

УДК 581.1

СОДЕРЖАНИЕ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ *HvHMA2* И *HvHMA3* У РАСТЕНИЙ ЯЧМЕНЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ

© 2014 г. Н. М. Казнина, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, Ю. В. Батова, Г. Ф. Лайдинен

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Поступила в редакцию 29.03.2013 г.

Изучено содержание транскриптов генов *HvHMA2* и *HvHMA3* в корнях и листьях 3-дневных (фаза прорастания семян) и 7-дневных (фаза всходов) проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Зазерский 85) в присутствии ионов кадмия (100 мкМ). Выявлен ряд органоспецифичных и возрастных различий в уровне матриц изученных генов. Так, после 4-суточной экспозиции растений на растворе, содержащем ионы кадмия, у 3-дневных проростков увеличивался уровень транскриптов гена *HvHMA3* в корне, способствуя изоляции токсичных ионов в вакуоли. У 7-дневных проростков в большей степени возрастал уровень транскриптов гена *HvHMA2*, причем в листьях, что, по-видимому, могло привести к усилению поступления ионов металла во флоэму и активизации их транспорта из листьев в корни. Выявленное снижение содержания транскриптов этого гена в корне, в свою очередь, способствовало ограничению транспорта ионов кадмия в побег. На основании сопоставления уровня транскриптов генов и устойчивости проростков разного возраста к металлу сделан вывод о возможном участии гена *HvHMA2* в повышении устойчивости 7-дневных растений ячменя к кадмию.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare* – кадмий – транспортные белки – уровень транскриптов генов

DOI: 10.7868/S0015330314030063

ВВЕДЕНИЕ

Исследованиями последних лет показано, что основную роль в поступлении и передвижении тяжелых металлов (ТМ) по растению играют трансмембранные белки-переносчики [1, 2]. При этом одна группа белков-транспортеров осуществляет транспорт ионов металлов в цитоплазму из внешней среды или из внутриклеточных компартментов. К ним, в частности, относятся представители семейств CDF (от *Cation diffusion facilitator*), NRAM (от *Natural resistance-associated macrophage protein*), ZIP (от *Zinc iron permease*) [3–5]. Другая группа белков участвует в транспорте ТМ из цитоплазмы через плазмалемму в проводящие сосуды или через мембраны в органеллы клеток. Среди них – белки из семейства НМА (от *Heavy metal ATase*) [6, 7].

НМА-белки, относящиеся к P_{1B}-типу АТФаз, различаются между собой локализацией в клетке и выполняемыми функциями [8–10]. Например, белки НМА2 и НМА3 схожи по своей первичной

структуре, но НМА2-белки расположены на плазмалемме и участвуют в загрузке ионов ТМ, в частности кадмия и цинка, в проводящие сосуды и их транспорте из корней в стебли [11], а НМА3-белки локализованы на тонопласте и осуществляют транспорт ионов в вакуоль [12].

Необходимо отметить, что большая часть исследований, посвященных НМА-белкам и экспрессии соответствующих им генов, проведена на растениях-гипераккумуляторах ТМ, *Arabidopsis hallerii* и *Thlaspi caerulescens* [13–15], и все они направлены на изучение механизмов сверхнакопления и сверхустойчивости. Что касается растений, не относящихся к гипераккумуляторам, например, из сем. Роасеае, то работ с такими растениями гораздо меньше. Хотя и у этих видов обнаружено повышение экспрессии генов *HMA2* и *HMA3* под влиянием кадмия. Так, уровень содержания транскриптов указанных генов увеличивался в присутствии металла в корнях и побегах пшеницы [16], риса [7] и ячменя [17]. При этом выявлено, что усиление экспрессии *HMA2*- и *HMA3*-генов у злаков (в частности у риса) влияет на транспорт металла из корней в стебли и, соответственно, на концентрацию кадмия в семенах [7, 18].

Сокращения: ТМ – тяжелые металлы, НМА – белки, относящиеся к P_{1B}-типу АТФаз (от *Heavy metal ATase*).

Адрес для корреспонденции: Казнина Наталья Мстиславовна. 185910 Петрозаводск, Пушкинская ул., 11. Институт биологии Карельского научного центра РАН. Электронная почта: kaznina@krc.karelia.ru

Таблица 1. Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>HvHMA2</i>	5'-gctgctcttctgctctttctcc-3'	5'-gagaagccgcaaaggagatac-3'
<i>HvHMA3</i>	5'-gcagtgccctagcatcctataatcc-3'	5'-ctgttgctgagattgtttggtc-3'

Приведенные выше данные показывают важность изучения роли белков-переносчиков из НМА-семейства и соответствующих им генов в транспорте ионов кадмия по растению и в механизмах металлоустойчивости растений. Однако несмотря на очевидный прогресс в этой области, все еще остается невыясненным целый ряд вопросов, в частности о возможном вкладе генов *HMA2* и *HMA3* в повышение устойчивости растений к кадмию, а также о влиянии возраста растений на экспрессию указанных генов. Хотя, к примеру, известно о существовании отчетливо выраженных возрастных различий в содержании транскриптов гена *HvPCS*, участвующего в синтезе фитохелатин-синтазы в корнях ячменя [19], и генов, кодирующих белки-транспортёры, относящиеся к ZIP- и CDF-семействам у *T. caerulescens* [14], при действии на растения ионов кадмия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили с проростками ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Зазерский 85. Семена проращивали в сосудах с песком при температуре воздуха 20–22°C, освещенности 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижении растениями возраста 3 (фаза прорастания семян) и 7 (фаза всходов) дней их переносили в пластиковые контейнеры (объемом 2 л) на половинный раствор Кнопа с добавлением микроэлементов (контроль). В опытных вариантах к питательному раствору добавляли CdSO₄ (100 мкМ). Спустя 4 суток нахождения на растворе с Cd²⁺ (далее варианты “3 + 4” и “7 + 4”) измеряли уровень транскриптов генов *HvHMA2* и *HvHMA3* в корнях растений и листьях, сформированных за время экспозиции, а также определяли содержание ТМ в органах. Об устойчивости растений к кадмию судили по изменению (относительно контроля) ряда ростовых показателей: длины корня, высоты побега, накопления сухой биомассы корня и побега.

Уровень транскриптов генов определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) после обратной транскрипции. Тотальную РНК выделяли с помощью набора для выделения РНК YellowSolve (“Clonogene”, Россия). Препарат РНК обрабатывали ДНКазой (1 ед. акт.). Первую цепь кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции со случайными праймерами (“Силекс”, Россия). Используемые праймеры представлены в табл. 1. ПЦР в режиме ре-

ального времени проводили на приборе iCycler iQ5 с оптической приставкой с использованием наборов с интеркалирующим красителем SYBR (“Синтол”, Россия). После амплификации для подтверждения специфичности ПЦР-продуктов осуществляли процедуру плавления. Содержание кадмия определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа АВС 1.1 (“Вольта”, Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси 70% HNO₃ и 33% H₂O₂ в соотношении 4 : 1 с использованием микроволновой системы пробоподготовки МС-6 (“Вольта”).

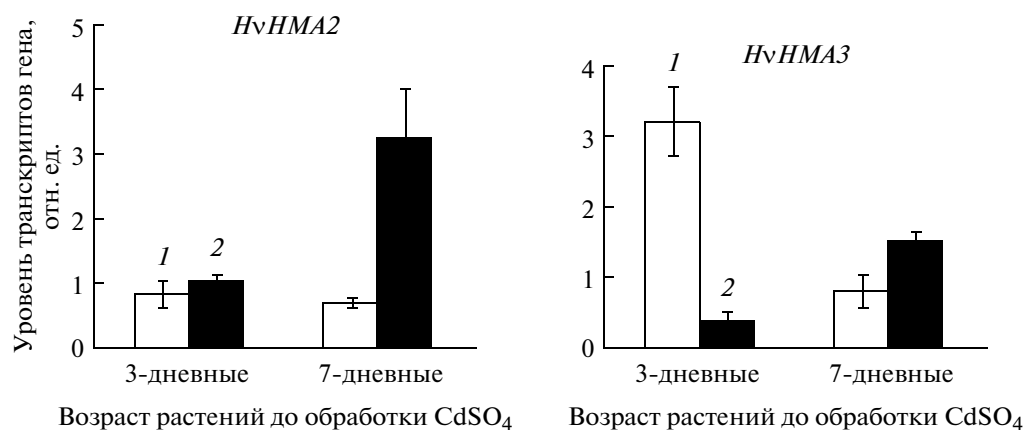
Исследования проведены с использованием приборно-аналитической базы Центра коллективного пользования научным оборудованием Института биологии КарНЦ РАН.

Все представленные в статье данные являются средними из двух независимых опытов. Повторность в пределах одного варианта каждого опыта для разных показателей составляла от 6 до 20 растений. В таблицах и на рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования выявили ряд органо-специфичных и возрастных различий в уровне транскриптов генов *HvHMA2* и *HvHMA3* у растений ячменя в присутствии ионов кадмия. Так, если у 3-дневных проростков (вариант “3 + 4”) уровень матриц гена *HvHMA2* и в корне, и в листе опытных и контрольных растений был практически одинаковым, то у 7-дневных проростков (вариант “7 + 4”) отмечено почти 2-кратное снижение уровня в клетках корня и еще более заметное (в 3.5 раза) повышение в клетках листа (рисунок). Уровень транскриптов гена *HvHMA3*, наоборот, в большей степени изменялся у 3-дневных проростков. При этом он значимо (в 3.2 раза) возрос в корнях и снижался (в 2.3 раза) в листьях. У 7-дневных проростков наблюдалось лишь некое увеличение уровня транскриптов этого гена в клетках листа (рисунок).

Анализ содержания массовой доли кадмия в органах растений показал, что 4-суточная экспозиция на растворе с Cd²⁺ приводила к значительному накоплению металла в корнях. Причем у 7-дневных проростков (вариант “7 + 4”) этот эффект был вы-



Уровень транскриптов генов *HvHMA2* и *HvHMA3* в корнях (1) и листьях (2) растений ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с CdSO_4 (100 мкМ).

Содержание транскриптов генов у растений контрольного варианта принято за единицу ($n = 6$).

ражен сильнее, чем у 3-дневных (вариант “3 + 4”) (табл. 2). В меньшей степени кадмий накапливался в надземных органах, однако и там его содержание, в частности в стеблях, было почти в 2 раза выше у 7-дневных проростков. В то же время содержание металла в активно растущих листьях было практически равным у проростков разного возраста.

Изучение влияния ионов кадмия на рост растений выявило достоверное снижение (по отношению к контролю) большинства показателей (за исключением высоты побега) только у 3-дневных проростков, несмотря на меньшее содержание в них металла, что свидетельствует об их более высокой чувствительности к Cd^{2+} (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди известных НМА-белков и соответствующих им генов НМА2-белки, по-видимому, изучены в наименьшей степени, хотя у целого ряда видов, относящихся и к гипераккумуляторам, и к исключателям, экспрессия этих генов обнаружена в клетках проводящих тканей (ксилемы и флоэмы) практически во всех органах растений [9,

20]. Помимо этого, в присутствии кадмия выявлены значительные органоспецифические различия в их экспрессии и количестве образовавшихся транскриптов, которые не зависели от содержания ТМ в органах. Например, у риса при действии ТМ наиболее высокий уровень экспрессии гена (*OsHMA2*) был обнаружен в корнях [7], у ячменя (*HvHMA2*) – в листьях [17], а у пшеницы (*TaHMA2*) – в узлах стебля [16]. В наших опытах у 7-дневных проростков ячменя в присутствии металла уровень транскриптов гена *HvHMA2* в корне снижался (относительно контроля) несмотря на более высокое содержание в нем кадмия, а в листе, наоборот, повышался.

Поскольку НМА2-белки участвуют в загрузке флоэмы, зафиксированное возрастание содержания транскриптов гена *HvHMA2* в листе более взрослых проростков, на наш взгляд, может способствовать усилению транспорта ионов кадмия в сосуды флоэмы и, следовательно, его перемещению из стебля в корень. Подобный эффект обнаружен у растений *A. thaliana* в присутствии повышенных концентраций ионов цинка [9] и у риса под влиянием ионов кадмия [21]. Поступление же токсичных ионов во флоэму и их транспорт из ли-

Таблица 2. Содержание кадмия в проростках ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с CdSO_4 (100 мкМ)

Возраст проростков и экспозиция с Cd	Содержание кадмия, мкг/г сырой массы			
	корни	стебли	1-й лист	2-й лист
3-дневные + 4 суток с Cd	16.19 ± 0.48	3.41 ± 0.09	1.62 ± 0.12	–
7-дневные + 4 суток с Cd	23.89 ± 0.46	6.02 ± 0.10	0.66 ± 0.01	1.73 ± 0.08

Примечание. В таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки ($n = 6$).

Содержание кадмия в корнях растений контрольного варианта 0.31 ± 0.01 мг/кг сырой массы, в стеблях и листьях – ниже предела определения использованного метода.

Таблица 3. Влияние кадмия на рост проростков ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с CdSO_4 (100 мкМ)

Возраст проростков и экспозиция с Cd	Показатель, % от контроля			
	длина корня	сухая масса корня	высота побега	сухая масса побега
3-дневные + 4 суток с Cd	72*	87*	92	84*
7-дневные + 4 суток с Cd	98	100	82*	90

Примечание. В таблице представлены средние значения ($n = 20$).

* Различия с контролем достоверны при $P < 0.05$.

стьев в корень, как полагают, является одним из механизмов уменьшения их содержания в надземных органах [22]. Выявленное при этом снижение уровня транскриптов гена *HvHMA2* в корне, в свою очередь, может ограничивать транспорт ионов кадмия в побег.

У проростков варианта “3 + 4” изменений (по отношению к контролю) в уровне матриц гена *HvHMA2* не наблюдалось. Следовательно, и активизации указанных выше механизмов, направленных на уменьшение содержания токсичных ионов в надземных органах, не происходило. При этом их устойчивость к ионам кадмия оказалась заметно ниже, чем 7-дневных проростков. Эти результаты могут, на наш взгляд, свидетельствовать об участии данного гена в повышении устойчивости растений ячменя к кадмию. Ранее аналогичный вывод был сделан Morel с соавт. [12], которые обнаружили у *A. thaliana* прямую зависимость между уровнем экспрессии гена *AtHMA2* в корнях в присутствии ионов кадмия и устойчивостью растений к этому металлу.

Экспрессия генов *HMA3* и соответствующие им белки также обнаружены в клетках корня и листа у целого ряда видов растений. При этом доказано, что *HMA3*-белки участвуют в транспорте ионов кадмия из цитоплазмы в вакуоль, способствуя тем самым его детоксикации в клетке [12]. Относительно возможного участия генов *HMA3* в повышении устойчивости растений к кадмию в литературе нет единого мнения. Так, у растения *T. caerulescens* [15], которое является гипераккумулятором ТМ, увеличение экспрессии *HMA3*-генов приводило к возрастанию концентрации кадмия в органах, при этом устойчивость растений к токсичным ионам повышалась. В отличие от них у растений, не являющихся гипераккумуляторами, например, у *Nicotiana tabacum* и *N. rustica* [23] и у риса [6, 24], возрастание экспрессии генов *HMA3* в присутствии кадмия не сопровождалось увеличением их устойчивости к ионам металла. В наших экспериментах повышение уровня транскриптов гена *HvHMA3*, отмеченное в корнях 3-дневных проростков ячменя, также не приводило к увеличению их устойчивости к кадмию.

О возрастных различиях в экспрессии *HMA2*- и *HMA3*-генов сведений в известной нам литературе нет. Однако результаты настоящего исследования подтверждают высказанное нами ранее предположение о том, что активность и вклад отдельных механизмов металлоустойчивости в значительной степени зависят от возраста растений и, в частности, от физиолого-биохимических особенностей, характерных для каждой фазы развития [19]. Если у проростков варианта “3 + 4” при меньшем (по сравнению с вариантом “7 + 4”) содержании кадмия в органах активизировался транспорт ионов металла в вакуоль клеток корня, способствуя тем самым его удержанию в подземных органах растений, то у проростков варианта “7 + 4” происходила активизация флоэмного транспорта ионов металла из листьев в корни при одновременном снижении его поступления в ксилему корня.

Таким образом, у растений ячменя в присутствии ионов кадмия наблюдаются заметные органоспецифичные и возрастные различия в уровне транскриптов генов *HvHMA2* и *HvHMA3*. У 3-дневных проростков увеличивается содержание транскриптов гена *HvHMA3* в корне, способствуя, очевидно, изоляции токсичных ионов в вакуоли и препятствуя их передвижению в надземные органы. У 7-дневных проростков в большей степени возрастает содержание транскриптов гена *HvHMA2* в листьях, что может приводить к усилению поступления ионов кадмия во флоэму и активизации их транспорта из листьев в корни. Более высокий уровень транскриптов гена *HvHMA2* соответствовал и более высокой устойчивости проростков к кадмию, что позволяет говорить о его возможном участии в повышении устойчивости 7-дневных растений ячменя к этому ТМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Colangelo E.P., Guerinot M.L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2006. V. 9. P. 322–330.
2. Krämer U., Talke I.N., Hanikenne M. Transition metal transport // FEBS Lett. 2007. V. 581. P. 2263–2272.

3. Cailliatte R., Lapeyre B., Briat J.F., Mari S., Curie C. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity // *Biochem. J.* 2009. V. 422. P. 217–228.
4. Lanquar V., Ramos M.S., Lelièvre F., Barbier-Brygoo H., Krieger-Liszka A., Krämer U., Thomine S. Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency // *Plant Physiol.* 2010. V. 152. P. 1986–1999.
5. Lee K., Bae D.W., Kim S.H., Han H.J., Liu X., Park N.C., Lim C.O., Lee C.Y., Chung W.S. Comparative proteomic analyses of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 161–168.
6. Ueno D., Koyama E., Kono I., Yano M., Ma F. Identification of a novel major quantitative traits locus controlling distribution of Cd between roots and shoots in rice // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. P. 2223–2233.
7. Satoh-Nagasawa N., Mori M., Nakazawa N., Kawamoto T., Nagato Y., Sakurai K., Takahashi H., Watanabe A., Akagi H. Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of zinc and cadmium // *Plant Cell Physiol.* 2012. V. 53. P. 213–224.
8. Hall J.L., Williams L.E. Transition metal transporters in plants // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 2601–2613.
9. Hussain D., Haydon M.J., Wong E., Sherson S.M., Young J., Camakaris J., Harper J.F., Cobbett C.S. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 1327–1339.
10. Williams L.E., Mills R.F. P(1B)-ATPases: an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 491–502.
11. Argüello J.M., Eren E., González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P_{1B}-ATPase // *Biometals.* 2007. V. 20. P. 233–248.
12. Morel M., Crouzet J., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., Vavasseur A., Richaud P. AtHMA3, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2009. V. 149. P. 894–904.
13. Becher M., Talke I.N., Krall L., Krämer U. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 251–268.
14. Küpper H., Kochian L.V. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population) // *New Phytol.* 2010. V. 185. P. 114–129.
15. Ueno D., Milner M.J., Yamaji N., Yokosho K., Koyama E., Clemencia-Zambrano M., Kaskie M., Ebbs S., Kochian L.V., Ma J.F. Elevated expression of *TcHMA3* plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* // *Plant J.* 2011. V. 66. P. 852–862.
16. Tan J., Wang J., Chai T., Zhang Y., Feng S., Li Y., Zhao H., Liu H., Chai X. Functional analyses of TaHMA2, P_{1B}-type ATPase in wheat // *Plant Biotechnol. J.* 2013. V. 11. P. 420–431.
17. Mills R.F., Peaston K.A., Runions J., Williams L.E. HvHMA2, a P_{1B}-ATPase from barley, is highly conserved among cereals and functions in Zn and Cd transport // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e42640. doi 10.1371/journal.pone.0042640
18. Ueno D., Yamaji N., Kono I., Huang C.F., Ando T., Yano M., Ma J.F. Gene limiting cadmium accumulation in rice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 16500–16505.
19. Казнина Н.М., Тумов А.Ф., Топчиева Л.В., Лайдинен Г.Ф., Батова Ю.В. Влияние возрастных различий на реакцию растений ячменя на действие кадмия // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. С. 74–79.
20. Eren E., Argüello J.M. Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P_{1B}-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 3712–3723.
21. Uraguchi S., Fujiwara T. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation // *Rice.* 2012. V. 5. P. 1–8. doi 10.1186/1939-8433-5-5
22. Van Belleghem F., Cuypers A., Semane B., Smeets K., Vangronsveld J., d'Haen J., Valcke R. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* 2007. V. 173. P. 495–508.
23. Bovef L., Rossi L., Lugon-Moulin N. Cadmium partitioning and gene expression studies in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* // *Physiol. Plant.* 2006. V. 128. P. 466–475.
24. Miyadate H., Adachi S., Hiraizumi A., Tezuka K., Nakazawa N., Kawamoto T., Katou K., Kodama I., Sakurai K., Takahashi H., Satoh-Nagasawa N., Watanabe A., Fujimura T., Akagi H. OsHMA3, a P_{1B}-type ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles // *New Phytol.* 2011. V. 189. P. 190–199.