

# БОТАНІКА

УДК 577:122:58.036.2

Д.А. БЛЮМА

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України  
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601

## **ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ АКВАПОРИНІВ ПІДГРУПИ PIP2 В РОСЛИНАХ SIUM LATIFOLIUM L. В УМОВАХ РІЗНОГО ВОДНОГО РЕЖИМУ**

Досліджено вплив помірного водного дефіциту на експресію генів аквапоринів підгрупи PIP2 суходільних рослин *S. latifolium*. Показано, що в умовах стресу рівень експресії генів підвищувався на стадіях онтогенезу: вегетації, бутонізації-цвітіння, цвітіння-плодоношення.

*Ключові слова:* аквапорини, експресія генів, водний дефіцит

Згідно сучасних уявлень, існує три шляхи, по яких вода надходить в рослину: 1) по апопласту (вода рухається по міжклітинному простору), 2) по симпласту (вода рухається через цитоплазму клітин по плазмодесмах), 3) вода рухається від клітини до клітини через цитоплазматичну мембрану [10].

Тривалий час водну проникність цитоплазматичної мембрани пояснювали дифузією води через ліпідний бішар. Оскільки явище швидкої зміни водної проникності мембран, неможливо пояснити дифузією води через ліпіди, було висловлено припущення існування переносників води білкової природи. Результати подальших досліджень переконливо показали, що процес транспорту води через цитоплазматичну мембрану забезпечують, в основному, аквапорини, які є мембранними білками, що формують спеціалізовані водні канали [5, 9]. Нині число відомих аквапоринів перевищує двісті, причому значну частину становлять аквапорини рослин. Так, наприклад, в геномі *Arabidopsis thaliana* знайдено 35 генів, які кодують аквапорини в *Zea mays* - 33 гени [1, 7]

Оскільки аквапорини беруть участь у транспорті води крізь цитоплазматичну мембрану, рівень експресії їх генів може бути одним із механізмів регуляції внутрішньоклітинного водного балансу під час адаптації рослин до змін водного режиму. Зручним об'єктом для дослідження впливу помірного водного дефіциту на експресію генів аквапоринів є повітряно-водні рослини (геліофіти), які можуть також зростати на суходолі, поблизу від річки, де суходільні рослини знаходяться в умовах помірного водного дефіциту, порівняно з повітряно-водними, протягом онтогенезу. Тому ми поставили за мету з'ясувати, чи впливає помірний водний дефіцит на експресію генів аквапоринів підгрупи PIP2 у геліофітів, які зростають на суходолі.

### **Матеріал і методи досліджень**

Об'єктами досліджень було обрано рослини *Sium latifolium* L., які зростали вздовж узбережжя р. Псьол біля м. Велика Багачка Полтавської області у воді (прибережна водна смуга) та на суходолі, на відстані 3-25 м від річки. Рослини цього виду є багаторічними, за своєю екологією належать до повітряно-водних рослин. *S. latifolium* має повзучі підземні пагони, стебло

гранисто-борозенчасте. Листки гетерофільні: занурені у воду листки двічі- (і більше) перисторозсічені з ниткоподібними частками; надводні листки перисторозсічені з 4-6-парними частками, косояйцеподібними або ланцетними (нерівнобокими біля основи), дрібно-гостропильчастими; окрім тих можуть бути проміжні форми листків. Зростає *S. latifolium* на болотах, у берегів водойм. Завдяки своїй високій адаптивній пластичності рослини вежу нормально вегетують як в прибережній водній зоні, так і на суходолі, формуючи два морфологічно виражені екотипи – суходільний і повітряно-водний.

Матеріал для досліджень збирали у фазах вегетації, бутонізації-цвітіння та цвітіння-плодоношення під час польових експедицій протягом 2007-2010 рр. Матеріал занурювали в рідкий азот на місці збору, подальшу обробку та аналіз проводили в лабораторії. Для досліджень використовували листки повітряно-водних та суходільних рослин.

Виділення РНК проводили за допомогою TRI-REAGENT (Sigma) за відповідним протоколом з деякими змінами. Всі розчини та обладнання, що використовували для роботи з РНК були попередньо оброблені діетилпірокарбонатом (DEPC) та автоклавовані. Рослинний матеріал гомогенізували у рідкому азоті у відповідній кількості TRI-REAGENT з розрахунку 1 мл на 100 мг зразку. Центрифугували (10 хвилин 12000 g, при 4<sup>0</sup> C) та відбирали супернатант. Після додавання хлороформу витримували 10 хвилин за кімнатної температури та центрифугували (10 хвилин 12000 g, при 4<sup>0</sup> C). Преципітацію РНК здійснювали за допомогою ізопропанолу протягом 24 годин при температурі 4<sup>0</sup>C. Після центрифугування (10 хвилин 12000 g, при 4<sup>0</sup>C) зливали супернатант та відмивали РНК за допомогою 75% розчину спирту. Фінальне центрифугування здійснювали 5 хвилин при 7500 g та 4<sup>0</sup>C. Висушували осад та розчиняли у стерильній воді. Кількість РНК вимірювали за оптичною щільністю при довжині хвилі 260 нм.

Вироджені праймери були сконструйовані на основі відомих послідовностей мРНК РІР2-аквапоринів дводольних рослин. Послідовності мРНК були отримані з бази даних NCBI. Аналіз послідовностей мРНК був проведений за допомогою програм BLAST та ClustalW. Використані праймери комплементарні найбільш консервативним ділянкам мРНК аквапоринів дводольних рослин.

РТ-ПЛР (зворотньо траскрибована полімеразна ланцюгова реакція) проводили за методикою протоколу FERMENTAS (Литва). Для отримання кДНК тотальну РНК та специфічний reverse-праймер інкубували 5 хв при 65<sup>0</sup>C, додавали 5x буфер, 10мМ dNTP mix, інгібітор РНКаз та інкубували ще 5 хв при 37<sup>0</sup>C. Додавали 1 об'єм M-MuLV зворотньої транскриптази і інкубували 1 год при 42<sup>0</sup>C. Зупиняли реакцію нагріванням до 70<sup>0</sup>C 10 хв. Отриману кДНК використовували для подальшої ПЛР. ПЛР проводили з використанням вироджених праймерів довжиною 18-20 нуклеотидів, сконструйованих з використанням бази даних NCBI та IDT DNA (<http://www.ncbi.nih.gov/>; <http://www.idtdna.com/analyzer>) та програми ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

Forward 5' CAC ATI AAC CCG GCG GTG AC-3'

Reverse 5' GCI GAG AAG ACG GTG TAG AC -3'

В кожний епендорф додавали буфер для ПЛР, MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix, Taq ДНК полімерази, праймери, кДНК та стерильну воду, 25 мкл мінеральної олії для ПЛР. Ампліфікацію проводили при наступному режимі:

95<sup>0</sup>C – 30 сек

57<sup>0</sup>C – 30 сек

72<sup>0</sup>C – 1хв

30 циклів

72<sup>0</sup>C – 10 хв

10<sup>0</sup>C – зберігання

Продукти RT-PCR розділяли у 2%-му агарозному гелі, візуалізували в ультрафіолетовому світлі та фотографували за допомогою системи візуалізації гелів (Bio-Vision). Для оцінки кількості продуктів використовували програмне забезпечення Image Mater Total Lab™.

### Результати досліджень та їх обговорення

Для досліджень експресії генів РІР2-аквапоринів нами вперше сконструйовані вироджені праймери на основі відомих послідовностей мРНК РІР2-аквапоринів дводольних рослин. Використовуючи дані праймери, ми виявили значну відмінність в експресії генів аквапоринів у повітряно-водних та суходільних рослин *S. latifolium* протягом 2008-2010 років. Експресія генів РІР2-аквапоринів повітряно-водних рослин майже не відрізнялась протягом стадій вегетації, бутонізації-цвітіння та цвітіння-плодоношення 2008 року і була значно нижчою порівняно з експресією генів РІР2-аквапоринів суходільних рослин (рис. 2 А). Така ж тенденція спостерігалась в 2009 році. Експресія генів РІР2-аквапоринів суходільної форми залишалась на підвищеному рівні порівняно з експресією генів повітряних-водних рослинами і не змінювалась протягом онтогенезу (рис. 2 Б). Особливо чітка різниця в експресії генів РІР2-аквапоринів між повітряно-водними та суходільними рослинами спостерігалась на стадіях бутонізації-цвітіння та цвітіння-плодоношення в другій половині липня та в першій половині серпня 2010 року, коли температура повітря досягала 35-40<sup>0</sup>С. На всіх стадіях онтогенезу експресія генів аквапоринів суходільних рослин залишалась приблизно на одному рівні, в той час як в повітряно-водних рослин вона була нижчою на стадії цвітіння- плодоношення порівняно зі стадією вегетації та бутонізації-цвітіння (рис.2 В). Така тенденція в експресії цих генів вказує на існування механізму адаптації суходільних рослин до помірного водного дефіциту. Отримані нами дані узгоджуються з літературними щодо участі аквапоринів РІР2 підгрупи у відповіді рослини на вплив водного дефіциту.

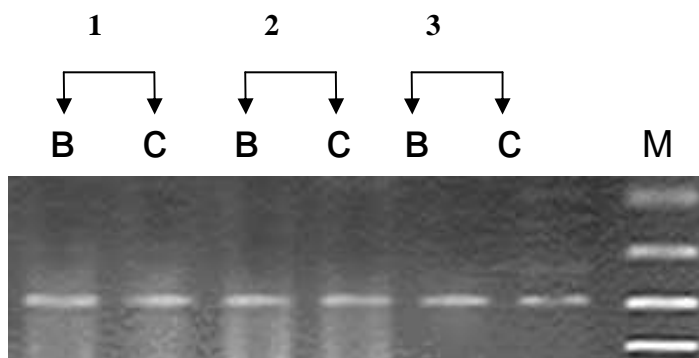


Рис. 1 Експресія мРНК актину Агарозний гель-електрофорез продуктів реакції зворотньої транскрипції та ПЦР. Продукти ПЦР розміром 200 пн. В – повітряно-водний екотип; С – суходільний екотип; М – 100пн ПЦР маркер бенди від 100 до 400 пн 1 - стадія вегетації, 2 – стадія бутонізації/цвітіння, 3 – стадія цвітіння/плодоношення

Відомо, що водний стрес впливає як на експресію генів рослинних аквапоринів, так і на активність самих білків. Так, показано, що штучний водний стрес, викликаний обробкою рослин *Arabidopsis thaliana* 250мМ розчину манітолу, значно змінював експресію більшості РІР-генів, причому в різних напрямках. Експресія генів РІР1;5 РІР2;2 РІР2;3 РІР2;6 швидко знижувалась майже в 10 разів порівняно з нормальним рівнем експресії цих генів. Експресія гену РІР1;1 навпаки підвищувалась. Експресія генів РІР1;2 РІР2;7 та РІР2;8 залишалась незмінною в перші 12 годин стресу а потім різко знижувалась [6]. В умовах довготривалого (більше 12 діб) помірного водного стресу експресія переважної більшості генів РІР-родини *A.thaliana* знижувалась. Експресія двох ізоформ генів аквапоринів - РІР1;4 та РІР2;5 навпаки підвищувалась [12].

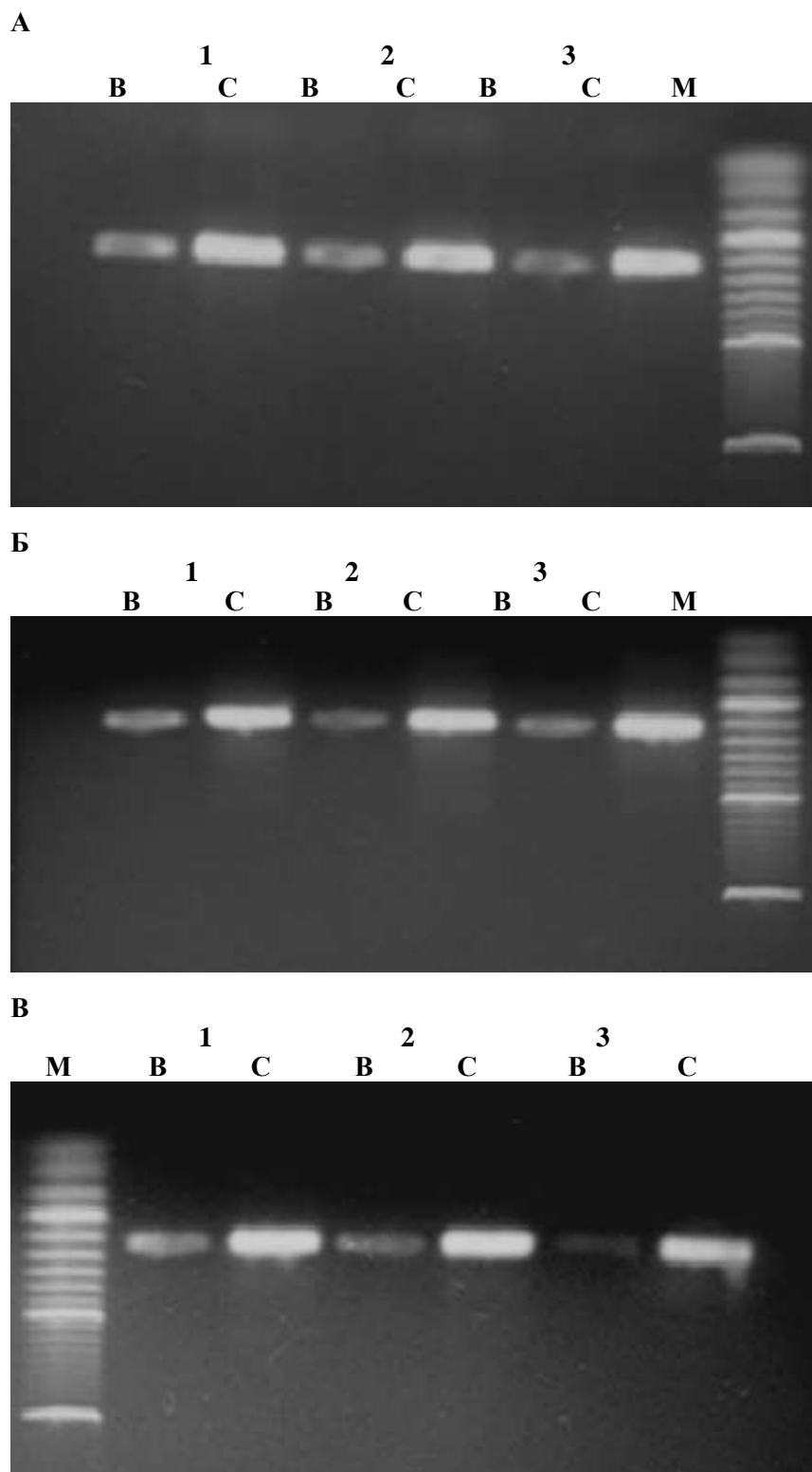


Рис.2. Експресія мРНК аквапоринів RIP2 підгрупи. Агарозний гель-електрофорез продуктів реакції зворотної транскрипції та ПЦР. Продукти ПЦР розміром 270 пн. А-2008 рік, Б-2009 рік, В-2010 рік В – повітряно-водний екотип; С – суходільний екотип; М – 50 пн ПЦР-маркер, бенди від 50 до 1000 пн. 1 - стадія вегетації, 2 – стадія бутонізації/цвітіння, 3 – стадія цвітіння/плодоношення

Така різна реакція генів аквапоринів (посилення чи послаблення експресії або взагалі відсутність будь-якої реакції) у відповідь на водний стрес припускає, що різні ізоформи

аквапоринів рослин грають різну роль у регуляції водного транспорту, причому певні аквапорини беруть участь в адаптації рослини до умов водного дефіциту [4]. Наприклад, різна реакція генів аквапоринів у відповідь на водний дефіцит була виявлена у рослин двох популяцій рису *Oriza sativa*: одна зростала на високій місцевості, стійка до посухи, друга - низинного типу, чутлива до посухи. В умовах посухи, кількість PIP-аквапоринів значно зростала в клітинах коренів рослин обох популяцій, в клітинах листків – тільки у стійкої до посухи популяції. В той час як кількість траскриптів більшості ізоформ аквапоринів значно зростала в клітинах коренів та листків стійкого типу, вона не змінювалась або знижувалась у чутливого типу *O. sativa*. Ці дані свідчать про те, що аквапорини різних популяцій одного виду по різному реагують на стрес в залежності від чутливості до нього [11]. Показано, що експресія гену PIP1 *Vicia faba* у клітинах *A.thaliana* посилювала стійкість до посухи за рахунок закриття продихів, що підтверджує участь аквапоринів у відповіді рослини на посуху [3].

В дослідах на мутантах *A thaliana* з низьким рівнем аквапоринів PIP1 та PIP2 в цитоплазматичній мембрані було виявлено, що водна провідна здатність цитоплазматичної мембрани мутантів та рослин *A. thaliana* дикого типу не відрізнялась в стаціонарних умовах, але в умовах посухи мутантні рослини відновлювали водну провідну здатність та рівень транспірації набагато повільніше ніж рослини дикого типу, та мали нижчий водний потенціал після відновлення поливу цих рослин. На основі цих даних автори зробили висновок що PIP-білки відіграють важливу роль у відновленні водного балансу рослини після припинення посухи [8].

Вважається, що в сприятливих умовах зростання рослин, коли відбувається транспірація, вода рухається по тканинах переважно по апопласту. В умовах водного дефіциту, коли рівень транспірації значно знижується, вода транспортується крізь цитоплазматичну мембрану клітин, тобто через аквапорини [12]. Так, у рослин *Phaseolus vulgaris* було виявлено значне підвищення експресії гену аквапорину PIP2;1 у відповідь на посуху, яке супроводжувалось підвищенням кількості аквапоринів в цитоплазматичній мембрані. При цьому, підвищення експресії спостерігалось в клітинах листків з низьким рівнем транспірації [2]. Було також встановлено, що зниження транспірації в листках викликало підвищення водної пропускної здатності цитоплазматичної мембрани клітин цих листків. На думку авторів це явище опосередковане збільшенням кількості аквапоринів в мембрані [6].

Виявлена нами тенденція в експресії генів аквапоринів PIP2 підгрупи а також дані літератури дає змогу припустити, що в умовах помірного водного дефіциту в клітинах листків суходільної рослини підвищується рівень експресії аквапоринів, який веде до підвищення кількості аквапоринів в цитоплазматичній мембрані клітин, що беруть участь у транспорті основної кількості води по рослині в умовах посухи.

## Висновки

1. За допомогою зконструйованих нами вироджених праймерів вперше визначено рівень експресії генів аквапоринів в листках рослин *Sium latifolium L.*, повітряно-водних за своєю екологією, які зростають в природі в різних умовах водного режиму.
2. Встановлено підвищений рівень експресії генів PIP2- аквапоринів в листках суходільних рослин на фаза вегетації, бутонізації-цвітіння та цвітіння-плодоношення, тобто в умовах помірного водного дефіциту, протягом 2008- 2010 років. Особливу різницю в накопиченні мРНК аквапоринів повітряно-водних та суходільних рослин виявлено в другій половині липня та в першій половині серпня 2010 року, коли температура повітря трималась близько 35-40°C
3. Одержані дані дають підставу вважати, що аквапорини підгрупи PIP2 приймають участь в адаптації рослин до змін водного режиму в природних умовах.

1. *An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in Arabidopsis thaliana* / J.Y. Jang, D.G. Kim, Y.O. Kim [et al.] // Plant Mol. Biol. - 2004. – Vol. 54. - P. 713–725.

2. *Drought, Abscisic Acid and Transpiration Rate Effects on the Regulation of PIP Aquaporin Gene Expression and Abundance in Phaseolus vulgaris* / R. Aroca, A. Ferrantei, P. Vernieri, [et al.] // *Plants Annals of Botany*. - 2006. - Vol. 98. - P. 1301–1310.
3. *Expression of the Vicia faba VfPIP1 gene in Arabidopsis thaliana plants improves their drought resistance* / XH. Cui, FS. Hao, H. Chen [et al.] // *Journal of Plant Research*. - 2008. - Vol. 121. - P. 207–214.
4. *Hachez C. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions?* / C. Hachez, E. Zelazny, F. Chaumont // *Biochim Biophys Acta*. - 2006. - Vol. 1758. - P. 1142–1156.
5. *Luu D.T. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status* / Doan-Trung Luu, Christophe Maurel // *Plant Cell Envir.* - 2005. - Vol. 28, №1. - P. 85–96
6. *Morillon R. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells* / Raphael Morillon, Maarten J. Chrispeels // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. - 2001. - Vol. 98. - P. 14138–14143.
7. *Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions* / C. Maurel, L. Verdoucq, D.T. Luu [et al.] // *Annu Rev Plant Biol.* - 2008. - Vol. 59. - P. 595–624.
8. *Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit* / P. Martre, R. Morillon, F. Barrieu [et al.] // *Plant Physiology*. - 2002. - Vol. 130. - P. 2101–2110.
9. *Reizer J. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins* / J. Reizer, A. Reizer, M. Saier // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* - 1993. - 28. - P. 235–257.
10. *Steudle E. How does water get through roots?* / Ernst Steudle, Carol A. Peterson // *J. Exp. Bot.* - 1998. - Vol. 49, №5. - P. 775–788.
11. *Upland rice and lowland rice exhibited different PIP expression under water deficit and ABA treatment* / HL. Lian, X. Yu, D. Lane [et al.] // *Cell Res.* - 2006. - Vol. 16. - P. 651–660.
12. *Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins* / E. Alexandersson, L. Fraysse, S. Sjoval-Larsen [et al.] // *Plant Molecular Biology*. - 2005. - Vol. 59. - P. 469–484.

*Д.А. Блюма*

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АКВАПОРИНОВ ПОДГРУППЫ PIP2 В РАСТЕНИЯХ SIUM LATIFOLIUM L. В УСЛОВИЯХ РАЗНОГО ВОДНОГО РЕЖИМА**

Исследовано влияние умеренного водного дефицита на экспрессию генов аквапоринов подсемейства PIP2 сухолюбивых растений *S. latifolium*. Показано, что в условиях стресса уровень экспрессии генов повышался на стадиях онтогенеза: вегетации, бутонизации-цветения, цветения-плодоношения.

*Ключевые слова: аквапорины, экспрессия генов, водный дефицит*

*D.A. Bliuma*

Institute of Botany of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

**PIP2 – AQUAPORIN GENE EXPRESSION OF SIUM LATIFOLIUM L. UNDER DIFFERENT WATER SUPPLY**

The effect of moderate water deficit on gene expression of aquaporin PIP2- subfamily of terrestrial plants of *S. Latifolium* was investigated. It is shown that under stress the level of PIP2 gene expression increased at the stages of vegetation, budding-flowering and flowering - fruiting.

*Key words: aquaporins, gene expression, water deficit*

Рекомендує до друку

М.М. Барна

Надійшла 22.09.2010