

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.22279

刘霄霏, 甘锦鑫, 周涛, 张伏中, 刘宁芳, 卢蕊, 胡龙兴, 徐倩. 千穗谷 *MTP* 基因家族生信分析及镉胁迫下的表达特征[J]. 植物科学学报, 2023, 41(4): 467-478

Liu XF, Gan JX, Zhou T, Zhang FZ, Liu NF, Lu R, Hu LX, Xu Q. Bioinformatics analysis of the *MTP* gene family in *Amaranthus hypochondriacus* L. and expression characteristics under cadmium stress[J]. *Plant Science Journal*, 2023, 41(4): 467-478

千穗谷 *MTP* 基因家族生信分析及镉胁迫下的表达特征

刘霄霏¹, 甘锦鑫¹, 周涛¹, 张伏中², 刘宁芳¹, 卢蕊¹, 胡龙兴^{1*}, 徐倩^{1*}

(1. 湖南农业大学农学院草业科学系, 长沙 410128; 2. 湖南省环境保护科学研究院, 长沙 410004)

摘要: MTP (Metal tolerance protein) 又称 CDF (Cation diffusion facilitator), 是与金属离子转运相关的一类蛋白。为了研究千穗谷 (*Amaranthus hypochondriacus* L.) *MTP* 基因家族的序列特征和进化关系, 预测其不同成员的功能和调控机制, 我们以最新的千穗谷基因组为参考, 鉴定出 9 个 *MTP* 家族成员, 分为 Zn-CDF (3 个)、Zn/Fe-CDF (4 个)、Mn-CDF (4 个) 3 个亚族。所有家族成员均具有 MTP 转运蛋白的典型结构域 Cation_efflux, 部分成员还包含 1 个 ZT_dimer 结构域。染色体定位显示, 9 个 *MTP* 基因分布在 7 条染色体上。Cd 胁迫下, *AhMTP7* 和 *AhMTP9* 在根和叶中的表达均被抑制, *AhMTP6* 在叶中被抑制, 在根中却被诱导; 其余 6 个 *MTP* 基因均受 Cd 诱导表达, *AhMTP2*、*AhMTP3* 仅在叶中被诱导, *AhMTP5* 仅在根中被诱导。顺式作用元件分析结果显示, *AhMTP* 启动子中存在多个逆境响应、生长发育和激素信号的顺式作用元件。miRNA 预测分析结果表明, 15 个 miRNA 靶向 7 个 *AhMTP* 成员。

关键词: 千穗谷; MTP; 基因表达; 金属胁迫; 基因家族

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2023)04-0467-12

Bioinformatics analysis of the *MTP* gene family in *Amaranthus hypochondriacus* L. and expression characteristics under cadmium stress

Liu Xiao-Fei¹, Gan Jin-Xin¹, Zhou Tao¹, Zhang Fu-Zhong², Liu Ning-Fang¹,
Lu Rui¹, Hu Long-Xing^{1*}, Xu Qian^{1*}

(1. Department of Pratacultural Science, College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Hunan Research Academy of Environmental Sciences, Changsha 410004, China)

Abstract: Metal tolerance protein (MTP), also known as cation diffusion facilitator (CDF), is a metal ion transport-related protein. To study the sequence characteristics and evolutionary relationships of the *MTP* gene family in *Amaranthus hypochondriacus* L., and to predict the functions and regulatory mechanisms of its members, we took the latest *A. hypochondriacus* genome as a reference and identified a total of nine members of the *A. hypochondriacus* *MTP* family. According to their sequence characteristics, they were divided into three subgroups: Zn-CDF (3), Zn/Fe-CDF (4), and Mn-CDF (4). All family members contained a cation_efflux domain, a typical feature of MTP transporters, with some also containing a ZT_dimer domain. Chromosome mapping showed that the nine *MTP* genes were distributed on seven chromosomes. Under cadmium (Cd) stress, the expression levels of *AhMTP7* and *AhMTP9* were inhibited in both leaves and roots, while the ex-

收稿日期: 2022-11-21, 修回日期: 2022-12-26。

基金项目: 湖南省研究生创新项目 (CX20200674); 湖南省教育厅项目 (21A0126); 长沙市自然科学基金项目 (kq2202228)。

This work was supported by grants from the Graduate Innovation Project of Hunan Province (CX20200674), Earmarked Hunan Provincial Education Department Project (21A0126), and Natural Science Foundation of Changsha (kq2202228).

作者简介: 刘霄霏 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为草坪和牧草逆境分子生理 (E-mail: 1825436030@qq.com)。

* 通讯作者 (Authors for correspondence. E-mail: grass@hunau.edu.cn; xuqian@hunau.edu.cn)。

pression level of *AhMTP6* was inhibited in leaves but induced in roots. The expression levels of the other six *AhMTPs* were induced by Cd, with *AhMTP2* and *AhMTP3* only induced in leaves, and *AhMTP5* only induced in roots. Promoter cis-acting element analysis identified several cis-acting elements in the *AhMTP* promoter for stress response, growth and development, and hormone signaling. MicroRNA (miRNA) prediction analysis showed that 15 miRNAs targeted seven *AhMTPs*.

Key words: *Amaranthus hypochondriacus*; MTP; Gene expression; Metal stress; Gene families

锌 (Zn)、钴 (Co)、铁 (Fe)、锰 (Mn) 和铜 (Cu) 等是植物生长发育所必需的微量元素, 低水平下对维持植物生物学功能具有重要意义, 但过量时会引起毒害作用^[1]。同时, 其他非必需元素, 如镉 (Cd)、银 (Ag)、铅 (Pb) 和汞 (Hg) 等在低浓度时也会对植物产生毒害作用。因此, 植物进化出一系列吸收、转运、螯合和封存机制来应对金属离子的胁迫。目前, 一些与阳离子转运相关的蛋白质家族已经被鉴定, 如重金属 ATP 酶 (Heavy metal ATPase)、NARMP (Natural resistance associated macrophage protein)、MTP (Metal tolerance protein, MTP) 及 ZIP 转运蛋白 (ZRT-IRT like protein) 等^[2, 3], 其中 MTP 家族在植物响应重金属胁迫过程中起关键作用。

MTP 也被称为 CDF (Cation diffusion facilitator) 转运蛋白, 其主要功能是将植物体内的金属离子转运到液泡, 以保持细胞中的金属稳态, 从而维持植物的正常生长发育。常见的金属阳离子如 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 都可以被 MTP 转运。MTP 蛋白的数目因物种而异, 目前, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[4]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[5]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[6]、甜橙 (*Citrus sinensis* L.)^[7]、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)^[8]、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* L.)^[9] 和黄瓜 (*Cucumis sativus* L.)^[10] 等物种中分别鉴定到 12、10、20、12、22、12、10 个 MTP 基因。根据离子转运特性, 可将 MTP 家族分为 Zn-CDF、Zn/Fe-CDF 和 Mn-CDF 3 个亚族, 根据序列相似性又可进一步分为 7 组, 即组 1、组 5~9 以及组 12。其中, 组 1、5 和 12 属于 Zn-CDF 亚族; 组 6、7 属于 Zn/Fe-CDF 亚族; 组 8、9 属于 Mn-CDF 亚族^[4]。大多数 MTPs 包含 4~6 个跨膜结构域和 1 个 C 端阳离子流出域 (Cation_efflux)^[11], 部分 MTPs 还包括 1 个锌离子转运二聚体 (Zinc transporter dimeriza-

tion domain, ZT_dimer)。

拟南芥的 12 个 MTP 成员中, *AtMTP1* 和 *AtMTP3* 均属于 Zn-CDF 亚族, 且均聚在组 1。研究表明, *AtMTP1* 和 *AtMTP3* 可以转运高浓度 Zn^{2+} 和 Co^{2+} 离子到液泡中^[12, 13]。水稻 *OsMTP1* 也属于组 1, 实验证明在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中过表达 *OsMTP1* 可以提其对 Cd 的积累和耐受性^[12]。*AtMTP5* 和 *AtMTP12* 也属于 Zn-CDF 亚族, *AtMTP12* 有 14 个跨膜结构域, 与 *AtMTP5* 形成一个异质二聚体, 共同促进 Zn^{2+} 进入高尔基体^[13]。*AtMTP8* 属于 Mn-CDF, 研究发现, *AtMTP8* 参与 Mn^{2+} 的响应机制^[14]。此外, *MTP8.1* 和 *MTP8.2* 在水稻^[15]、甜橙^[7] 和茶 (*Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.)^[16] 中都被证明与 Mn^{2+} 的转运有关, 过表达黄瓜 *CsMTP8* 无论是在酵母还是拟南芥中都表现出对锰耐受性的提高^[17]。*AtMTP6* 是 Zn/Fe-CDF 亚族成员, 在大肠杆菌突变体中进行功能互补分析表明, *AtMTP6* 参与了 Zn^{2+} 从细胞外转运至细胞内的过程^[18]。

千穗谷 (*Amaranthus hypochondriacus* L.) 是苋科苋属的一年生草本植物, 作为粮饲兼用型多功能作物, 千穗谷具有产量高、适口性好、营养价值高等优点。其籽粒中蛋白质含量可达 15%^[19], 氨基酸含量明显高于 FAO/WHO 规定的标准, 脂肪含量占籽粒的 6.88%。千穗谷植株高大, 一般为 1~2 m, 高的可达 3 m 以上, 茎叶中蛋白含量较高, 营养成分可与牧草之王紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 媲美^[19]。千穗谷根系发达, 生长速率快, 且适应性强, 耐干旱、耐高温^[20], 对重金属的富集能力较强^[21], 在重金属修复方面具有较大开发潜能。

目前关于千穗谷 MTP 家族的研究还未见报道, 本研究在全基因组范围内鉴定到 9 个千穗谷 MTP 家族成员, 从基因序列特征、跨膜结构域、染色体定位、启动子顺式作用元件预测、miRNA 靶基

因预测和组织特异性表达等方面进行了分析,并通过定量 RT-PCR 检测了 *AhMTPs* 对 Cd 胁迫的响应,以期为千穗谷 MTP 基因的功能研究和高产优质千穗谷新种质的培育提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 千穗谷 MTP 家族成员及理化性质分析

基于 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 数据库中 MTP 的隐马尔可夫模型 PF01545, 使用 HMMER3.0 软件的 HMMSEARCH 功能在千穗谷 v2.1 基因组数据库中查找 MTP 家族成员序列号,并在 Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 数据库中搜索序列号,获得基因序列和蛋白序列。

通过在线工具 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析千穗谷 MTP 的氨基酸序列长度、等电点、相对分子质量等理化性质数据;使用在线网站 Plant-mPLoc server (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#>) 预测 *AhMTP* 蛋白的亚细胞定位。

1.2 千穗谷 MTP 蛋白系统发育树构建

通过 MEGA 7 软件对 9 个千穗谷、12 个拟南芥、9 个甜菜 (*Beta vulgaris* L.) MTP 蛋白序列进行多重序列比对,构建系统发育树(采用邻近法)。进一步使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 美化系统发育树。拟南芥 MTP 家族蛋白序列下载于 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>),甜菜 MTP 基因家族蛋白序列下载于 Phytozome v13 数据库。

1.3 千穗谷 MTP 基因结构及跨膜结构域分析

使用 TBtools 软件对 *AhMTP* 家族成员进行基因结构分析。通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线软件对千穗谷 MTP 家族成员进行跨膜结构域分析。使用 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer>) 在线软件对所有 *AhMTP* 家族成员进行功能域鉴定。

1.4 千穗谷 MTP 蛋白二级与三级结构分析

使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 在线软件对千穗谷 MTP 成员进行蛋白质二级结构分析;通过 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线服务器对千穗谷 MTP 家族成员进行蛋白质三级结构建模分析。

1.5 千穗谷 MTP 基因染色体定位及共线性分析

根据 Phytozome v13 数据库中的基因位置信息,使用 TBtools 软件展示 *AhMTP* 家族成员染色体定位结果。从 Phytozome v13 数据库下载千穗谷、拟南芥、水稻、甜菜的基因结构注释信息文件及基因组文件,通过 TBtools 将其共线性关系进行可视化^[22],其中 Ah 为千穗谷缩写,Os 为水稻缩写,At 为拟南芥缩写,Bv 为甜菜缩写。

1.6 千穗谷 MTP 基因启动子顺式作用元件预测

取每个家族成员基因序列上游 2 000 bp,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站进行启动子顺式作用元件预测。

1.7 千穗谷 MTP 组织特异性表达分析

从 Phytozome v13 数据库获取千穗谷 MTP 基因在不同发育时期、不同组织器官的 PKAM 数据,使用 Hemi 软件对基因在不同组织中的表达谱进行聚类分析,并绘制热图。

1.8 千穗谷 MTP 基因的 miRNA 预测

利用 psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/home>) 在线网站,使用 MTP 基因的编码区为靶序列进行 miRNA 预测,设置期望值 ≤ 4.0 ,miRNA 数据选择双子叶模式植物拟南芥。

1.9 材料培养与处理

在温度为 23 ℃、光周期为 14 h / 10 h、相对湿度为 70% 的气候室内培养基因型为“1506”的千穗谷种子。发芽后喷施 1/2 霍格兰营养液,出现第 3 片真叶时转入含 5 L 1/2 霍格兰营养液的水培装置。水培 10 d 后,加入 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 溶液进行胁迫处理。Cd 胁迫 1、6 h 时采集叶片和根系,立即液氮冷冻,-80 ℃ 保存备用。每个处理 3 个生物学重复。

1.10 RNA 提取和定量 RT-PCR 分析

RNA 提取:称取 0.1 g 叶片,用液氮快速研磨,转移至已加入 1 mL TRIZOL (Takara, 日本) 的离心管中;在室温下放置 5 min,加 0.2 mL 氯仿,混匀 15 s,室温放置 3 min。处理后的匀浆在 4 ℃ 以 12 000 r/min 的转速离心 5 min;吸取上清液至新离心管,加入 0.5 mL 异丙醇,室温下放置 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min;去上清,用 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀;离心并去除乙醇后,将沉淀在空气中晾干 5~10 min,溶解 RNA 于 DE-

PC 处理的水中, 枪尖吸打数次, 55 °C~60 °C 助溶 5~10 min, 置于-80 °C 保存备用。

反转录试剂盒为诺唯赞 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+ gDNA wiper)。定量 RT-PCR 所用的引物由 Primer3 Plus 设计, 见附表 1¹⁾。qRT-PCR 体系为: 10 μL 2 × Ace Q Universal SYBR qPCR Master Mix, 上下游引物各 0.4 μL, 2 μL cDNA, 7.2 μL ddH₂O。扩增条件为: 预变性 95 °C 5 min, 循环反应为 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共 39 个循环, 熔解曲线 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。每个处理共 3 个重复, 相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

2 结果与分析

2.1 千穗谷 MTP 家族成员鉴定

千穗谷基因组文件由 Phytozome v13 数据库获取, 基于 Pfam 数据库中 MTP 的隐马尔可夫模型, 通过 hmmsearch 软件鉴定出 9 个 MTP 基因家族成员, 分别命名为 *AhMTP1*~*AhMTP9*。鉴定结果表明, *AhMTP* 基因长度在 2 493~12 747 bp, *AhMTP3* 最长, *AhMTP2* 最短; 编码蛋白长度在 155~830 个氨基酸, 最长的为 *AhMTP2*, 最短的为 *AhMTP8*; 等电点在 4.81~9.54, 大部分蛋白等电点小于 7, 仅 *AhMTP1*、*AhMTP3* 和 *AhMTP6* 的等电点大于 7, 分别为 8.75、7.80 和 9.54; 蛋白分子量在 16 885.61~93 971.60 Da, *AhMTP2* 最大, *AhMTP8* 最小。亚细胞定位结果显示, 除了 *AhMTP2* 和 *AhMTP6* 定位在细胞膜和液泡, 其他成员都定位于液泡 (表 1)。

2.2 千穗谷 MTP 蛋白系统发育树构建

为了研究千穗谷 MTP 家族成员的进化关系, 我们利用 MEGA 7 软件对千穗谷、拟南芥和千穗谷近缘物种甜菜的 MTP 家族成员构建了系统进化树 (图 1)。结果表明, MTP 家族成员可分为 3 个亚族, 即 Zn-CDF、Zn/Fe-CDF 和 Mn-CDF。千穗谷 *AhMTP2*、*AhMTP6* 和 *AhMTP8* 属于 Zn-CDF 亚族, 与拟南芥 *AtMTP1*~*AtMTP5*、*AtMTP12* 以及甜菜 *BvMTP1*~*BvMTP3*、*BvMTP7* 属于同一亚族; 其中, *AhMTP8* 属于组 1, *AhMTP6* 属于组 5, *AhMTP2* 属于组 12。*AhMTP1* 和 *AhMTP3* 属于 Zn/Fe-CDF 亚族, 与拟南芥 *AtMTP6*、*AtMTP7* 以及甜菜 *BvMTP6* 属于同一亚族; 其中 *AhMTP1* 属于组 6, *AhMTP3* 属于组 7。而 *AhMTP4*、*AhMTP5*、*AhMTP7* 和 *AhMTP9* 属于 Mn-CDF, 与拟南芥 *AtMTP8*~*AtMTP11* 属于同一亚族, 其中, *AhMTP5* 和 *AhMTP9* 属于组 8, *AhMTP4* 和 *AhMTP7* 属于组 9。

2.3 千穗谷 MTP 基因结构与跨膜结构域分析

千穗谷 MTP 家族成员基因结构较为复杂, 除 *AhMTP2* 无内含子外, 其余成员均包含两个及以上内含子, 其中 *AhMTP3* 多达 12 个内含子。不同基因内含子序列长度差异也较大, 其中 *AhMTP8* 包含该家族中最长的内含子, 长达 4 089 bp (图 2: A)。

MTP 作为金属离子转运蛋白, 跨膜结构是其行使功能的重要结构域。对千穗谷 MTP 家族 9 个成员进行跨膜结构预测发现, 大部分成员包含

表 1 千穗谷 MTP 家族成员基本信息
Table 1 Basic information of MTP family members in *Amaranthus hypochondriacus*

基因 Gene	登录号 Accession number	蛋白长度 Protein length / aa	基因长度 Gene length / bp	分子量 Molecular weight / Da	等电点 Isoelectric point	亚细胞定位 Localization
<i>AhMTP1</i>	AH022184	376	8 344	41 127.39	8.75	液泡
<i>AhMTP2</i>	AH001412	830	2 493	93 971.60	6.94	细胞膜/液泡
<i>AhMTP3</i>	AH022259	451	12 747	49 774.67	7.80	液泡
<i>AhMTP4</i>	AH023492	396	6 491	44 899.19	4.87	液泡
<i>AhMTP5</i>	AH010891	417	5 541	47 165.96	5.67	液泡
<i>AhMTP6</i>	AH020319	224	6 107	25 139.53	9.54	细胞膜/液泡
<i>AhMTP7</i>	AH016853	205	2 747	23 800.73	6.83	液泡
<i>AhMTP8</i>	AH019735	155	4 707	16 885.61	5.78	液泡
<i>AhMTP9</i>	AH006882	279	4 895	31 121.67	4.81	液泡

1) 如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站(<http://www.plantscience.cn>)查看本期文章。

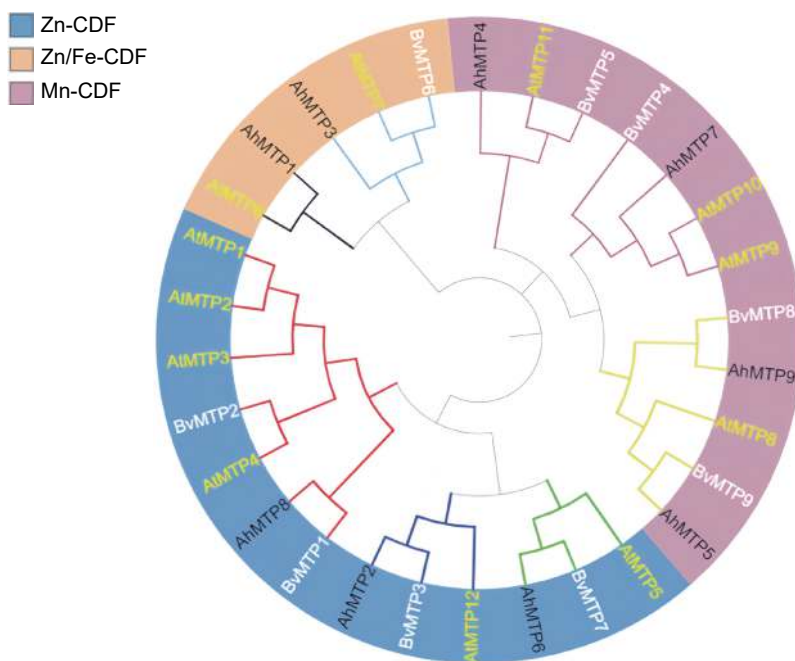


图 1 千穗谷、拟南芥和甜菜的 *MTP* 基因家族系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *Amaranthus hypochondriacus*, *Arabidopsis thaliana*, and *Beta vulgaris*

不同颜色字体代表不同物种。黄色：拟南芥；白色：甜菜；黑色：千穗谷。不同颜色分支代表不同组，红色代表组 1，绿色代表组 5，黑色代表组 6，亮蓝色代表组 7，黄色代表组 8，紫色代表组 9，深蓝色代表组 12。

Different color fonts represent different species. Yellow for *Arabidopsis thaliana*, white for *Beta vulgaris*, and black for *Amaranthus hypochondriacus*; Different color branches represent different groups, red for group 1, green for group 5, black for group 6, bright blue for group 7, yellow for group 8, purple for group 9, and dark blue for group 12.

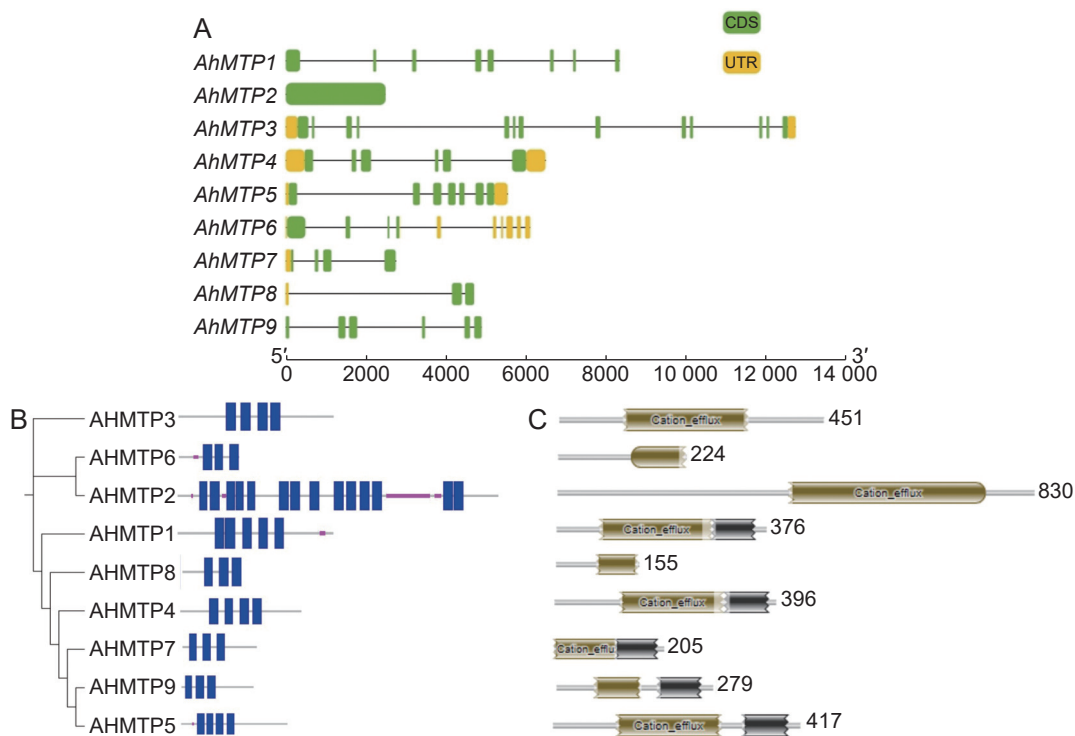


图 2 千穗谷 *MTP* 基因结构与跨膜结构域分析

Fig. 2 *MTP* gene structure and transmembrane domain analysis in *Amaranthus hypochondriacus*

A: *AhMTPs* 基因结构分析; B: *AhMTPs* 跨膜结构域分析; C: *AhMTPs* 保守结构域分析。

A: Gene structure analysis of *AhMTPs*; B: Transmembrane domain analysis of *AhMTPs*; C: Conservative domain analysis of *AhMTPs*.

3~4 个跨膜结构域, 而 AhMTP2 的跨膜结构域最多, 达 14 个 (图 2: B)。此外, 所有家族成员均具有 MTP 转运蛋白的典型特征 Cation_efflux 域, AhMTP1、AhMTP4、AhMTP5、AhMTP7、AhMTP9 还包含 1 个 ZT_dimer 结构域 (图 2: C)。

2.4 千穗谷 MTP 蛋白质二级和三级结构分析

基于 SOPMA 在线软件对千穗谷 MTP 成员进行蛋白质二级结构分析 (附图 1¹⁾), 结果表明, 所有家族成员均包含 α -螺旋、无规则卷曲和延伸链, 大多数成员 α -螺旋占比最高, 只有 AhMTP6 无规则卷曲占比 (46.43%) 高于 α -螺旋 (29.02%)。

AhMTP 蛋白的 3D 结构预测是在密集模式下使用 Phyre2 服务器生成的, 基于与模型匹配覆盖度以及置信百分数最高的比对结果进行预测分析。千穗谷 MTP 家族 9 个成员均可以匹配到匹配度高于 30% 的蛋白模型 (附图 2²⁾), AhMTP1、AhMTP6、AhMTP8 以 c6xpd8 (锌转运体 8) 为参考模型, 重叠覆盖度分别为 33%、43%、73%; AhMTP2、AhMTP3、AhMTP 4、AhMTP 5、AhMTP7 以 c3jlzp (阳离子转运蛋白) 为参考模型, 重叠覆盖度分别为 78%、63%、71%、70%、97%; AhMTP9 以 c2qfiB (二价铁转运体) 为模型参考, 重叠覆盖度为 71%。其中, AhMTP1 和 AhMTP6 匹配程度较低, 但也在 30% 以上。

2.5 千穗谷 MTP 基因染色体定位及共线性分析

对千穗谷 MTP 基因家族成员进行染色体定位

分析, 结果表明, 9 个家族成员分别定位在 chr1、chr4、chr6、chr11、chr13、chr15、chr16 这 7 条染色体上, 其中 AhMTP6 和 AhMTP8 定位在 chr13 染色体上, AhMTP1 和 AhMTP3 定位在 chr15 上, 其他染色体上均只有 1 个家族成员 (图 3)。

共线性分析结果显示, 千穗谷与水稻只有 1 个共线性对, 与拟南芥有 3 个共线性对, 而与甜菜则含有 6 个共线性对 (图 4), 这可能是由于千穗谷与甜菜之间的亲缘关系更近。

2.6 启动子顺式作用元件预测

对千穗谷 MTP 基因起始密码子上游 2 000 bp 的序列进行顺式作用元件预测, 发现启动子序列包含多个调控生长发育和应激响应以及激素相关的顺式作用元件。其中, 光响应元件和厌氧响应元件存在于每个 AhMTP 的启动子区; 与赤霉素相关的作用元件除了没在 AhMTP2 和 AhMTP4 中发现外, 在其他成员中均有发现, 与茉莉酸甲酯相关的作用元件除在 AhMTP5 和 AhMTP8 中不存在外, 其他成员均有发现; AhMTP1、AhMTP2、AhMTP5 中存在响应低温胁迫的作用元件, 而 AhMTP2、AhMTP6、AhMTP7 中存在响应干旱胁迫的元件 (图 5)。

2.7 组织特异性表达

基于 Phytozome v13 数据库中的组织表达信息, 将千穗谷 MTP 家族成员不同组织、不同时期的 FPKM 值进行了聚类分析。MTP 家族 9 个成员在根、叶、花、未成熟种子和茎部均有表达。其

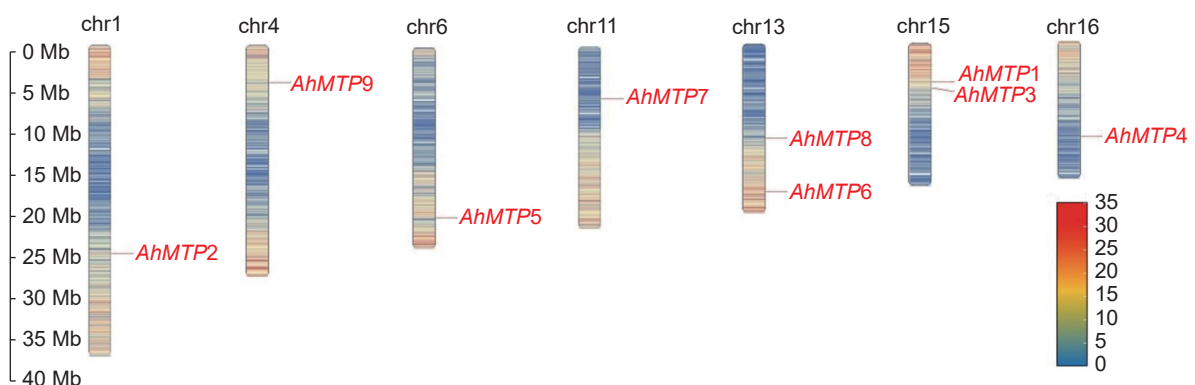


图 3 千穗谷 MTP 家族成员染色体定位信息

Fig. 3 Chromosome location information of MTP family members in *Amaranthus hypochondriacus*

不同颜色代表染色体上基因密度。蓝色越深代表高密度越高。

Different colors represent gene density on chromosomes. Deeper blue indicates higher density.

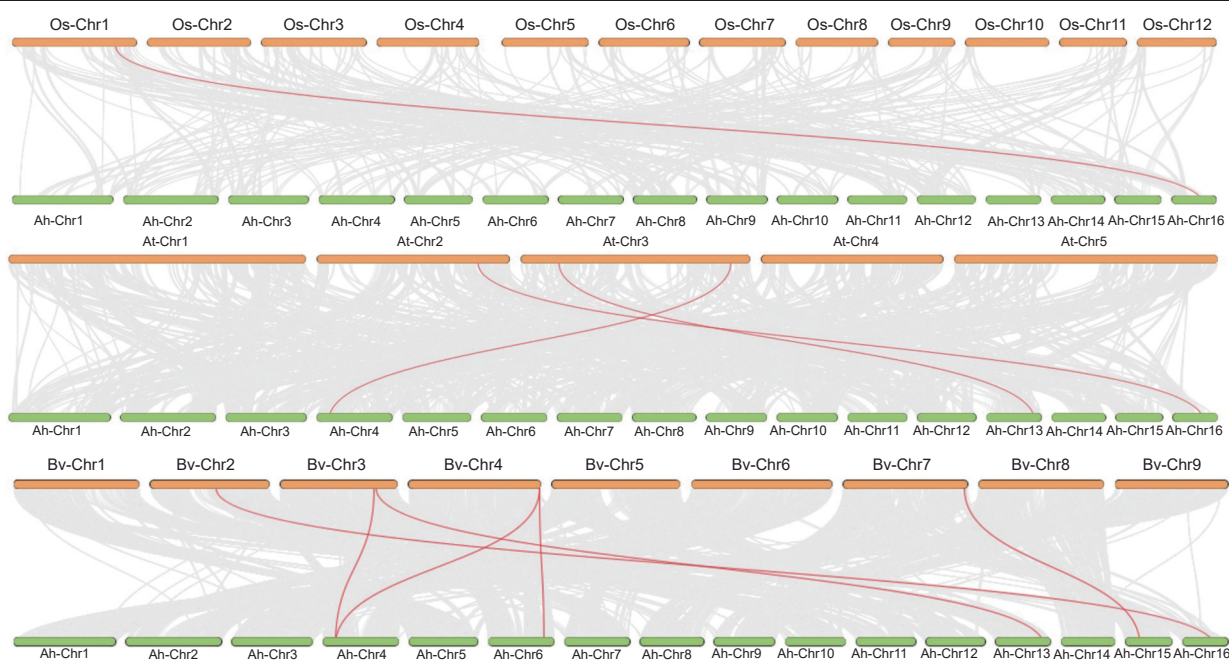


图 4 千穗谷与其他模式植物 *MTP* 家族共线性分析

Fig. 4 Collinearity analysis of MTP family between *Amaranthus hypochondriacus* and other model plants

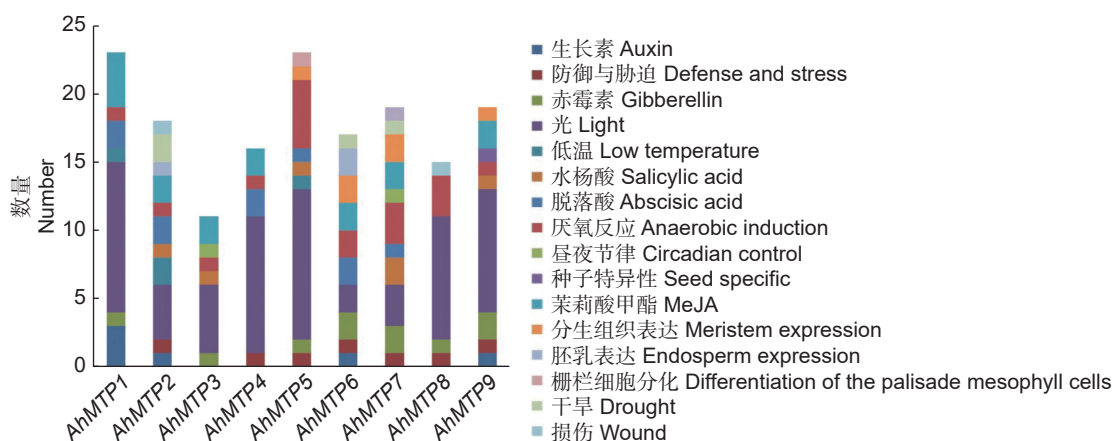


图 5 千穗谷 *MTP* 启动子顺式作用元件预测

Fig. 5 Prediction of cis-acting elements in *Amaranthus hypochondriacus* MTP promoter

中，*AhMTP3* 和 *AhMTP4* 在不同组织中的表达量都较高，且不同组织间差异较大。*AhMTP3* 在叶中的表达量最高，*AhMTP4* 在未成熟种子中表达量最高。*AhMTP1* 在根中表达量最低，在其他组织之间差异较小。*AhMTP2* 在根、未成熟的种子、茎中表达量较高，在叶和花中较低。*AhMTP3* 和 *AhMTP9* 的表达模式较为相似，均在叶中丰度最高。*AhMTP6* 和 *AhMTP8* 的表达模式相似，均在花中表达量最高，这可能是由于二者都属于 Zn-CDF 亚族，亲缘关系较近。*AhMTP7* 在各个组织

间的表达量差异不明显（图 6）。

2.8 千穗谷 *MTP* 基因的 miRNA 预测

为深入了解潜在的 miRNA 对千穗谷 *MTP* 基因的转录调控，以 *AhMTP* 基因的转录本为靶序列，预测能够相互作用的 miRNA。结果发现，*AhMTP1* 被 *ath-miR2937* 切割抑制；*ath-miR5658* 分别切割抑制和翻译抑制靶向 *AhMTP2*，同时还靶向 *AhMTP3*；*ath-miR398b/c-5p* 同样切割抑制靶向 *AhMTP2*，此外，*ath-miR773b-3p* 和 *ath-miR8179* 也靶向 *AhMTP2*。*AhMTP3* 除 *ath-*

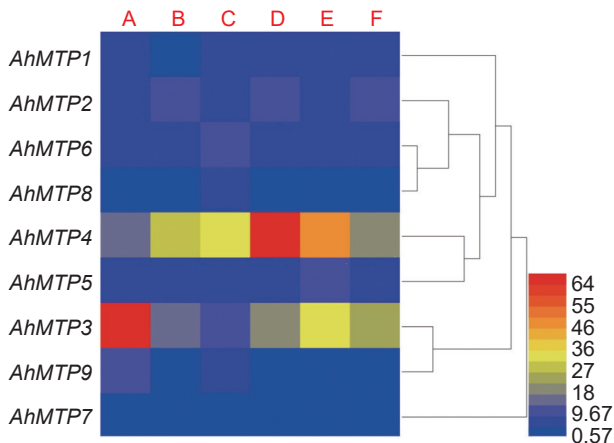


图 6 不同组织千穗谷 *MTP* 基因表达量

Fig. 6 *MTP* gene expression levels in *Amaranthus hypochondriacus* in different tissues

A: 叶; B: 根; C: 花; D: 未成熟种子; E: 干物质混合组织; F: 茎。

A: Leaf; B: Root; C: Flowers; D: Immature seeds; E: Dry matter mixed tissue; F: Stem.

miR5658 外, 还是 *ath-miR826b* 的切割抑制靶向基因。*AhMTP4* 分别是 *ath-miR413* 和 *ath-miR844-3p* 的切割靶向基因。*AhMTP5* 分别是 *ath-miR4240* 和 *ath-miR8182* 的切割抑制靶向基因。*AhMTP7* 受 *ath-miR5663-5p* 切割抑制调控; 而 *AhMTP8* 是 *ath-miR856* 的切割抑制靶向调控基因 (附表 2¹⁾)。

2.9 千穗谷 *MTP* 基因响应镉胁迫的表达分析

为了解 *MTP* 在千穗谷对镉离子吸收转运中的作用, 本研究分析了镉处理条件下根和叶中所有 *AhMTP* 基因的表达模式。结果显示, 镉处理后, 叶中 *AhMTP1*、*AhMTP3*、*AhMTP8* 的表达量显著升高, *AhMTP6*、*AhMTP7*、*AhMTP9* 的表达量显著下降, 而 *AhMTP2* 和 *AhMTP4* 先上调, 后在 6 h 恢复到对照水平。根中 *AhMTP1*、*AhMTP4* 的表达水平显著升高, *AhMTP7*、*AhMTP9* 的表达水平显著降低, 而 *AhMTP5*、*AhMTP6*、*AhMTP8* 的表达先上调后恢复至对照水平。综合分析发现, 镉处理条件下, *AhMTP1*、*AhMTP2* 和 *AhMTP4* 在根与叶中均受到诱导表达, *AhMTP7*、*AhMTP9* 在根与叶中的表达则被抑制。*AhMTP2*、*AhMTP3* 对镉胁迫的响应只体现在叶中, 在根中无显著变化, 而 *AhMTP5* 对镉胁迫的响应只体现在根中, 在叶中无变化 (图 7)。

3 讨论

本研究以千穗谷基因组为参考, 共鉴定出 9 个 *MTP* 家族成员, 和拟南芥 (12)、水稻 (10)、甜橙 (12)^[7]、葡萄 (*Vitis vinifera* L.) (11)^[23]、茶 (13)^[16]、海刀豆 (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) (12)^[24] 以及蒺藜苜蓿 (12)^[9] 成员数相近, 但在其他物种中, 如油菜 (*Brassica napus* L.) (33)^[25]、烟草 (26)^[26, 27] 和小麦 (20)^[6, 28] 中, *MTP* 家族成员数较多, 这可能是由于这些物种多倍体基因组的复杂性所导致。植物 *MTP* 家族一般包含 Zn-CDF、Zn/Fe-CDF、Mn-CDF 3 个亚族, 根据不同植物 *MTP* 蛋白序列的相似性和进化关系, 又可将 Zn-CDF 分为 1、5、12 等 3 个组, Zn/Fe-CDF 分为 6 和 7 两个组, Mn-CDF 分为 8 和 9 两个组^[4]。本研究鉴定的 9 个千穗谷 *MTP* 基因的序列长度、编码氨基酸数量、理论等电点以及分子量之间的差异均较大。系统进化树显示, 它们均匀分布在 7 个组中, 除组 8 和组 9 各包含两个成员外, 其他组均只含 1 个成员, 说明千穗谷的不同 *MTP* 成员在进化上关系较远, 有可能具有不同的功能和调控机制。*AhMTP* 蛋白大多数被预测定位于液泡, 表明它们可能在液泡中发挥转运阳离子的作用, *AhMTP2* 和 *AhMTP6* 同时定位于液泡和细胞膜上, 可能负责细胞间转运金属离子的重要作用, 二者均属于 Zn-CDF 亚族。

根据前人的研究, 所有 *MTP* 成员均包含 1 个典型的 C 端 Cation_efflux 结构域和数量不等的跨膜结构域^[29]。本研究也表明所有 *AhMTP* 蛋白均包含 Cation_efflux 结构。此外, *AhMTP1/4/5/7/9* 均包含一个金属离子转运二聚体 ZT_dimer, 可形成 *MTPs* 的同源二聚体或异源二聚体。所有 *AhMTP* 均含有多个跨膜结构域, 其中 *AhMTP2* 的跨膜结构域最多, 达 14 个。*AhMTP2* 也是唯一没有内含子的家族成员, 其编码区最长 (2 493 bp), 分子量也最大 (93 971.60 Da), 这与同为 Zn-CDF 亚组的拟南芥 *MTP* 蛋白 AtMTP12 相似^[4]。

基因结构分析结果表明, 千穗谷 *MTP* 不同成员的内含子数量在 0~12 个, Zn-CDF 亚族成员中, 除 *AhMTP6* 包含 9 个内含子外, 其余成员均在

1) 如需查阅附件内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

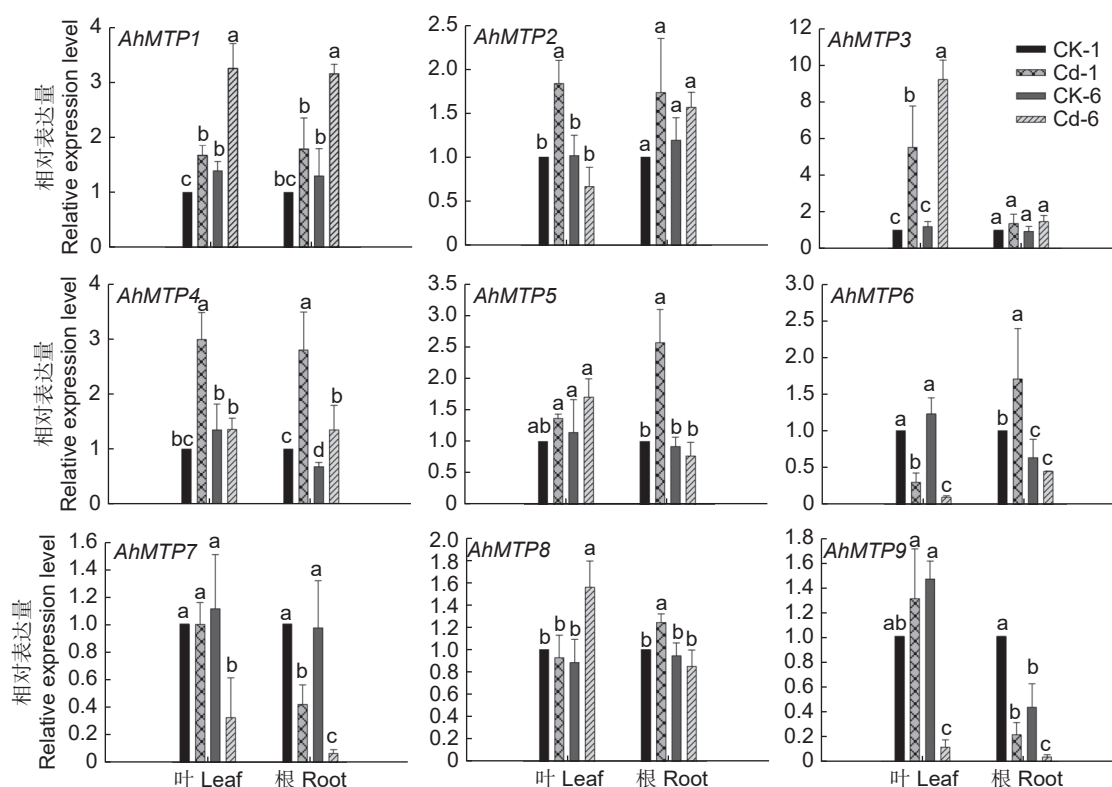


图 7 镉胁迫下千穗谷 *MTP* 基因在根系和叶片中的表达水平

Fig. 7 *MTP* gene expression levels in roots and leaves of *Amaranthus hypochondriacus* under Cd stress

CK-1: 对照 1 h; Cd-1: 镉处理 1 h; CK-6: 对照 6 h; Cd-6: 镉处理 6 h。不同小写字母代表不同处理之间差异显著 ($P < 0.05$)。

CK-1: Control for 1 h; Cd-1: Cadmium treatment for 1 h; CK-6: Control for 6 h; Cd-6: Cadmium treatment for 6 h. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

0~2 个, 组 1 成员 *AhMTP8* 包含 2 个内含子, 组 12 成员 *AhMTP2* 则无内含子。Mn-CDF 亚族成员内含子数量在 3~6 个。Zn/Fe-CDF 成员包含的内含子数量最多, 如 *AhMTP1* 有 7 个, *AhMTP3* 有 12 个。这与毛果杨中 *MTP* 成员内含子的分布相似^[8], 毛果杨 Zn-CDF 亚族中除组 5 成员有 9 个内含子外, 其余组的均在 0~1 个; Mn-CDF 成员的内含子数在 3~6 个; Zn/Fe-CDF 也同样包含最多的内含子, 为 10~12 个。此外, 黄瓜 *MTP* 的内含子数在 1~12 个^[10], Zn-CDF 亚族中除组 5 成员含有 9 个内含子外, 其他成员只有 1 个; Mn-CDF 成员内含子数量为 5~6 个, 而 Zn/Fe-CDF 成员的内含子最多, 为 11~12 个。以上结果表明, 按照亚族来分, Zn-CDF 内含子数量最少 (组 5 除外), Mn-CDF 次之, 而 Zn/Fe-CDF 成员的内含子数量最多。

蛋白结构分析是研究其功能的基础, 千穗谷 *MTP* 蛋白质的二级结构主要有 α -螺旋、无规则卷曲以及部分延伸链。前人研究表明, 所有 MdMTP

蛋白质均包含 1 个 CED 结构, 其作用是促进阳离子外流^[30]。3D 预测结果表明, 所有 *AhMTP* 中的 CED 都被折叠成多个跨膜结构域 (TMD) 形成紧密的螺旋束, Zn-*MTP* 和 Zn/Fe-*MTP* 子家族成员中含有 1 或 2 个保守的 HXXXD (X = 任意氨基酸, H = 组氨酸, D = 天冬氨酸) 残基, Mn-*MTP* 亚组成员则包含两个保守的 DXXXD 残基。

分析不同物种间的共线基因对可能有助于基因家族的进化研究, 本文对千穗谷与模式作物水稻、拟南芥和甜菜的 *MTP* 基因进行同源性分析, 结果发现, 甜菜中 *AhMTPs* 的同源基因对高于拟南芥和水稻, 表明甜菜与千穗谷的协同性更高。Ah-Chr4、Ah-Chr13 和 Ah-Chr16 在拟南芥与甜菜中均存在共线性对, Ah-Chr16 在水稻、拟南芥与甜菜中都具有共线性对, 表明这些同源基因在进化过程中的保守性较强。

启动子顺式作用元件分析可以帮助我们预测基因在植物不同生长发育阶段、对外界环境和各种生物以及非生物胁迫反应中的作用。G-box、

MRE、Box4 和 ACE 等元件在植物光信号转导中发挥重要作用^[31]，在对千穗谷 9 个 *MTP* 成员的启动子序列分析中，与光反应有关的顺式元件最多，且在每个 *AhMTP* 成员中均有发现，暗示千穗谷 *MTP* 基因的表达可能受光的调节。*AhMTP* 基因启动子中数量较多的元件还包括与厌氧反应有关的 ARE，以及与抵御胁迫相关的 TC-rich repeats，显示这些基因可能参与了千穗谷对外界环境胁迫的反应。此外，大部分 *AhMTPs* 基因启动子区都包含激素响应元件，如与赤霉素相关的 TATC-box、与生长素相关的 TGA-element 和 AuxRR-core、与水杨酸相关的 ACA-element，以及响应茉莉酸甲酯的顺式元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif 等。其中，*AhMTP8* 只包含 TATC-box，暗示其可能只受赤霉素的调控，对其他激素无响应，而 *AhMTP9* 包含以上所有激素相关的顺式元件，说明该基因可能受多种激素的调控。千穗谷 *MTP* 基因启动子顺式作用元件的多样性表明，千穗谷 *MTP* 功能可能也存在多样性。

千穗谷 *MTP* 启动子中与生长发育相关的顺式元件主要包括与胚乳表达相关的 GCN4-motif，存在于 *AhMTP2* 和 *AhMTP6* 中。苦荞麦 (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) *FtMTP3.2* 和 *FtMTP8.1* 中也存在该元件^[32]，暗示某些 *MTP* 基因可能在胚乳中特异性表达。与分生组织表达相关的 CAT-box 在 *AhMTP5/6/7/9* 中均有发现。前人研究中，苦荞麦的 *FtMTP5/6/7.2/8.1/12* 基因启动子也包含该元件^[30]，暗示这些基因可能在茎尖、根尖等分生组织高表达。此外，*AhMTP5* 启动子区域存在栅栏状叶肉细胞分化相关的 HD-zip1 元件，*AhMTP9* 中存在与种子特异性相关的 RY-element 元件，暗示 *MTP* 基因的表达可能存在一定的组织特异性。

进化关系较近的蛋白通常具有相似的功能。本研究分析了千穗谷和拟南芥 *MTP* 家族的进化关系，发现了多个同源基因对。如，千穗谷的 *AhMTP5* 和 *AhMTP9* 与拟南芥的 *AtMTP8* 蛋白同属 *MTP* 家族的第 8 组，前人研究结果显示 *AtMTP8* 定位于液泡^[14]，本研究发现 *AhMTP5* 和 *AhMTP9* 也定位在液泡，可能与拟南芥 *AtMTP8* 具有类似的功能。前人研究显示，拟南芥 *AtMTP8* 基因与锰离子和铁离子的转运有关，而本研究发现，*AhMTP5* 和 *AhMTP9* 基因的表达受 Cd 的抑

制，可能参与 Cd 的转运和吸收，暗示同一分支的同源蛋白功能之间存在分化。已经证实，Zn-CDF 亚族组 1 的多个基因均与 Cd 的吸收转运有关，如 *AtMTP1*^[33]、*AtMTP3*^[34] 和 *OsMTP1*^[12, 35, 36] 均能够显著提高转基因酵母细胞对 Cd²⁺ 的耐受性。系统进化树显示，*AhMTP8* 属于 Zn-CDF 亚族的组 1，镉胁迫实验也表明，其表达受到了 Cd²⁺ 胁迫的诱导，说明 *AhMTP8* 很可能参与了千穗谷对 Cd 的响应。

miRNA 可通过抑制靶基因的表达，参与植物生长发育以及胁迫响应的不同生理反应。miR398 响应多种金属胁迫，可靶向铜/锌超氧化物歧化酶 (CSD)^[37, 38]。如在拟南芥^[39]、烟草^[40] 和水稻^[41] 中均发现 miR398 响应 Cu、Fe 和 Mn 的胁迫。此外，miR398 在蒺藜苜蓿叶片中也响应 Cd 和 Hg 胁迫^[42]。在本研究中，我们发现，miR398b 和 miR398c 均靶向 *AhMTP2*，且后者在叶中同样响应 Cd 胁迫。

4 结论

千穗谷 *MTP* 家族的 9 个成员可分为 Zn-CDF、Mn-CDF 和 Zn/Fe-CDF 3 个亚族。不同亚家族基因成员的内含子数目较为相近。9 个 *AhMTPs* 定位在 7 条不同的染色体上；千穗谷与甜菜的共线性对最多，为 6 对。千穗谷 *MTP* 启动子区域包含多个与生长发育和应激响应及激素相关的元件。表达分析表明，*AhMTP3* 和 *AhMTP4* 在不同组织间的表达量差异最为显著。miRNA 预测显示共有 7 个 *AhMTPs* 含有潜在的 miRNA 靶位点。*AhMTP2*、*AhMTP3* 只在叶中响应镉胁迫，而 *AhMTP5* 只在根中响应；镉胁迫下，除 *AhMTP6* 在叶和根中的表达趋势相反，其余成员在不同部位的表达趋势均一致。

参考文献:

- [1] Ghorri NH, Ghorri T, Hayat MQ, Imadi SR, Gul A, et al. Heavy metal stress and responses in plants[J]. *Int J Environ Sci Technol*, 2019, 16 (3): 1807-1828.
- [2] 金枫, 王翠, 林海建, 沈亚欧, 张志明, 等. 植物重金属转运蛋白研究进展[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(7): 1875-1882.
Jin F, Wang C, Lin HJ, Shen YO, Zhang ZM, et al. Heavy metal-transport proteins in plants: a review[J]. *Chinese*

- Journal of Applied Ecology*, 2010, 21 (7): 1875–1882.
- [3] Fan W, Liu CY, Cao BN, Qin ML, Long DP, *et al.* Genome-wide identification and characterization of four gene families putatively involved in cadmium uptake, translocation and sequestration in mulberry[J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 879.
- [4] Gustin JL, Zanis MJ, Salt DE. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters[J]. *BMC Evol Biol*, 2011, 11 (1): 76.
- [5] Ram H, Kaur A, Gandass N, Singh S, Deshmukh R, *et al.* Molecular characterization and expression dynamics of MTP genes under various spatio-temporal stages and metal stress conditions in rice[J]. *PLoS One*, 2019, 14 (5): e0217360.
- [6] Vatanserver R, Filiz E, Eroglu S. Genome-wide exploration of metal tolerance protein (MTP) genes in common wheat (*Triticum aestivum*): insights into metal homeostasis and biofortification[J]. *BioMetals*, 2017, 30 (2): 217–235.
- [7] Fu XZ, Tong YH, Zhou X, Ling LL, Chun CP, *et al.* Genome-wide identification of sweet orange (*Citrus sinensis*) metal tolerance proteins and analysis of their expression patterns under zinc, manganese, copper, and cadmium toxicity[J]. *Gene*, 2017, 629: 1–8.
- [8] Gao YF, Yang FM, Liu JK, Xie W, Zhang L, *et al.* Genome-wide identification of metal tolerance protein genes in *Populus trichocarpa* and their roles in response to various heavy metal stresses[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (5): 1680.
- [9] El-Sappah AH, Elbaiomy RG, Elrys AS, Wang Y, Zhu YM, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of metal tolerance protein gene family in *Medicago truncatula* under a broad range of heavy metal stress[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 713224.
- [10] 朱雄萌, 蒋昕晨, 席克勇, 杨静, 尹军良, 朱永兴. 黄瓜 MTP 基因家族分析及重金属胁迫下表达特征[J]. *西北植物学报*, 2021, 41(6): 933–943.
- Zhu XM, Jiang XC, Xi KY, Yang J, Yin JL, Zhu YX. Analysis of MTP gene family and expression characteristics under heavy metal stress in cucumber[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41 (6): 933–943.
- [11] Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: Improved signature and prediction of substrate specificity[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8 (1): 107.
- [12] Menguer PK, Farthing E, Peaston KA, Ricachenevsky FK, Fett JP, Williams LE. Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1[J]. *J Exp Bot*, 2013, 64 (10): 2871–2883.
- [13] Fujiwara T, Kawachi M, Sato Y, Mori H, Kutsuna N, *et al.* A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS J*, 2015, 282 (10): 1965–1979.
- [14] Eroglu S, Meier B, von Wirén N, Peiter E. The vacuolar manganese transporter MTP8 determines tolerance to iron deficiency-induced chlorosis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2016, 170 (2): 1030–1045.
- [15] Chen ZH, Fujii Y, Yamaji N, Masuda S, Takemoto Y, *et al.* Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family[J]. *J Exp Bot*, 2013, 64 (14): 4375–4387.
- [16] Zhang XY, Li QH, Xu WL, Zhao H, Guo F, *et al.* Identification of MTP gene family in tea plant (*Camellia sinensis* L.) and characterization of CsMTP8.2 in manganese toxicity[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 202: 110904.
- [17] Migocka M, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Poździk P, Posylniak E, *et al.* Retracted: Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana*[J]. *J Exp Bot*, 2014, 65 (18): 5367–5384.
- [18] 吴平治, 陈键, 栾升, 李东屏. 拟南芥 CDF 家族基因 *AtMTP6* 编码一个锌离子转运蛋白[J]. *生命科学研究*, 2006, 10(3): 244–247.
- Wu PZ, Chen J, Luan S, Li DP. A cation diffusion facilitator (CDF) gene *AtMTP6* encodes a zinc transporter in *Arabidopsis*[J]. *Life Science Research*, 2006, 10 (3): 244–247.
- [19] 张丹丹, 程金芝. 籽粒苋在食品工业中的研究进展及前景[J]. *科技与创新*, 2016(23): 31.
- [20] 周涛, 彭辉, 喻望晨, 刘宁芳, 胡龙兴, 徐倩. 千穗谷 TCP 基因家族生物信息学分析[J]. *草地学报*, 2022, 30(4): 867–878.
- Zhou T, Peng H, Yu WC, Liu NF, Hu LX, Xu Q. Bioinformatics analysis of TCP gene family in *Amaranthus hypochondriacus*[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30 (4): 867–878.
- [21] Yuan M, He HD, Xiao L, Zhong T, Liu H, *et al.* Enhancement of Cd phytoextraction by two *Amaranthus* species with endophytic *Rhizobium* sp. JN27[J]. *Chemosphere*, 2014, 103: 99–104.
- [22] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Mol Plant*, 2020, 13 (8): 1194–1202.
- [23] Shirazi Z, Abedi A, Kordrostami M, Burritt DJ, Hossain MA. Genome-wide identification and characterization of the metal tolerance protein (MTP) family in grape (*Vitis vinifera* L.)[J]. *3 Biotech*, 2019, 9 (5): 199.

- [24] Zou T, Lin RY, Pu L, Mei QM, Wang ZF, *et al.* Genome-wide identification, structure characterization, expression pattern profiling, and substrate specificity of the metal tolerance protein family in *Canavalia rosea* (Sw.) DC[J]. *Plants*, 2021, 10 (7): 1340.
- [25] Xie T, Yang WJ, Chen X, Rong H, Wang YP, Jiang JJ. Genome-wide identification and expressional profiling of the *Metal Tolerance Protein* gene family in *Brassica napus*[J]. *Genes*, 2022, 13 (5): 761.
- [26] Liu JK, Gao YF, Tang YL, Wang D, Chen XM, *et al.* Genome-wide identification, comprehensive gene feature, evolution, and expression analysis of plant metal tolerance proteins in tobacco under heavy metal toxicity[J]. *Front Genet*, 2019, 10: 345.
- [27] Papierniak-Wygladala A, Kozak K, Barabasz A, Palusińska M, Calka M, *et al.* Identification and characterization of a tobacco metal tolerance protein, *NtMTP2*[J]. *Metallomics*, 2020, 12 (12): 2049–2064.
- [28] 杨蕾, 卢晨, 朱永兴, 尹军良, 方正武, 马东方. 小麦 *MTP* 基因家族分析及其在胁迫下的作用[J]. 西北植物学报, 2020, 40(7): 1123–1134.
Yang L, Lu C, Zhu YX, Yin JL, Fang ZW, Ma DF. Bioinformatic analysis of wheat metal tolerance protein (*MTP*) gene family and its role under stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40 (7): 1123–1134.
- [29] Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, Soulimane T. Cation diffusion facilitator family: structure and function[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589 (12): 1283–1295.
- [30] Qi DZ, Wang LM, Liang MX, Zhang Q, Tang XL, *et al.* Genome-wide analyses of metal tolerance protein genes in apple (*Malus domestica*): Identification, characterization, expression and response to various metal ion stresses[J]. *Environ Exp Bot*, 2022, 201: 104948.
- [31] Lin M, Yan JW, Ali MM, Wang SJ, Tian SN, *et al.* Isolation and functional characterization of a green-tissue promoter in japonica rice (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*) [J]. *Biology*, 2022, 11 (8): 1092.
- [32] Li ZQ, Wang CL, Wang KY, Zhao JY, Shao JR, *et al.* Metal tolerance protein encoding gene family in *Fagopyrum tartaricum*: genome-wide identification, characterization and expression under multiple metal stresses[J]. *Plants*, 2022, 11 (7): 850.
- [33] Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, *et al.* Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45 (12): 1749–1758.
- [34] Arrivault S, Senger T, Krämer U. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply[J]. *Plant J*, 2006, 46 (5): 861–879.
- [35] Yuan LY, Yang SG, Liu BX, Zhang M, Wu KQ. Molecular characterization of a rice *metal tolerance protein*, *OsMTP1*[J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31 (1): 67–79.
- [36] Das N, Bhattacharya S, Maiti MK. Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco overexpressing rice metal tolerance protein gene *OsMTP1* is promising for phytoremediation[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 105: 297–309.
- [37] Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2009, 229 (4): 1009–1014.
- [38] Dugas DV, Bartel B. Sucrose induction of *Arabidopsis* miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67 (4): 403–417.
- [39] Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance[J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (8): 2051–2065.
- [40] Burklew CE, Ashlock J, Winfrey WB, Zhang BH. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (5): e34783.
- [41] Lima JC, Arenhart RA, Margis-Pinheiro M, Margis R. Aluminum triggers broad changes in microRNA expression in rice roots[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10 (4): 2817–2832.
- [42] Zhou ZS, Huang SQ, Yang ZM. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374 (3): 538–542.

(责任编辑: 李惠英)