

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ИЗБЫТКА ЦИНКА И НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *IRT1* В КОРНЯХ И ЛИСТЯХ ЯЧМЕНЯ

Н. М. Казнина*, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов, Н. С. Репкина, Ю. В. Батова

Поступило 05.04.2019 г.

В условиях контролируемой среды изучали влияние избытка цинка (1000 мкМ) и низкой положительной температуры (4 °С) на экспрессию гена транспортного белка *IRT1* в корнях и листьях ячменя. При воздействии каждого из изученных стресс-факторов по отдельности наблюдали увеличение содержания транскриптов гена *HvIRT1*, более явно выраженное в листьях. При этом рост проростков продолжался. При совместном действии стресс-факторов в первые трое суток количество мРНК гена также возрастало, однако через семь суток экспозиции регистрировали резкое его падение, что корреспондировалось с полной остановкой роста проростков. На основании полученных данных высказано предположение о том, что остановка роста проростков при совместном действии избытка цинка и низкой температуры связана со снижением транскрипционной активности гена *HvIRT1* вследствие возникающего в этих условиях дефицита ряда микроэлементов.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* L., *IRT1*, цинк, низкая температура.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524873333-337>

Цинк относится к числу необходимых для нормальной жизнедеятельности растений микроэлементов, однако его избыток в почве может вызывать нарушение физиологических процессов и приводить к снижению продуктивности растений [1, 2]. Тем не менее наличие у растений многочисленных механизмов адаптации, действующих на разных уровнях организации, позволяет им успешно расти и развиваться в условиях, когда концентрации цинка в почве многократно превышают его средний уровень. Одним из таких механизмов является регуляция поступления цинка в клетки с участием транспортных белков клеточных мембран. Среди них важную роль играет белок *IRT1* (iron-regulated transporter), относящийся к семейству ZIP (zink-iron-regulated transporter), который обеспечивает перенос катионов металлов через плазмалемму в цитоплазму клеток корня, а также из ксилемы в клетки мезофилла [3]. Установлено, что этот белок имеет высокое сродство к ионам железа, и вместе с тем доказано его участие в транспорте цинка, магния, марганца и меди [4–6].

Регуляция поступления ионов металлов в клетки растений с участием белка *IRT1* обеспечивает поступление необходимого количества микроэлементов при их дефиците в почве и в самом растении и в то же время предотвращает избыточное накопление ионов в органах растений при их высоких

концентрациях во внешней среде [6, 7]. Что касается цинка, то на сегодня получено достаточно большое число доказательств важной роли *IRT1* в устойчивости растений к его недостатку, но почти ничего не известно об участии этого белка в адаптации растений к избытку металла. Добавим, что известные нам исследования проведены при оптимальных температурах, хотя в природных условиях во многих регионах мира растения в период вегетации достаточно часто подвергаются воздействию низких положительных температур, которые тормозят поступление микроэлементов в клетки, нарушая их естественный баланс [8]. Каким образом в этих условиях изменяется экспрессия гена *IRT1* и активность контролируемого им белка, не известно, хотя в единичных работах указывается на снижение под влиянием холода активности некоторых других транспортных белков [4, 8].

Исходя из вышеизложенного, а также учитывая, что регуляция транспорта ионов металлов с участием белка *IRT1* осуществляется не только на уровне его аккумуляции и активности, но и на уровне транскрипции кодирующего его гена [6, 7], нами проведено сравнительное изучение влияния избытка цинка и низкой температуры, действующих раздельно или совместно, на количество транскриптов гена *IRT1* в корнях и листьях ячменя.

Исследования проводили на растениях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Нур, которые выращивали в течение 7 сут в камере искусственного климата при температуре 22 °С, относительной влажности воздуха

Институт биологии Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск

*E-mail: kaznina@krc.karelia.ru

60–70%, ФАР 100 мкмоль/(м²·с), 14-часовом фото-периоде, на питательном растворе Хогланда—Арнона с оптимальным (вариант 22 °С + Zn, 2 мкМ) или избыточным (вариант 22 °С + Zn, 1000 мкМ) содержанием цинка. Повышенная концентрация цинка (1000 мкМ) и низкая температура (4 °С), которые являются для ячменя субповреждающими, были выбраны на основе предварительных опытов. Спустя 7 сут (исходный уровень) одну часть растений обоих вариантов переносили в климатическую камеру с температурой 4 °С (варианты 4 °С + Zn, 2 мкМ и 4 °С + Zn, 1000 мкМ), а другую их часть оставляли в прежних условиях. В исходной точке (7 сут) и спустя 1, 3 и 7 сут у растений всех вариантов измеряли длину корня и высоту побега, в корнях и листьях определяли содержание цинка и количество транскриптов гена *HvIRT1*.

Содержание цинка измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-7000 (“Shimadzy”, Япония). Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Для удаления остатков ДНК препарат РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед/мл) (“Синтол”, Россия). кДНК синтезировали, используя наборы для обратной транскрипции с M-MLV обратной транскриптазой и случайными (random) гексапраймерами (“Евроген”). Количество и качество выделенной РНК и синтезированной кДНК проверяли спектрофотометрически на приборе SmartSpecPlus (“Bio-Rad”). Амплификацию образцов проводили в приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (“Bio-Rad”), используя наборы для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green (“Евроген”).

В 25 мкл смеси для ПЦР содержалось 1 мкл кДНК (100 нг), 10 мкл реакционной смеси, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 мкМ), 1 мкл MgCl₂ и 17 мкл деионизованной воды, свободной от нуклеаз. В качестве референсного гена использовали actin *Hordeum vulgare*. Для проведения ПЦР

использовали праймеры компании “Евроген”: *HvActin* (HVU21907) ATGTTTTTTTCCAGACG (прямой) и ATCCAAGCCAACCCAAGT (обратный), *HvIRT1* (EU54802) GTGCTTCCACCAGATGTTTGAG (прямой) и GGATGCCGACGACGATGA (обратный). Протокол ПЦР: 5 мин при 95 °С, далее 45 циклов: 15 с при 95 °С, 30 с при 56 °С.

Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов: 1 мин при 95 °С, 1 мин при 50 °С, 10 с при 60 °С (80 циклов, повышая в каждом цикле температуру на 0,5 °С). Накопление транскриптов генов вычисляли по $\Delta\Delta C_T$ [9]. Контролем служили растения, не подвергавшиеся воздействию стресс-факторов. В каждом варианте опыта измерения проводили на 3–10 растениях (биологическая повторность) в зависимости от показателя, аналитическая повторность была трёх-четырёхкратной. Весь опыт повторяли дважды.

Нами установлено, что в оптимальных условиях (вариант 22 °С + Zn, 2 мкМ) уровень транскриптов гена *HvIRT1* у растений ячменя постепенно увеличивался с возрастом и к завершению опыта повышался в 30 раз по сравнению с исходным уровнем, причём практически в равной мере в корнях и листьях (рис. 1а). Очевидно, подобный эффект связан с возрастанием потребности растений в микроэлементах вследствие интенсивного роста корня и побега, наблюдаемого в это время у злаков (табл. 1).

Хорошо известно, что цинк в высокой концентрации способен оказывать негативное воздействие на рост растений [10, 11]. В наших опытах проростки, находящиеся в условиях избытка цинка в корнеобитаемой среде (вариант 22 °С + Zn, 1000 мкМ), имели гораздо меньшие линейные размеры корня и побега по сравнению с оптимальными условиями, хотя полной остановки роста при этом не наблюдалось (табл. 1). Более того, с увеличением

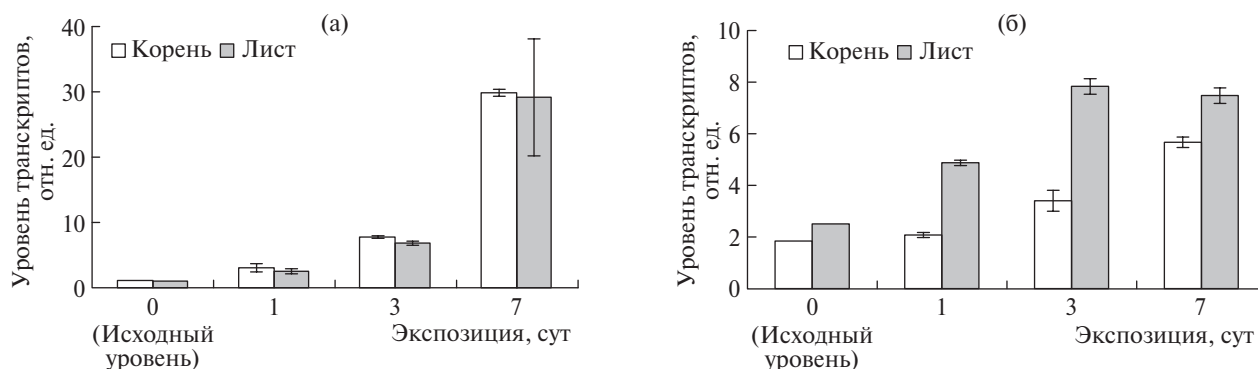


Рис. 1. Влияние избытка цинка на содержание транскриптов гена *HvIRT1* в корнях и листьях ячменя с. Нур при температуре 22 °С. Здесь и на рис. 2 концентрация цинка 2 мкМ (а); 1000 мкМ (б). $M \pm m$, $n = 9$.

Таблица 1. Влияние низкой температуры (4 °C) на рост корня и побега растений ячменя сорта Нур, находящихся в условиях оптимального (2 мкМ) и избыточного (1000 мкМ) содержания цинка в корнеобитаемой среде

Вариант	Экспозиция, сут			
	0 (исходный уровень)	1	3	7
Длина корня, см				
22 °C + Zn, 2 мкМ	14,75±0,45a	16,10±0,45a	18,33±0,78b	21,35±1,18b
22 °C + Zn, 1000 мкМ	4,85±0,18a	5,23±0,24ab	5,65±0,38b	6,80±0,19c
4 °C + Zn, 2 мкМ	14,75±0,45a	15,47±0,41a	16,55±0,68a	17,00±0,64b
4 °C + Zn, 1000 мкМ	4,85±0,18a	4,59±0,20a	4,15±0,47a	4,70±0,22a
Высота побега, см				
22 °C + Zn, 2 мкМ	19,04±0,33a	20,44±0,33b	24,66±0,57c	31,46±0,47d
22 °C + Zn, 1000 мкМ	15,69±0,47a	16,12±0,38a	17,87±0,62b	20,80±0,57c
4 °C + Zn, 2 мкМ	19,04±0,33a	17,90±0,42a	18,46±0,43a	20,48±0,44b
4 °C + Zn, 1000 мкМ	15,69±0,47a	14,29±0,46a	14,68±0,61a	14,43±0,47a

Примечание. Здесь и в табл. 2 $M \pm m$, $n = 20$. Буквами a–d обозначены достоверные различия по отношению к исходному уровню при $p < 0,05$.

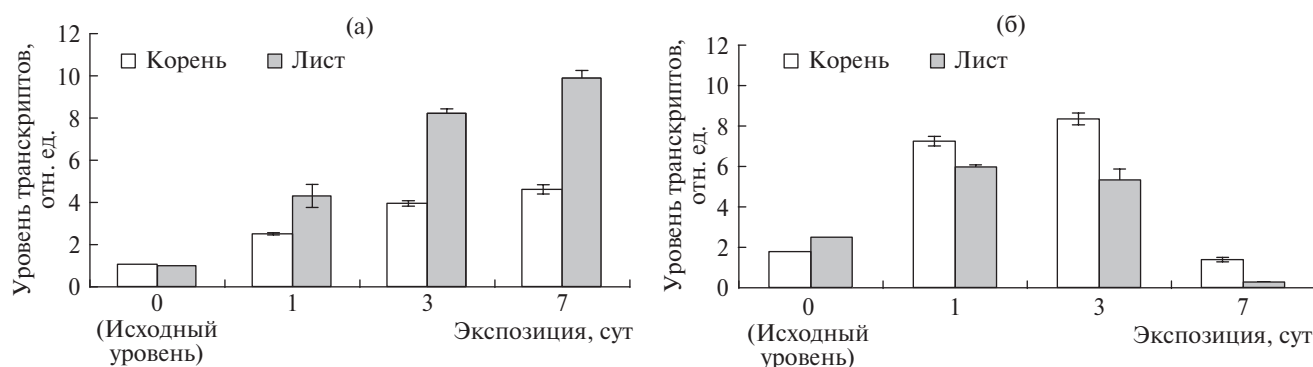
экспозиции, несмотря на возрастание содержания цинка в органах (табл. 2), отрицательный эффект металла ослабевал. Уровень транскриптов гена и в корнях, и листьях уже в исходной точке был в 2–3 раза выше по сравнению с вариантом с использованием концентрации металла 2 мкМ (рис. 16). В дальнейшем, по мере роста растений он продолжал повышаться, что более ярко проявлялось в листьях, но в целом на 7-е сут содержание мРНК гена *HvIRT1* в корнях и листьях оказалось гораздо ниже, чем при оптимальной концентрации цинка.

Воздействие низкой температуры на проростки, находящиеся при оптимальной (2 мкМ) концентрации цинка (вариант 4 °C + Zn, 2 мкМ), также приводило к некоторому замедлению их роста, что коррелировалось с увеличением (по сравнению с исходным уровнем) экспрессии гена *HvIRT1*, причём динамика уровня транскриптов была практически такой же, как и в варианте 22 °C + Zn, 1000 мкМ (рис. 2а). Относительно низкое количество мРНК гена, обнаруженное нами в вариантах опыта с воздействием изученных стресс-факторов по от-

дельности, вероятно, связано со снижением запроса на микроэлементы, обусловленного, например, торможением роста корней и побегов. Более сильную экспрессию гена в листьях, наблюдаемую в обоих вариантах опыта, по-видимому, можно объяснить чрезвычайной важностью таких элементов, как железо, магний и марганец, для фотосинтетических процессов [12].

В случае когда низкая температура воздействовала на проростки, находящиеся в условиях избытка цинка (вариант 4 °C + Zn, 1000 мкМ), рост растений полностью останавливался (табл. 1), несмотря на то, что концентрация металла в корнях и листьях, в отличие варианта опыта 22 °C + Zn, 1000 мкМ, не повышалась. При этом в течение первых трёх суток от начала измерений уровень транскриптов гена *HvIRT1* возрастал, однако затем сменялся резким его снижением в корнях до исходного уровня, а в листьях — почти до нулевых значений (рис. 2б).

Таким образом, в ходе исследований нами впервые установлено, что при воздействии избытка цинка и низкой положительной температуры, дей-

**Рис. 2.** Влияние избытка цинка на содержание транскриптов гена *HvIRT1* в корнях и листьях ячменя с. Нур при температуре 4 °C.

ствующих по отдельности, в корнях и листьях ячменя возрастает уровень экспрессии гена *HvIRT1*, тогда как при их совместном действии после некоторого повышения уровня мРНК гена в течение первых трёх суток затем происходит резкое его снижение, наиболее отчётливо выраженное через семь суток.

Известно, что избыток цинка негативно влияет на физиологические процессы у растений, вследствие чего уменьшение экспрессии генов, контролирующих синтез транспортных белков, и снижение их активности может быть одним из механизмов, препятствующих поступлению избыточных количеств ионов в клетку. Так, например, у арабидопсиса в условиях избытка цинка в корнях и листьях не было обнаружено мРНК *IRT1* [7]. Вместе с тем доказано, что при увеличении концентрации цинка в органах растений даже в меньшей степени, чем это было обнаружено нами у ячменя (табл. 2), снижается поступление в растения и других микроэлементов, в результате чего создаётся их дефицит, который, очевидно, возникает из-за конкуренции их ионов с ионами цинка за общие сайты связывания в белках-транспортёрах [8, 13]. В этом случае увеличение экспрессии гена *IRT1* будет способствовать снижению дефицита железа, магния или марганца, что наблюдалось у арабидопсиса [14] в исследованиях других авторов, а также у ячменя [5]. В наших опытах при избытке цинка в корнеобитаемой среде уровень транскриптов гена *HvIRT1* в корнях и листьях ячменя также возрастал, способствуя усилению поглощения микроэлементов и, как следствие, дальнейшему росту растений.

В условиях действия холода, как уже отмечалось выше, поглощение элементов минерального питания из почвы замедляется, что также вызывает их дефицит в растениях. Поэтому повышение уровня транскриптов гена, обнаруженное нами у проростков

в варианте опыта 4 °C + Zn, 2 мкМ, скорее всего, обусловлено необходимостью устранения этого дефицита. Однако подтверждений этого в известной нам литературе обнаружить не удалось. Лишь в одной работе [15] указывается на возможное отрицательное влияние низкой температуры (0 °C) на экспрессию генов транспортных белков *ZIP1* и *ZIP3* у арабидопсиса, о чём авторы судили по отсутствию поступления цинка в клетки корня как диких форм растений, так и трансгенных, обладающих сверхэкспрессией генов *ZIP1* и *ZIP3*. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что понижение температуры в пределах субповреждающих значений, наоборот, приводит к повышению уровня транскриптов гена *IRT1*, что, по-видимому, является одной из причин отсутствия явно выраженного торможения роста растений в этих условиях.

Интересно, что при совместном действии изученных нами стресс-факторов (вариант 4 °C + Zn, 1000 мкМ) увеличение экспрессии гена *HvIRT1* зафиксировано только в первые трое суток. Спустя же 7 сут наблюдалось резкое снижение уровня транскриптов гена в корнях и листьях проростков. Это коррелировало с полной остановкой их роста, хотя содержание цинка в органах растений было в этом случае даже меньше по сравнению с вариантом с оптимальной температурой. Чем вызвано такое снижение уровня экспрессии при совместном воздействии изученных стресс-факторов, не вполне ясно. Одной из причин этого, на наш взгляд, является уменьшение запроса на микроэлементы вследствие полной остановки роста проростков и замедления скорости фотосинтеза, обнаруженное нами ранее [2]. Не исключено также, что при сложении отрицательных эффектов двух стресс-факторов происходит нарушение передачи сигнала о недостатке микроэлементов.

Таблица 2. Влияние низкой температуры (4 °C) на содержание цинка в корнях и листьях растений ячменя сорта Нур, находящихся в условиях оптимального (2 мкМ) и избыточного (1000 мкМ) содержания металла в корнеобитаемой среде

Вариант	Экспозиция, сут			
	0 (исходный уровень)	1	3	7
Содержание цинка в корне, мг/г сухой массы				
22 °C + Zn, 2 мкМ	0,35±0,06a	0,36±0,06a	0,35±0,06a	0,73±0,12b
22 °C + Zn, 1000 мкМ	21,57±3,45a	25,41±4,07b	26,18±4,19a	38,36±6,14b
4 °C + Zn, 2 мкМ	0,35±0,06a	0,27±0,04a	0,25±0,04a	0,32±0,05a
4 °C + Zn, 1000 мкМ	21,57±3,45a	24,03±3,84a	20,83±3,33a	23,07±3,69a
Содержание цинка в побеге, мг/г сухой массы				
22 °C + Zn, 2 мкМ	0,03±0,00a	0,03±0,00a	0,05±0,00b	0,05±0,00b
22 °C + Zn, 1000 мкМ	1,87±0,20a	1,79±0,28a	1,96±0,03a	3,10±0,50b
4 °C + Zn, 2 мкМ	0,03±0,00a	0,04±0,00a	0,03±0,00a	0,03±0,00a
4 °C + Zn, 1000 мкМ	1,87±0,20a	1,50±0,24a	1,44±0,23a	1,54±0,25a

В целом результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о том, что как при избытке цинка в корнеобитаемой среде, так и при воздействии низкой температуры в корнях и в большей степени в листьях растений ячменя увеличивается уровень транскриптов гена *HvIRT1*, при этом рост растений не останавливается. Совместное же действие этих стресс-факторов, несмотря на некоторое повышение количества мРНК гена в первые трое суток, приводит в дальнейшем (через 7 сут) к резкому снижению его транскрипционной активности, что, по-видимому, вызывает сильный дефицит микроэлементов и, как следствие, остановку роста проростков в этих условиях.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотруднику ИЛ КарНЦ РАН К.М. Никеровой за помощь в проведении экспериментов. Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской Академии наук».

Источник финансирования. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (тема № 0218–2019–0074).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Broadley M.R., White P.J., Hammond J.P., et al.* Zinc in Plants // *New Phytol.* 2007. V. 173. P. 677–702.
2. *Казнина Н.М., Батова Ю.В., Лайдинен Г.Ф. и др.* // Тр. КарНЦ РАН. Сер. Эксперим. биология. 2017. № 12. С. 118–124.
3. *Palmer G.M., Guerinot M.L.* // *Nature Chem. Biol.* 2009. V. 5. P. 333–340.
4. *Guerinot M.L.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1465. P. 190–198.
5. *Pedas P., Ytting C.K., Fuglsang A.T., et. al.* // *Plant Physiol.* 2008. V. 148. P. 455–466.
6. *Lee S., An G.* // *Plant, Cell and Environ.* 2009. V. 32. P. 408–416.
7. *Connolly E.L., Fett J.P., Guerinot M.L.* // *Plant Cell.* 2002. V. 14. P. 1347–1357.
8. *Hacisalihoglu G., Hart J.J., Kochian L.V.* // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 456–463.
9. *Livak K.J., Thomas D., Schmittgen T.D.* // *Methods.* 2001. V. 25. P. 402–408.
10. *Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. и др.* Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2007. 172 с.
11. *Серегин И.В., Кожевникова А.Д., Грачева В.В. и др.* // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 85–94.
12. *Битюцкий Н.П.* Необходимые микроэлементы растений: Учебник. СПб.: ДЕАН, 2005. 256 с.
13. *Marschner H.* Mineral Nutrition of Higher Plants. L.: Acad. Press, 1995. 889 p.
14. *Fukao Y., Ferjani A., Tomioka R., et al.* // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1893–1907.
15. *Grotz N., Fox T., Connolly E., et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 7220–7224.

EFFECT OF ZINC EXCESS AND LOW TEMPERATURE ON THE *IRT1* GENE EXPRESSION IN THE ROOTS AND LEAVES OF BARLEY

N. M. Kaznina, Corresponding Member of the RAS A. F. Titov, N. S. Repkina, Ya. V. Batova

Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Received April 5, 2019

We studied the effect of zinc excess (1000 μM) and low temperature (4 °C) on the *IRT1* gene expression in barley roots and leaves. Exposure at each of the stress factors separately, induced an increase in the content of the *HvIRT1* gene transcripts, more pronounced in the leaves. At the same time, growth of seedlings continued. Under the combined action of factors in the first 3 days, the amount of mRNA also increased, but after 7 days of exposure it significantly declined, which corresponded with a complete inhibition of seedlings growth. It is assumed that the seedlings growth inhibition under the combined effect of the zinc excess and low temperature is associated with a decrease in the transcriptional activity of the *HvIRT1* gene, due to the deficiency of a number of trace elements under these conditions.

Keywords: *Hordeum vulgare* L., *IRT1*, zinc excess, low temperature.