

Изучение гена устойчивости к тяжёлым металлам (*MTP4*) у сахарной свёклы

Т.П. ФЕДУЛОВА, вед. научн. сотрудник, д-р биолог. наук (e-mail: biotechnologiya@mail.ru)

Т.Н. ДУВАНОВА, мл. научн. сотрудник

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свёклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»

Введение

Тяжёлые металлы встречаются в окружающей среде, однако вследствие антропогенной деятельности произошло критическое увеличение концентраций повсеместно. Некоторые тяжёлые металлы, например Pb, Cd и Hg, не вовлечены в метаболизм растений и являются токсичными для них даже в низких концентрациях [1, 2]. Они угнетают процессы фотосинтеза, затрудняют минеральное и водное питание растительного организма. Однако растениям присущи адаптивные механизмы, сформировавшиеся в процессе эволюции. Благодаря механизмам устойчивости растения могут приспосабливаться и выживать в условиях загрязнения окружающей среды тяжёлыми металлами [3–5]. Основой большинства механизмов устойчивости растений к абиотическим стрессам и, в частности, к тяжёлым металлам, является синтез защитных белков, связанный с экспрессией определённых генов или групп генов. К настоящему времени у разных видов растений выделено и описано множество генов, кодирующих белки-транспортёры, которые обеспечивают экспорт ненужных ионов металла из клетки посредством белков-переносчиков, встроенных в плазматическую мембрану [6–8]. К ним относятся и белки-транспортёры MTP (Metal Tolerance Protein). Представители данного семейства способны переносить ионы двухвалентных металлов, таких как цинк, кадмий, кобальт, никель и марганец, из цитозоля в вакуоль. Встречается шесть трансмембранных доменов (TMD), два из которых (TMD II и TMD V) содержат высококонсервативные сигнальные последовательности, обеспечивающие селективность по металлу. Белки толерантности к металлам (MTP) действуют как антипортеры катионов двухвалентных металлов Me^{2+} , которые обеспечивают транспорт Me^{2+} из цитозоля за пределы клетки или в субклеточные компартменты. Транспортёры филогенетически распространены повсеместно, охватывая царства архей, эубактерий и эукариот [9–12].

Для селекции сахарной свёклы ценными являются растения, устойчивые к тяжёлым металлам. Устойчивость данной культуры к металлам обуславливается работой нескольких моногенов. В базе данных NCBI представлены 9 генов (*MTP1*, *MTP2*, *MTPC2*, $2 \times$ *MTP4*, *MTPC2*, *MTP10*, *MTP11*, *MTP.B*) у *Beta vulgaris* L., экспрессирующих белки, ответственные за устойчивость растений к тяжёлым металлам [13]. Гены представлены практически во всех хромосомах, что может свидетельствовать также об их компенсаторном действии. Сегодня для получения растений сельскохозяйственных культур с повышенным уровнем стрессоустойчивости используют не только полевую отбор, но и биотехнологические подходы. Клеточная селекция позволяет получать адаптированные формы растений методом отбора *in vitro* [14, 15].

Цель исследования

Цель данной работы заключалась в выявлении и изучении гена устойчивости к тяжёлым металлам *MTP4* у растений-регенерантов сахарной свёклы, отобранных на селективной среде с ионами кадмия.

Материалы и методы

В качестве материалов для исследования на устойчивость к тяжёлым металлам, в частности к Cd, служили растения-регенеранты (микрклоны) сахарной свёклы, полученные на селективной среде, содержащей ацетат кадмия ($Cd(CH_3COO)_2$) в различной концентрации. Для проведения экспериментов использовали зелёную массу. ДНК выделяли с использованием наборов для выделения геномной ДНК (ЗАО «Синтол»). Качество образцов ДНК оценивали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле в 1×TBE-буфере, концентрацию определяли с использованием набора для анализа ДНК HS QubitR (ThermoFisherScientific, США). ПЦР-амплификацию осуществляли на приборе SimpliAmp (ThermoFisherScientific, США). Для визуализации использовали УФ-трансиллюминатор Vilber Lourmat (Франция).

Оптимальная температура для проведения реакции ПЦР подбиралась в соответствии с температурой отжига праймеров. Протокол постановки ПЦР:

«94,5 °C в течение 4 мин, далее 30 циклов со следующими условиями: 94,5 °C в течение 35 сек, отжиг праймеров – 35 сек, 72 °C в течение 45 сек с завершающей элонгацией при 72 °C в течение 4 мин».

В экспериментах использованы следующие специфические праймеры на ген устойчивости к тяжёлым металлам *MTP4*: MTP4A F/R и MTP4B F/R, разработанные в программе BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>):

MTP4A_F TGAACACGCCCAACCTCAAT
MTP4A_R GGCCCTTACGAGGGCAATAG
MTP4B_F GCACGAACGATCCTGTTTCC
MTP4B_R GAGGTTGGGCGTGTTCAACT

Секвенирование осуществляли методом Сэнгера на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (ООО «Евроген»).

Результаты исследований и их обсуждение

С использованием специфических праймеров MTP4A F/R и MTP4B F/R на выявление гена устойчивости к тяжёлым металлам *MTP4*, локализованного на 3-й хромосоме, был проведён классический ПЦР-анализ. В результате эксперимента у 8 образцов рас-

тений-регенерантов сахарной свёклы, которые ранее отобраны и идентифицированы как устойчивые генотипы, были выявлены ампликоны размером в 550 и 1000 п. н. соответственно, что полностью соответствует ожидаемым размерам (рис. 1 (а, б)).

Чувствительные генотипы, кроме образца под № 13, указанные ампликоны не содержали. Причина того, почему визуально структурно целый ген у № 13 не работает, может быть в наличии SNPs. Для выяснения данного утверждения ДНК-ампликоны, обнаруженные у образцов под № 2 и 13, полученные с праймером MTP4B, были просеквенированы (ООО «Евроген»).

Праймер MTP4B охватывает области 2, 3 и 4-го экзона изучаемого гена, а также интроны между ними. Результаты прочтения нуклеотидных последовательностей 2-го и 3-го экзона не дали ответа, так как обнаружили абсолютно идентичный паттерн как между собой, так и в сравнении с контрольным образцом (GenBank № HQ709091.1 NCBI) (рис. 2). Анализ проводили в программе Geneious Prime (<https://www.geneious.com/prime/>).

В интроне между 2-м и 3-м экзонами обнаружены две однонуклеотидные замены (G/T, T/A).

При выравнивании нуклеотидных последовательностей областей 4-го экзона гена *MTP4* у устойчивого генотипа 92 (№ 2) выявлено SNPs в позиции 135–137

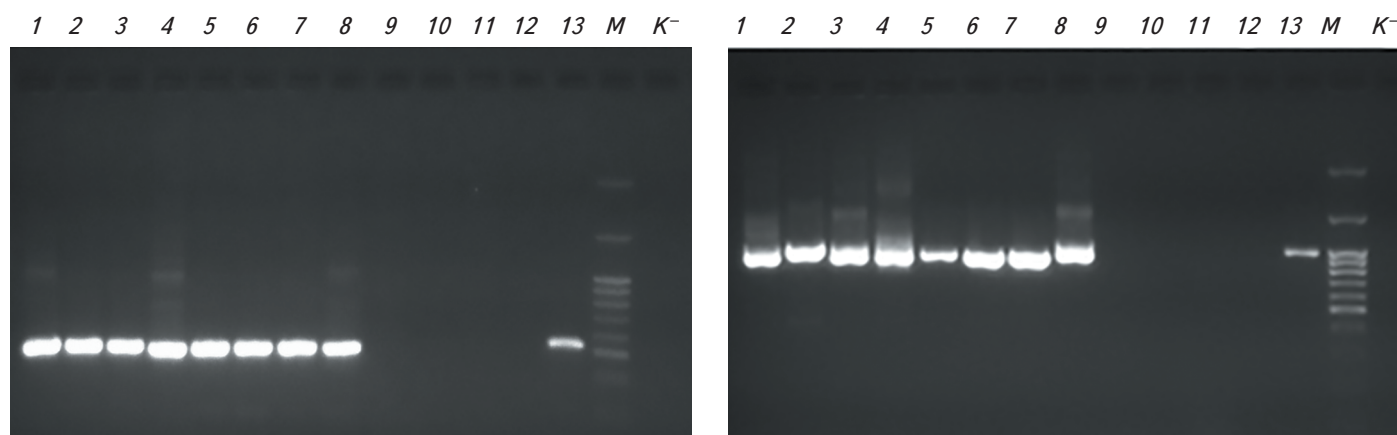


Рис. 1. Электрофореграмма разделения ПЦР-продуктов с использованием MTP4A F/R (а) и MTP4B F/R (б). Дорожки: 1–8 – устойчивые растения-регенеранты, 9–13 – чувствительные растения-регенеранты. М – маркер молекулярных масс ДНК GeneRuler™, 100–3000 п. н. (ThermoScientific, США). К – отрицательный контроль (стерильная вода вместо ДНК)

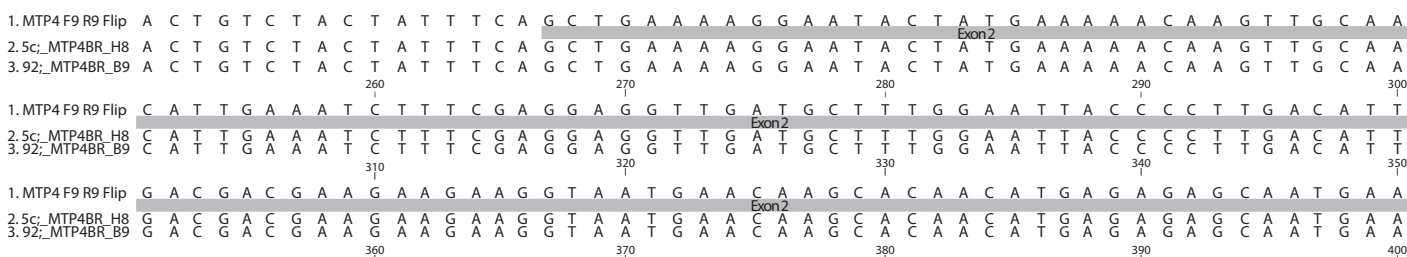


Рис. 2. Фрагмент выравнивания образцов № 2 (92) и № 13 (5с) по 2-му экзону



(A/T, G/T, C/A). Обнаружены также делеции в позициях 115, 123, 130 и 131 (рис. 3).

В ходе сравнительного анализа, проведённого в программе Geneious Prime, выявлен гипотетический вариант трансляции нуклеотидной последовательности 4-го экзона с идентифицированными нуклеотидными заменами. Так, удалось проанализировать, какие из них являются действительно значимыми (nonsynonymous) и изменяют аминокислотный состав кодируемых полипептидов, что подразумевает и возможное изменение функциональной активности кодируемого геном МТР4 белка (рис. 4).

Изменения аминокислотного состава по анализу 4-го экзона (Geneious Prime) приведены в таблице.

Цветом выделена разница в аминокислотной последовательности изученных генотипов.

Заключение

С использованием специфических праймеров МТР4А F/R и МТР4В F/R на выявление гена устойчивости к тяжёлым металлам МТР 4 был проведён классический ПЦР-анализ. Эксперимент позволил подтвердить достаточно высокую специфичность праймеров, так как они позволили разграничить устойчивые и чувствительные материалы. Секвенирование ДНК-фрагмента устойчивой формы растения-регенеранта выявило SNPs в 4-м экзоне (A/T, G/T, C/A). Здесь же обнаружены и делеции. 2-й и 3-й экзоны показали абсолютную идентичность между устойчивым и чувствительным генотипами. При помощи программы Geneious Prime у растения-регенеранта № 2 (92) показан гипотетический вариант

трансляции нуклеотидной последовательности полиморфных вариантов 4-го экзона.

Сочетание методов биотехнологии (культуры тканей) и молекулярной генетики даёт возможность отбирать устойчивый селекционный материал для создания гибридов сахарной свёклы и включать его в дальнейший селекционный процесс.

Список литературы

1. DalCorso, G. Regulatory networks of cadmium stress plants / G. DalCorso, S. Farinati, A. Furini // Plant Signal. Behav. – 2010. – № 5, 6. – P. 663–667.
2. Viehweger, K. How plants cope with heavy metals / K. Viehweger. – Bot Stud, 2014, 55:35. doi: 10.1186/1999-3110-55-35.
3. Репкина, Н. Влияние тяжёлых металлов на экспрессию генов у растений / Н. Репкина, В. Таланова, А. Титов // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2013. – № 3. – С. 31–45.
4. Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice. Plant Soil / I. Ogawa, H. Nakanishi, S. Mori, N.K. Nishizawa. – 2009. – № 325. – P. 97–108.
5. State-of-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century / M. Capdevila, R. Bofill, O. Palacios, S. Atrian // Coordin. Chem. Rev. – 2012. – № 256. – P. 46–62.
6. Pal, R. Phytochelatins: Peptides involved in heavy metal detoxification / R. Pal, J. Rai // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2010. – № 160. – P. 945–963.
7. Waters, B. Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective / B. Waters, P. Sankaran // Plant Sci. – 2011. – № 180. – P. 562–574.
8. Khan, M. Moving toward a precise nutrition: preferential loading of seeds with essential nutrients over nonessential

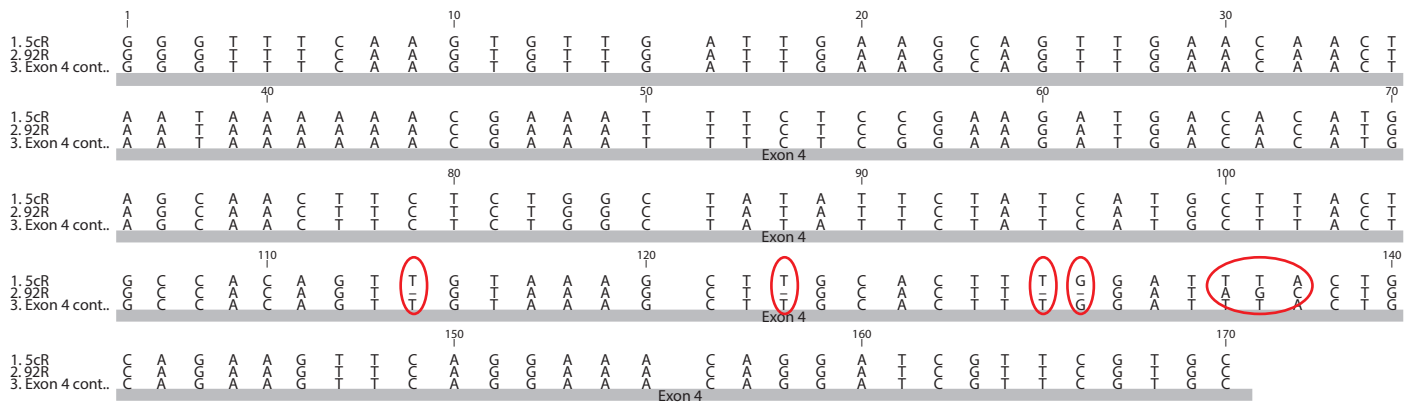


Рис. 3. Локализация делеций и нуклеотидных замен в 4-м экзоне № 2 (92) и № 13 (5с)

Сравнение аминокислотного состава

Генотип	Аминокислотная последовательность
HQ709091.1 (NCBI)	Gln-Leu-Leu-Trp-Leu-Tyr-Ser-Ile-Met-Leu-Thr-Ala-Thr-Val-Val-Lys-Leu-Ala-Leu-Trp-Ile-Tyr-Cys-Arg-Ser-Ser-Gly-Asn-Arg-Ile-Val-Arg
№ 2 (92) (устойчивый генотип)	Gln-Leu-Leu-Trp-Leu-Tyr-Ser-Ile-Met-Leu-Thr-Ala-Thr-Val-Ser-Cys-Thr-Pro-Ala-Glu-Val-Gln-Glu-Thr-Gly-Ser-Phe-Val
№ 13 (5с) (чувствительный генотип)	Gln-Leu-Leu-Trp-Leu-Tyr-Ser-Ile-Met-Leu-Thr-Ala-Thr-Val-Val-Lys-Leu-Ala-Leu-Trp-Ile-Tyr-Cys-Arg-Ser-Ser-Gly-Asn-Arg-Ile-Val-Arg

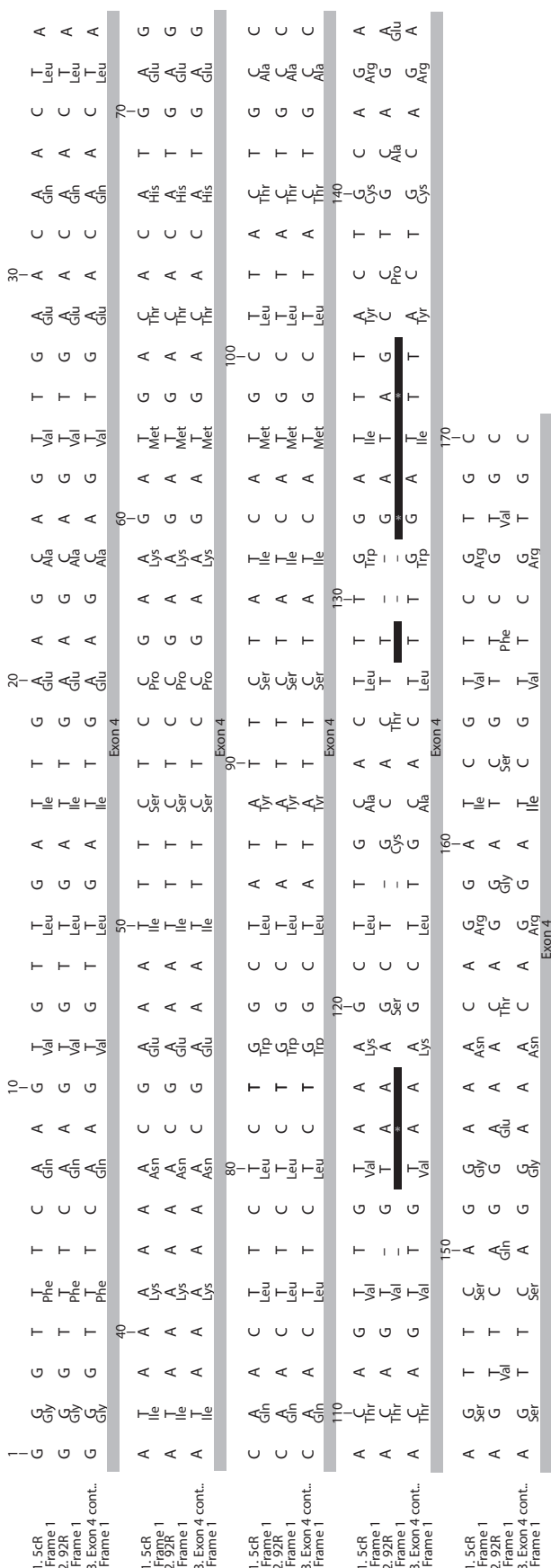


Рис. 4. Дедуктивные аминокислотные последовательности, кодируемые полиморфными вариантами 4-го экзона гена МТР4

toxic elements / M. Khan, N. Castro-Guerrero, D. Mendoza-Cozatl // Plant Sci. – 2014. – № 5:51. doi: 10.3389/fpls.2014.00051.

9. A role for the AtMTP11 gene of Arabidopsis in manganese transport and tolerance / E. Delhaize, D. Gruber, K. Pittman [et al.] // Plant J. – 2007. – № 51 (2). – P. 198–210. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03138.x

10. Gustin, J.L. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters / J.L. Gustin, M.J. Zanis, D.E. Salt // BMC Evol Biol. – 2011. – № 1. – P. 76.

11. Gallego, S. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms / S. Gallego, L. Pena, R. Barcia [et al.] // Environ. Exp. Bot. – 2012. – № 83. – P. 33–46.

12. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies / F. Ricachenevsky, P. Menguer, R. Sperotto [et al.] // Front Plant Sci. – 2013. – № 4:144. doi: 10.3389/fpls.2013.00144.

13. Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from Beta vulgaris subspecies maritima that confers manganese tolerance in yeast / I. Erbasol, O. Bozdogan, A. Koc [et al.] // BioMetals. – 2013. – № 26 (5). – P. 795–804. doi:10.1007/s10534-013-9658-7.

14. Знаменская, В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свёклы / В.В. Знаменская // Энциклопедия рода Beta: биология, генетика и селекция свёклы. – Новосибирск, 2010. – С. 420–437.

15. Raia, M. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress / M. Raia, R. Kaliaa, R. Singha [et al.] // Environmental and Experimental Botany. – 2011. – № 71. – P. 89–98.

Аннотация. Исследован ген *MTP4* (Metal tolerance protein 4), контролирующий устойчивость растений сахарной свёклы к тяжёлым металлам. Для проведения ПЦР использованы две пары праймеров: *MTP4A F/R* и *MTP4B F/R*. Праймеры являются специфичными к области, охватывающей 2, 3 и 4-й экзоны гена *MTP4* и интроны между ними. У образцов, устойчивых к воздействию тяжёлых металлов, в частности кадмия, в гене *MTP4* обнаружены нуклеотидные замены в 4-м экзоне. Использование инструмента Geneious Prime для анализа секвенированных последовательностей гена *MTP4*, возможно, позволит отбирать устойчивые формы в культуре *in vitro* с целью их дальнейшего вовлечения в селекционную схему.

Ключевые слова: сахарная свёкла, *MTP*-гены, генетический полиморфизм, ПЦР-анализ, молекулярно-генетические маркеры, селекция, ДНК.

Summary. *MTP4* (Metal tolerance protein 4) gene controlling resistance of sugar beet plants to heavy metals has been investigated. Specific PCR primers *MTP4A F/R* and *MTP4B F/R* covering the 2nd, 3rd and 4th exons and introns between them of the *MTP4* gene have been used. Cd resistant samples showed a nucleotide changes in the 4th exon. Using of Geneious Prime software as a tool for *MTP4* gene sequence analyzing, will probably allow selecting *in vitro* stage the resistant forms for using in a breeding scheme.

Keywords: sugar beet, *MTP genes*, genetic polymorphism, PCR, molecular-genetic markers, breeding, DNA.