

УДК 577:606:633.11; 579.254.2

ТРАНСКРИПЦІЙНІ ФАКТОРИ NAC-СУБРОДИНИ У ПІДВИЩЕННІ РІВНЯ СТІЙКОСТІ КУЛЬТУРНИХ РОСЛИН ДО ОСМОТИЧНИХ СТРЕСІВ

О.М. ТИЩЕНКО, С.І. МИХАЛЬСЬКА

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

В огляді схарактеризовано транскрипційні фактори NAC-субродина, розглянуто ефективність їх використання в молекулярних біотехнологіях для підвищення рівня стійкості культурних рослин до осмотичних стресів.

Ключові слова: транскрипційні фактори, NAC, трансгенез, осмотичний стрес.

NAC (*Petunia NAM*, *Arabidopsis ATAF1-2*, *CUC2*) — специфічна для рослин субродина транскрипційних факторів (ТФ), які виконують різноманітні біологічні функції, в тому числі контролю експресії генів, пов'язаних зі стійкістю до абіотичних (у цьому випадку їх іще класифікують як SNAC) та меншою мірою до біотичних чинників. Перший представник цих ТФ був схарактеризований у петунії й отримав назву NAM. У подальшому гени, що кодують ТФ NAC, були ідентифіковані в геномі арабідопсису при вивченні промоторів генів ранньої відповіді на дегідратацію *ERD1* (Early Responsive to Dehydration 1), де ключове значення мала MYC-подібна послідовність CATGTG. Індукція генів *ERD1* здійснювалася у відповідь на водний дефіцит, засолення, дію АБК [10, 13]. Незважаючи на те що встановлено десятки—сотні членів цієї субродина (зокрема, у кукурудзи припускається 190 ТФ, цит. за [16]), біологічна функція генів, пов'язаних зі стресостійкістю, досліджена для обмеженої кількості видів.

ТФ NAC різних видів можуть взаємодіяти з неоднаковими *cis*-діючими елементами. Так, у промоторах генів *ERD1* арабідопсису повна послідовність, що упізнається ТФ NAC, була CATGT, де тетрамер CATG — кор-послідовність сайту зв'язування, тоді як білки пшениці TaNAC69, сої GmNAC11 і GmNAC20 взаємодіють із кор-послідовністю CGTA/G. N-Термінальна ділянка білків містить дуже консервативний домен, що зв'язує NAC і формує структуру типу спіраль—поворот—спіраль. Остання взаємодіє з ДНК. Ця ділянка може включати консервативні субдомени, зокрема у кукурудзи їх 5 [16]. C-Термінальна ділянка різноманітна за розміром та амінокислотними послідовностями. Вважають, що вона є ділянкою транскрипційної активації. Крім NAC-домена в промоторах генів, які кодують ТФ NAC, можуть знаходитися й інші *cis*-діючі елементи. Так, у промоторі гена *OsNAC6* рису встановлено по кілька АБК-реагуючих елементів ABRE (ABREs; ACGTGG/TC), сайтів упізнання

MYB (MYBRs; C/TAACNA/G), MYC (MYCRs), а також *cis*-діючі елементи, які беруть участь у відповіді на біотичні стреси, а саме: W-бокси (TTGAC), GCC-бокси (GCCGCC), що є сайтами впізнавання транскрипційних факторів WRKY і ERF [1, 6, 9, 10, 15, 16].

Функціональним аналізом встановлено, що більшість ТФ NAC є транскрипційними активаторами. До них, наприклад, належать TaNAC69 пшениці, ZmSNAC1 кукурудзи, OsNAC6 рису, GmNAC11 сої [2, 3, 7, 10, 15]. Разом з тим у низки представників цієї субродини були ідентифіковані й транскрипційні інгібітори [6]. ТФ NAC в основному локалізовані в ядрі клітин рослин, однак можуть бути асоційованими і з мембраною. Так, чотири представники TaNAC і TaNTL5 (Δ TM) пшениці, в яких відсутній трансмембранний мотив, ідентифіковані виключно в ядрі, TaNAC2a — встановлений в ядрі й плазмолемі, а TaNTL5 асоційований тільки з плазмолемою [13].

У трансгенних рослин пшениці (*Triticum aestivum* L.) з використанням гена *TaNAC69* під конститутивним промотором ячменю — HvDhn8s і сильним стресіндукованим промотором — HvDhn4s експресія генів *TaNAC69* (1—4) в нормальних умовах здійснювалась у коренях, тоді як за водного дефіциту — в листках і коренях [15]. Виявлено толерантність до водного дефіциту HvDhn4s::*TaNAC69*-рослин пшениці, в яких відбувалась надекспресія власного гена *TaNAC69I*. При цьому збільшувалась біомаса пагонів і коренів трансгенних рослин в умовах комбінованого водного дефіциту й помірного сольового стресу, видовжувались корені за нестачі вологи, поліпшувалась ефективність використання води.

Транскрипційний фактор TaNAC69 та його гомолог у рису ONAC131 здатні взаємодіяти з *cis*-елементами промоторів генів хітинази, ZIM, гліоксилази. Надекспресія *TaNAC69* супроводжувалась підвищенням рівня експресії низки структурних генів, пов'язаних із відповідною реакцією на стрес. Автори вважають, що TaNAC69 є транскрипційним активатором, який бере участь у процесах адаптації пшениці до водного дефіциту.

Ген рису *OsNAC10* здійснює експресію головним чином у коренях та індукується водним дефіцитом, засоленням, АБК. У трансгенних рослин рису з надекспресією гена *OsNAC10* під контролем конститутивного або стресіндукованого промотора підвищувався рівень стійкості до водного дефіциту, засолення, позитивних низьких температур на стадії вегетативного росту [4]. Найважливіше, що в RCc3::*OsNAC10*-рослин на репродуктивній стадії розвитку значно зростала стійкість до водного дефіциту, при цьому їх урожайність в умовах стресу збільшувалась на 25—42 % порівняно з контролем, а в нормі — на 5—14 %. Водночас урожайність трансгенних рослин за використання конститутивного промотора була аналогічна нетрансгенному контролю як у нормі, так і в умовах водного дефіциту. Згідно з результатами аналізу спектра генів, що транскрибувалися на різних етапах розвитку, така відмінність у польових умовах за водного дефіциту могла відображати зміни експресії генів, що індуються транскрипційним фактором OsNAC10.

Підвищений рівень стійкості до водного дефіциту спостерігали також у трансгенних рослин рису, що надекспресують свій власний ген *OsNAC5* [5, 11]. Урожайність RCc3::*OsNAC5*- та GOS2::*OsNAC5*-рослин, яку досліджували протягом трьох сезонів, підвищувалася відповідно на

9—23 та 9—26 % за нормальних умов культивування. В умовах стресу врожайність рослин RCc3::*OsNAC5* була істотно більшою (на 22—63 %), тоді як рослин GOS2::*OsNAC5* — зменшувалася або відповідала врожайності контрольних рослин. У трансгенних рослин збільшувалась довжина коренів, а їх діаметр був більшим у рослин RCc3::*OsNAC5*. Ідентифіковано відповідно 19 і 18 генів, які специфічно експресувалися в RCc3::*OsNAC5*- та GOS2::*OsNAC5*-рослинах. Коренеспецифічна надекспресія гена *OsNAC5* приводила до зміни розміру коренів, у результаті чого підвищувались рівні стресотолерантності і врожайності в польових умовах. Порівняльним аналізом трансгенних ліній, що надекспресували *OsNAC5*, і ліній із частковою супресією цього гена шляхом РНК-інтерференції (RNAi) встановлено, що на відміну від *OsNAC5*-ліній RNAi-лінії були менш толерантними до стресів, ніж дикий тип.

Накопичення *L*-проліну і розчинних цукрів позитивно корелювало з рівнем експресії гена *OsNAC5* в *OsNAC5*-лініях. Менше накопичення *L*-проліну в RNAi-лінії можливо було пов'язане з інгібуванням його синтезу і транспорту. Відповідно підвищувались і знижувались кількості малондіальдегіду і H_2O_2 в RNAi- і *OsNAC5*-ліній, в RNAi-лінії також було більшим співвідношення іонів Na^+ і K^+ .

Експресія гена *OsNAC5* індукувалась дефіцитом води, засоленням, дією холоду, АБК та жасмонової кислоти [12]. *OsNAC5* взаємодіє з ТФ *OsNAC6*, *SNAC1*. Надекспресія *OsNAC5* у трансгенних рослинах рису не впливала на їх ріст, але активувала низку стресіндукованих генів, у тому числі *OsLEA3*. На відміну від *OsNAC5* надекспресія *OsNAC6* призводила до уповільнення росту.

Ген *OsNAC6* рису індукується водним дефіцитом, засоленням, холодом (4 °C), а також пораненням, дією АБК, метилжасмонату, біотичних стресорів [10]. Виявлено підвищену стійкість до водного дефіциту й засолення трансгенних рослин рису поколінь T_2 і T_3 , що надекспресують свій власний ген *OsNAC6*. За стресу швидкість росту LIP9::*OsNAC6*-рослин та їх урожайність не відрізнялась від контрольних показників. Негативного впливу на ріст за нормальних умов культивування не спостерігали. Сповільнювався ріст і знижувалась урожайність трансгенних рослин рису, які конститутивно надекспресували *OsNAC6* за нормальних умов вегетації, однак на фоні пригнічення росту підвищувалась їх толерантність до грибного патогена *M. grisea*. Крім того, в трансгенних рослин ідентифіковано індукцію транскрипції майже 163 генів, пов'язаних із дегідратацією, засоленням, холододовим стресом, у тому числі й низки транскрипційних факторів, які індукували транскрипцію структурних генів, що пов'язані з абіотичними й біотичними стресами. Ген *OsNAC6* функціонує як транскрипційний активатор у відповідь на абіотичні та біотичні стреси.

Експресія гена *ONAC045* рису індукується в листках і коренях дефіцитом води, високим рівнем засолення, низькотемпературним стресом, дією АБК. За генетичної трансформації рису з використанням векторної конструкції pCAMBIA 1300S-ONAC045 (у промоторі гена містяться сайти впізнавання ТФ MYB і MYC) у трансгенних рослин, які надекспресували свій власний ген *ONAC045*, підвищувалась толерантність до водного дефіциту і засолення на ранніх етапах онтогенезу. В нормі відмінностей у швидкості росту не фіксували [16]. *ONAC045* функціонує як транскрипційний активатор.

У трансгенних рослин рису, які надекспресували свій власний ген *SNAC2*, підвищувалась стійкість до холодного стресу, толерантність до обробки ПЕГ, зростала чутливість до обробки АБК [3]. Трансгенні рослини раніше проростали, пришвидшувався їх ріст, підвищувався рівень стабільності клітинних мембран відносно контрольних показників. При цьому відмічено індукцію генів, які кодують орнітинамінотрансферазу, пероксидази, білки теплового шоку, а також білки, пов'язані з ТМ GDSL-подібною ліпазою. *SNAC2* розглядають як транскрипційний активатор.

Значно підвищувалась стійкість до водного дефіциту й трансгенних рослин рису з надекспресією власного гена *SNAC1*, що кодує ТФ NAC-родини [2]. В умовах жорсткої посухи в трансгенних рослин формувалося на 22–34 % більше насіння, ніж у нетрансгенному контролі. Фенотипних змін і втрати врожаю не зафіксовано, підвищувалась стійкість до водного дефіциту і засолення на стадії вегетативного росту. Порівняно з контролем підвищувалась чутливість до АБК, уповільнювалася втрата води внаслідок закриття продихів, при цьому фотосинтетична активність не змінювалася. Відбувалася експресія значної кількості генів, пов'язаних зі стресостійкістю.

Трансгенні рослини тютюну покоління T_2 , в яких експресувався *GmNAC2* (NAC-like gene 2) сої, що кодує подібний АТАФ1 ТФ сої NAC-родини, виявляли підвищену чутливість до водного дефіциту, засолення, холодного стресу [6]. У трансгенних рослин встановлено також диференціальну експресію генів, що реагують на дегідратацію, засолення, холод в умовах стресу і в нормі, деякі з цих генів регулюються етиленом і АБК. У 35S:*GmNAC2*-рослинах тютюну за стресових умов підвищувався рівень малонового діальдегіду. Припускається, що *GmNAC2* бере участь у передачі ROS-сигналів шляхом модуляції експресії генів, пов'язаних із пригніченням АФК. *GmNAC2* розглядають як негативний регулятор за абіотичних стресів.

Експресія гена *ZmSNAC1* кукурудзи індукується низькою температурою, засоленням, дефіцитом води, дією АБК. Надекспресія *ZmSNAC1* у трансгенних рослинах арабідопсису на стадії пророщування призводила до гіперчутливості до АБК та осмотичних стресів [7]. В умовах водного дефіциту проростало відповідно приблизно в 5 і 1,2–1,5 рази менше насіння трансгенних рослин, але в нормі відмінностей між трансформантами і диким типом не було. Разом з тим CaMV 35S::*ZmSNAC1*-проростки виявились толерантними до водного дефіциту. Морфологічних змін у 35S::*ZmSNAC1*-рослин не спостерігали.

Експресія гена *TaNAC2* пшениці у трансгенного арабідопсису приводила до підвищеної толерантності трансгенних рослин до водного дефіциту, засолення і холодного стресу [9]. Підвищувався рівень транскрипції стресіндукованих генів (зокрема *DREB2A*, *ABI2*, *ABI5*, *RD22*), поліпшувались показники флуоресценції хлорофілу в умовах стресу. В нормі відмінностей між трансгенними і контрольними рослинами не було.

Гени *GmNAC11* і *GmNAC20* диференційно індукуються низькою стресових чинників і фітогормонами в коренях і сім'ядолях. Експресія гена *GmNAC20* в трансгенних рослинах арабідопсису приводила до підвищення рівня їх толерантності до засолення і низьких температур, тоді як експресія гена *GmNAC11* підвищувала їх толерантність тільки до

засолення [1]. Функціонування гена *GmNAC20* в трансгенних рослинах може регулювати рівень толерантності активуванням DREB/CBF-COR і посилювати утворення латеральних коренів зміною експресії генів, пов'язаних із сигнальними шляхами за участю фітогормону ауксину. Експресія гена *GmNAC211*, ймовірно, регулює DREB1A та інші стресреагуючі гени. *GmNAC11* функціонує як транскрипційний активатор, тоді як *GmNAC20* — як помірний репресор.

У трансгенних рослин злакових, в яких накопичувались високі рівні власних білків транскрипційних факторів, підвищувалась стійкість до водного дефіциту, засолення, інших абіотичних стресів [6, 12, 15]. Слід підкреслити важливість вибору промотора, під яким запускалися ці цільові гени. Позитивних ефектів на ріст і розвиток в умовах стресу переважно досягали в разі використання стресіндуцибельних промоторів. Зокрема, при водному дефіциті підвищення стресостійкості HvDhn4s::TaNAC69-рослин супроводжувалося подовженням коренів, збільшенням біомаси пагонів і коренів, зростанням ефективності використання води [15]. Подовжувались корені і в трансгенних рослин рису, які надекспресували ген *OsNAC5* під контролем стресіндуцибельного (RCc3) і конститутивного (GOS2) промоторів, проте діаметр коренів був більшим у RCc3:OsNAC5-рослин. Більш того, в польових умовах у нормі в цих трансгенних рослин рівень підвищення врожайності був однаковим, тоді як в умовах стресу врожайність зростала (втричі) тільки у RCc3:OsNAC5-рослин. На думку авторів, зміна саме розміру коренів сприяла підвищенню стресотолерантності і врожайності в польових умовах [5]. Значно збільшувалась продуктивність також трансгенних рослин рису, в яких відбувалася надекспресія гена *OsNAC10* під дією коренеспецифічного промотора RCc3 [4].

Зазначимо також, що в польових умовах за водного дефіциту в трансгенних рослин рису, в яких із високим рівнем експресувався ген *SNAC1*, що переважно функціонує в покривних клітинах рису, утворювалася більша кількість фертильних колосків (на 17—22 %) і насіння (на 22—34 %). Крім того, закривалася значна кількість продихів, мабуть у результаті їх підвищеної чутливості до АБК. Водночас у трансгенних рослин рису, які надекспресували ген *SNAC2*, аналогічного ефекту не виявлено [2]. Наведені дані показали, що за водного дефіциту ТФ NAC беруть участь в АБК-залежних і АБК-незалежних шляхах передачі сигналів [10, 14].

Разом із транскрипційними активаторами серед представників NAC-субродини ідентифіковано також транскрипційні інгібітори, наприклад такі, як *GmNAC20*. Зазначимо, що для білка цього ТФ характерна наявність домена репресії, що має назву NARD (NAC Repression Domain) і взаємодіє із субдоменом ДНК-зв'язувальної ділянки розміром 35 нуклеотидів. NARD-подібні елементи представлені також у інших членів субродини NAC, вони можуть зменшувати здатність до транскрипційної активації різних транскрипційних факторів [1].

У цілому ТФ NAC виконують різну роль у реакції на різноманітні стресори. Згідно з наведеними даними, низку генів транскрипційних активаторів можна розглядати в ролі перспективних кандидатів для розробки молекулярних біотехнологій щодо підвищення стійкості культурних рослин до стресів.

1. Hao Yu-Jun, Wei Wei, Qing-Xin Song et al. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants // *Plant J.* — 2011. — **68**. — P. 302–313.
2. Hu H., Dai M., Yao J. et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2006. — **103**, N 35. — P. 12987–12992.
3. Hu H., You J., Fang Y. et al. Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice // *Plant Mol. Biol.* — 2008. — **67**, N 1–2. — P. 169–181.
4. Jeong J.S., Kim Y.S., Baek K.H. et al. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions // *Plant Physiol.* — 2010. — **153**. — P. 185–197.
5. Jeong J.S., Kim Y.S., Redillas M.C. et al. OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field // *Plant Biotechnol. J.* — 2013. — **11**, N 1. — P. 101–114.
6. Jin H., Huang F., Cheng H. et al. Overexpression of the GmNAC2 gene, an NAC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 2012. DOI 10.1007/s 11105–012–0514–7.
7. Lu M., Sheng Ying, Deng-Feng Zhang et al. A maize stress-responsive NAC transcription factor, ZmSNAC1, confers enhanced tolerance to dehydration in transgenic *Arabidopsis* // *Plant Cell Rep.* — 2012. — **31**, N 9. — P. 1701–1711.
8. Mao X., Jia D., Li A. et al. Transgenic expression of TaMYB2A confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis* // *Funct. Integr. Genomics.* — 2011. — **11**, N 3. — P. 445–465.
9. Mao X., Zhang H., Qian X. et al. TaNAC2, a NAC-type wheat transcription factor conferring enhanced multiple abiotic stress tolerances in *Arabidopsis* // *J. Exp. Bot.* — 2012. — **63**, N 8. — P. 2933–2946.
10. Nakashima K., Tran L.-S., Dong Van Nguyen et al. Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice // *Plant J.* — 2007. — **51**. — P. 617–630.
11. Song S.Y., Chen Y., Chen J. et al. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress // *Planta.* — 2011. — **234**, N 2. — P. 331–345.
12. Takasaki H., Maruyama K., Kidokoro S. et al. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OaNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice // *Mol. Gen. Genomics.* — 2010. — **284**, N 3. — P. 173–183.
13. Tang Y., Liu M., Gao S. et al. Molecular characterization of novel TaNAC genes in wheat and overexpression of TaNAC2a confers drought tolerance in tobacco // *Physiol. Plant.* — 2012. — **144**, N 3. — P. 210–224.
14. Tran L.-S.P., Nishiyama R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach // *GM Crops.* — 2010. — **1**. — P. 32–39.
15. Xue G.-P., Waya H.M., Richardson T. et al. Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat // *Mol. Plant.* — 2011. — **4**. — P. 697–712.
16. Zheng X., Chen B., Lu G., Han B. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2009. — **379**. — P. 985–989.

Отримано 23.02.2017

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ NAC-СУБСЕМЕЙСТВА В ПОВЫШЕНИИ
УРОВНЯ УСТОЙЧИВОСТИ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ К ОСМОТИЧЕСКИМ
СТРЕССАМ

Е.Н. Тищенко, С.И. Михальская

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

В обзоре дана характеристика транскрипционных факторов NAC-субсемейства, рассмотрена эффективность их использования в молекулярных биотехнологиях для повышения уровня устойчивости культурных растений к осмотическим стрессам.

TRANSCRIPTION FACTORS NAC-SUBFAMILY IN IMPROVING CROP RESISTANCE
TO OSMOTIC STRESSES

O.M. Tishchenko, S.I. Mykhalska

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

In a review the characteristics of transcription factors NAC-subfamily as well as the effectiveness of their use in molecular biotechnology to improve crop resistance to osmotic stress are discussed.

Key words: transcription factors, NAC, transgenesis, osmotic stress.