



烟草 *NtHMA4* 基因突变体鉴定及低镉特性研究

高玉龙, 王丙武, 李文正, 李梅云, 宋中邦, 吴玉萍

(云南省烟草农业科学研究院, 烟草行业烟草生物技术育种重点实验室, 国家烟草基因工程研究中心, 昆明 650021)

摘要: 该研究从中国烟草主栽品种‘云烟 87’的 EMS 突变体库中, 通过 TILLING 技术筛选, 获得 *NtHMA4* 的 EMS 突变体 *hma4-4h12*。对突变体进行测序表明, 该突变体核苷酸突变方式为 C152T, 氨基酸突变方式为 T51I。利用 100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化镉对突变体进行镉胁迫试验表明, *hma4-4h12* 与对照‘云烟 87’相比, 叶片中镉、锌、铜、砷、铅、镍含量分别降低 55.48%、21.11%、20.96%、27.50%、16.23% 和 19.28%, 铁、锰和铬含量与对照没有显著差异。*hma4-4h12* 突变体大田农艺性状观察表明, 其株高、节距、茎围等与对照相比显著变小, 推测 *hma4-4h12* 中含有影响这些性状的突变位点。该研究获得的低镉突变体 *hma4-4h12* 可以作为培育低镉烟草品种的材料, 但是育种中利用该突变体, 后续还需要通过回交去除不利突变的影响。

关键词: 烟草; *NtHMA4* 基因; 突变体; 镉含量
中图分类号: Q789; TS41⁺3 **文献标志码:** A

Identification and Low Cadmium Characteristics Research of *NtHMA4* Mutant in Tobacco

GAO Yulong, WANG Bingwu, LI Wenzheng, LI Meiyun, SONG Zhongbang, WU Yuping
(Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tobacco Biotechnological Breeding, National Tobacco Genetic Engineering Research Center, Kunming 650021, China)

Abstract: EMS mutant of *NtHMA4*, *hma4-4h12*, was screened from mutant library of main tobacco cultivar ‘Yunyan 87’ in China by TILLING technology in this study. Sequencing of the mutants showed that the mutation of nucleotides was C152T in the *hma4-4h12*, and the mutation of amino acid in the *hma4-4h12* was T51I. The content of cadmium, zinc, copper, arsenic, lead and nickel in *hma4-4h12* leaf were decreased by 55.48%, 21.11%, 20.96%, 27.50%, 16.23%, and 19.28% respectively compared with those of control after 100 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 treatment. *hma4-4h12* was planted in the field and its agronomic traits were observed. Plant height, stem circumference and intermodal length of *hma4-4h12* were decreased significantly compared with those of control. It was speculated that *hma4-4h12* contained mutant loci affecting these traits. The low cadmium mutant, *hma4-4h12*, obtained from this study can be used as a material for cultivating low cadmium tobacco varieties. However, the use of this mutant in breeding requires further backcrossing to remove the negative mutation.

Key words: tobacco; *NtHMA4* gene; mutant; cadmium content

镉是常见的土壤重金属污染物之一。种植于镉污染土壤上的植物能够从土壤中吸收镉, 进而对植物和人体造成伤害。近年来, 随着工业快速发展, 矿

产资源的不合理开采等原因, 镉污染问题日益严重^[1]。2014 年中国土壤污染状况调查公报披露, 中国土壤污染物总的超标率为 16.1%, 污染类型以无

机型为主,其中又以镉污染为主要污染类型,其点位超标率为 7%,从污染分布情况来看,南方土壤污染较重,西南、中南地区土壤重金属超标范围较大^[2]。当镉含量为植物叶片干重的 5~10 mg/kg 时,就会对植物造成伤害^[3]。镉是植物生长发育的非必需元素。植物中,镉的流向主要有 3 个:根部吸收、根部螯合及向地上部运输。

目前,对镉从根部向地上部的运输机制研究得较为清楚。镉的转运体主要包括 AtIRT1(iron-regulated transporter 1)、AtNRAMP3(natural resistance-associated macrophage)^[4]、AtHMA2^[5] 和 AtHMA4^[6]等。拟南芥中 *AtHMA2*、*AtHMA4* 基因的研究结果表明:过量表达 *AtHMA4* 基因可提高植株对镉的耐性及吸收力^[7-8],而 *HMA4* 基因突变后则能增强植物对镉的敏感性^[9]。水稻 OsHMA2 蛋白是水稻锌和镉从根向茎的主要转运体^[10]。在拟南芥中过量表达大麦 *HvHMA2* 基因可部分恢复拟南芥双突变体 *hma2hma4* 锌和镉的转运能力^[11]。可见不同植物中的 HMA 蛋白功能上具有保守性。

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是镉富集植物,且主要积累于叶片。中国各烟区烟叶中的镉含量平均为 2.95 mg/kg,最高为 19.35 mg/kg^[12]。与其他重金属相比,镉在烟气中的迁移率较高。吸烟成为人体摄入镉的重要途径之一,因此降低烟叶中镉含量成为烟草生产及育种工作的重要目标^[13]。该研究以功能研究较为清楚的植物镉转运基因 *HMA4* 为靶标,利用 TILLING 技术筛选‘云烟 87’EMS 突变体库,获得一个该基因的错义突变体。对该突变体进行镉胁迫试验,以期获得对镉转移能力下降的烟草材料,为培育低镉含量烟草品种提供育种材料。

1 材料和方法

1.1 试验材料

‘云烟 87’野生型种植于云南省烟草农业科学研究院试验基地,开花期取根、茎(距根部 1/3 处)、叶(第 10 位叶)、花组织液氮速冻后于-80℃保存备用。1 842 份‘云烟 87’EMS 突变体由云南省烟草农业科学研究院创制并保存。利用 TILLING 技术从该突变体库中筛选获得 *NtHMA4* 基因发生核苷酸改变的一个突变体 *hma4-4h12*,该突变体用于镉胁迫试验及大田农艺性状调查。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

按照试剂盒

RNAiso Plus(Takara,日本)的操作说明,提取野生型‘云烟 87’开花期根、茎、叶、花的总 RNA。由微量紫外检测仪 Nano-Drop 检测 RNA 浓度。利用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)(TaKaRa,日本)将提取的 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 *NtHMA4* 基因组织特异性表达分析 根据基因 *NtHMA4* CDS 序列(NCBI 登录号 HF937054.1)设计 qRT-PCR 引物 HMA4QF(GTTTCAGAATCAAAGTCATGTG)和 HMA4QR(GCAGATTGGC-ATGCTTTAGA)。以烟草 Actin 基因作为内参,设计 PCR 引物 Actin-F(CTGAGGTCCTTTTCCAACCA)和 Actin-R(TACCCGGGAACATGGTAGAG)。

以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR,反应在 Roche LightCycler 480 上利用 LightCycler 480 SYBR Green I master 进行,20 μL 体系含有 10 μL LightCycler 480 SYBR Green I master(2×),正反引物各 1 μL(10 μmol/L),cDNA 1 μL(反转录产物稀释 4 倍),7 μL 灭菌蒸馏水。反应程序如下:95℃预变性 5 min;95℃退火 20 s,61℃变性 15 s,72℃延伸 15 s,45 个循环。反应结束后对扩增产物荧光值变化和溶解曲线进行分析。相对表达量使用 2^{-ΔΔCt}方法,3 个生物学重复。

1.2.3 TILLING 筛选 *NtHMA4* 基因突变体 利用 Primer 3 设计 TILLING 引物,T-HMA4-F(TAG-AGTGTAGAGGAAAAATAGAAAGAAGAG)和 T-HMA4-R(ATAAGCTGAGAGCTTAAGAAAAAA-GAAACT)。利用 DNeasy Plant Mini Kit 提取突变体库中 1 842 份 M₂ 代材料叶片的 DNA。将所有样品的 DNA 浓度稀释至 40 ng/μL,组建成 8 倍样品池用于 TILLING 检测。TILLING 检测步骤具体参照文献[14]。筛选的突变体 M₃ 代通过测序进行验证,最终获得纯合突变体 *hma4-4h12*。

1.2.4 突变体镉胁迫试验 将突变体 *hma4-4h12* 及对照‘云烟 87’种植于温室,昼/夜温度为(25±1)℃/(20±1)℃。盆栽试验使用 28 cm×28 cm 塑料盆,盆栽介质为烟草育苗基质:沙=1:1。每株施烟草专用肥(N:P:K=1:1.5:2.8)30 g,分 5 次施入,突变体 and 对照种植各 20 株,各取 9 株长势一致的烟苗进行试验。现蕾期^[15]将 500 mL CdCl₂ 溶液(100 μmol/L)浇于烟株根部,5 d 后取第 17~19 片叶^[16-17],去梗后 100℃杀青,60℃烘干备用。

1.2.5 重金属含量的检测 根据烟草行业标准 YC/T380-2010^[18],利用电感耦合等离子体质谱仪

测定烟叶中镉、砷、铅、铬、镍的含量。样品粉碎后过 100 目筛,称取 0.2~0.3 g 样品于消解罐中,样品精确到 0.1 mg。向消解罐中依次加入 5 mL 65%浓硝酸和 2 mL 30%过氧化氢,旋紧消解罐盖子,置于微波消解仪中。消解程序:室温经 5 min 升至 100 ℃,保持 5 min;再经 5 min 升至 130 ℃,保持 5 min;最后经 10 min 升至 190 ℃,保持 20 min。消解完毕后,待温度降至室温后取出消解罐。将消解罐中的样品溶液转移至 50 mL 塑料容量瓶中,用去离子水冲洗消解罐 3~4 次,将清洗液一并转移至容量瓶中,用去离子水定容,摇匀后将所得的样品溶液进行检测。锌、铜、铁、锰的检测前处理同上,不同的是消解后的样品上电感耦合等离子体光谱仪进行检测。

1.2.6 大田农艺性状调查 试验在云南省烟草农业科学研究院玉溪市研和试验基地进行,种植密度为 120 cm×50 cm。使用烟草专用肥,N:P:K=1:1.5:2.8,施肥量按 75 kg/hm² 进行,底肥占总施肥量的 30%,追肥分 5 次施入,占 70%。在中心花开放时打顶。农艺性状参照中国烟草行业标准 YC/T 142-2010^[19] 进行调查。采用完全随机区组设计进行试验,突变体 *hma4-4h12* 和对照‘云烟 87’分别设 5 个小区,每个小区种植 50 株。在每个小区中选择 5 株具有代表性的烟株进行农艺性状调查。

2 结果与分析

2.1 *NtHMA4* 基因组织特异性表达分析

拟南芥、水稻等作物^[20-21]中 *HMA4* 基因主要在根中表达。对烟草不同组织中 *NtHMA4* 基因的表达研究结果(图 1)显示,该基因在烟草根中表达量最高,茎和花中微量表达,叶中基本不表达。该基因的表达模式与其编码蛋白功能有关,重金属 Cd 或 Zn 等在根部与 *HMA4* 蛋白结合并运往地上部。

2.2 *NtHMA4* 基因突变体的获得

HMA4 是植物二价重金属镉、锌从地下部向地上部转运的主要转运体。烟草 *NtHMA4* 基因 ORF 长 4 335 bp,编码 1 444 个氨基酸。利用 TILLING

技术从 1 842 份‘云烟 87’EMS 突变体库中获得 1 个 *NtHMA4* 基因错义突变体,其核苷酸突变方式为 C152T,氨基酸突变方式为 T51I,命名为 *hma4-4h12*。突变体突变位点在 *NtHMA4* 基因组中的示意图见图 2。该突变体突变位点位于 *NtHMA4* 基因 5'端,突变体中第 51 位氨基酸由极性氨基酸苏氨酸变为非极性的异亮氨酸,该突变可能对蛋白的三维结构产生影响。通过测序获得了纯合突变株系(图 3)。

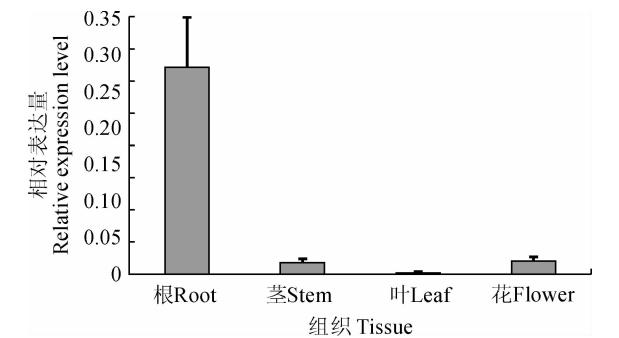
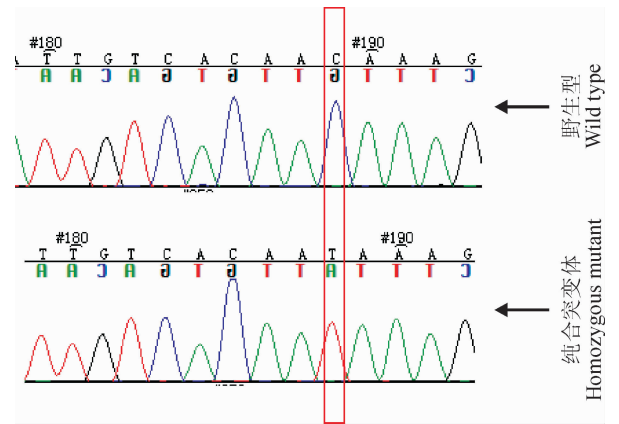


图 1 *NtHMA4* 基因组织特异性表达分析
Fig. 1 Analysis of tissue specific expression of *NtHMA4*



方框所示为突变位点

图 3 *hma4-4h12* 纯合突变体测序结果
box is shown as a mutation site

Fig. 3 Identification of homozygous mutation site by sequencing

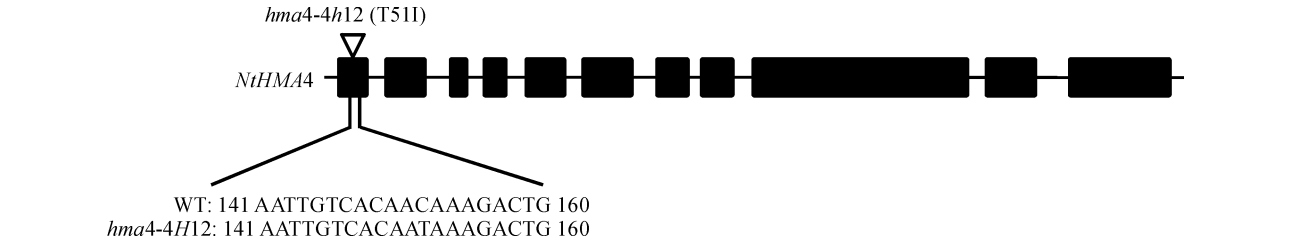


图 2 突变体 *hma4-4h12* 中 *NtHMA4* 基因突变位点示意图

Fig. 2 Diagram of mutation site of *hma4-4h12* in *NtHMA4* gene

2.3 突变体镉胁迫试验

温室种植突变位点纯合的突变体 *hma4-4h12*。现蕾期在烟株根部施入 500 mL 100 μ mol/L CdCl₂, 处理后 5 d 取中部叶片杀青、烘干后检测重金属含量。与对照相比(图 4), 突变体 *hma4-4h12* 叶片中的镉、锌、铜、镍含量分别降低 55.48%、21.11%、27.50%, 差异均达到极显著水平; 铜、铅、镍含量分别降低 20.96%、16.23%、19.28%, 差异达到显著水平; 突变体铁、锰和铬含量与对照没有显著差异。这些重金属中, 镉、铬、铅和砷不参与植物的生理过程, 而锌、铁、锰、铜和镍或参与植物氧化还原反应, 或作为酶、其他蛋白的辅酶因子、配位基团。

2.4 突变体农艺性状

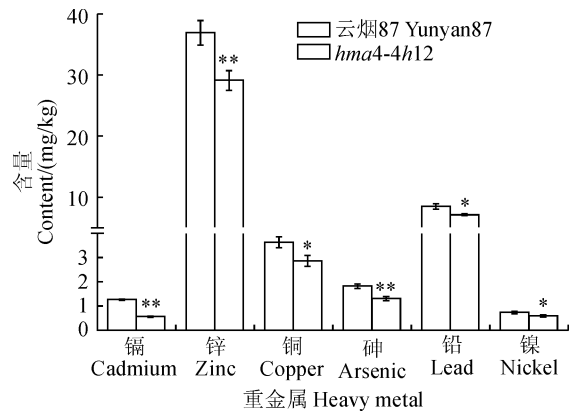
由于 *hma4-4h12* 是 EMS 诱变获得的, 除了目标基因突变外, 可能还有许多未知位点的突变, 这些突变可能会影响到 *hma4-4h12* 的表型, 为了研究该突变体大田农艺性状是否有明显的缺陷, 在大田种

植该突变体对农艺性状进行了观察比较。结果表明(图 5), 突变体 *hma4-4h12* 自然株高、打顶株高与对照相比变矮, 且差异达极显著水平; 茎围、节距、最大腰叶长与对照相比变小, 且差异达极显著水平; *hma4-4h12* 自然叶数与对照相比变少, 其差异达显著水平。可见突变体 *hma4-4h12* 与对照相比在农艺性状上具有较大差异。该突变体在生产上进行应用还需要对缺陷性状进行回交改良。

3 讨 论

随着工业化进程的加速, 重金属镉污染日趋严重。镉通过食物最终被人体吸收, 可以对人体造成重大伤害。烟草是中国重要的经济作物, 在国民经济中占有举足轻重的地位。烟草对镉的富集作用较大, 降低烟草镉含量是当前烟草减害的一个重要目标。HMA4 是植物镉转运的主要蛋白之一, 主要负责镉从根部向地上部的转运^[5-7,10]。拟南芥 *AtHMA4* 基因突变后可显著降低镉从根部向地上部的转运率^[5]。烟草以叶片为收获对象, 通过抑制镉从根部向地上部的转运而获得烟叶镉含量降低的烟草品种是一个有效的途径。

本研究获得了一个烟草镉转运基因 *NtHMA4* 的 EMS 突变体 *hma4-4h12*, 该突变体第 51 位氨基酸由极性氨基酸苏氨酸变为非极性的异亮氨酸。通过镉胁迫试验发现, 突变体 *hma4-4h12* 叶片中的镉含量比对照降低 55.48%。另外, 锌、铜、砷、铅、镍也降低明显。而铁、锰和铬含量与对照没有显著差异。重金属中, 镉、铬、铅和砷不参与植物的生理过程, 而锌、铁、锰、铜和镍或参与植物氧化还原反应, 或作为酶、其他蛋白的辅酶因子、配位基团。如, 铁参与叶绿体和线粒体中的电子传递过程、抗氧化酶



* 和 * * 分别表示 0.05 和 0.01 水平上差异显著。下同
图 4 突变体重金属含量
* and * indicate significant difference at 0.05 level and 0.01 level, respectively. The same as below

Fig. 4 Content of heavy metal in mutant tobacco leaf

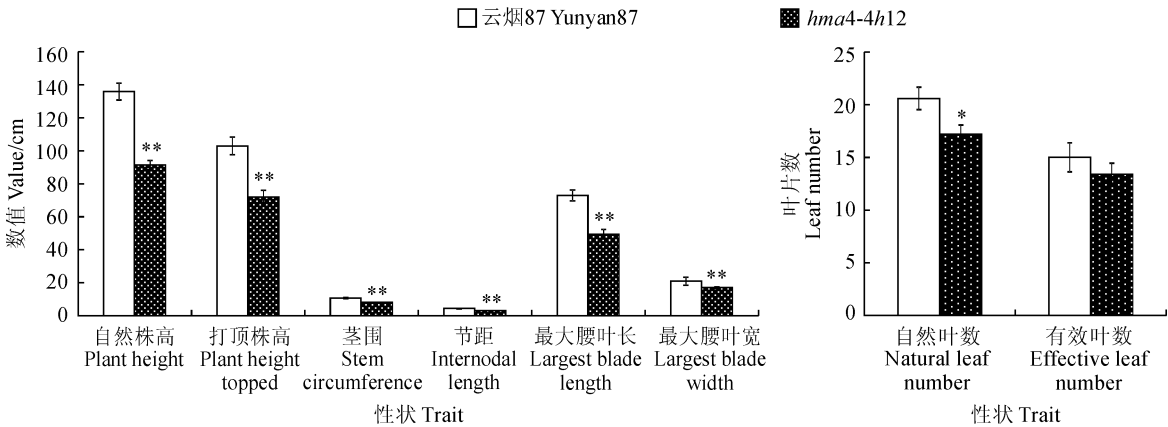


图 5 突变体大田农艺性状
Fig. 5 Field agronomic traits of mutant

迫、氮的固定、激素合成等过程。锰是 SOD、丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶等的辅酶因子^[22]；锌做为辅酶因子在电子传递和抗氧化代谢中起重要作用,也是许多转录因子的组成部分^[23]。*hma4-4h12* 突变体同时降低了镉、铅、砷等 3 种植物生长不需要的有害重金属,在低重金属含量培育中可以广泛应用。

hma4-4h12 是由 EMS 突变体库中筛选获得

的,除了目标位点外,可能还有许多突变会影响其表型等。大田种植突变体,对其表型性状进行了观察比较。突变体 *hma4-4h12* 与对照相比株高、节距、茎围等显著变小。可见 *hma4-4h12* 中含有影响这些性状的突变位点。为了利用 *hma4-4h12* 培育低镉烟草品种,后续还需要通过回交去除这些不利突变的影响。

参考文献:

[1] YADAV S K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants[J]. *South African Journal of Botany*, 2010,**76**(2): 167-179.

[2] 环境保护部,国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[J]. 中国环保产业, 2014,(5): 10-11.

The Ministry of Environmental Protection and the Ministry of Land and Resources. Bullention on national survey of soil contamination[J]. *China Environmental Protection Industry*, 2014,(5):10-11.

[3] WHITE P J, BROWN P H. Plant nutrition for sustainable development and global health[J]. *Plant and Soil*, 2011,**339** (1/2): 1-2.

[4] LUX A, MARTINKA M, VACULÍK M, *et al.* Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review[J]. *Journal of Experimental Botany*,2011,**62**(1): 21-37.

[5] WONG C K E, COBBETT C S. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*,2008,**181**(1): 71-78.

[6] CUN P, SARROBERT C, RICHAUD P, *et al.* Modulation of Zn/Cd P_{1B2}-ATPase activities in *Arabidopsis* impacts differently on Zn and Cd contents in shoots and seeds[J]. *Metallo-mics*, 2014,**6**(11): 2 109-2 116.

[7] VERRET F, GRAVOT A, *et al.* Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance[J]. *FEBS Letters*,2004,**576**(3): 306-312.

[8] HANIKENNE M, TALKE I N, *et al.* Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*[J]. *Nature*, 2008,**453** (7 193): 391-395.

[9] VERRET F, GRAVOT A, AUROY P, *et al.* Heavy metal transport by *AtHMA4* involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His 11 stretch[J]. *FEBS Letters*, 2005,**579**(6): 1 515-1 522.

[10] 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 [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2011,**53**(1): 213-224.

[11] MILLS R F, PEASTON K A, RUNIONS J, *et al.* HvHMA2, a P1B-ATPase from barley, is highly conserved among cereals and functions in Zn and Cd transport[J]. *PLoS One*, 2012,**7**(8): e42640.

[12] 张艳玲,尹启生,周汉平,等. 中国烟叶铅、镉、砷的含量及分

布特征[J]. 烟草科技, 2006, (11): 49-52,57.

ZHANG Y L, YIN Q S, ZHOU H P, *et al.* Contents and distribution of Pb, Cd and As in Chinese tobacco leaves[J]. *Tobacco Science and Technology*, 2006, (11): 49-52,57.

[13] 曹晨亮, 马义兵, 李菊梅,等. 烟草镉的健康风险评价及消减技术研究进展[J]. 应用生态学报, 2015,**26**(4): 1 279-1 288.

CAO C L, MA Y B, LI J M, *et al.* Tobacco cadmium health risk assessment and reduction techniques: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015,**26**(4): 1 279-1 288.

[14] JIANG G Q, YAO X F, LIU C M. A simple CEL1 endonuclease-based protocol for genotyping both SNPs and inDels[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013,**31**: 1 325-1 335.

[15] WAGNER G J, YEARGAN R. Variation in cadmium accumulation potential and tissue distribution of cadmium in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1986,**82**: 274-279.

[16] BOVET L, ROSSI L, LUGON-MOULIN N. Cadmium partitioning and gene expression studies in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana rustica* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, **128**(3): 466-475.

[17] SIEMIANOWSKI O, BARABASZ A, KENDZIOREK M, *et al.* *HMA4* expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014,**65**(4): 1 125.

[18] 国家烟草专卖局. YC/T380—2010 烟草及烟草制品 铬、镍、砷、硒、镉、铅的测定 电感耦合等离子体质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

[19] 国家烟草专卖局. YC/T 142—2010 烟草农艺性状调查测量方法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[20] MILLS R F, KRIJGER G C, BACCARINI P J, *et al.* Functional expression of *AtHMA4*, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass[J]. *Plant Journal*, 2003,**35**(2): 164-176.

[21] HUANG X Y, DENG F L, YAMAJI N, *et al.* A heavy metal P-type ATPase *OsHMA4* prevents copper accumulation in rice grain[J]. *Nature Communications*, 2016,**7**(12 138): 1-13.

[22] HÄNSCH R, MENDEL R R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl) [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009,**12**(3): 259-266.

[23] CHANG H B, LIN C W, HUANG H J. Zinc-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots[J]. *Plant Growth Regulation*, 2005,**46**(3): 261-266.