

УДК 581.1

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *HMA2* В ЛИСТЯХ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОПТИМАЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ЦИНКА В КОРНЕОБИТАЕМОЙ СРЕДЕ И ЕГО ДЕФИЦИТЕ

© 2022 г. Н. М. Казнина^{1,*}, член-корреспондент НАН Беларуси Н. И. Дубовец², Н. С. Репкина¹, Ю. В. Батова¹, А. А. Игнатенко¹, О. А. Орловская¹, член-корреспондент РАН А. Ф. Титов¹

Поступило 22.03.2022 г.

После доработки 09.04.2022 г.

Принято к публикации 11.04.2022 г.

У двух интрогрессивных линий мягкой пшеницы (15-7-1 и 15-7-2), различающихся аллельным статусом гена *Gpc-B1*, изучена экспрессия гена транспортного белка *HMA2* в флаговых листьях в условиях оптимального содержания цинка в корнеобитаемой среде (2 мкМ) и при его дефиците (0 мкМ). Впервые показано, что растения с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* (линия 15-7-1) характеризуются более высоким уровнем транскриптов гена *TaHMA2*, чем растения с нефункциональным его аллелем (линия 15-7-2), причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде. Важно, что высокая транскрипционная активность гена *TaHMA2* не отразилась на росте побегов, но соответствовала более высокому содержанию цинка в надземных органах растений. Высказано предположение, что белок NAC, кодируемый геном *Gpc-B1*, может участвовать в регуляции уровня экспрессии гена *TaHMA2*.

Ключевые слова: *TaHMA2*, дефицит цинка, рост, интрогрессивные линии пшеницы

DOI: 10.31857/S2686738922040072

Цинк является одним из наиболее важных микроэлементов, необходимых для нормальной жизнедеятельности человека. Во многом это связано с его ролью как структурного компонента или активатора более 300 ферментов, участвующих в обмене белков, углеводов и нуклеиновых кислот [1]. Кроме того, цинк является структурным элементом транскрипционных факторов с доменом “цинковые пальцы” (zinc finger), которые играют ключевую роль в регуляции экспрессии целого ряда генов. Поэтому дефицит цинка отрицательно сказывается на состоянии здоровья населения во многих регионах планеты, вызывая целый ряд заболеваний [2].

Как известно, в организм человека цинк поступает в основном с растительной пищей, поэтому наиболее эффективным и экономически оправданным подходом к решению проблемы де-

фицита этого микроэлемента считается повышение его содержания в зерне основных сельскохозяйственных культур за счет улучшения их генетических качеств, т.е. биофортификации [3, 4]. В настоящее время с использованием метода отдаленной гибридизации получены сорта (линии) мягкой пшеницы с улучшенными качествами зерна в отношении содержания в нем микроэлементов. Это стало возможным благодаря введению в различные сорта мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) функциональных аллелей гена *Gpc-B1* (grain protein concentration) из *T. dicoccoides* [5]. Установлено, что этот ген кодирует белок NAC, принадлежащий к одному из специфичных для растений семейств NAC-факторов транскрипции, который регулирует процесс старения листьев и участвует в ремобилизации азота и ряда микроэлементов, включая цинк, из листьев в колос [6, 7]. Обнаружено, что растения с функциональным аллелем данного гена имеют более высокое содержание цинка в зерне, чем растения, у которых аллель этого гена нефункционален. Но чем обусловлены эти различия, пока не ясно. Поэтому в последнее время повышенное внимание уделяется изучению у злаков молекулярно-генетических механизмов, обеспечивающих поступление цинка в растение и его дальний транспорт в надземные органы, в том числе в семена.

¹ Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, Россия

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

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

На сегодняшний день известно, что в гомеостазе цинка (поддержании необходимого его количества) участвует более 1800 генов, среди которых наибольшее количество — это гены белков-переносчиков [8]. Среди них наиболее изученными являются белки из семейства ZIP (*zinc-iron-regulated transporter*). Например, показано, что при дефиците цинка заметно возрастает экспрессия генов белка ZIP1 в побегах пшеницы [9], белков ZIP 3/7/8/10/13 в корнях и побегах ячменя [10], ZIP5 и ZIP8 — в побегах кукурузы [11], что приводит к активизации поглощения этого микроэлемента корнями и увеличению его содержания как в подземных, так и в надземных органах.

Об участии других белков транспортеров в адаптации растений к дефициту цинка данных относительно немного. Вместе с тем известно, что в гомеостазе двухвалентных металлов важную роль играют белки, участвующие в дальнем транспорте ионов и осуществляющие их перенос через плазмалемму клеток в проводящие сосуды. К ним, в частности, относятся белки HMA2 (*heavy metal ATPase2*), относящиеся к P_{1B}-типу АТФаз и осуществляющих загрузку ионов металлов, включая цинк, в ксилему и флоэму [12]. Участие HMA2-генов в гомеостазе цинка у злаков показано в целом ряде исследований [12, 13]. При этом обнаружено, что увеличение активности HMA2 транспортеров в условиях дефицита цинка может способствовать повышению его содержания в надземных органах и зерне.

Ранее нами было показано, что интрогрессивные линии мягкой пшеницы (*T. aestivum* сорт Фестивальная), созданные с участием *T. dicoccoides*, различаются аллельным статусом гена *Gpc-B1* и, как следствие, содержанием цинка в зерне [14]. В частности, у растений линии 15-7-1, содержащей функциональный аллель этого гена, содержание цинка оказалось почти в 2 раза выше, чем у растений линии 15-7-2 с его нефункциональным аллелем, причем не только в оптимальных условиях минерального питания, но и при дефиците этого микроэлемента в субстрате. Различаются ли растения этих линий по активности транспортных белков, не известно, хотя в литературе имеются данные, свидетельствующие об участии NAC-белков в регуляции активности ряда белков транспортеров [15, 16].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение уровня экспрессии гена *TaHMA2* в листьях растений пшеницы с разным функциональным статусом гена *Gpc-B1*, выращиваемых при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците.

В данном исследовании впервые установлено, что растения с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* характеризуются более высоким уровнем транскриптов гена *TaHMA2*, чем растения с его

нефункциональным аллелем, причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка в корнеобитаемой среде. И это коррелировалось с более высоким содержанием цинка в надземных органах растений.

Растения пшеницы выращивали в условиях вегетационного опыта в песчаном субстрате в сосудах (объемом 6 л). Плотность посева — 12 растений на сосуд. Полив растений контрольного варианта осуществляли питательным раствором Хогланда-Арнона, в котором содержалось 2 мкМ цинка в виде его сернокислой соли (Zn оптимум). В опытных вариантах соль цинка в питательный раствор не вносили (Zn дефицит). Как показал химический анализ, содержание цинка в нем было менее 0.5 мкМ. В фазу созревания семян у растений измеряли высоту и сухую биомассу побега. В флаговых листьях измеряли содержание транскриптов гена *TaHMA2*. Помимо этого в побегах определяли содержание цинка.

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 качестве референсного гена использовали actin. Для проведения ПЦР использовали праймеры компании “Евроген”: Actin — номер в базе данных NCBI AG579382 (f — 5'-ggtcgtgacctactgatgc-3', rev — 5'-caatagaggaaactgctctttgc-3'), *TaHMA2* — номер в базе данных NCBI GF489141 (f — 5'-gttcacgtctctctctctcac, rev — 5'-atcttcacatcctggtagc-3'). Протокол ПЦР: 5 мин при 95°C, далее 45 циклов 15 с при 95°C, 30 с при 56°C. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Накопление транскриптов генов вычисляли по $\Delta\Delta C_t$ [17]. В качестве контрольного образца использовали кДНК растений *T. aestivum* с. Фестивальная. Содержание цинка измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре AA-7000 (Shimadzu, Япония). В каждом варианте опыта измерения проводились на 3–10 растениях (биологическая повторность) в зависимости от показателя, аналитическая повторность была 2–4-кратной. Статистическую значимость различий между средними оценивали на основании t-критерия Стьюдента. В статье обсуждаются только величины, статистически значимые при $p < 0.05$.

Проведенные исследования показали, что в оптимальных условиях минерального питания содержание транскриптов гена *TaHMA2* во флаговых листьях растений линии 15-7-1, имеющих функциональный аллель гена *Gpc-B1*, было более, чем в 7 раз выше, чем у растений линии 15-7-2, содержащих нефункциональный аллель этого гена. При недостатке цинка в корнеобитаемой среде оно возрастало у растений обеих линий, причем у линии 15-7-2 даже в большей степени, но тем не менее оставалось при этом гораздо ниже (почти в 5 раз), чем у линии 15-7-1 (рис. 1).

Имеющиеся в литературе сведения о зависимости между уровнем экспрессии гена *HMA2* и ростом растений носят противоречивый характер. Так, *hma2*-мутантные растения риса [13] и арабидопсиса [12] с нарушенной экспрессией гена *HMA2* заметно отставали в росте от дикого типа, при этом и содержание цинка в надземных органах у них было более низким. В то же время растения табака и пшеницы со сверхэкспрессией гена *HMA2* не отличались от дикого типа по росту вегетативных и генеративных органов, но содержали больше цинка в корнях и побегах [18].

В наших опытах, несмотря на значительные различия в экспрессии гена *TaHMA2* между растениями изученных линий, различия в изученных показателях роста побега у них не наблюдалось, причем независимо от содержания цинка в корнеобитаемой среде (табл. 1). Однако при этом содержание металла в побегах у растений изученных линий заметно различалось и было выше у растений линии 15-7-1 по сравнению с линией 15-7-2 как в условиях оптимального содержания цинка в субстрате, так и при его дефиците (табл. 2).

Поиск возможных путей биофортификации зерна пшеницы цинком является одной из важнейших селекционно-генетических задач, направленных на устранение дефицита этого микроэлемента в организме человека. Перспективным путем ее решения является создание с использованием метода отдаленной гибридизации сортов (линий) пшеницы, имеющих в геноме функциональный аллель гена *Gpc-B1* (от *T. dicoccoides*). В целом ряде исследований показано, что растения с функциональным аллелем этого гена отличаются более высоким содержанием цинка в зерне по сравнению с растениями, у которых аллель этого гена не функционален, что связано с лучшей ремобилизацией цинка из листьев в зер-

Содержание транскриптов гена *TaHMA2*, усл. ед.

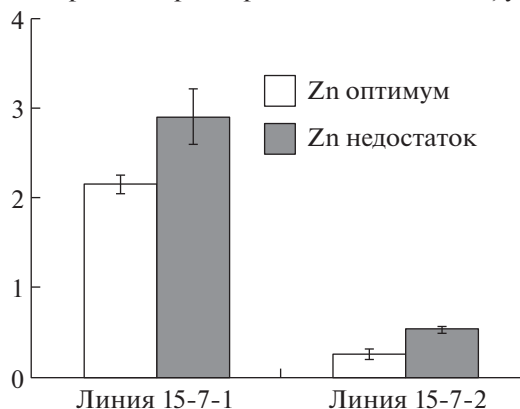


Рис. 1. Содержание транскриптов гена *TaHMA2* в листьях пшеницы при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците. За единицу принято содержание транскриптов гена в листьях *T. aestivum* с. Фестивальная.

но. Поскольку дальний транспорт цинка по растению осуществляется с помощью транспортных белков, крайне важным является изучение роли этих белков и кодирующих их генов в обеспечении зерна данным микроэлементом [19]. В литературе есть сведения, указывающие на участие гена *HMA2* в обеспечении растений цинком. Например, выявлено, что у растений риса со сверхэкспрессией гена *HMA2* возрастало по сравнению с диким типом содержание микроэлемента в надземных органах, что положительно сказывалось на скорости формирования семян [18]. В наших опытах более высокий уровень экспрессии гена *TaHMA2* в листьях пшеницы линии 15-7-1 также соответствовал более высокому содержанию цинка в побегах растений, что особенно отчетливо проявилось в условиях его дефицита в корнеобитаемой среде. При этом торможение роста побегов не наблюдалось.

В литературе имеются также сведения о том, что у *T. aestivum* белок GPC1 связан с изменениями уровней экспрессии нескольких транспортеров цинка, включая *ZIP* и *YSL* [15]. Помимо этого обнаружено, что у растений *T. durum* сорта US1114, имеющих в своем геноме ген *Gpc-B1*, при обработке флаговых листьев сульфатом цинка возрастал уровень экспрессии гена *HMA*, регулирующего экспорт цинка из хлоропластов в цито-

Таблица 1. Рост побегов пшеницы при оптимальном содержании цинка в корнеобитаемой среде и его дефиците

Показатель	Высота побега, см		Сухая биомасса побега, г	
	Zn оптимум (контроль)	Zn дефицит (опыт)	Zn оптимум (контроль)	Zn дефицит (опыт)
Линия 15-7-1	99.85 ± 3.78	94.05 ± 3.58	0.047 ± 0.005	0.040 ± 0.003
Линия 15-7-2	104.26 ± 3.33	104.45 ± 2.54	0.043 ± 0.003	0.045 ± 0.004

Таблица 2. Содержание цинка (мг/кг сухой массы) в побегах пшеницы при его оптимальном содержании в корнеобитаемой среде и дефиците

Линия	Zn оптимум (контроль)	Zn дефицит (опыт)
15-7-1	24.51 ± 0.54	22.23 ± 0.62
15-7-2	20.50 ± 0.40*	14.02 ± 0.51*

* – различия между линиями достоверны при $p < 0.05$.

плазму, а также генов транспортных белков ZIP1/15. При этом у растений сорта MACS3125, не имеющих гена *Gpc-B1*, подобный эффект отсутствовал [20]. Наши результаты показали, что содержание транскриптов гена *HMA2* у растений с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* значительно выше, чем у растений с его нефункциональным аллелем. Анализ литературы и полученных нами данных позволяет высказать предположение, что ген *Gpc-B1*, кодирующий NAC фактор транскрипции, участвует в регуляции экспрессии гена *HMA2*.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами впервые установлены различия в экспрессии гена транспортного белка *HMA2* в листьях растений пшеницы, различающихся аллельным статусом гена *Gpc-B1*. У растений с функциональным аллелем гена *Gpc-B1* содержание транскриптов гена *TaHMA2* оказалось значительно выше, чем у растений с его нефункциональным аллелем, причем как в оптимальных условиях минерального питания, так и при дефиците цинка. Это соответствовало более высокому содержанию цинка в побегах, но не отражалось на росте побега. Предполагается, что белок NAC, кодируемый геном *Gpc-B1*, может участвовать в регуляции уровня экспрессии гена *TaHMA2*.

Следует также еще раз отметить, что эффекты, связанные с наличием у растений функционального аллеля гена *Gpc-B1*, изучены пока крайне слабо. Однако поскольку такие растения являются перспективными с точки зрения биофортификации зерна пшеницы цинком и могут рассматриваться в качестве потенциального источника для улучшения качественных показателей зерна, то изучение этих эффектов, как в плане феноменологии, так и механизмов, лежащих в их основе, требуют проведения дальнейших исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БелРФФИ № 20-516-00016, БРФФИ (грант № Б20Р-240) и государственного задания FMEN-2022-0004 на научном оборудовании центра коллективного пользования КарНЦ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hänsch R., Mendel R.R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl) // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. V. 12. P. 259–266.
2. Hotz C., Brown K.H. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control // *Food Nutr. Bul.* 2004. V. 25. P. 94–204.
3. Mayer J.E., Pfeiffer W.H., Beyer P. Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. P. 166–170.
4. Velu G., Ortiz-Monasterio I., Cakmak I., et al. Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat // *J. Cereals.* 2014. V. 59. № 3. P. 365–372.
5. Митрофанова О.П., Хакимова А.Г. Новые генетические ресурсы в селекции пшеницы на увеличение содержания белка в зерне // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2016. Т. 20. № 4. С. 545–554.
6. Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., et al. A NAC gene 15 regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science.* 2006. № 314. P. 1298–1301.
7. Avni R., Zhao R., Pearce S., et al. Functional characterization of *GPC-B1* genes in hexaploid wheat. *Planta.* 2014. V. 239. P. 313–324.
8. Walter S., Kahla A., Arunachalam C., Perochon A., et al. A wheat ABC transporter contributes to both grain formation and mycotoxin tolerance // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 66. № 9. P. 2583–2593.
9. Durmaz E., Coruh C., Dinler G., et al. Expression and cellular localization of ZIP1 transporter under zinc deficiency in wild emmer wheat // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2011. V. 29. P. 582–596.
10. Tiong J., McDonald G., Genc Y., et al. Increased expression of six ZIP family genes by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced uptake and root-to-shoot translocation of Zn in barley (*Hordeum vulgare*). // *New Phytol.* 2015. № 207. P. 1097–1109.
11. Li Y., Zhang Y., Shi D., et al. Spatial-temporal analysis of zinc homeostasis reveals the response mechanisms to acute zinc deficiency in *Sorghum bicolor* // *New Phytol.* 2013. V. 200. P. 1102–1115.
12. Hussain D., Haydon M.J., Wang Y., et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2004. V. 16. P. 1327–1339.
13. Satoh-Nagasawa N., Mori M., Nakazawa N., et al. 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.
14. Kaznina N., Dubovets N., Batova Y., et al. The Response of wheat with different allele statuses of the *Gpc-B1* gene under zinc deficiency // *Agronomy.* 2021. V. 11. P. 1057.

15. Pearce S., Tabbita F., Cantu D., et al. Regulation of Zn and Fe transporters by the *GPC1* gene during early wheat monocarpic senescence // BMC Plant Biol. 2014. V. 14. P. 368.
16. Gupta O.P., Pandey V., Saini R. et al. Comparative physiological, biochemical and transcriptomic analysis of hexaploid wheat (*T. aestivum* L.) roots and shoots identifies potential pathways and their molecular regulatory network during Fe and Zn starvation // Genomics. 2021. V. 113. P. 3357–3372.
17. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
18. Tan J., Wang J., Chai T., et al. Functional analyses of TaHMA2, a P₁B-type ATPase in wheat // Plant Biotech. J. 2013. V. 11. P. 420–431.
19. Krishna A.T.P., Maharajan T., Victor R.G., et al. Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 662.
20. Deshpande P., Dapkekar A., Oak M., et al. Nanocarrier-mediated foliar zinc fertilization influences expression of metal homeostasis related genes in flag leaves and enhances gluten content in durum wheat // PLoS One. 2018. V. 13. e0191035.

THE *HMA2* GENE EXPRESSION IN LEAVES OF INTROGRESSIVE WHEAT LINES UNDER ZN OPTIMUM AND DEFICIENCY CONTENT IN ROOT ENVIRONMENT

N. M. Kaznina^{a, #}, Corresponding Member of the NANB N. I. Dubovets^b, N. S. Repkina^a, Yu. V. Batova^a, A. A. Ignatenko^a, O. A. Orlovskaya^a, and Corresponding Member of the RAS A. F. Titov^a

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

^b Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

[#]e-mail: kaznina@krc.karelia.ru

In two introgressive lines of bread wheat (15-7-1 и 15-7-2), which differ in the allelic status of the *Gpc-B1* gene, the expression of gene, encoding HMA2 transport protein in flag leaves under optimum Zn content in substrate (2 мкМ) and its deficiency (0 мкМ), were investigated. In present research we introduced a novel data about higher gene expression of *TaHMA2* in plants with functional allele *Gpc-B1* gene (line 15-7-1) compare to plants with non-functional allele *Gpc-B1* gene (line 15-7-2) under optimum Zn amount in substrate as well as under its deficiency. It is important to note, that high HMA2 gene expression did not affected the wheat growth but correlated to high Zn concentration in aboveground part of plants. Suposed, that NAC transcription factor encoded by *Gpc-B1* gene, can be involved in regulation of *TaHMA2* gene.

Keywords: *TaHMA2*, zinc deficiency, growth, introgressive wheat lines