с; 72 °C 10 хв.

Трансформовані та контрольні рослини віком 4 тижні інкубували в різних стресових умовах від 2 до 4 тижнів. Для визначення відносного рівня приросту щотижня визначали масу кожної окремої рослини для кожного типу стресу та лінії рослин. Для усереднення даних для кожної експериментальної точки проводились виміри від 6 до 9 рослин. Відносний рівень приросту визначали відповідно до методики Пуртера та Гарнієра [13]. Експерименти повторювали три рази. Дані виражали у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення (SD).

Результати та їх обговорення. В ході ПЛР-аналізу проростків, отриманих від регенерованих рослин, були відібрані зразки, що містили послідовності CaMV-35S промотору разом із кДНК генів ТРК каналів рису (рис. 1). ПЛР-позитивні проростки рису разом із контрольною лінією рослин культивували на стандартному гідропонному середовищі протягом 3 тижнів, потім переміщували для подальшого аналізу відносного рівня приросту біомаси на рідке середовище із стресовим чинником, а саме високими концентраціями NaCl чи KCl (25 mM чи 50 mM), дефіцитом K^+ , 16% розчином поліетиленгліколю 4000, високими концентраціями NaCl разом із 50 мкМ KCl. Як показують результати експериментів, за умов майже всіх типів стресу, крім дефіциту калію, ріст рослин значно знижувався або навіть повністю пригнічувався (рис. 2).

Трансформовані *OsTPKa* рослини рису виявляли стійкість до впливу помірного солявого стресу (25 mM NaCl).

Треба також зазначити, що рослини із додатково привнесеним *OsTPKa* мали істотно вищий рівень приросту біомаси при культивуванні на середовищі із 25 mM KCl (див. рис. 2). З огляду на те, що *OsTPKa* широко поширений у всіх тканинах рису, трансформація рослин додатковими копіями відповідного гена може значно покращити гомеостаз K^+ рослин [8]. Покращення гомеостазу K^+ сприяє підвищенню стійкості рослин до цитотоксичної дії іонів Na^+ чи накопичення та зберігання надлишкового K^+ у центральній літичній вакуолі, що може займати до 80% клітинного об'єму. Таке накопичення K^+ у вакуолі мінімізує токсичні ефекти високих концентрацій цього елемента, з іншого боку, є джерелом насичення цитоплазми рослин K^+ та утримання оптимального електрохімічного мембранного градієнта, що перешкоджає потраплянню токсичного Na^+ у цитозоль та запобігає порушенню метаболічного статусу клітини.

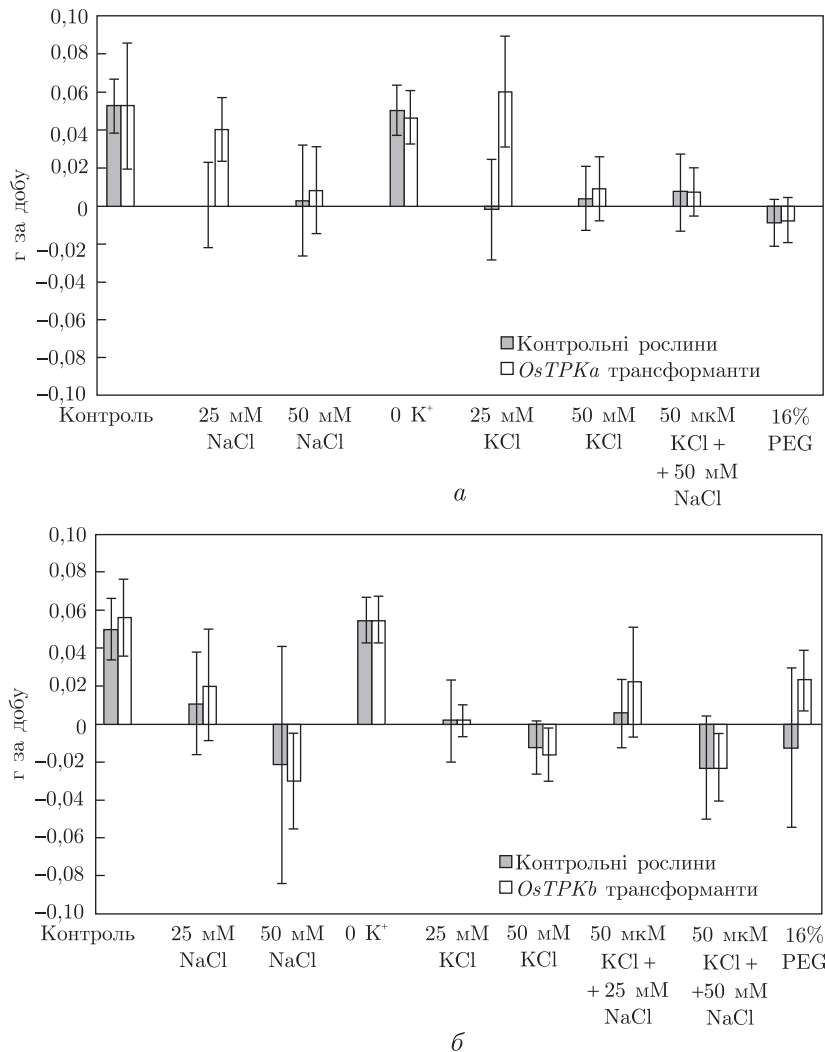


Рис. 2. Відносний приріст маси в трансформантах та контрольних рослинах рису за умов дії різних типів стресу: *a* — рослини, трансформовані *OsTPKa*; *б* — рослини, трансформовані *OsTPKb*
 Умови культивування: контроль — стандартне поживне середовище; середовище із додаванням 25 та 50 мМ NaCl (сольовий стрес); 0 K⁺ — середовище без калію (дефіцит калію); середовище із додаванням 25 або 50 мМ KCl (токсичність K⁺); середовище із комбінацією низьких концентрацій (50 мкМ) KCl та високих концентрацій (25 або 50 мМ) NaCl (протекція клітин за допомогою K⁺); 16% PEG — середовище із додаванням поліетиленгліколю 4000 до кінцевої концентрації 16% (водний стрес)

На відміну від *OsTPKa* трансформантів, характер відповіді рослин, трансформованих геном *OsTPKb*, дещо відрізнявся (див. рис. 2). Рослини, трансформовані *OsTPKb*, виявляли вищу порівняно з контрольними стійкість при водному стресі (16% поліетиленгліколь) та при культивуванні в умовах помірного сольового стресу (25 мМ NaCl) із додаванням 50 мкМ KCl. Таким чином, цілком вірогідно, що деякі механізми осмопротекції рослинних клітин іонами K⁺ опосередковані роботою калієвого каналу протеїнових вакуоль *OsTPKb*. Вірогідно, що цей калієвий канал відіграє важливу роль і при регуляції водного стресу при проростанні насіння та захисті його клітин від токсичного впливу NaCl та осмотичного шоку. Порівнюючи між собою відносний рівень приросту в трансформованих рослин,

значимо, що індекс росту *OsTPKa* трансформантів був вищим, ніж у трансформованих *OsTPKb* та контрольних рослин, при дії 25 мМ NaCl чи 25 мМ KCl (див. рис. 2). Цікавим фактом є те, що рівень відносного приросту майже не відрізнявся для трансгенних та контрольних рослин при вирощуванні їх на середовищі, вільному від калію (див. рис. 2). Невеликі варіації, що спостерігалися для даного типу експериментів, були в межах похибки.

Таким чином, згідно з результатами експериментів, трансформація рису генами калієвих каналів родини ТРК може істотно підвищити показники соле- та посухостійкості рослин. Показано, що отримані трансгенні рослини мають кращі показники приросту в різних умовах сольового та водного стресу. Характер стійкості рослин залежить від типу гена, що був додатково привнесений у геном рису. Підвищення експресії цього гена даного каналу веде до покращення калієвого гомеостазу рослини. Цілком ймовірно, що тканини отриманих трансгенних рослин містили у собі більше іонів K^+ порівняно з диким типом. Тому такі рослини, що мають покращений гомеостаз K^+ , потребують та накопичують у своїх тканинах значно меншу кількість цитотоксичного Na^+ для подолання осмотичного шоку. Осмотичний шок тісно пов'язаний із сольовим стресом та водним дефіцитом.

Наші дані свідчать про те, що застосування калієвих каналів родини ТРК для покращення характеристик соле- та посухостійкості рослин, а саме рису, може позитивно впливати на ці показники.

Цитована література

1. O'Leary J. W. Adaptive components of salt tolerance // Handbook of plant and crop physiology. – New York: Marcel Dekker, 1995. – P. 577–585.
2. Van Hoorn J. W., van Alphen J. G. Salinity control // Drainage Principles and Applications. – Wageningen: ILRI, 2006. – P. 533–600.
3. FAO. FAO Land and Plant Nutrition Management Service // Available online: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. – 2008.
4. Ісаєнков С. В. Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу рослин // Цитология и генетика. – 2012. – **5**. – С. 50–71.
5. Zhu J.-K. Plant salt tolerance // Trends Plant Sci. – 2001. – **6**. – P. 66–71.
6. 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.
7. 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.
8. Isayenkov S., Isner J.-C., Maathuis F. J. M. Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role // Plant Signal. Behav. – 2011. – **6**. – P. 1201–1204.
9. 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.
10. 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.
11. Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M. Rice two-pore K^+ channels are expressed in different types of vacuoles // Plant Cell. – 2011. – **23**. – P. 756–768.
12. Vain P., Harvey A., Worland B. et al. The effect of additional virulence genes on transformation efficiency, transgene integration and expression in rice plants using the pGreen/pSoup dual binary vector system // Transgenic Res. – 2004. – **13**. – P. 593–603.
13. Poorter H., Garnier E. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components // Handbook of Functional Plant Ecology. – New York: Marcel Dekker, 1999. – P. 81–120.

References

1. O'Leary J. W. Handbook of plant and crop physiology, New York: Marcel Dekker, 1995.
2. Van Hoorn J. W., van Alphen J. G. Drainage Principles and Applications, Wageningen, ILRI, 2006.
3. FAO Land and Plant Nutrition Management Service, <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>, 2008.
4. Isayenkov S. V. Cytology & Genetics, 2012, **5**: 50–71 (in Ukrainian).
5. Zhu J.-K. Trends Plant Sci., 2001, **6**: 66–71.
6. Maathuis F. J. M., Amtmann A.K. Ann. Bot., 1999, **84**: 123–133.
7. Gobert A., Isayenkov S., Voelker C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, **104**: 10726–10731.
8. Isayenkov S., Isner J.-C., Maathuis F. J. M. Plant Signal. Behav., 2011, **6**: 1201–1204.
9. Hamamoto S., Marui J., Matsuoka K. et al. J. Biol. Chem., 2008, **283**: 1911–1920.
10. Wang F., Deng S., Ding M. et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2013, **112**: 19–31.
11. Isayenkov S., Isner J.C., Maathuis F. J. M. Plant Cell., 2011, **23**: 756–768.
12. Vain P., Harvey A., Worland B. et al. Transgenic Res., 2004, **13**: 593–603.
13. Poorter H., Garnier E. Handbook of Functional Plant Ecology, New York: Marcel Dekker, 1999: 81–120.

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ
Університет м. Йорк, Великобританія

Надійшло до редакції 24.06.2015

С. В. Исаенков, А. Миан, Ф. Й. М. Маатхаус

Трансформация риса генами калиевых каналов семейства ТРК улучшает показатели прироста массы растений в условиях солевого стресса

ГУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ
Університет г. Йорк, Великобританія

Исследован характер ответа риса на действие водного стресса (16% полиэтиленгликоль 4000), высоких концентраций NaCl, KCl и комбинации невысоких концентраций KCl с высокими NaCl при трансформации растений генами вакуолярных калиевых каналов семейства ТРК, а именно OsTRKa и OsTRKb. Показано, что растения, трансформированные OsTRKa, более устойчивы к влиянию высоких концентраций NaCl и KCl. По сравнению с OsTRKa трансформантами растения риса, трансформированные геном OsTRKb, более устойчивы к воздействию водного стресса и высоких концентраций NaCl при наличии 50 мкМ KCl в среде культивирования. Таким образом, установлено, что трансформация растений генами вакуолярных калиевых каналов семейства ТРК для повышения уровня экспрессии последних улучшает показатели устойчивости к воздействию высоких концентраций NaCl, KCl и водного дефицита. Устойчивость трансформированных растений к воздействию солевого и водного стрессов отличается по своему характеру и зависит от типа гена, который был дополнительно привнесен в геном риса.

Ключевые слова: рис, ТРК, вакуолярные калиевые каналы, солевой стресс, водный стресс.

S. V. Isayenkov, A. Mian, F. J. M. Maathuis

Transformation of rice by genes encoding the potassium TPK channels improves the plant relative growth rates under salinity and drought stress conditions

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev
University of York, United Kingdom

The plant responses to the drought (16% PEG), high concentration of NaCl, KCl and combination of moderate KCl concentrations together with high NaCl ones under the transformation of rice by TPK genes are studied. The OsTPKa transformants exhibit a higher tolerance to the high NaCl or KCl concentrations in cultivation medium. In contrast with OsTPKa transformants, the plants transformed by OsTPKb were more tolerant to the drought stress and the high NaCl concentration supplemented by 50 μ M KCl. It is shown that the plant transformation by the genes of TPK channels for the further elevation of their gene expression levels could improve the tolerance to the drought stress, high NaCl or KCl concentrations. The tolerance manner of transformed plants is different and depends on the type of a gene inserted into the rice genome.

Keywords: rice, TPK, vacuolar potassium channels, salt stress, drought stress.