

Н. О. Коваленко, Т. О. Палладіна

## Експресія генів $H^+$ -АТФази плазматичних мембран клітин коренів кукурудзи за умов сольового стресу та дії біоактивних препаратів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костериним)

*Досліджено вплив біоактивних препаратів метіур та івін на експресію генів  $H^+$ -АТФази плазматичних мембран у клітинах коренів проростків кукурудзи, експонованих у присутності 0,1 М NaCl. Показано, що сольова експозиція проростків протягом доби викликала короткочасне посилення експресії генів  $H^+$ -АТФази. За відсутності сольової експозиції обидва препарати призводили до підвищення експресії її генів, яка з часом знижувалась. За умов однодобової сольової експозиції проростків, вироцених з обробленого препаратами насіння, експресія генів цього ензиму послаблювалася, тоді як при її подовженні до 10 діб – посилювалася у варіанті з метіуром. Таким чином, показаний нами раніше позитивний вплив цих препаратів, зокрема метіуру, на функціонування  $H^+$ -АТФази за умов сольового стресу не пов'язаний з посиленням експресії її генів, а здійснюється, очевидно, на молекулярному рівні.*

Засоленість ґрунтів є для рослин найсильнішим стресовим фактором, що обмежує їх видову різноманітність та перешкоджає агровиробництву у багатьох регіонах світу. Утворення стану сольового стресу полягає в порушенні осмотичного та іонного гомеостазу і супроводжується виникненням вторинного окиснювального стресу. Проте важкість його дії визначається присутністю натрію, який є головним катіоном солей, що засолюють ґрунти. Натрій є токсичним елементом для рослинних організмів, який порушує перебіг метаболізму в клітинах, і тому вони видаляють його з цитоплазми назовні та до вакуолярного простору. Цей процес здійснюється за допомогою вторинно-активних  $Na^+/H^+$ -антипортерів, які функціонують у плазматичних і вакуолярних мембранах за рахунок енергії електрохімічних потенціалів, створених на них первинно-активними  $H^+$ -насосами [1].

Механізм роботи електрогенного  $H^+$ -насоса в плазматичній мембрані репрезентовано  $H^+$ -АТФазою Е-Р типу, тоді як у плазматичній мембрані тваринних клітин функціонує  $Na^+$ -насос, репрезентований  $Na^+/K^+$ -АТФазою того ж типу, що саме зумовлює докорінну різницю у ставленні цих організмів до натрію. Білок  $H^+$ -АТФази плазматичної мембрани кодується мультигенною родиною, яка в кукурудзи складається з чотирьох генів [2]. Активність цієї  $H^+$ -АТФази значно посилюється за дії стресових факторів, зокрема умов засолення, що визначає її важливість для формування солестійкості рослин [3–5]. Регуляція активності цього ферменту відбувається на генетичному рівні, де важливу роль відіграють міРНК як ключові регулятори експресії генів на постраскрипційному рівні [6], а також на молекулярному рівні, зокрема за допомогою регуляторних білків 14-3-3, які фосфорилюють аутоінгібіторний домен  $H^+$ -АТФази, посилюючи її транспортувальну активність [7].

Раніше нашою групою було досліджено здатність певних біоактивних препаратів посилювати функціонування  $H^+$ -насосів та  $Na^+/H^+$ -антипортерів у мембранах клітин коренів

проростків кукурудзи за умов засолення з метою їх використання як альтернативи посиленню солестійкості рослин методами генної інженерії. Порівняння солепротекторної дії препаратів метіур (6-метил-2-меркапто-4-гідроксипіримідин) та івін (N-оксид-2,6-диметилпіридин) показало перевагу першого з них [8]. Також вищою є ефективність метіуру щодо посилення функціонування  $H^+$ -насосів та  $Na^+/H^+$ -антипортерів у плазматичних та вакуолярних мембранах клітин коренів [5, 9]. У зв'язку з цим постала необхідність визначити, як зазначені препарати впливають на роботу даних систем — шляхом посилення експресії їх генів чи молекулярних змін білків.

Метою дослідження стало з'ясування впливу препаратів метіур та івін на експресію генів  $H^+$ -АТФази плазматичних мембран у клітинах коренів проростків кукурудзи за умов стресу, викликаного експозицією в присутності NaCl.

Експерименти виконували на проростках кукурудзи (гібрид “Остер”), які вирощували у водній культурі на середовищі Хогленда. Насіння протягом доби замочували в  $10^{-7}$  М розчинах метіуру та івіну. Проростки в тижневому віці переносили на свіже середовище, яке містило 0,1 М NaCl, що є критичною концентрацією для рослин кукурудзи, й експонували протягом 1 та 10 діб. Експресію генів  $H^+$ -АТФази оцінювали на підставі накопичення її транскриптів, рівень яких визначали методом ЗТ-ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією) з використанням специфічних праймерів до ділянки ДНК, гомологічної для всіх ізоформ.

Ізолювання загальної РНК проводили шляхом фенол-хлороформної екстракції з реагентом TRIzol. Кількісний аналіз РНК здійснювали спектрофотометричним методом, а якісний — шляхом електрофорезу в 1% агарозному гелі за денатуруючих умов [10].

Зворотну транскрипцію (синтез кДНК на РНК матриці) та ампліфікацію проводили на ампліфікаторі “Терцик” з набором реактивів і за протоколом від “Fermentas” (Литва). Продукт ЗТ-ПЛР розділяли у 1,5% агарозному гелі в присутності бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі та фотографували за допомогою системи Bio-Vision. Для оцінки кількості продуктів ампліфікації використовували програму Gel analyzer. Внутрішній контроль перебігу реакції здійснювали шляхом визначення транскрипції гена альфа тубуліну кукурудзи на тих самих зразках кДНК.

Усі дослідження виконували в трьох біологічних повтореннях, достовірність отриманих результатів перевіряли за критерієм Стьюдента.

Проведені нами дослідження виявили, що експресія генів  $H^+$ -АТФази в коренях контрольних проростків з віком істотно не змінювалась, тоді як 1-добова сольова експозиція викликала її посилення на 23%, яке зникало при подовженні терміну до 10 діб (рис. 1, табл. 1).

Таблиця 1. Інтенсивність свічення (ум. од.) продуктів ампліфікації транскриптів АТФази за дії біоактивних препаратів та експозиції на 0,1 М NaCl проростків кукурудзи,  $M \pm m$ ;  $n = 3$

Варіант дослідження	Контроль	Метіур	Івін	0,1 М NaCl	Метіур + 0,1 М NaCl	Івін + 0,1 М NaCl
8-добові проростки,						
1-добова сольова експозиція	736 ± 20	949 ± 70*	1075 ± 50*	911 ± 52*	794 ± 19#	878 ± 24*
17-добові проростки,						
10-добова сольова експозиція	659 ± 10	778 ± 43*	775 ± 69	601 ± 27	772 ± 46##	663 ± 37

Примітка.  $p \leq 0,05$ , \* — вірогідно відносно контролю, # — вірогідно відносно 0,1 М NaCl.

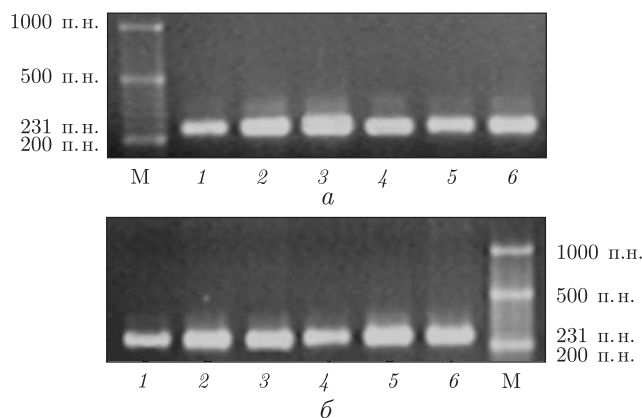


Рис. 1. Електрофореграма ЗТ-ПЛР аналізу експресії генів  $H^+$ -АТФази в клітинах коренів проростків кукурудзи за умов сольового стресу та дії біоактивних препаратів: *a* — 8-добові проростки, 1-добова сольова експозиція; *б* — 17-добові проростки, 10-добова сольова експозиція.

М — маркер молекулярної маси ДНК; 1 — контроль; 2 — обробка препаратом метіур; 3 — обробка препаратом івін; 4 — 0,1 М NaCl у середовищі; 5 — обробка препаратом метіур + 0,1 М NaCl; 6 — обробка препаратом івін + 0,1 М NaCl

Обидва препарати посилювали накопичення транскриптів у коренях 8-добових проростків, причому вплив івіну (46%) виявився сильнішим, ніж метіуру (29%) (див. рис. 1, *a*, табл. 1). Ці результати схожі з даними порівняння впливу зазначених препаратів на загальну експресію генів у зародковій осі квасолі [11]. Зі збільшенням віку проростків до 17 діб ефект препаратів послаблювався, причому рівень транскриптів у варіанті з метіуром залишався дещо вищим, ніж у контролі (див. рис. 1, *б*, табл. 1).

У разі 1-добової сольової експозиції проростків стимулюючий ефект препаратів на експресію генів  $H^+$ -АТФази зменшувався, причому кількість транскриптів у варіанті з івіном була на рівні сольового контролю, а у варіанті з метіуром виявилась навіть нижчою за нього (див. рис. 1, *a*, табл. 1). Проте при подовженні терміну сольової експозиції до 10 діб у варіанті з метіуром вміст транскриптів збільшився на 28%, тоді як у варіанті з івіном змін не спостерігалось (див. рис. 1, *б*, табл. 1).

Одержані результати свідчать про те, що стимулюючий вплив зазначених препаратів, особливо Івіну, на експресію генів  $H^+$ -АТФази сильніше виявляється за відсутності сольового стресу на ранніх стадіях розвитку організмів. Короткочасна дія стресового фактора, яким є присутність NaCl, призводила до нетривалого посилення експресії генів  $H^+$ -АТФази, яке зникало при подовженні терміну сольової експозиції. Застосування досліджених препаратів, особливо метіуру, за умов короткотривалого сольового стресу викликало послаблення експресії генів зазначеної  $H^+$ -АТФази, яке негативно корелювало з підвищенням транспортальної активності цього ензиму, що було показано раніше [5]. Таким чином, позитивний вплив метіуру на функціонування  $H^+$ -АТФази плазматичної мембрани за умов сольового стресу, що виявляється у вигляді посилення її транспортальної активності, не пов'язаний із підвищенням експресії її генів. На нашу думку, він здійснюється переважно на молекулярному рівні за участю регуляторів активності її білка.

1. Gaxiola R. A., Palmgren M. G., Schumacher K. Plant proton pumps // FEBS Lett. — 2007. — **581**. — P. 2204-2214.

2. Santi S., Locci G., Monte R. et al. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms // J. Exp. Bot. – 2003. – **54**. – P. 1851–1864.
3. Niu X., Narasimhan M., Salzman R. NaCl regulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in Glycophyte and Halophyte // Plant Physiology. – 1993. – **103**. – P. 713–718.
4. Klobus G., Janicka-Russak M. Modulation by cytosolic components of proton pump activities in plasma membrane and tonoplast from Cucumis sativus roots during salt stress // Physiol. Plant. – 2004. – **121**. – P. 84–92.
5. Рибченко Ж. І., Палладіна Т. О. Функціонування транспортних H<sup>+</sup>-АТФаз плазматичних і вакуолярних мембран у клітинах коренів кукурудзи в умовах сольового стресу та дії адаптогенних препаратів // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 6. – С. 63–68.
6. Ding D., Zhang L., Wang H. et al. Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots // Ann Bot. – 2009. – 103(1). – P. 29–38.
7. Шанько А. В., Бабаков А. В. Белки 14–3–3 регулируют активность H<sup>+</sup>-насоса плазматических мембран корней ячменя *Hordeum disticum* при солевом стрессе // Физиология растений. – 2002. – **49**, № 6. – С. 847–853.
8. Палладіна Т. О., Рибченко Ж. І., Контурська О. О. Залежність адаптогенної дії препарату Метиур на рослини за умов сольового стресу від його молекулярної структури // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 1. – С. 115–119.
9. Рибченко Ж. І., Палладіна Т. О. Функціонування Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-антипортерів плазматичних і вакуолярних мембран у рослинних клітинах за умов засоленого середовища та вплив на них біологічно активних препаратів // Доп. НАН України. – 2013. – № 2. – С. 158–162.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.
11. Цыганкова В. А., Мусатенко Л. И., Галкина Л. А. и др. Особенности действия регуляторов роста на экспрессию генов в клетках зародышей семян в раннем постэмбриогенезе // Биотехнология. – 2008. – **1**, № 2. – С. 81–91.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 13.12.2012

**Н. О. Коваленко, Т. А. Палладіна**

### **Экспрессия генов H<sup>+</sup>-АТФазы плазматических мембран клеток корней кукурузы в условиях солевого стресса и действия биоактивных препаратов**

*Исследовано влияние биоактивных препаратов метиур и ивин на экспрессию генов H<sup>+</sup>-АТФазы плазматических мембран в клетках корней проростков кукурузы, экспонированных в присутствии 0,1М NaCl. Показано, что солевая экспозиция проростков в течение суток вызывала кратковременное усиление экспрессии генов H<sup>+</sup>-АТФазы. При отсутствии солевой экспозиции оба препарата приводили к повышению экспрессии ее генов, которая со временем снижалась. При односуточной солевой экспозиции проростков, выросших из обработанных препаратами семян, экспрессия генов этого энзима ослаблялась, тогда как при ее продлении до 10 суток – усиливалась в варианте с метиуром. Таким образом, показанное нами ранее положительное влияние этих препаратов, в частности метиура, на функционирование H<sup>+</sup>-АТФазы в условиях солевого стресса не связано с усилением экспрессии ее генов, а осуществляется, вероятно, на молекулярном уровне.*

N. O. Kovalenko, T. A. Palladina

**Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in corn seedling root cells under salt stress conditions and the action of bioactive preparations**

*Effect of preparations Methyure and Ivine used by seed soaking on the gene expression of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in corn seedlings exposed on 0.1M NaCl has been studied. It is found that both preparations, especially Ivine, increase the gene expression of this enzymatic protein in roots of one week seedling without salinity, but their effect disappears with age. NaCl exposition weakened their positive effect which was retained in a some content at using Methyure only. The obtained results have evidenced that a positive effect of these preparations, especially Methyure, on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase transport activity is not connected with increasing the gene expression and can be realized on the molecular level.*