

На правах рукописи



Кривошеева Александра Борисовна

Получение и анализ солеустойчивости трансгенных растений арабидопсиса и картофеля, экспрессирующих гетерологичные гены вакуолярных антипортеров *HvNHX2* или *HvNHX3*

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена в лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва

Научные руководители:

кандидат биологических наук
кандидат биологических наук

Беляев Денис Вадимович
Холодова Валентина Павловна

Официальные оппоненты:

Ежова Татьяна Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, профессор кафедры генетики.

Кондратьев Михаил Николаевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, профессор кафедры физиологии растений.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук.

Защита состоится «30» июня в 13.00 на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук www.ippras.ru

Автореферат разослан «28» апреля 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Засоление почв является одним из наиболее распространенных по площади и неблагоприятному воздействию на продуктивность растений абиотических стрессоров (Munns, Tester, 2008). Проблеме адаптации растений к засолению посвящен ряд фундаментальных работ как в России (Строгонов, 1962; Удовенко, 1978; Балнокин, Строгонов, 1985), так и за рубежом (Epstein et al., 1966; Flowers et al., 1986; Blumwald, Poole, 1985). Большой успех в решении данной проблемы достигнут с развитием методов молекулярной генетики, что позволило идентифицировать многие гены, индуцирующиеся при засолении. В частности, выявлено, что в ответ на повышение концентрации NaCl повышается уровень экспрессии генов, кодирующих белки семейства NHX-антипортеров. На основании локализации и предполагаемой роли в клетке NHX-антипортеры делят на плазмалеммарные, вакуолярные и эндосомальные. Отличительной чертой вакуолярных NHX-антипортеров является локализация в тонопласте. Показано, что данные белки переносят ионы Na^+ и K^+ из цитоплазмы в вакуоль в обмен на ионы H^+ благодаря движущей силе протонного градиента, который создают H^+ -АТФаза V-типа и H^+ -пирофосфатаза (Pardo et al., 2006; Rodriguez-Rosales et al., 2009; Bassil et al., 2012). Компартиментация избытка Na^+ в вакуоли - стратегия, используемая многими растениями для выживания при засолении, и солеустойчивость растения при этом зависит от эффективности работы вакуолярного NHX-антипортера (Blumwald et al., 2000). На клеточном уровне компартиментация Na^+ в вакуоли уменьшает количество токсичного Na^+ в цитоплазме, снижает осмотический потенциал вакуоли для поддержания тургора и роста клеток растяжением при засолении, а также вызывает необходимость накопления в цитоплазме совместимых осмолитов для поддержания равенства осмотического потенциала вакуоли и цитоплазмы. Данная стратегия актуальна как для одноклеточных растительных организмов, так и для высших растений. В процессе эволюции перед высшими растениями возникла необходимость регулировать дальний транспорт Na^+ , то есть транспорт Na^+ в системе целого растения (Балнокин, 2012). Транспорт и накопление Na^+ внутри вакуолей побега может быть ключевым фактором поддержания роста при засолении для некоторых растений, например, галофитов. Но большинство гликофитов, в том числе почти все культурные растения, стремятся ограничить накопление Na^+ в побеге путем торможения его транспорта из корней в побег, особенно в листья, рециркуляции Na^+ из побега в корни и хранения его в вакуолях клеток корня или стебля (Munns, Tester, 2003; Tester, Davenport, 2003). Участие вакуолярных NHX-антипортеров в этих процессах подтверждается индуцированием Na^+/H^+ -обменной активности или экспрессии NHX-антипортеров в побегах или корнях многих видов растений в ответ на повышение концентрации NaCl (Rodriguez-Rosales et al., 2009). Хотя к настоящему моменту идентифицированы последовательности NHX-антипортеров более чем из 60

видов растений, подробно изучены лишь NHX-антипортеры арабидопсиса, томата и риса. Роль разных изоформ NHX-антипортеров в осморегуляции, росте и развитии клетки в нормальных и стрессовых условиях все еще активно выясняется. Важное место в этих исследованиях занимает создание и изучение трансгенных растений, экспрессирующих гены NHX-антипортеров.

Цель работы: изучить влияние экспрессии гетерологичных вакуолярных антипортеров ячменя *HvNHX2* и *HvNHX3* на солеустойчивость трансгенных растений арабидопсиса и картофеля. **Задачи исследования:**

1. Провести трансформацию растений арабидопсиса и картофеля с помощью векторов *pBINvNHX2* и *pCambiaHvNHX3*, содержащих гены вакуолярных антипортеров ячменя *HvNHX2* и *HvNHX3*, соответственно.

2. Проверить наличие вставки и экспрессии целевых генов *HvNHX2* и *HvNHX3* в трансформантах арабидопсиса и картофеля.

3. Сравнить солеустойчивость трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих ген *HvNHX2* или ген *HvNHX3*, а также определить содержание в листьях растений пролина, Na^+ и K^+ в стандартных условиях и при засолении.

4. Проанализировать солеустойчивость и определить содержание Na^+ и K^+ в трансгенных растениях картофеля, экспрессирующих ген *HvNHX2* или ген *HvNHX3*.

Научная новизна. Результатом работы стало получение трансгенных растений арабидопсиса и картофеля, экспрессирующих гены *HvNHX2* или *HvNHX3*, кодирующие изоформы вакуолярного NHX-антипортера из солеустойчивого сорта ячменя Эло. Показано, что большинство трансгенных растений арабидопсиса и картофеля, экспрессирующих ген *HvNHX2*, отличались повышенной солеустойчивостью. У арабидопсиса повышение солеустойчивости было связано с поддержанием высокого уровня K^+ и отношения K^+/Na^+ в листьях, тогда как в трансгенных растениях картофеля основное значение имело поддержание высокого отношения K^+/Na^+ в корнях. Несмотря на более высокое содержание Na^+ в листьях (по сравнению с содержанием в стандартных условиях) трансгенные растения картофеля проявляли повышенную солеустойчивость, что может свидетельствовать о решающем значении высокой активности NHX-транспортёров тонопласта трансгенных растений в переносе Na^+ в вакуоль.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные экспериментальные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов солеустойчивости растений и могут быть использованы для разработки теоретических основ управления продуктивностью растений при засолении. Основные выводы и результаты могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических и сельскохозяйственных специальностей.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Повышение солеустойчивости растений может быть достигнуто введением в геном гена изоформы вакуолярного антипортера *HvNHX2*, но не гена изоформы *HvNHX3*.

2. Солеустойчивость трансгенных растений арабидопсиса и картофеля, экспрессирующих ген *HvNHX2*, в значительной мере определяется повышением эффективности ионного гомеостатирования как на уровне клетки, так и на уровне целого растения.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на III Всероссийском симпозиуме «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности (Москва, 2010); Всероссийском симпозиуме "Растение и стресс" (Москва, 2010); VII Съезде Общества физиологов растений России "Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий" (Н.Новгород, 2011); 16-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология наука XXI века" (Пущино, 2012); IV Всероссийском симпозиуме "Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность" и Годичном собрании Общества физиологов растений России (Москва, 2012); Всероссийской научной конференции с международным участием и Годичном собрании ОФР "Инновационные направления современной физиологии растений" (Москва, 2013); X Международной конференции "Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология" (Казань, 2013); Годичном собрании Общества физиологов растений России и Международной научной конференции "Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий" (Калининград, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из которых 2 – статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 113 страницах машинописного текста и содержат 15 таблиц и 33 рисунка. Список цитируемой литературы включает 110 наименований, в т.ч. 87 иностранных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использовали следующие растения: арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*) экотипа Wassilewskija (обозначен как WS), инсерционный мутант арабидопсиса экотипа Wassilewskija по гену *AtNHX1* (обозначен как *atnhx1*), картофель (*Solanum tuberosum*) сорта Юбилей Жукова (обозначен как WT), трансгенная линия картофеля со вставкой T-ДНК вектора pBI121 (обозначена как pBI121). Семена *atnhx1* были присланы проф. Э. Блумвальдом, Университет Калифорнии (Arse et al., 2003). Линия картофеля pBI121 была предоставлена к.с.-х.н. Н.О. Юрьевой, лаборатория физиологии культивируемых клеток ИФР РАН.

Условия выращивания растений. Растения выращивали в климатической камере при 22-24⁰С, влажности 75% и 16-часовом освещении люминесцентными лампами белого света (освещенность 8 клк). Растения картофеля культивировали *in vitro* на агаризованной или жидкой среде MS. Растения арабидопсиса выращивали в почве, смешанной с перлитом, в горшочках диаметром 5 см.

Получение трансгенных растений. Для трансформации растений арабидопсиса и картофеля использовали векторные конструкции pVHvNHX2 и pCambiaHvNHX3, включающие, соответственно, гены изоформ вакуолярного NHX-антипортера ячменя - HvNHX2 (Acc. No. AY247791) и HvNHX3 (Acc.N. DQ372061), каждый под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Данные гены были любезно предоставлены проф. А.В. Бабаковым, ФГБНУ ВНИИСБ. Трансформацию арабидопсиса проводили методом "floral dip" (Ралдугина с соавт., 2011). Трансформацию картофеля проводили методом агробактериальной трансформации эксплантов листа или стебля картофеля (Юрьева с соавт., 2014).

Анализ наличия вставки и экспрессии HvNHX2 и HvNHX3. Для обнаружения целевого гена HvNHX2 в трансгенных растениях проводили ПЦР (Терцик, ДНК-Технология, Россия) с прямым NHXF и обратным NHXR праймерами, длина амплифицированного фрагмента составляла 450 п.н.; для обнаружения гена HvNHX3 - с прямым Hv3-685U и обратным Hv3-1325L праймерами, длина фрагмента 640 п.н. Праймеры подбирали с использованием программы Oligo. Тотальную ДНК растений выделяли со СТАВ. Визуализацию результатов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле в \times ТАЕ буфере. Транскрипцию мРНК определяли методом ОТ-ПЦР и методом нозерн-гибридизации. Выделение тотальной РНК проводили кислым фенол-хлороформом. Качество РНК оценивали спектрофотометрически (NanoDrop 2000, США) по соотношению показателей OD260/280 и OD260/230, а также с помощью электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях. Обработку РНК ДНКазой и синтез кДНК осуществляли согласно рекомендациям фирмы-производителя (Fermentas, Литва). Денатурирующий электрофорез РНК в агарозном геле проводили в соответствии с (Маниатис и др., 1984). Для проведения нозерн-гибридизации РНК переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану Hybond-N⁺ (Amersham Bioscience, США) в соответствии с инструкциями изготовителя. BamHI - SalI фрагмент гена HvNHX2 длиной 450 п.н. радиоактивно метили α^{32} P dATP набором NEBlot (New England Biolabs, США) и использовали как пробу для гибридизаций. Гибридизацию проводили согласно (Беляев, 2011). Гибридизационные сигналы детектировали путём экспонирования мембран в кассете PhosphorImager в течение трех суток, а затем с Amersham hyperfilmTM MP при - 80⁰С в течение трех недель. Уровень экспрессии генов нормировали по концентрации тотальной РНК.

Условия проведения экспериментов. Всхожесть семян арабидопсиса определяли на 7 день инкубирования на агаризованной среде MS без NaCl или MS,

содержащей 150 мМ NaCl, также определяли процент проросших растений на 21 день инкубирования. Для оценки влияния NaCl на рост корня семена WS и трансгенных растений арабидопсиса предварительно проращивали до длины корня 3 мм, а затем помещали на 7 суток на агаризованную среду MS со 150 мМ NaCl. Засоление в почве создавали поливом с интервалом в три дня 50, 100, 150 мМ раствором NaCl (10 мл на горшочек), затем с тем же интервалом поливали водой без соли, фиксировали растительный материал на 14 сутки после начала полива NaCl, анализировали диаметр розетки, площадь листьев, сырую и сухую массы надземной части, содержание пролина, Na^+ и K^+ . Солеустойчивость трансгенного картофеля оценивали двумя способами: 1) на агаризованной среде MS со 150 мМ NaCl (определяли биомассу побега, содержание Na^+ и K^+); 2) с предварительным укоренением на стандартной жидкой среде MS, которую заменяли на среду MS со 150 мМ NaCl (определяли высоту побега, биомассу и содержание Na^+ и K^+ в корнях, стеблях и листьях, осмотический потенциал в листьях). Оценку влияния NaCl на клубнеобразование трансгенного картофеля проводили путем индукции клубнеобразования добавлением 8% сахарозы к среде MS со 150 мМ NaCl. Через 2 месяца регистрировали число образовавшихся клубней и сырую массу клубней и столонов, определяли содержание Na^+ и K^+ в клубнях и столонах. **Определение содержания свободного** пролина проводили по методу Bates с соавт. (Bates et al., 1973). **Осмотический потенциал** клеточного экссудата определяли на криоскопическом осмометре Osmomat 030 (Gonotec, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Измерение **содержания K^+ и Na^+** в водных экстрактах проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре Hitachi 207 (Hitachi, Япония).

Статистический анализ. На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения из n-числа повторностей (где $n \geq 4$) и их стандартные отклонения. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента, значения t-критерия находили для 95% уровня значимости. При анализе расщепления семенного потомства арабидопсиса использовали тест хи-квадрат. При корреляционном анализе использовали коэффициент корреляции Пирсона. Результаты обработаны с использованием пакета программ MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Получение трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих ген *HvNHX2* или ген *HvNHX3*

С растений арабидопсиса, трансформированных с помощью метода "floral dip" собирали семена, которые использовали для отбора независимых трансформантов на селективной среде с канамицином (Km) в концентрации 50 мг/л. В результате экспериментов отобрали 14 независимых Km-устойчивых трансформантов, из них 10 - со вставкой *HvNHX2* (обозначены как WSHvNHX2) и 4 - со вставкой *HvNHX3*

(обозначены как WSHvNHX3). Анализ расщепления полученного самоопылением семенного потомства первичных трансформантов по признаку устойчивости к Km показал наследование этого признака в соотношении 3:1 у 13 из 14 полученных трансгенных линий, что свидетельствует об инсерции T-ДНК вектора в один локус генома. С помощью последовательного отбора на селективной среде с Km полученные линии довели до гомозиготности и в дальнейших экспериментах использовали растения гомозиготных линий. Для доказательства наличия целевых генов *HvNHX2* или *HvNHX3* в геноме гомозиготных линий провели ПЦР. Данные электрофоретического анализа продуктов ПЦР показали наличие интенсивного сигнала (полосу 450 п.н. для WSHvNHX2 трансформантов, 640 п.н. для WSHvNHX3 трансформантов) для всех трансформантов (рис.1). В пробе ДНК WS-растений и в пробе с контролем реакционной среды сигнала не было.

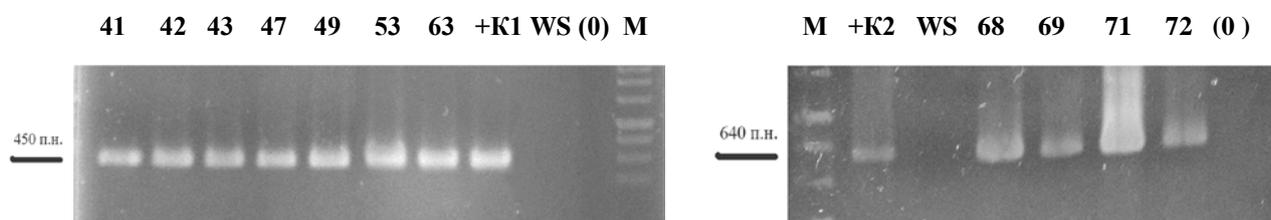


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации на наличие гена *HvNHX2* и *HvNHX3* в трансформированном арабидопсисе. Для ПЦР использовались ДНК из: 41 - 63 - WSHvNHX2 со вставкой *HvNHX2*; 68 - 72 - WSHvNHX3 со вставкой гена *HvNHX3*; (+K1) - плазмидная ДНК, содержащая вектор pBINvNHX2; +K2 - плазмидная ДНК, содержащая вектор pCambiaHvNHX3; WS - нетрансформированное растение; (0) - проба без матрицы (контроль реакционной смеси); М - маркер молекулярной массы ДНК (1 т.п.н.).

Наличие экспрессии трансгенов *HvNHX2* или *HvNHX3* во всех полученных трансгенных линиях арабидопсиса показали методом ОТ-ПЦР. Уровень индивидуальных транскриптов гена *HvNHX2* оценивали с помощью нозерн-гибридизации (рис. 2). В пробе с РНК нетрансформированного растения гибридационный сигнал отсутствовал, что указывает на специфичность использованного зонда к мРНК *HvNHX2*. Присутствие сигнала с РНК трансгенных растений подтверждает данные о наличии транскрипции мРНК *HvNHX2*, полученные методом ОТ-ПЦР. В трансгенной линии арабидопсиса 49 был зарегистрирован наиболее высокий уровень транскриптов целевого гена в расчете на тотальную РНК.

2. Анализ солеустойчивости трансгенных растений арабидопсиса

Предположение о возможности применения генов *HvNHX2* и *HvNHX3* для повышения солеустойчивости растений было высказано в связи с тем, что количество белка изоформ *HvNHX2* и *HvNHX3* повышалось в корнях и побегах в ответ на солевой стресс у устойчивого к засолению сорта ячменя (Рослякова с соавт., 2011).

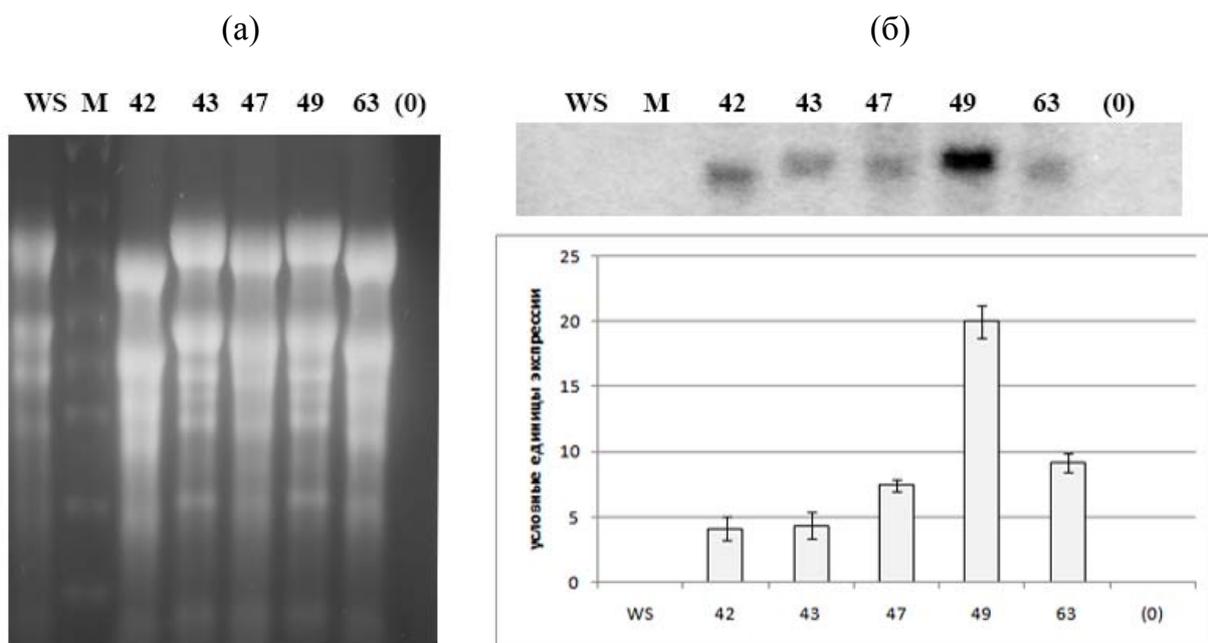


Рис. 2. Экспрессия *HvNHX2* в арабидопсисе: (а) электрофореграмма тотальной РНК; (б) Нозерн - гибридизация с зондом *HvNHX2*, измерение уровня сигнала гибридизации на PhosphoImager. WS - проба тотальной РНК нетрансформированного растения; М – РНК-маркер RiboRuler; 42- 63 – сигнал с трансгенных линий; (0) – проба без матрицы (контроль реакционной смеси).

В экспериментах по оценке солеустойчивости арабидопсиса использовали WS-растения, 5 линий WSHvNHX2, 3 линии WSHvNHX3 и линию *atnhx1*.

Всхожесть. В стандартных условиях всхожесть семян нетрансформированных растений составила 100%, для семян трансгенных линий с экспрессией *HvNHX2* или *HvNHX3* была от 91±7% до 100% и 86±6% семян *atnhx1*. На среде со 150 мМ NaCl всхожесть составила 50±4%. семян нетрансформированных растений, для WSHvNHX2 всхожесть была выше - от 56±3% до 74±0%, для 69 линии с экспрессией *HvNHX3* всхожесть была 44±11%, что не отличалось от параметра WS-растений. Для двух линий 71 и 72 с экспрессией *HvNHX3* всхожесть была значительно ниже, чем у WS-растений - 11±2% и 10±2% соответственно. Наибольшее снижение всхожести на соли произошло у семян *atnhx1*, этот параметр составил всего 1,5±1% от значения без соли. Таким образом, всхожесть трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих *HvNHX2*, в присутствии 150 мМ NaCl повысилась по сравнению с WS-растениями. Особенно выделились линии 47 и 49, всхожесть семян которых было соответственно на 24,4% и 17,8 % выше прорастания семян WS-растений. К 21 суткам на 150 мМ NaCl процент проросших семян трансгенных линий с экспрессией *HvNHX2* или *HvNHX3* достоверно вырос до 81±1% и до 95±1% по сравнению с 76±2% семян WS-растений, за исключением линии 43, у которой он был 76±4%. Для линии *atnhx1* процент проросших семян также вырос до 70±1%.

Рост корня. В стандартных условиях длина корня проростков всех исследованных трансгенных линий арабидопсиса, за исключением линии 69, была ниже длины корня WS-растений. Длина корня растений линии 69 была на 13,5% больше длины корня WS-растений. Действие 150 мМ NaCl подавляло рост корня WS-растений в 9 раз по сравнению с ростом в стандартных условиях, рост корня WSHvNHX2 - в 3,5 - 7 раз, рост корня WSHvNHX3 - в 3 раза у линии 72, в 9 раз у линии 71, в 15 раз у линии 69, наконец, рост корня atnhx1 был ингибирован в 4 раза по сравнению с ростом без NaCl. При этом в присутствии 150 мМ NaCl у 4 из 5 линий WSHvNHX2 корень был достоверно длиннее корня WS-растений, особенно у линии 43 - длиннее в 2,3 раза и линии 47 - в 2,2 раза. Оценка влияния 150 мМ NaCl на прорастание семян и рост корня проростков позволяет сказать, что трансгенные растения арабидопсиса, экспрессирующие *HvNHX2*, адаптировались быстрее WT-растений на раннем этапе развития к высокому содержанию NaCl в среде.

В дальнейшем эксперименты проводили на шестинедельных растениях.

Биомасса листьев растений арабидопсиса. В стандартных условиях сухая масса листьев растений с экспрессией NHX - антипортера превосходила сухую массу листьев WS-растений в 1,3-2,2 раза для WSHvNHX2, в 3,0-4,6 раза для растений WSHvNHX3 (табл. 1). В условиях засоления данная тенденция сохранялась, и сухая масса листьев большинства трансгенных линий была достоверно выше показателя WS-растений. Для оценки степени воздействия засоления на накопление биомассы было использовано отношение биомассы листьев одного растения при засолении к биомассе листьев этой же линии в стандартных условиях, выраженное в процентах и обозначенное как “Индекс солеустойчивости” (ИС). Трансгенные растения всех линий WSHvNHX2 превосходили WS-растения по ИС на 5,8-26,2%. Наиболее высокий ИС был у трансгенных линий 49 и 63, сухая масса листьев растений этих линий фактически не изменилась в условиях засоления. Для трансгенных растений с экспрессией *HvNHX3* ИС был значительно ниже, чем у WS-растений – минимальное значение ИС - 44,4 отметили у растений линии 72. Линия atnhx1 значительно уступала по уровню накопления сухой массы в стандартных условиях и при засолении как WS-растениям, так и линиям с экспрессией *HvNHX2* или с экспрессией *HvNHX3*. ИС у atnhx1 также был ниже в 1,7 раза по сравнению с WS-растениями.

Диаметр розетки и площадь листьев. Были проанализированы площадь листьев и диаметр розетки у линии 49, у которой был отмечен наибольший уровень транскриптов *HvNHX2*, по сравнению с WS-растениями. Трансгенные растения обладали достоверно большим, чем WS-растения, диаметром розетки и большей площадью листьев. Засоление практически одинаково снизило диаметр розетки как у WS, так и у растений линии 49 – до 90.8% и до 88.1% от параметров в стандартных условиях, соответственно. Но уменьшение площади листьев одного растения под действием NaCl у растений этой трансгенной линии было на 13.0% меньшим, чем у WS-растений.

Табл. 1. Влияние засоления на сухую массу листьев растений арабидопсиса

		Сухая масса листьев, мг		ИС, %
		контроль	опыт	
WS		127,1±23,0	103,3±6,0	81,3±15,4
WSHvNHX2	42	161,3±25,0	140,4±24,4	87,1±20,3
	43	184,7±41,1	181,2±50,8*	98,1±35,1
	47	275,2±25,9*	209,0±35,0*	75,9±14,6
	49	232,2±42,0*	249,6±19,8*	107,5±21,2
	63	238,6±42,4*	256,6±53,7*	107,5±29,5
WSHvNHX3	69	382,8±119,4*	213,5±46,2*	55,8±21,2
	71	447,3±55,2*	304,1±40,7*	68,0±12,3
	72	586,6±92,0*	260,4±39,8*	44,4±9,7
atnhx1		45,4±7,5*	21,1±3,3*	46,5±10,6

* Значения отличаются от WS (нетрансформированных растений) при уровне значимости $P > 0,95$

Табл. 2. Влияние засоления на содержание пролина в листьях арабидопсиса

		Пролин, мкмоль/ г сырой массы		Отношение к контролю
		контроль	опыт	
WS		2,42±0,91	8,78±3,38	3,6±2,0
WSHvNHX2	42	0,72±0,24*	7,97±3,49	11,1±6,1
	43	1,48±0,45	7,07±2,00	4,8±2,0
	47	1,26±0,06	11,30±3,69	9,0±3,0
	49	1,57±0,45	8,40±1,98	5,4±2,0
	63	0,80±0,24*	4,08±2,17	5,1±3,1
WSHvNHX3	69	1,11±0,30	8,56±1,79	7,7±2,6
	71	2,52±0,29	9,39±1,74	3,7±0,8
	72	2,24±0,73	12,07±1,56	5,4±1,9
atnhx1		1,07±0,89	9,54±2,62	8,9±7,8

* Значения отличаются от WS (нетрансформированных растений) при уровне значимости $P > 0,95$.

Содержание пролина. В стандартных условиях содержание пролина сильно различалось в листьях растений изученных форм, максимальным оказался уровень пролина у WS, тогда как у растений всех линий с экспрессией *HvNHX2* он составлял от 1/3 до 2/3 содержания пролина в листьях WS-растений (табл.2). У трансгенных линий 71 и 72 с экспрессией *HvNHX3* содержание пролина в стандартных условиях было таким же, как у WS-растений, у линии 69 составляло примерно 1/2 уровня пролина WS-растений.

В условиях засоления линии 42, 43 и 49 с экспрессией *HvNHX2* по содержанию пролина близки к WS, но при этом они синтезировали в 1.3-1.5 раз (линии 43 и 49) и даже в 3 раза (линия 42) больше пролина, чем в стандартных условиях. В растениях линии 63 был минимальный среди всех линий с экспрессией *HvNHX2* уровень пролина, хотя относительно роста в стандартных условиях наблюдалось 5-кратное повышение содержания пролина. Умеренно различался уровень пролина при засолении у трансгенов с экспрессией *HvNHX3*: линии 69 и 71 – близки по уровню пролина к WS, максимальным среди всех растений было накопление пролина растениями линии 72 – выше 12 мкмоль/г сырой массы.

3. Содержание Na^+ и K^+ в листьях трансгенного арабидопсиса

При росте без полива NaCl содержание Na^+ у всех исследованных растений находилось в пределах 3-8 мкмоль/г сырой массы (кроме *athnx* – 13 мкмоль/г сырой массы) (рис.3). При засолении содержание Na^+ в листьях всех исследованных линий арабидопсиса увеличилось в 5 и более раз. Листья WS-растений и линий WSHvNHX2 содержали до 37-42 мкмоль/г сырой массы Na^+ ; у линий WSHvNHX3 этот показатель был ниже у линий 71 и 72 примерно 30 мкмоль/г сырой массы, но очень высоким – до 70 мкмоль/г сырой массы у линии 69. Интересно, что листья растений *atnhx1* в стандартных условиях накапливали в 1,6 раза больше Na^+ , чем WS-растения, хотя при засолении содержание Na^+ в листьях *atnhx1* не отличалось достоверно от этого параметра для WS - растений.

Содержание K^+ в листьях трансгенных линий 42, 47 и 63 достоверно не отличалось от параметра WS-растений, но достигало 74 и 80 мкмоль/г сырой массы у линий 49 и 43 (рис. 4). Содержание K^+ у всех линий с экспрессией *HvNHX3* было значительно ниже, чем у WS-растений, и составило менее 40 мкмоль/г сырой массы листьев. При действии NaCl отмечено снижение содержания K^+ у всех линий WSHvNHX2, но снижение было относительно невелико у линии 47 (на 38,3 % от своего контроля) и меньше всего у 49 (на 26,2 %). При засолении в 4 из 5 (43, 47, 49 и 63) трансгенных линиях с экспрессией *HvNHX2* было более высокое содержание K^+ в тканях листа по сравнению с WS-растениями (рис.4). Выделилась линия 49, листья которой содержали $54,35 \pm 6,17$ мкмоль/г сырой массы K^+ при засолении, что было в 1,8 раз больше содержания K^+ в листьях WS-растений. Содержание K^+ при солевом стрессе в листьях WSHvNHX3 достоверно не отличалось от показателя WS-растений.

В стандартных условиях отношение K^+/Na^+ в листе всех трансгенных линий с экспрессией *HvNHX2* или *HvNHX3* по сравнению с WS-растениями было выше, наибольшим этот показатель был у линии 49 - в 2,3 раза выше. При засолении 4 из 5 линий WSHvNHX2 поддерживали более высокое отношение K^+/Na^+ в листьях, чем WS-растения, лучшим этот параметр был также у линии 49. У линий с экспрессией *HvNHX3* не было выявлено какой-либо тенденции: у линии 69 отношение K^+/Na^+ было в 2,3 раза меньше, у линии 71 в 1,2 раза выше показателя WS-растений, показатель линии 72 достоверно от него не отличался.

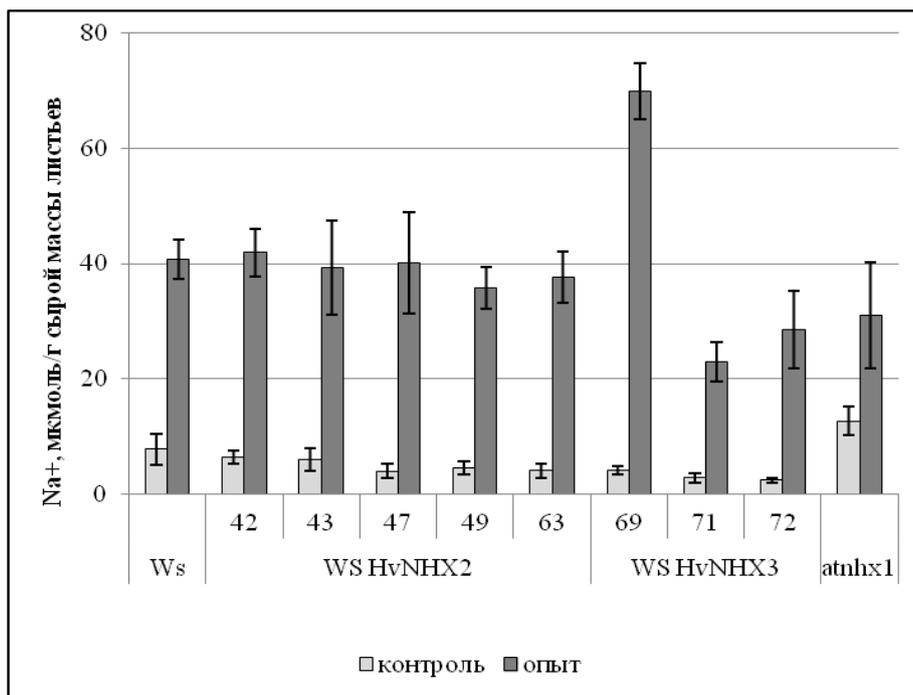


Рис. 3. Влияние засоления на содержание Na^+ в листьях арабидопсиса. WS нетрансформированные растения; 42-72—трансгенные линии; WSHvNHX2 - линии с экспрессией гена *HvNHX2*; WSHvNHX3 - линии с экспрессией гена *HvNHX3*, atnhx1 - линия с нокаут-мутацией по гену *AtNHX1*.

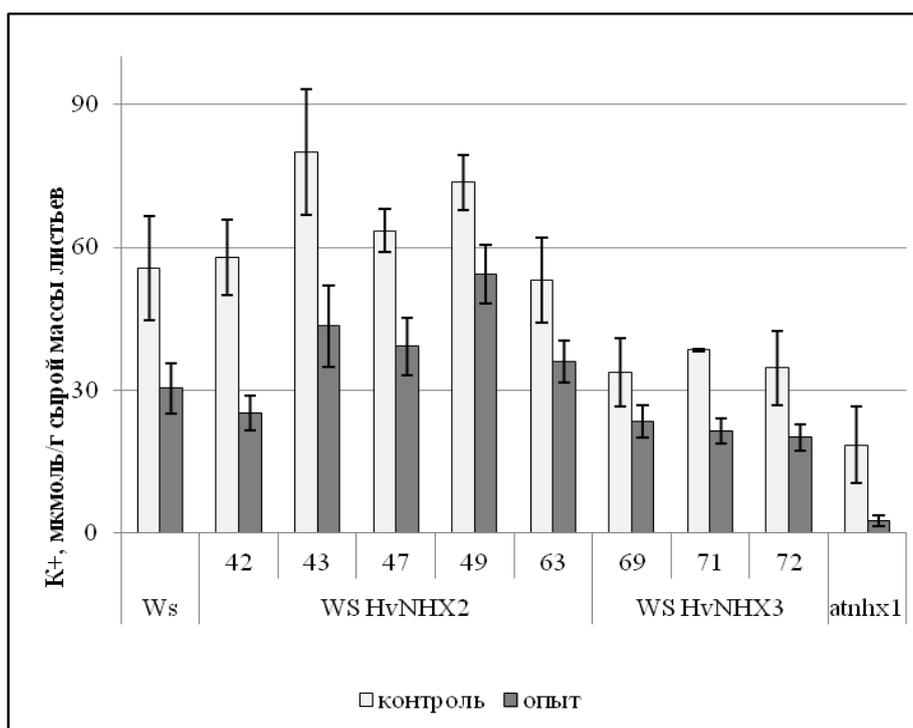


Рис. 4. Влияние засоления на содержание K^+ в листьях арабидопсиса. WS нетрансформированные растения; 42-72—трансгенные линии; WSHvNHX2 - линии с экспрессией гена *HvNHX2*; WSHvNHX3 - линии с экспрессией гена *HvNHX3*, atnhx1 - линия с нокаут-мутацией по гену *AtNHX1*.

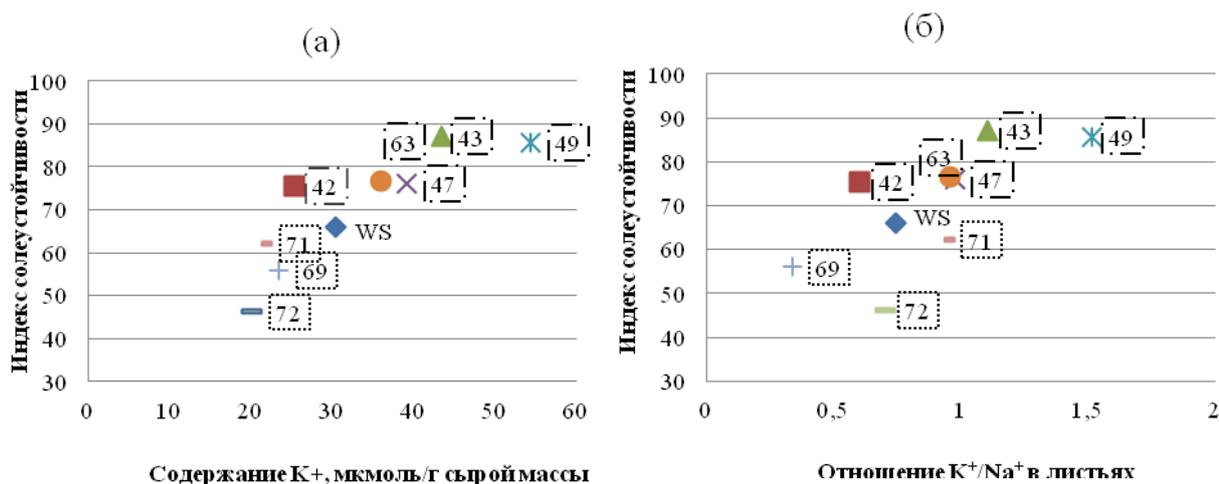


Рис. 5. Соотношение между индексом солеустойчивости и (а)- содержанием K^+ в листьях, (б) отношением K^+/Na^+ в листьях. WS нетрансформированные растения; 42-72–трансгенные линии арабидопсиса

Чтобы оценить потенциальные взаимосвязи между содержанием и соотношением ионов калия и натрия в листьях растений изученных форм и степенью их устойчивости, по некоторым показателям рассчитаны коэффициенты корреляции Пирсона. Обнаружили корреляцию между ИС и содержанием K^+ в листьях при засолении, а также с отношением K^+/Na^+ при засолении - коэффициенты корреляции составили +0,849 и +0,693, соответственно. Корреляции между ИС и содержанием Na^+ в листьях при засолении не обнаружили.

4. Получение трансгенного картофеля с геном *HvNHX2* или геном *HvNHX3*

В результате экспериментов по трансформации картофеля отобрали 41 Km^+ -устойчивый регенерант, из них 31 регенерант при использовании вектора *pBINvNHX2* и 10 регенерантов при использовании вектора *pCambia-HvNHX3*. Наличие вставки целевых генов *HvNHX2* или *HvNHX3* в геноме отобранных первичных трансформантов анализировали с помощью ПЦР (рис.6). В 28 регенерантах присутствовала вставка соответствующей Т-ДНК, а именно 25 регенерантов содержали вставку *HvNHX2*, 3 регенеранта содержали вставку *HvNHX3*.

Успешную транскрипцию мРНК *HvNHX2* или *HvNHX3* показали методом ОТ-ПЦР. Для трансформантов со вставкой *HvNHX2* подтвердили наличие транскрипции методом нозерн-гибридизации (рис. 7). Для дальнейших исследований использовали семь линий картофеля с экспрессией *HvNHX2* (WTHvNHX2), в которых транскрипция мРНК целевого гена была показана одновременно двумя методами, и три полученных линии с экспрессией *HvNHX3* (WTHvNHX3).

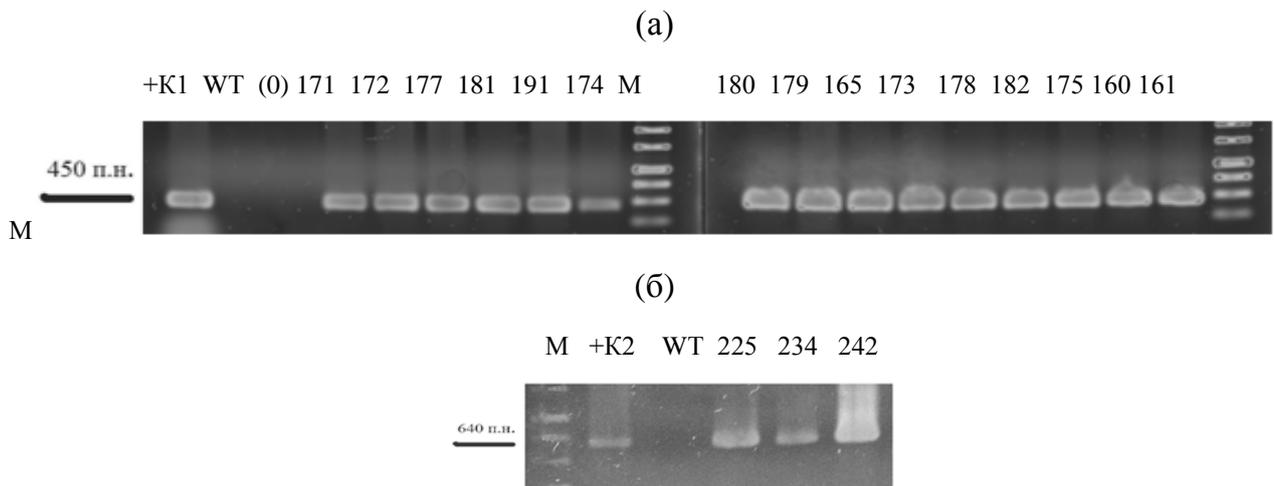


Рис. 6. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР-амплификации на наличие гена *HvNHX2* (а) и гена *HvNHX3* (б) в трансформированном картофеле. Для ПЦР использовались ДНК из: 171 - 161 - WTHvNHX2 со вставкой *HvNHX2*; 225 - 242 - WTHvNHX3 со вставкой гена *HvNHX3*; (+K1) - плазмидная ДНК, содержащая вектор pBINvNHX2; +K2 - плазмидная ДНК, содержащая вектор pCambiaHvNHX3; WT - нетрансформированное растение; (0) - проба без матрицы (контроль реакционной смеси); М - маркер молекулярной массы ДНК (1 т.п.н.).

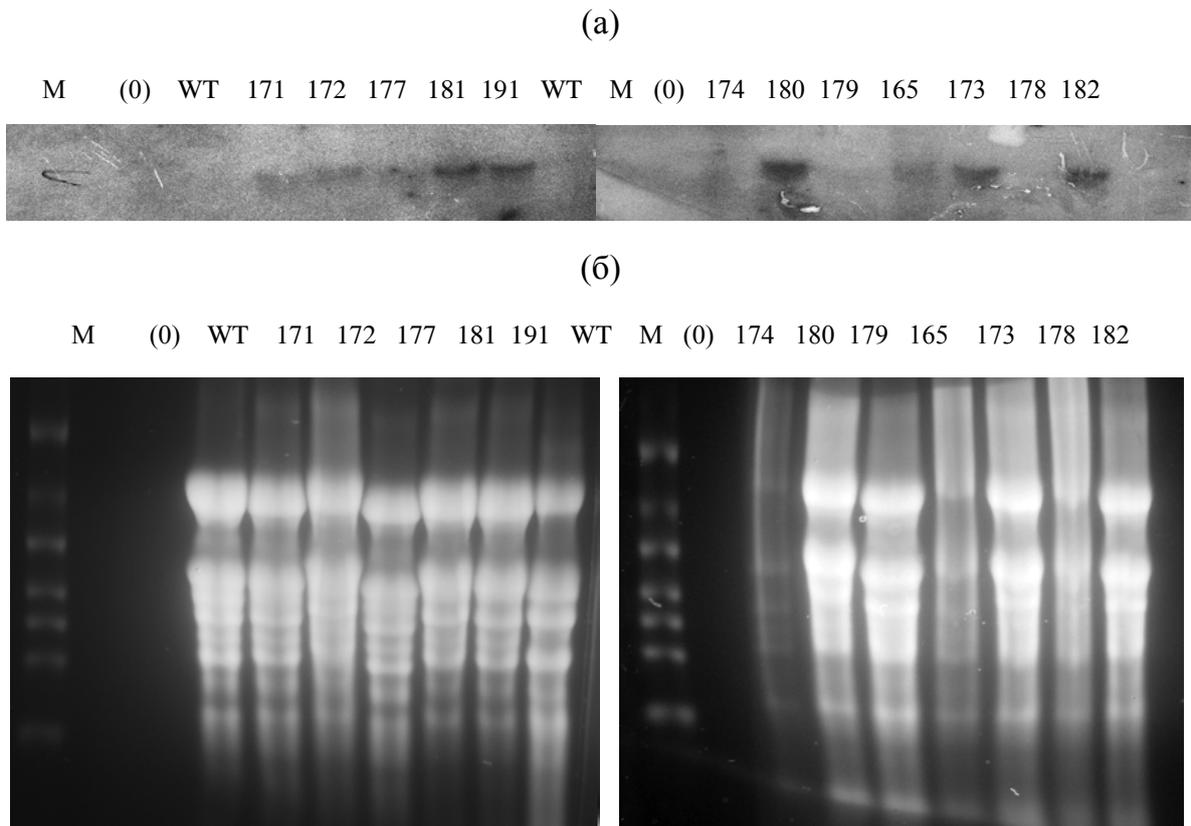


Рис. 7. Экспрессия *HvNHX2* в картофеле: (а) Нозерн-гибридизация totalной РНК с зондом *HvNHX2*, (б) электрофореграмма totalной РНК, WT- нетрансформированные растения картофеля; М – РНК-маркер RiboRuler; 171-182 – сигнал с трансгенных растений; (0) – проба без матрицы (контроль реакционной смеси).

5. Оценка солеустойчивости трансгенных растений картофеля с геном *HvNHX2* или геном *HvNHX3*

Все линии WTHvNHX2 в стандартных условиях без внесения NaCl накапливали достоверно *объшую* сырую массу побега по сравнению с WT-растениями, причем наиболее велика была сырая масса у 181 линии - $1,21 \pm 0,21$ г. Также побеги WTHvNHX2 были выше и накапливали в 1,5-1,9 раза больше сухую массу побега, чем WT-растения (рис. 8). Линии WTHvNHX3 и pBI121 по этим параметрам не отличались от WT-растений.

Для оценки солеустойчивости трансгенных линий картофеля помещали черенки картофеля на агаризованную среду MS со 150 мМ NaCl, в этом случае токсичный эффект Na^+ проявлялся в большей степени за счет прямого поступления Na^+ по ксилеме в растение. Высокое содержание Na^+ в среде негативно влияло как на укоренение черенков, так и на развитие и рост растений. В данном эксперименте было зарегистрировано значительное ингибирование накопления сырой массы побега у всех линий - сырая масса составила от 16,2 до 33,4 % от значения в стандартных условиях, но достоверных отличий между трансгенными линиями картофеля с экспрессией *HvNHX2* или *HvNHX3* и нетрансформированными растениями не было, кроме достоверного снижения накопления сухой массы линией 242. При внесении в среду 150 мМ NaCl высота побега снизилась в 3,1 раза у WT-растений, в 3,0 - 4,2 раза у большинства трансгенных линий; наиболее сильным снижением было у линий 172 и 242 - в 6,1 и 8,4 раза соответственно. Наиболее выраженную реакцию на введение NaCl в среду проявила трансгенная линия 242: в стрессовых условиях длина побега была в 3,4 раза меньше, чем у нетрансформированных растений. Торможение накопления сухой массы побега при 150 мМ NaCl в среде также было значительным для всех исследованных линий (рис. 8), но сухая масса побега как WTHvNHX2, так и WTHvNHX3, и pBI121 не отличалась достоверно от показателя нетрансформированных растений.

Также был проведен анализ содержания Na^+ и K^+ в данных растениях. Достоверных различий по содержанию ионов у нетрансформированных растений и трансгенных линий не обнаружили, за исключением линии 172. Эта линия характеризовалась тенденцией к повышению содержания Na^+ и снижению K^+ по сравнению с WS-растениями при 150 мМ NaCl, при этом в стандартных условиях различий не было.

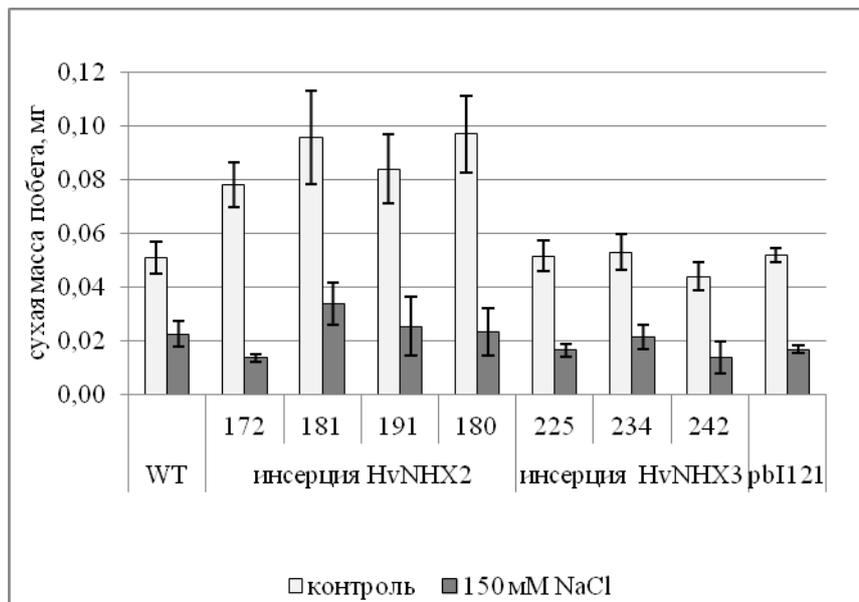


Рис. 8. Влияние 150 мМ NaCl на сухую массу побега картофеля. WT - нетрансформированные растения; 172,181,191,180 - трансгенные линии с экспрессией *HvNHX2*; 225, 234, 242 - линии с экспрессией *HvNHX3*; pB1121 - линия с T-ДНК pB1121

6. Морфометрические особенности картофеля с геном *HvNHX2* при засолении

При оценке солеустойчивости картофеля другим способом растения предварительно укореняли на среде без NaCl. В эксперименте использовали 7 линий WTHvNHX2. Внесение NaCl в среду негативно влияло на длину побега растений всех исследованных линий. Но по сравнению с нетрансформированными растениями рост большинства трансгенных линий (6 из 7) ингибировался в меньшей степени, а длина побега линии 181 уменьшилась всего на 16,9% от значения для данной линии на стандартной среде. В стрессовых условиях 6 из 7 трансгенных линий сохраняли в среднем на 30% больше листьев, чем WT-растения. При оценке влияния засоления на накопление сухой массы листьев (рис. 9) отметили, что сухая масса линий WTHvNHX2 не отличалась или была выше параметра в стандартных условиях, то есть торможения накопления массы при засолении фактически не было. Но сухая масса листьев WT-растения в этих же условиях была значительно снижена. Таким образом, при моделировании засоления оценивали влияние NaCl на испытуемое растение при поступлении Na⁺ через интактные корни, при этом линии картофеля с экспрессией трансгена *HvNHX2* обладали большим числом листьев, были более высокими, активнее накапливали биомассу при засолении.

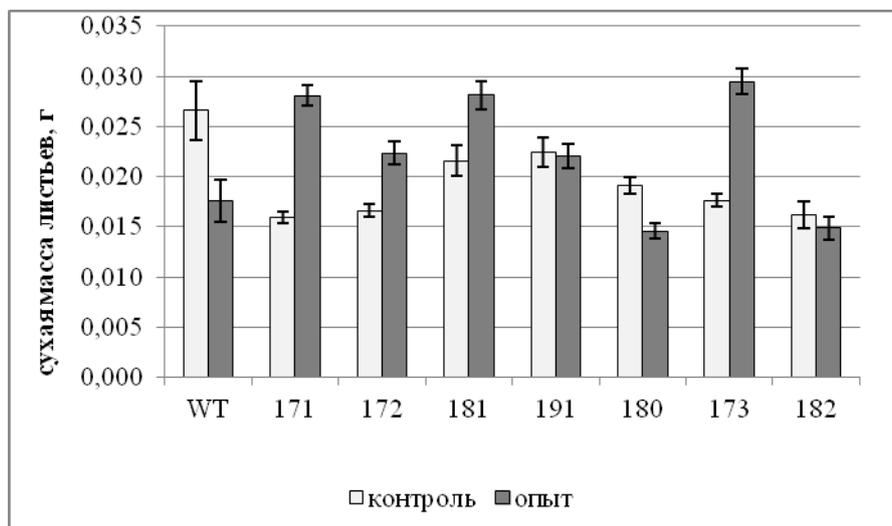


Рис. 9. Влияние 150 мМ NaCl на сухую массу листьев картофеля. WT - нетрансформированные растения; 171-182 - трансгенные линии картофеля с экспрессией гена *HvNHX2*

7. Влияние 150 мМ NaCl на содержание Na⁺ и K⁺ в органах трансгенных растений картофеля с геном *HvNHX2*

При анализе уровня Na⁺ и K⁺ в листьях, стеблях и корнях растений, росших на стандартной среде и в присутствии 150 мМ NaCl в среде (рис. 11), оказалось, что четыре из семи трансгенных линий накапливали достоверно меньше натрия на 1 г сырой массы в листьях и в корнях, чем нетрансформированные растения. В то же время три линии накапливали большее количество натрия в стеблях. Стебли 4 из 7 трансгенных линий содержали большее количество калия в единице сырой массы, чем нетрансформированные растения, как в контрольных условиях, так и при повышенном содержании NaCl; для листьев в тех же условиях наблюдалась обратная картина.

Табл.3. Отношение K⁺/Na⁺ в нетрансформированных и трансгенных растениях

	контроль		опыт	
	WT	WT <i>HvNHX2</i>	WT	WT <i>HvNHX2</i>
корень	9,32	10,72±1,89	0,34	1,57±0,78
стебель	7,17	10,14±3,71	0,31	0,50±0,18
лист	5,70	9,22±2,08	0,31	0,31±0,12

Проведено исследование влияния 150 мМ NaCl на клубнеобразование трансгенных линий картофеля 172 и 181 с экспрессией *HvNHX2*. Интересно, что трансгенные линии образовывали больше крупных клубней, чем растения исходного сорта. При этом средняя масса клубня у линии 181 была в 1,6 раз выше, чем у WT-растений в контрольных условиях и 1,8 раз выше при засолении. Анализ накопления ионов (рис.10) показал, что у трансгенных линий содержание Na⁺ было выше в клубнях, чем у WT -растений, снижаясь в столонах, но в то же время накопление K⁺ на 1 г сырой массы достоверно не отличалось.

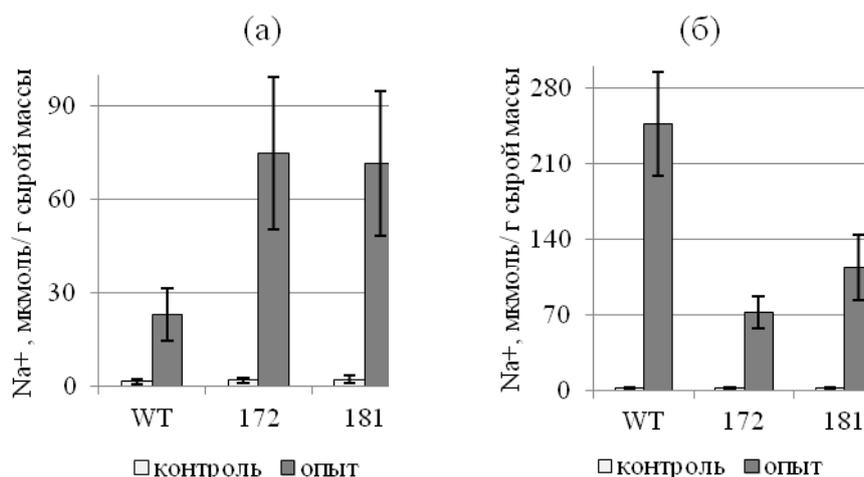


Рис. 10. Содержание Na⁺ в клубнях (а) и столонах (б) картофеля.

WT - нетрансформированные растения; 172 и 181 - линии с экспрессией *HvNHX2*

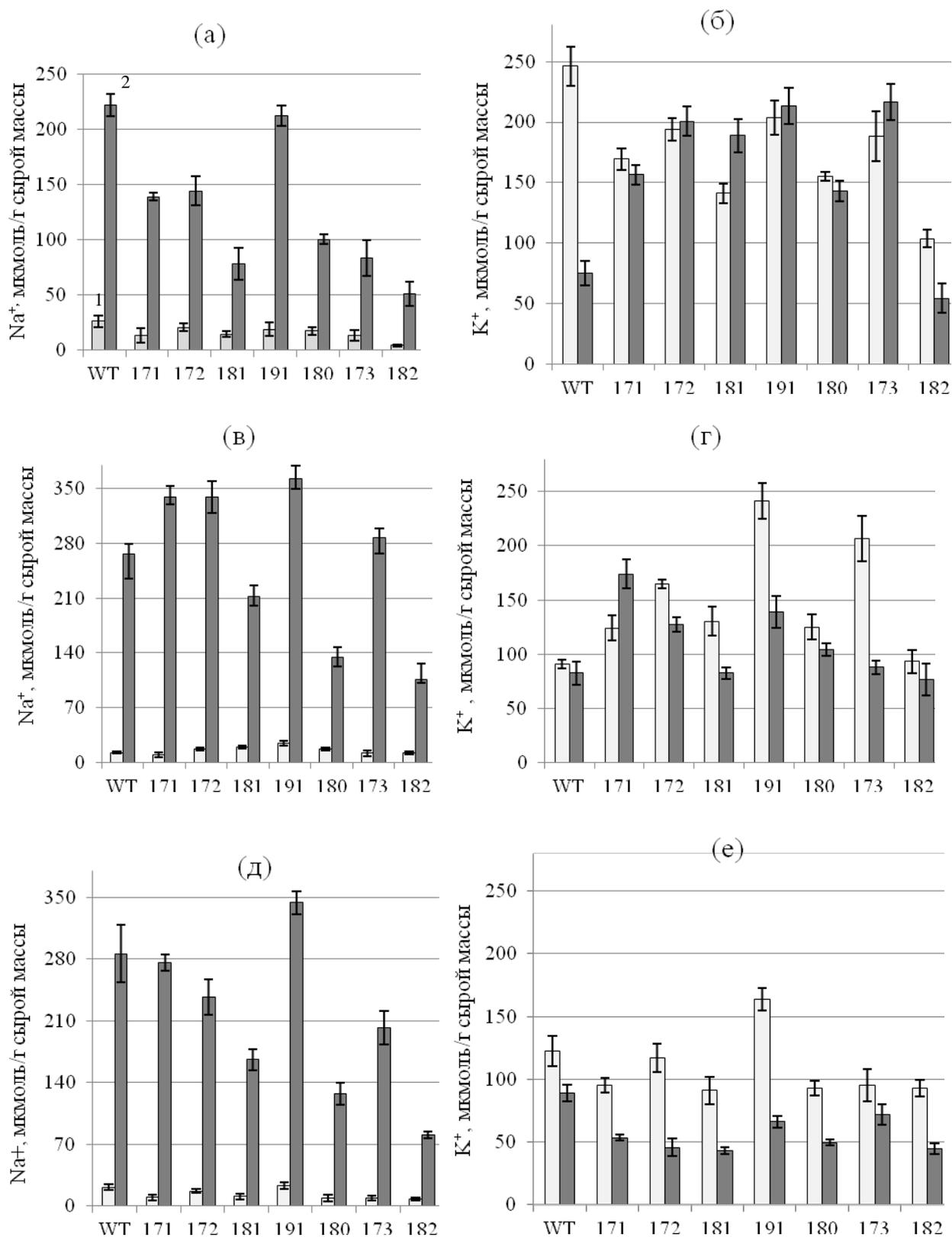


Рис. 11. Влияние 150 мМ NaCl на содержание ионов натрия в корнях (а), стеблях (в) и листьях (д) и на содержание ионов калия в корнях (б), стеблях (г) и листьях (е) нетрансформированных растений (WT) и трансгенных линий (171-182). Столбик 1 - контроль, столбик 2 - рост на среде с 150 мМ NaCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема солеустойчивости растений издавна привлекает внимание ученых всего мира. На разных этапах развития науки подходы к ее решению изменялись от регистрации изменений роста и развития разных видов и сортов растений на засоленных почвах до создания новых сортов солеустойчивых растений, в том числе генно-инженерными методами. Проведенная работа посвящена изучению роли двух изоформ вакуолярного антипортера ячменя *HvNHX2* и *HvNHX3* в ответе растений на засоление. Для этого были получены трансгенные растения арабидопсиса и картофеля, экспрессирующие *HvNHX2* или *HvNHX3*. Арабидопсис является удобным модельным организмом в молекулярно-биологических, генетических и физиологических исследованиях, но полученные данные по его солеустойчивости нужно очень осторожно переносить на культурные растения.

Несомненно, в модели компартментации, предполагающей, что обусловленная работой NHX-антипортеров солеустойчивость является следствием изоляции токсичных Na^+ в вакуолях, необходимым звеном является также поддержание гомеостаза K^+ в цитозоле клеток разных органов растений. Таким образом, солеустойчивость растений в значительной степени определяется эффективностью механизмов транспорта Na^+ и K^+ . Солеустойчивые растения, в отличие от несолеустойчивых, способны при засолении поддерживать в цитоплазме низкое содержание Na^+ , эффективно регулировать концентрации протонов в органеллах, избегать накопления Na^+ в молодых, активно метаболизирующих органах растения и поддерживать концентрационные градиенты ионов в системе целого растения, внося этим вклад в поддержание градиентов водного потенциала (Hasegawa et al., 2000).

ВЫВОДЫ

1. Получены трансгенные растения арабидопсиса и картофеля, экспрессирующие гетерологичные гены вакуолярных антипортеров *HvNHX2* или *HvNHX3*. Трансгены *HvNHX2* и *HvNHX3* наследовались при семенном размножении арабидопсиса и экспрессировались в процессе вегетативного размножения картофеля.
2. В стандартных условиях выращивания арабидопсис с экспрессией трансгена *HvNHX2* или с экспрессией *HvNHX3* и картофель с экспрессией трансгена *HvNHX2* характеризовались повышенным накоплением биомассы побегов по сравнению с нетрансформированными растениями.
3. Большинство линий арабидопсиса и картофеля с экспрессией трансгена *HvNHX2* проявили повышенную устойчивость к 150 мМ NaCl, тогда как экспрессия трансгена *HvNHX3* в арабидопсисе и картофеле не сопровождалась повышением солеустойчивости трансгенных растений по сравнению с нетрансформированными растениями.
4. В повышенной солеустойчивости трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих ген *HvNHX2*, важное значение имело поддержание высокого

уровня пролина, K^+ и отношения K^+/Na^+ в листьях растений, что подтверждается высокими коэффициентами корреляции между индексом солеустойчивости и содержанием K^+ (+0.849) и отношением K^+/Na^+ (+0.693).

5. Повышенная солеустойчивость трансгенных растений картофеля, экспрессирующих ген *HvNHX2*, проявилась при поддержании в корнях содержания K^+ на уровне значений в стандартных условиях и пониженного накопления Na^+ , тогда как в листьях отношения K^+/Na^+ не отличалось от его уровня у нетрансформированных растений. При клубнеобразовании высокое содержание Na^+ сопровождало быстрое развитие клубней трансгенного картофеля на ранней стадии их формирования. Эти данные могут свидетельствовать о решающем значении в солеустойчивости трансгенных растений картофеля высокой активности NHX-антипортеров тонопласта в переносе Na^+ в вакуоль.

6. Полученные данные свидетельствуют о возможности повышения солеустойчивости растений при гетерологичной экспрессии отдельных изоформ вакуолярного антипортера ячменя, причем механизм солеустойчивости, по-видимому, может быть различен в зависимости от вида трансформированных растений.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) **Кривошеева А.Б.**, Варламова Т.В., Юрьева Н.О., Соболюкова Г.И., Холодова В.П., Беляев Д.В. (2014) Получение трансгенных растений картофеля с геном *HvNHX3* и оценка их устойчивости к засолению. *Физиология растений*, 6, 1–11.
- 2) **Кривошеева А.Б.**, Юрьева Н.О., Соболюкова Г.И., Беляев Д.В. (2014) Рост трансгенного картофеля с катион-протонным антипортером *HvNHX2* при засолении. *Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки*, 14, 156-160.
- 3) **Липатникова А.Б.**, Баят Ф., Беляев Д.В. (2010) Трансформация *Arabidopsis thaliana* геном вакуолярного Na^+/H^+ - антипортера ячменя. В сб. тезисов: *III Всероссийский симпозиум «Физиология трансгенного растения и фундаментальные основы биобезопасности»*, Москва, с. 57.
- 4) **Липатникова А.Б.**, Митина А.М., Соболюкова Г.И., Беляев Д.В., Юрьева Н.О. (2010) Введение гена вакуолярного Na^+/H^+ - антипортера ячменя *HvNHX2* в растения картофеля повышает их солеустойчивость и дифференцированно влияет на накопление ионов натрия в различных сортах. В сб. тезисов: *Всероссийский симпозиум РАСТЕНИЕ И СТРЕСС (Plants under Environmental Stress)*, Москва, с. 219.
- 5) **Кривошеева А.Б.**, Баят Ф., Рослякова Т. В., Беляев Д.В. (2011) Эффекты сверхэкспрессии генов вакуолярных антипортеров моновалентных катионов ячменя на содержание ионов и рост арабидопсиса. В сб. тезисов: *VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий»*, Н.Новгород, с. 384.

- 6) **Кривошеева А.Б.**, Соболюкова Г.Н., Юрьева Н.О., Рослякова Т.В., Беляев Д.В. (2012) Анализ роста растений картофеля со встройкой трансгенов *HvNHX2* и *HvNHX3* при засолении. В сб. тезисов: *16-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология наука XXI века"*, Пущино, с.469-470
- 7) **Кривошеева А.Б.**, Рослякова Т.В., Беляев Д.В. (2012) Экспрессия генов вакуолярных NHX - антипортеров ячменя в растениях арабидопсиса как инструмент изучения функции кодируемых ими белков. В сб. тезисов: *IV Всероссийский симпозиум «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность» и Годичное собрание Общества физиологов растений России*, Москва, с.59
- 8) **Кривошеева А.Б.**, Беляев Д.В. (2013) Сравнительный анализ солеустойчивости трансгенных линий арабидопсиса, экспрессирующих вакуолярный антипортер ячменя *HvNHX2*. В сб. тезисов: *Всероссийская научная конференция с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений, Годичное собрание ОФР»*. Москва, с. 121
- 9) **Кривошеева А.Б.**, Юрьева Н.О., Беляев Д.В. (2013) Морфометрические особенности и накопление Na^+ и K^+ трансгенными растениями картофеля, несущими ген *HvNHX2*, на фоне повышенного содержания NaCl. В сб. тезисов: *X Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*. Казань, с.237-238
- 10) **Кривошеева А.Б.**, Юрьева Н.О., Беляев Д.В., Холодова В.П. (2014) Содержание ионов калия в картофеле со встройкой трансгена *HvNHX2* при повышенном уровне NaCl // В сборнике: *Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий. Годичное собрание Общества физиологов растений России. Международная научная конференция и школа молодых ученых*. Калининград, с. 264-266.