



普通烟草*NtZIP*基因家族鉴定及镉胁迫下其表达分析

邓兆龙¹, 孔嘉欣¹, 李俊营², 吴圣江³, 刘磊¹, 郭红祥¹, 王明鑫^{2,*}, 金维环^{1,*}

¹河南农业大学生命科学学院, 郑州450002

²河南省烟草公司平顶山市公司, 河南平顶山467000

³河南华测检测技术有限公司, 郑州450002

*共同通信作者: 王明鑫(mingxin892023@126.com)、金维环(whjin@henau.edu.cn)

摘要: 植物锌铁转运蛋白ZIP主要参与调节必需金属元素的动态平衡, 也参与镉(Cd)等重金属的吸收和转运。本研究运用生物信息学方法, 从普通烟草(*Nicotiana tabacum*)基因组中共鉴定出33个*NtZIP*基因家族成员, 其中11个成员定位在7条染色体上。亚细胞定位预测表明, 26个*NtZIP*蛋白定位于细胞膜上, 7个*NtZIP*蛋白定位于液泡膜上。通过邻接法, 将33个*NtZIP*家族成员分为4个亚家族。启动子分析表明, *NtZIP*家族基因启动子区都含有非生物胁迫和激素相关的顺式作用元件。Cd胁迫下, 荧光定量PCR结果表明, 烟草*NtZIP*基因家族有9个成员在根中对Cd显著应答, 与转录组数据基本一致, 但随着Cd浓度的改变, *NtZIP*家族成员也出现了差异化表达, 推测在烟草中*NtZIP*参与Cd的吸收与转运。

关键词: 普通烟草; ZIP蛋白; 基因家族分析; 镉胁迫

Identification of the *NtZIP* gene family and expression pattern analysis under cadmium stress in tobacco

DENG Zhaolong¹, KONG Jiaxin¹, LI Junying², WU Shengjiang³, LIU Lei¹, GUO Hongxiang¹, WANG Mingxin^{2,*}, JIN Weihuan^{1,*}

¹College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

²Pingdingshan City Company of Henan Tobacco Company, Pingdingshan, Henan 467000, China

³Centre Testing International Technology (Henan) Co., Ltd., Zhengzhou 450002, China

*Co-corresponding authors: Wang MX (mingxin892023@126.com), Jin WH (whjin@henau.edu.cn)

Abstract: The plant zinc-iron transporter protein, ZIP, is mainly involved in regulating the dynamic balance of essential metal elements, as well as participating in the absorption and transport of heavy metals such as cadmium (Cd). In this study, a total of 33 members of the *NtZIP* gene family were identified from the genome of common tobacco (*Nicotiana tabacum*) based on a bioinformatics approach, of which 11 members were localized on seven chromosomes. Subcellular localization prediction shows that 26 *NtZIP* proteins were localized to the cell membrane and seven *NtZIP* proteins to the vacuole membrane. The 33 *NtZIP* members were classified into four subfamilies by the neighbour-joining method. Promoter analysis shows that the promoter regions of the *NtZIP* genes all contain abiotic stress and hormone-related *cis*-acting elements. Under Cd stress, quantitative real-time PCR results show that nine *NtZIP* genes are significantly responded to Cd in tobacco roots, which is basically consistent with the transcriptome results, but

收稿 2023-10-15 修定 2024-05-07

资助 河南省烟草公司平顶山市公司科技项目(PYKJ202206)。

with the change of Cd concentration, *NtZIP* family members were differentially expressed, and it was hypothesized that *NtZIP* is involved in Cd uptake and translocation in tobacco.

Key words: *Nicotiana tabacum*; ZIP protein; gene family analysis; cadmium stress

ZIP蛋白家族是锌调控转运体(zinc-regulated transporter, ZRT)和铁调控转运体(iron-regulated transporter, IRT)的总称,广泛存在于动物、植物、细菌和原生生物中,维持体内锌(Zn^{2+})、铁(Fe^{2+})等必需离子的动态平衡,同时也参与镉(Cd^{2+})的吸收和转运(韩佳慧等2019; Guerinot 2000)。ZIP蛋白家族成员较多,但结构上保守,一般包含3~9个跨膜结构域,在第III、IV跨膜结构域之间有一段富含组氨酸(histidine, His)的可变区,可能参与二价金属离子的结合、转运;第IV和第V跨膜结构域包含His残基和极性的氨基酸残基,形成金属阳离子底物进出的通道(王祥等2007)。目前,部分物种中已鉴定出ZIP基因家族成员,如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中16个,水稻(*Oryza sativa*)中16个,大麦(*Hordeum vulgare*)中13个,玉米(*Zea mays*)中9个等(孟璐等2018; Li等2013; Pedas等2009; Mäser等2001)。

镉(Cd)是植物生长发育的非必需重金属元素,在土壤中移动性强,毒性大,危害地区广(Khan等2010)。生物体内还没有发现吸收和转运Cd的特异离子通道蛋白,但多数离子通道蛋白都参与Cd的吸收和转运,如:自然抗性相关巨噬蛋白(NRAMP)家族、ABC(ATP-binding cassette)转运体家族、重金属ATP酶基因(HMA)家族以及锌铁转运蛋白(ZIP)家族等(曹玉巧等2018)。ZIP家族成员不仅参与植物体内 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 代谢,也参与了 Cd^{2+} 的吸收和转运(曹玉巧等2018)。拟南芥中,ZIP家族成员AtIRT1、AtZIP1/AtZIP2是调节植物体内锌铁平衡所必需的,同时也能向地上部转运Cd(Zhang等2023)。水稻中,OsIRT1参与 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的转运(Lee和An 2009);同时,OsZIP6表达受缺锌、缺铁和缺锰的诱导,并能够将 Cd^{2+} 转运到液泡中(Kavith等2015)。大麦中,HvIRT1表达不仅受低浓度 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 诱导,而且能在酵母中参与对 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 及 Cd^{2+} 的转运(Pedas等2008)。

烟草(*Nicotiana tabacum*)中,部分*NtZIP*家族成

员表达同样受到环境中 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 浓度的诱导,进而维持体内 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 等离子稳态(Palusińska等2020),例如:*NtZIP11*在高锌环境中表达量显著上调,维持烟叶细胞内部锌稳态(Kozak等2019);*NtZIP1-like*主要在根部表达,高锌胁迫下表达量下调,可能参与高锌环境中对烟株的保护(Papierniak等2018)。烟草*NtIRT1*基因与拟南芥*AtIRT1*、水稻*OsIRT1*同源,功能上也具有相似性,在调节烟草对 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的吸收、转运中起着重要作用。*NtZIP4*和*NtZIP5*高度同源,缺锌条件下被诱导表达,同时也参与 Cd^{2+} 吸收和转运(Kozak和Antosiewicz 2023)。不仅如此,*NtZIP4A/B*在调节烟草的金属平衡中扮演着双重角色:在锌缺乏条件下,它促进植株对锌的吸收;而在镉和锌过量的情况下,则限制金属的吸收,具有抗重金属毒性(Barabasz等2019)。

烟草是重要的经济作物,对土壤中Cd等重金属具有强烈的富集作用,表现出超积累特征(陈丽鹃等2014)。Cd含量超标时,一方面会严重降低烟叶的品质,另一方面还会在吸烟者的体内富集,引发疾病,进而威胁人类健康(Yang等2022)。因此,研究烟草中Cd的吸收和转运机制,具有重要的经济意义和健康价值。烟草基因组的公布,有力地促进了烟草功能基因的研究(Edwards等2017),但烟草*NtZIP*家族基因中,仅有部分成员得到了鉴定和研究。本研究对烟草*NtZIP*家族进行了全基因组鉴定,通过生物信息学的方法对其成员进行了结构分析、进化分析、染色体分布分析及启动子分析,同时验证了部分*NtZIP*成员对Cd胁迫的响应,为深入探索*NtZIP*在Cd代谢过程中的生物学功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

以野生型‘K326’烟草(*Nicotiana tabacum* L. ‘K326’)为试验材料。将春化3 d后的烟草种子均匀撒在平铺于培养皿中的脱脂棉上,向培养皿中加

入适量蒸馏水以保持皿内水分; 将培养皿放在25°C光照培养箱, 光照强度为 $277.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16 h光照/8 h黑暗。在脱脂棉上培养10 d左右后移至小盆土壤中培养。在冯康等(2023)所述方法上稍加改动, 选取长势一致的七周龄烟苗18棵, 分为6组, 每组3棵; 将终浓度分别为0、200、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 溶液加入花盆底部的托盘, 每组200 mL, 每间隔1 d浇灌一次。持续处理7 d后, 分别取各组的根系, 液氮速冻, 放入-80°C冰箱, 用于后续RNA提取。

1.2 实验方法

1.2.1 *NtZIP*家族成员鉴定

从茄科基因组数据库(SGN, https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_tabacum/genome)下载普通烟草(2017年发布)的基因组数据, 包括GFF文件、蛋白序列和基因组序列(Edwards等2017)。在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上检索拟南芥ZIP基因家族成员, 下载其序列包含的特征序列Pfam (PF-02535); 使用HMMER 3.0本地软件构建隐马尔可夫模型, 利用该模型在已下载数据库中进行本地比对, 默认参数设置下, 得到35条序列, 经过CD-search在线网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>)筛选得到33条含ZIP保守域的序列。

1.2.2 亚细胞定位预测、跨膜结构域预测与理化性质分析

上传烟草ZIP家族成员蛋白序列到PortParam网站(<https://web.expasy.org/protparam>)分析蛋白理化性质。利用TMH在线工具(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)分析33条蛋白序列进行跨膜结构域预测。利用WoLF PSORT网站(<https://wolfpsort.hgc.jp>)预测33条蛋白质的亚细胞定位。

1.2.3 *NtZIP*家族染色体定位

利用已下载的基因组注释文件, 计算烟草基因组基因密度, 并提取烟草*NtZIP*家族成员的染色体位置信息, 利用TBtools软件将其可视化(Chen等2020)。

1.2.4 *NtZIP*家族进化分析

利用MEGA 11软件, 引入16条拟南芥ZIP蛋白

序列(序列来源为TAIR, <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>)、16条水稻ZIP蛋白序列(序列来源为Rice Genome Annotation Project, <http://rice.uga.edu/>)和9条玉米ZIP蛋白序列(序列来源为MaizeGDB, <https://maizegdb.org>)对烟草序列进行亚族分类。使用软件内程序寻找最佳模型, 利用最大似然法, 计算1 000次, 构建系统发育树。

1.2.5 *NtZIP*家族基因结构分析

将33条烟草序列上传至NCBI CD-Search网站, 下载得到文本化的基因结构域分析结果。

利用MEME在线工具(<http://meme-suite.org/tools/meme>)寻找蛋白保守基序, 参数选择最大数量为10, 下载结果。利用TBtools软件将下载的信息可视化(Chen等2020)。

1.2.6 *NtZIP*家族启动子分析

通过GFF文件的位置信息, 在基因组序列中以基因起始密码子ATG前2 000 bp为启动子区域, 提取各个*NtZIP*家族成员的启动子序列并将序列上传至PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)进行启动子分析, 利用Excel (版本2019)对分析结果进行整理、分析。

1.2.7 SRA数据库数据分析

在NCBI SRA数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>)下载烟草Cd处理的转录组数据, 编号为PRJNA632415。使用TBtools软件对转录组数据进行质控、拼接和计算, 筛选得到*NtZIP*家族成员表达量并利用Heat Map插件绘制热图。利用DESeq2对表达量变化进行计算, 以“ $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ ”为阈值筛选差异化表达基因; 式中, FC为变化倍数(fold change), P 值为显著性筛选条件。

1.2.8 RNA提取及实时荧光定量PCR结果分析

使用RNA提取试剂盒(FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司)提取烟苗根部RNA, 使用反转录试剂盒(HiSCRIPT IIQ RT SuperMix for qPCR, 诺唯赞)反转录得到cDNA。利用在线网站NCBI-Primer BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)设计定量引物, 并由上海生工生物工程有限公司合成(表1)。以烟草肌动蛋白基因(*NtActin*)为内参基因, 使用荧光定

表1 qRT-PCR 引物信息
Table 1 The information of qRT-PCR primers

基因名称	基因登记号	引物序列(5'→3')
<i>NtActin</i>	LOC107830629	正向: CTGAGGTCCTTTTCCAACCA 反向: TACCCGGGAACATGGTAGAG
<i>NtZIP3</i>	Nitab4.5_0003621g0010.1	正向: TTTTCGCCGTAACAACACCC 反向: TCCAGCAGATATAGAGTTAAGGC
<i>NtZIP8</i>	Nitab4.5_0006169g0030.1	正向: ACAGCTCTTATTGTGGAAGGACA 反向: CCATTGCCTTGCATTCTTGGA
<i>NtZIP12</i>	Nitab4.5_0000029g0210.1	正向: TAGACGAAGAAGCAGCCAGG 反向: TCCGATAGAATGAGTCGCCC
<i>NtZIP13</i>	Nitab4.5_0013314g0010.1	正向: AGGACTCGTTGCTGCACTTT 反向: TGGAGTTGTTATTGCCTGGAGA
<i>NtZIP16</i>	Nitab4.5_0004275g0010.1	正向: TTCTCCAGGCAACACTTGGG 反向: CAGCAGATGACGCATTGAGC
<i>NtZIP21</i>	Nitab4.5_0003876g0010.1	正向: AAAGGCAATGGGGTAGGGC 反向: CAGAATGGAAACACAGCGCC
<i>NtZIP23</i>	Nitab4.5_0000461g0190.1	正向: GCTGATTGTGTCTGTGATGGC 反向: TAGGATGCTATCGCCAAGCG
<i>NtZIP27</i>	Nitab4.5_0003027g0080.1	正向: ACAAGTTACAAGGCAGACGAAT 反向: CCAGCTCTAACACCATGGCA
<i>NtZIP28</i>	Nitab4.5_0008249g0040.1	正向: CACCATGTTTAGTGACTGC 反向: CTTGAGAAAAGGATTTGCTTCC

*NtActin*基因登记号来自NCBI网站, *NtZIP3*、*NtZIP8*、*NtZIP12*、*NtZIP13*、*NtZIP16*、*NtZIP21*、*NtZIP23*、*NtZIP27*、*NtZIP28*基因登记号来自SGN网站2017版基因组。

量检测预混液(2×SYBR Premix UrTaq II, 北京诺贝莱生物科技公司)进行实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR), 每个样品重复3次, qRT-PCR 仪为 Step One Plus real-time PCR system (美国赛默飞世尔科技公司)。qRT-PCR反应产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示均为单一条带, 查看qRT-PCR反应的熔解曲线均为单一的主峰。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因表达量。利用SPSS (版本号R26.0)对表达量数据进行显著性分析, 使用Graph-Pad Prism (版本号v9.3.1)绘图。

2 实验结果

2.1 *NtZIP*家族基本特性及染色体分布情况

利用HMMER软件, 在烟草数据库中筛选出35条蛋白质序列($E < 0.01$), 经CDD和Pfam验证, 剔除2条不含ZIP结构域的序列(Nitab4.5_0000433-g0080.1和Nitab4.5_0002988g0010.1), 最终鉴定出

33个烟草NtZIP蛋白质序列, 并按*E*值从小到大分别命名为NtZIP1~NtZIP33。烟草NtZIP家族成员氨基酸数目从139 (NtZIP33)到613 (NtZIP31)不等, 分子量从15 307.11~64 082.8 Da不等, 含有1~4个ZIP结构域, 其中, NtZIP31含有4个ZIP结构域。对烟草NtZIP成员进行跨膜结构域预测, 发现多数成员跨膜结构域数目集中在6~9个(23条), 少数为2~5个(7条序列), 其中NtZIP1、NtZIP31和NtZIP32跨膜结构域数目分别为12、13、11, 显著高于其他ZIP。有趣的是, NtZIP1序列长度为453 aa, 含有12个跨膜结构域, 但NtZIP20序列长度为558 aa, 却只含有3个跨膜结构域, 表明跨膜结构域数目与氨基酸残基数目不存在正相关性。亚细胞定位预测表明, 有7个NtZIP定位在液泡膜上, 其他的都定位在细胞质膜上。烟草共发现了60 000余基因, 其中只有30 000余个定位到了染色体上, 其余基因定位在super scaffold (未拼接成染色体的基因组片段)上

表2 烟草ZIP家族成员基础信息及亚细胞定位预测
Table 2 Basic information and subcellular localization analysis of tobacco ZIP family members

基因名称	基因登记号	氨基酸数目	跨膜结构域数目	分子质量/Da	亚细胞定位预测
<i>NtZIP1</i>	Nitab4.5_0009419g0010.1	453	12	48 597.44	细胞质膜
<i>NtZIP2</i>	Nitab4.5_0001367g0030.1	424	6	45 670.71	细胞质膜
<i>NtZIP3</i>	Nitab4.5_0003621g0010.1	429	6	46 083.15	细胞质膜
<i>NtZIP4</i>	Nitab4.5_0004275g0040.1	356	8	38 022.74	细胞质膜
<i>NtZIP5</i>	Nitab4.5_0003027g0070.1	352	8	37 603.34	细胞质膜
<i>NtZIP6</i>	Nitab4.5_0008682g0020.1	354	7	38 102.73	细胞质膜
<i>NtZIP7</i>	Nitab4.5_0000138g0180.1	353	7	38 053.67	细胞质膜
<i>NtZIP8</i>	Nitab4.5_0006169g0030.1	338	9	36 172.34	液泡膜
<i>NtZIP9</i>	Nitab4.5_0008492g0030.1	369	9	39 953.13	细胞质膜
<i>NtZIP10</i>	Nitab4.5_0002862g0020.1	370	8	39 903.82	细胞质膜
<i>NtZIP11</i>	Nitab4.5_0007700g0010.1	366	9	39 627.71	细胞质膜
<i>NtZIP12</i>	Nitab4.5_0000029g0210.1	367	8	39 596.29	细胞质膜
<i>NtZIP13</i>	Nitab4.5_0013314g0010.1	345	7	36 583.11	细胞质膜
<i>NtZIP14</i>	Nitab4.5_0006392g0060.1	361	8	39 215.05	细胞质膜
<i>NtZIP15</i>	Nitab4.5_0006169g0020.1	315	7	33 302.02	液泡膜
<i>NtZIP16</i>	Nitab4.5_0004275g0010.1	333	7	35 397.69	细胞质膜
<i>NtZIP17</i>	Nitab4.5_0002120g0010.1	264	5	28 323.50	细胞质膜
<i>NtZIP18</i>	Nitab4.5_0006976g0010.1	335	8	36 429.62	细胞质膜
<i>NtZIP19</i>	Nitab4.5_0000170g0390.1	290	7	30 768.17	液泡膜
<i>NtZIP20</i>	Nitab4.5_0000926g0040.1	558	3	60 244.88	细胞质膜
<i>NtZIP21</i>	Nitab4.5_0003876g0010.1	332	8	35 738.82	细胞质膜
<i>NtZIP22</i>	Nitab4.5_0000752g0020.1	295	7	31 994.72	细胞质膜
<i>NtZIP23</i>	Nitab4.5_0000461g0190.1	312	9	33 657.68	细胞质膜
<i>NtZIP24</i>	Nitab4.5_0007504g0030.1	291	3	30 661.34	液泡膜
<i>NtZIP25</i>	Nitab4.5_0000272g0030.1	309	8	33 512.08	细胞质膜
<i>NtZIP26</i>	Nitab4.5_0000170g0410.1	171	2	18 324.26	液泡膜
<i>NtZIP27</i>	Nitab4.5_0003027g0080.1	182	3	19 450.09	液泡膜
<i>NtZIP28</i>	Nitab4.5_0008249g0040.1	182	4	19 666.03	液泡膜
<i>NtZIP29</i>	Nitab4.5_0002026g0030.1	262	7	27 916.21	细胞质膜
<i>NtZIP30</i>	Nitab4.5_0000492g0060.1	261	7	27 744.02	细胞质膜
<i>NtZIP31</i>	Nitab4.5_0006228g0020.1	613	13	64 082.80	细胞质膜
<i>NtZIP32</i>	Nitab4.5_0000707g0290.1	600	11	62 606.22	细胞质膜
<i>NtZIP33</i>	Nitab4.5_0004842g0020.1	139	3	15 307.11	细胞质膜

基因登记号来源为SGN网站2017版基因组。

(Edwards等2017)。33个烟草ZIP家族成员中, 11个不均匀地分布在7条染色体上(图1-A), 其余22条序列分布在19条super scaffold上(图1-B)。其中Nt09、Nt10、Nt19、Nt22、Nt23五条染色体上分别只定位了1条序列, Nt02上定位了2条序列(*NtZIP19*、*NtZIP26*)并且位置相邻; 烟草最长的染色体Nt17上定位的*NtZIP*基因最多, 有3条, 其中的两条(*NtZIP28*、

NtZIP25)也定位在相邻位置。*NtZIP4*与*NtZIP16*、*NtZIP8*与*NtZIP15*、*NtZIP5*与*NtZIP27*三对基因以成对的形式分布在3个super scaffold上。

2.2 *NtZIP*家族进化分析

为了探究ZIP家族的进化关系, 将拟南芥、水稻、玉米以及烟草*NtZIP*家族蛋白序列构建多物种进化树。总体来看, 水稻OsZIP家族成员同玉米的

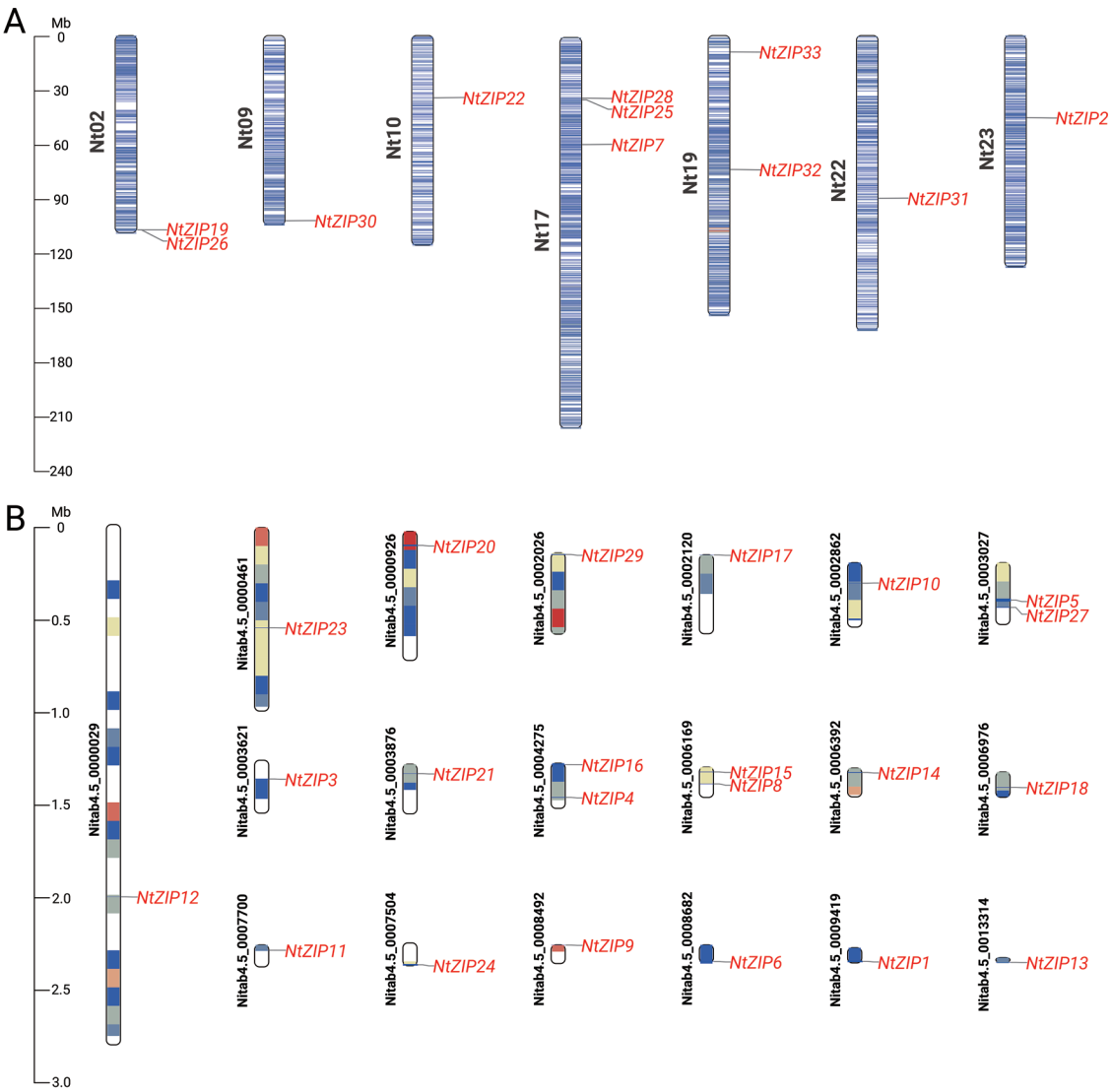


图1 烟草ZIP家族基因组定位
Fig. 1 The location of NtZIP gene family on the chromosome

A: NtZIP家族中的11个成员定位在7条染色体上; B: NtZIP家族中的其余22个成员定位在19条super scaffold上。Nt02、Nt09、Nt10、Nt17、Nt19、Nt22、Nt23表示烟草染色体编号, Nitab4.5_0000029、Nitab4.5_0000461、Nitab4.5_0003621、Nitab4.5_0007700、Nitab4.5_0000926、Nitab4.5_0003876、Nitab4.5_0007504、Nitab4.5_0002026、Nitab4.5_0004275、Nitab4.5_0008492、Nitab4.5_0002120、Nitab4.5_0006169、Nitab4.5_0008682、Nitab4.5_0002862、Nitab4.5_0006392、Nitab4.5_0009419、Nitab4.5_0003027、Nitab4.5_0006976、Nitab4.5_0013314表示super scaffold编号。左侧坐标轴表示染色体或super scaffold长度, 染色体或super scaffold内部的颜色表示基因密度, 颜色越红表示基因密度越高。

ZmZIP家族成员在进化关系上比较近, 烟草NtZIP家族成员同拟南芥的AtZIP家族成员在进化关系上比较近。烟草NtZIP家族成员也可分为I、II、III、IV 4个亚族(图2), 与拟南芥、水稻、玉米NtZIP家族成员分类相符。

烟草中, 不同NtZIP亚家族成员数目不同: 第I亚族有2个成员, 第II亚族有4个成员, 第III亚族有4个成员, 第IV亚族最多, 有23个成员。在亚家族内部, 各个成员之间的结构域相似度较高, 并且部分NtZIP成员以成对的形式形成了进化分支, 如

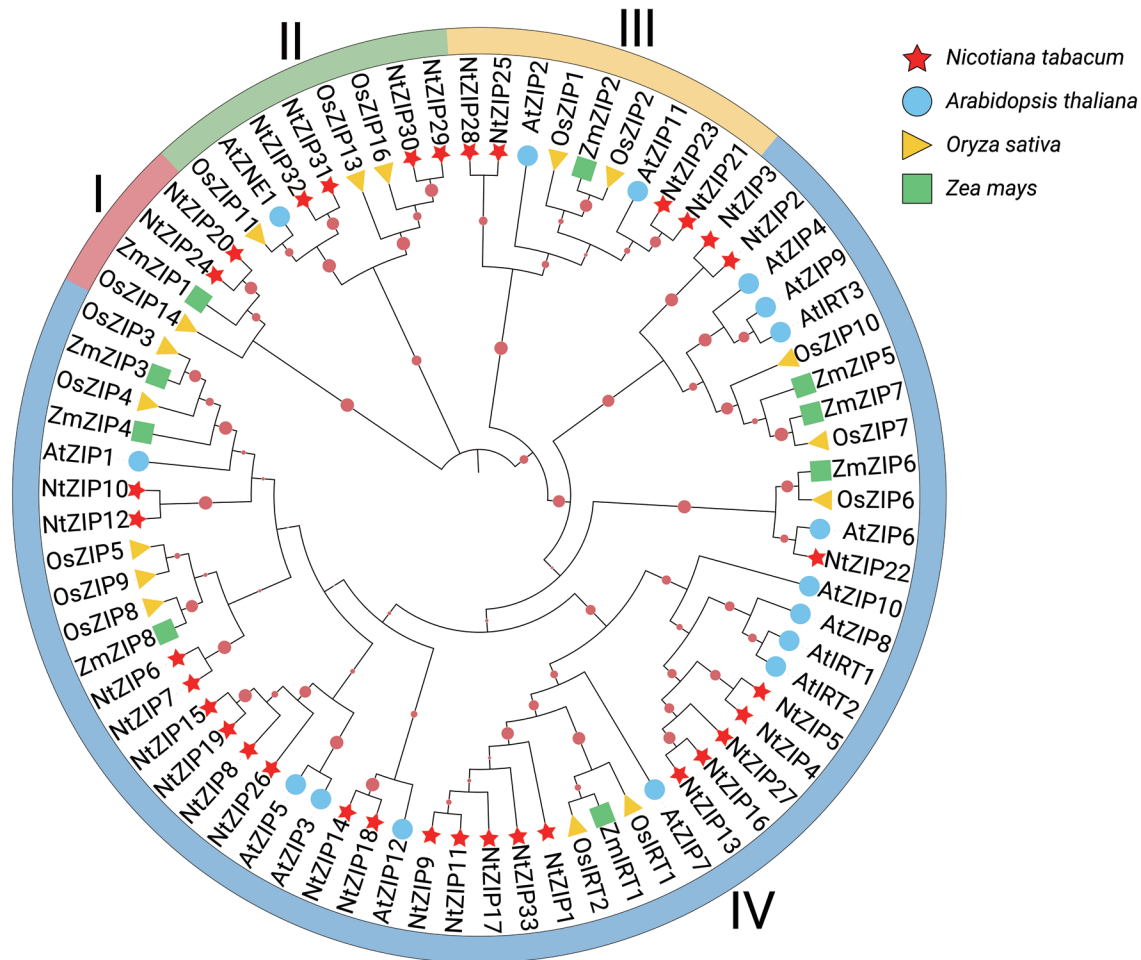


图2 多物种ZIP家族系统进化树分析

Fig. 2 The phylogenetic analysis of ZIP family in different species

图中进化树分支上不同大小的红色圆圈代表了进化分支的bootstrap。位于蛋白名前的不同符号分别代表了不同物种的ZIP家族成员。红色五角星: 烟草; 蓝色圆形: 拟南芥; 黄色三角: 水稻; 绿色方形: 玉米。外侧圆环的不同颜色分别表示I~IV亚族。

NtZIP2与NtZIP3、NtZIP6与NtZIP7、NtZIP10与NtZIP12、NtZIP14与NtZIP18、NtZIP15与NtZIP19、NtZIP29与NtZIP30 (bootstrap>95, 一种抽样方法的结果, 数值越大表示可信度越高), 并且在同一个进化分支中, NtZIP成员间结构、序列高度相似, 表明在进化过程中, 部分NtZIP基因家族成员出现复制, 形成了多拷贝基因。

拟南芥中, ZNE1 (Zinc Nutrient Essential 1; AtZEN1.1和AtZEN1.2又名AtZIP13)是独立于ZIP家族外的一个新的Zn转运体(Wang等2021), 其基因

功能也符合ZIP家族的整体功能, 因此本论文仍将AtZEN1归类到ZIP家族中。烟草中, NtZIP31和NtZIP32与拟南芥AtZEN1位于同一进化分支, 而且其结构、序列极为相似(相似度约99.5%), 因此, 烟草NtZIP31和NtZIP32也归类到第II亚族中。

2.3 NtZIP家族结构分析

通过对33条烟草ZIP蛋白序列进行基序(motif)和结构域(domain)分析(图3-A和B), 发现不同亚族成员包含的基序种类、数量、顺序存在明显差别, 第I亚族的NtZIP20、NtZIP24由多个基序9和基序8

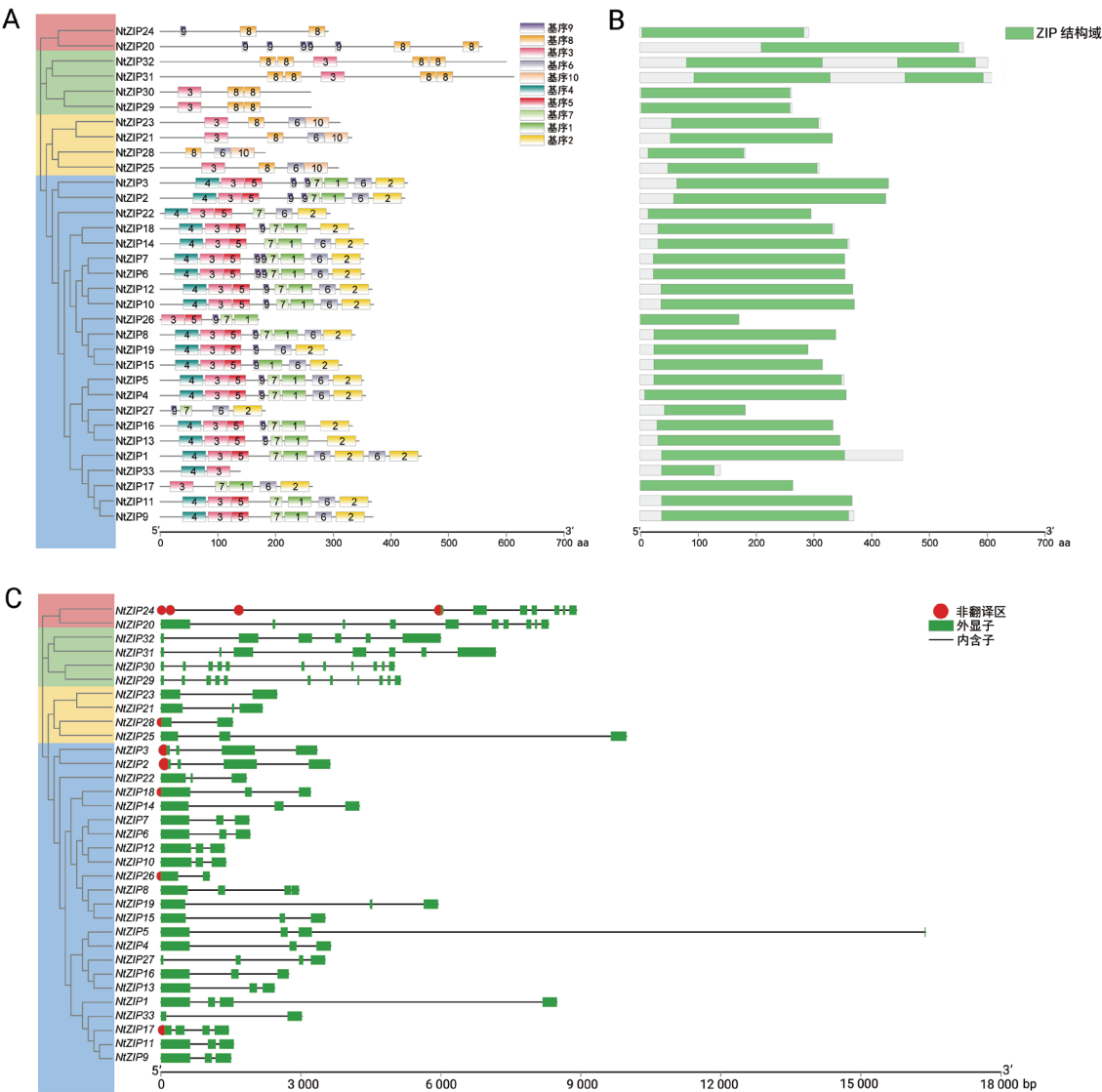


图3 烟草ZIP家族成员基序、结构域以及基因结构图分析

Fig. 3 Analyses of motifs, conserved domains and gene structure of ZIP members in tobacco

A: ZIP家族成员基序(motif)分析; B: ZIP家族成员结构域(domain)分析; C: ZIP家族成员基因结构分析(左侧线条表示进化树分支, 红、绿、黄、蓝颜色分别对应进化树分析得到的I、II、III、IV亚族)。

组成, 第II亚族的NtZIP31、NtZIP32由基序3和多个基序8组成, 第III亚族的序列上主要是基序3、基序8、基序10、基序6顺序排布(NtZIP28不含基序3); 第IV亚族的特征序列是由基序4、基序3、基序5、基序9、基序7、基序1、基序6、基序2顺序排布;

有些NtZIP家族成员部分基序有增添或缺失, 这可能会导致不同成员中出现功能差异。Hmsearch检索发现大多数NtZIP成员主要包含一个典型的ZIP结构域, 而NtZIP31和NtZIP32包含两个ZIP结构域, 推测二者可能与其他NtZIP家族成员存在功

能差异。

基因结构分析发现, 烟草*NtZIP*家族成员基因全长在1 539bp~16 383 bp之间, 外显子数量在2~11个之间, 但大多数为2~4个外显子(图3-C)。其中有3个外显子的成员数量最多, 有16个成员(占比48%); 其次为4个外显子(7个成员, 占比21.2%); 再次为2个外显子(4个成员, 占比12.1%); 外显子数量为2~4个的成员总占比约81.8% (27个)。其中, *NtZIP29*、*NtZIP30*外显子数量最多, 为11个, 其后依次为*NtZIP20* (10个)、*NtZIP24*与*NtZIP31* (7个)、

NtZIP23 (6个) (图3-C)。含外显子较多的家族成员都集中在第I与第II亚家族, 第III与第IV亚家族的成员外显子数量都在2~4个的区间内。

2.4 *NtZIP*家族启动子分析

启动子分析显示, *NtZIP*家族成员启动子区共包含4 378个顺式作用元件(图4), 包含2 620个组成型启动子、346个短作用元件(short function)、313个未命名元件(unnamed)、1 099个诱导型顺式作用元件。诱导型顺式作用元件中, 环境胁迫响应类元件最多, 达到461个, 其次分别为光响应元件312

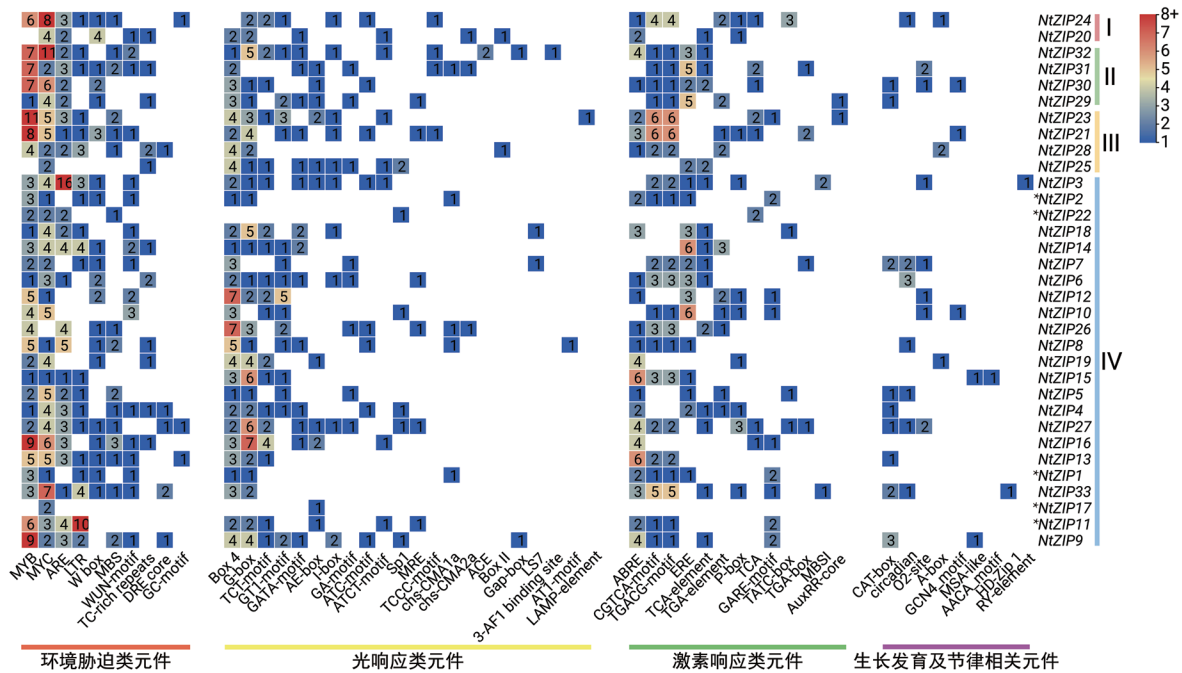


图4 烟草ZIP家族启动子区顺式作用元件分析

Fig. 4 *Cis*-acting element analysis of the *NtZIP* gene family

热图中颜色的红或蓝表示顺式作用元件数量的多或少; 右侧不同颜色竖条表示进化树分析得到的I、II、III、IV四个亚族; 下方不同颜色横条表示根据功能区分的顺式作用元件类别。基因名左侧的星号(*)表示启动子区域部分序列不完整, 可能导致启动子元件统计数量少于实际数量。环境胁迫类元件如右。ARE、GC-motif: 缺氧诱导响应元件; DRE core: 干旱、高盐、低温等非生物胁迫相关元件; LTR: 低温响应元件; MBS、MYB、MYC: 干旱、高盐等胁迫响应元件; TC-rich repeats、W box: 防卫和胁迫相关元件。光响应类元件有3-AF1 binding site、ACE、AE-box、AT1-motif、ATC-motif、ATCT-motif、Box 4、Box II、chs-CMA1a、chs-CMA2a、GA-motif、Gap-box、GATA-motif、G-box、GT1-motif、I-box、LAMP-element、LS7、MRE、Sp1、TCCC-motif、TCT-motif。激素响应类元件如右。ABRE: 脱落酸响应元件; AuxRE、AuxRR-core、TGA-box、TGA-element: 生长素响应元件; CGTCA-motif、TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应元件; ERE: 乙烯响应元件; GARE-motif、P-box、TATC-box、TCA: 赤霉素响应元件; MBSI: 类黄酮调控相关元件; TCA-element: 水杨酸响应元件。生长发育及节律相关元件如右。AACA_motif、GCN4_motif: 胚乳特异性表达元件; A-box: 节律相关元件; CAT-box: 分生组织表达相关元件; circadian: 昼夜节律相关元件; HD-Zip 1: 细胞分化相关元件; MSA-like: 细胞周期相关元件; O2-site: 醇代谢相关元件; RY-element: 种子发育相关元件。

个、激素响应元件295个、生长发育及节律相关元件31个。

环境胁迫响应类元件中, MYB (干旱、高盐等胁迫响应元件)顺式元件数目最多, 达到了127个; 其次为MYC (干旱、高盐等胁迫响应元件)顺式元件, 达到了121个; 后面依次为ARE (缺氧胁迫相关元件, 78个)、LTR (低温响应元件, 40个)、W-box (防卫和胁迫相关元件, 28个)、WUN-motif (伤害相关元件, 21个)、TC-rich repeats (防卫和胁迫相关元件, 13个)、DRE core (干旱、高盐、低温等非生物胁迫相关元件, 6个)、GC-motif (缺氧诱导相关元件, 3个)。含有多种响应不同胁迫的顺式作用元件, 表明*NtZIP*家族成员可能参与植物对环境的多种非生物胁迫响应。不同*NtZIP*家族成员的启动子区, 都包含1个或多个环境胁迫响应类元件, 并且其所包含的顺式作用元件种类和数目也不一样。数量最多的MYB类顺式作用元件(127个)分布于30个*NtZIP*基因启动子区, 但MYC顺式作用元件(121个)分布于32个*NtZIP*基因启动子区。*NtZIP3*、*NtZIP11*启动子区分别含有16个ARE元件、10个LTR元件, 远远高于*NtZIP*家族其他成员, 表明不同的*NtZIP*家族成员在响应环境胁迫中可能具有特异性。

*NtZIP*家族启动子包含的激素响应元件中, 脱落酸(ABA)响应元件最多(ABRE, 60个); 其次是茉莉酸甲酯(MeJA)响应元件(CGTCA-motif, 50个)和乙烯响应元件(ERE, 47个)。除此之外, 还发现了生长素(IAA)、赤霉素(GA)、水杨酸(SA)等植物激素的响应元件, 表明*NtZIP*表达也可能受到植物激素信号途径调控。除此之外, 部分*NtZIP*基因还包括植物生长发育、昼夜节律相关元件, 如胚乳特异性表达元件、种子发育相关元件等。

2.5 镉胁迫下*NtZIP*家族的表达分析

重金属胁迫也是重要的非生物胁迫。转录组数据显示, Cd处理后, 烟草*NtZIP*家族表达模式可分为5类(图5): A类成员在叶和根中均衡高表达; B类成员表达量极低, 甚至无法检测; C类成员在根和叶中表达显著受到Cd诱导; D类成员主要在叶中表达; E类成员主要在根中表达。

根部是植物最先接触并感受重金属胁迫的部位。本研究采用不同浓度的Cd处理烟草幼苗, 检测

根部9个*NtZIP*家族成员基因表达, 进而验证*NtZIP*家族基因响应Cd的情况。荧光定量PCR分析显示, Cd胁迫处理下, 烟株根部*NtZIP*基因表达情况与转录组数据基本一致(图6)。在低Cd浓度(200、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下*NtZIP8*、*NtZIP12*、*NtZIP21*表达丰度较高; 在中等浓度(1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下*NtZIP3*基因表达丰度较高; 在高Cd浓度(2 000、4 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下*NtZIP13*、*NtZIP16*、*NtZIP23*、*NtZIP28*基因表达丰度较高; 而*NtZIP16*、*NtZIP27*在低浓度胁迫下表达量下调, 在高浓度下表达量恢复; 除*NtZIP13*外, 其他*NtZIP*表达趋势与转录组数据完全相符。上述结果表明, *NtZIP*家族成员对不同Cd浓度的胁迫响应存在差异。

3 讨论

本文对烟草*NtZIP*家族进行全基因组鉴定, 共鉴定出33个*NtZIP*家族成员。进化树分析结果显示33个家族成员分别属于4个不同的亚家族, 与其他作物相似, 表明ZIP家族在进化过程中较为保守。另外, 烟草*NtZIP*家族存在很多序列高度相似的基因对, 且位于同一个进化分支上, 推测可能在二倍体亲本杂交形成四倍体的过程中, *NtZIP*家族成员也随之加倍。烟草*NtZIP*家族33个成员中有11个定位在7条染色体上, 剩余的22个定位在19个super scaffold上, 其中有5对定位在相邻位置且进化相似度非常高。推测部分*NtZIP*家族成员在进化过程中发生了串联重复, 并紧密排列在同一条染色体上, 形成多个序列相似、功能相近的基因簇。

根据内含子数量, 真核生物基因可分为无内含子基因、内含子贫乏基因(1~3个)以及富含内含子基因(4个及以上)三类(Liu等2021)。基因结构分析显示, 第I、II亚族*NtZIP*成员的内含子数量明显多于第III、IV亚族。第I、II亚族*NtZIP*成员属于富含内含子基因, 第III、IV亚族成员属于内含子贫乏基因。早期的真核生物基因普遍是富含内含子的, 在进化过程中逐渐出现了内含子贫乏基因和无内含子基因, 烟草*NtZIP*家族主要由内含子贫乏基因组成(81.8%), 无内含子基因及内含子贫乏基因主要与抗逆相关(Liu等2021), 符合ZIP家族的功能。

预测的跨膜结构域数目在家族成员之间相差

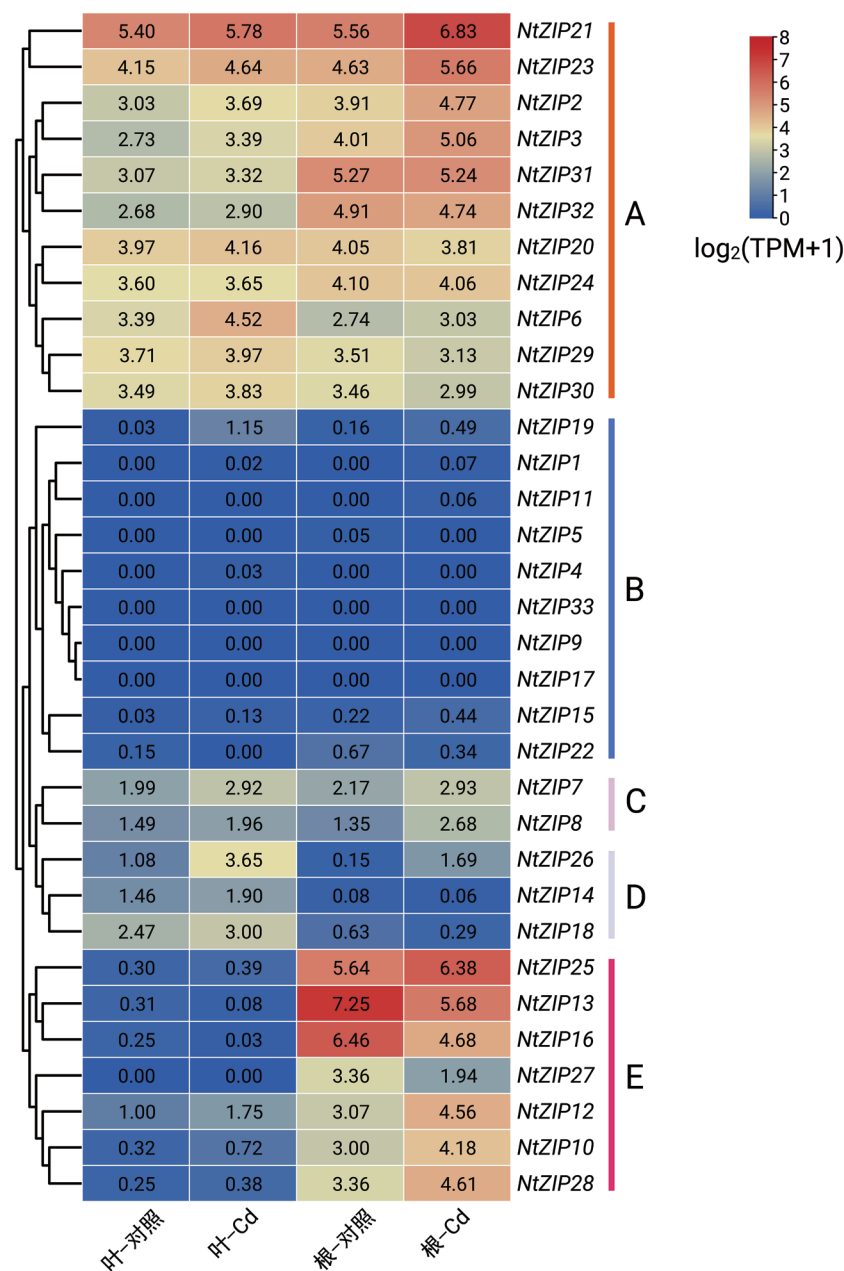
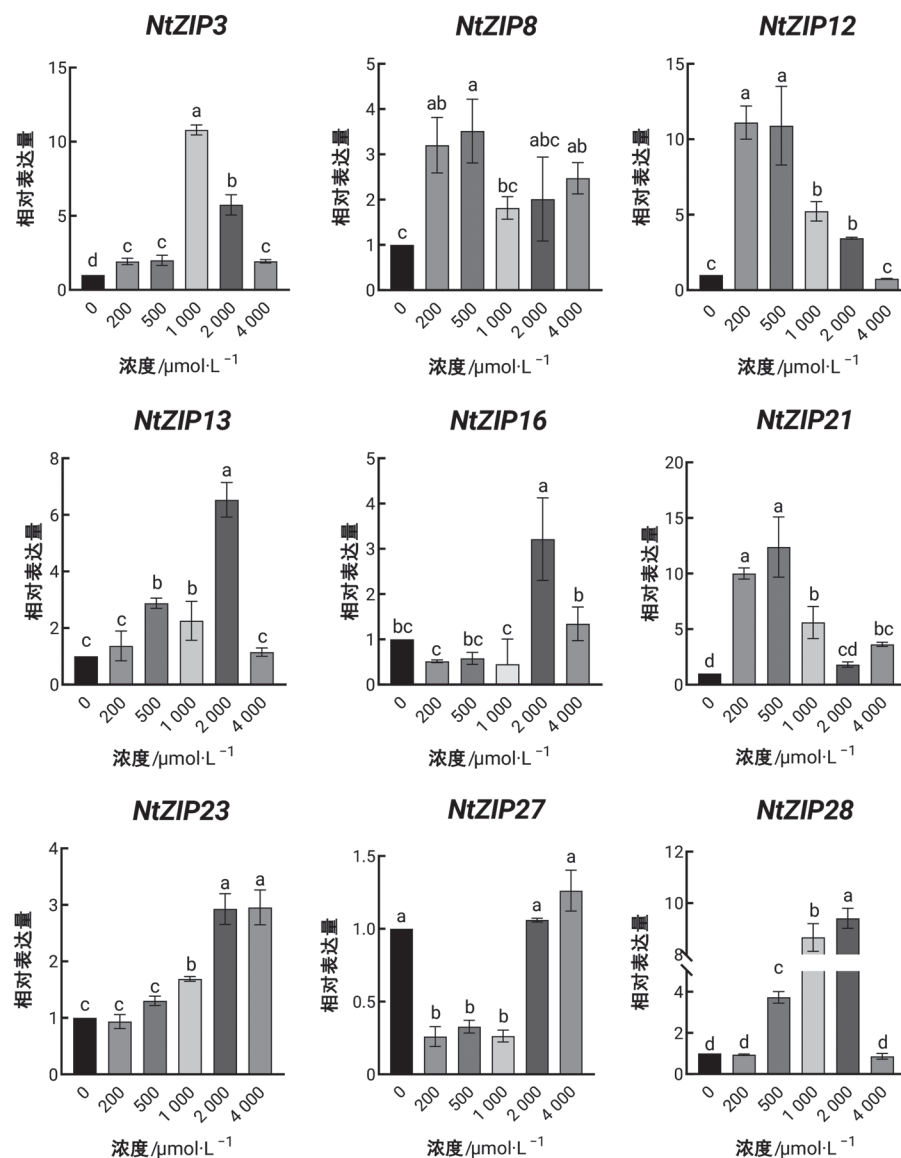


图5 Cd处理下烟草ZIP家族基因表达量变化
Fig. 5 Heatmap of gene expression of NtZIP family under Cd treatment

热图左侧分支表示根据基因表达模式进行聚类分析, 同一类的表达模式聚类为一个分支; 热图右侧分组与左侧分支对应, 不同颜色及字母表示不同的分支。TPM: transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads; TPM+1: 基因表达量的一种表示方式, 避免log函数出现指数为0的情况。

较大, 并且氨基酸数目与跨膜结构域数目并无对应关系, 推测不同的NtZIP家族蛋白转运离子种类和效率有差别, 而实际跨膜结构域数目和蛋白功能仍需进一步验证与解析。NtZIP家族绝大部分成

员预测定位在细胞质膜上, 可能参与细胞对金属离子的吸收转运; 少数预测定位在液泡膜上, 可能将细胞内超标的金属离子转运到液泡内, 对植物细胞解毒并维持胞内的离子平衡, 这也与其他植

图6 Cd处理下烟草根部部分*NtZIP*基因表达量分析Fig. 6 Gene expression analysis of some *NtZIPs* in tobacco roots under Cd treatment

物ZIP蛋白功能相一致(韩佳慧等2019)。启动子包含的元件及其数目与基因功能息息相关(刘宽等2022)。烟草*NtZIP*家族成员启动子区都含有干旱、低温、高盐等多种非生物胁迫和激素相关顺式作用元件,这与拟南芥、小麦中的研究一致(李嵩等2017; Wang等2010)。因此, *NtZIP*家族基因不仅参与金属离子的吸收和转运,也可能参与多种胁迫信号途径。

ZIP家族主要参与Zn与Fe的吸收,也参与对重

金属Cd的吸收、转运(韩佳慧等2019)。Cd对植物的生长发育,也是一种非生物胁迫。拟南芥中*AtIRT1*参与Cd元素的转运, *AtIRT2*参与Cd的解毒(Vert等2009)。转录组与荧光定量PCR数据显示,镉胁迫条件下,9个*NtZIP*家族成员中,6个上调表达,3个下调表达,表明烟草*NtZIP*家族成员响应Cd胁迫,参与烟草体内Cd的代谢。但不同ZIP家族成员的功能也存在差异。定位在液泡膜的ZIP蛋白通常被认为在重金属的解毒当中发挥作用(Vert等

2009)。在烟草中虽然*NtZIP27*与*NtZIP28*都预测定位在液泡膜上,但*NtZIP27*在中、低浓度Cd处理下表达量显著下调,而*NtZIP28*在中、高浓度Cd处理下表达量显著上调,推测*NtZIP27*可能是液泡向细胞质转运金属离子的转运体,在受到胁迫后其表达量下调,停止液泡向细胞质转运,而*NtZIP28*将细胞质中过量的重金属向液泡内转运,降低胞内的重金属毒性。因此,不同的ZIP成员可能存在功能分化,在Cd的吸收转运以及解毒过程中发挥不同的作用,但其具体功能仍需进一步研究。

本研究从烟草全基因组中鉴定出 33个*NtZIP*基因家族成员,分属于4个亚家族,预测定位于细胞质膜或液泡膜上,表明其与离子转运密切相关。研究结果表明,部分*NtZIP*基因家族成员能响应Cd胁迫。本研究不仅为深入研究Cd的响应机制及吸收、转运提供线索,也为解析烟草*NtZIP*基因家族的功能提供参考。

参考文献(References)

- Barabasz A, Palusińska M, Papierniak A, et al (2019). Functional analysis of *NtZIP4B* and Zn status-dependent expression pattern of tobacco ZIP genes. *Front Plant Sci*, 9: 1984
- Cao YQ, Nie QK, Gao Y, et al (2018). The studies on cadmium and its chelate related transporters in plants. *Crops*, (3): 15–24 (in Chinese with English abstract) [曹玉巧, 聂庆凯, 高云等(2018). 植物中镉及其螯合物相关转运蛋白研究进展. *作物杂志*, (3): 15–24]
- Chen C, Chen H, Zhang Y, et al (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 13 (8): 1194–1202
- Chen LJ, Zhou JH, Li Q, et al (2014). Advance in cadmium toxicity to tobacco and its resistance mechanism. *Chin Tob Sci*, 35 (6): 93–97 (in Chinese with English abstract) [陈丽鹃, 周冀衡, 李强等(2014). 镉对烟草的毒害及烟草抗镉机理研究进展. *中国烟草科学*, 35 (6): 93–97]
- Edwards KD, Fernandez-Pozo N, Drake-Stowe K, et al (2017). A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics*, 18 (1): 448
- Feng K, Yang YY, Liu Q, et al (2023). Cloning and expression analysis of *NtCCX2* gene in tobacco. *J Henan Agr Sci*, 52 (5): 52–60 (in Chinese with English abstract) [冯康, 杨园园, 刘琼等(2023). 烟草*NtCCX2*基因的克隆与表达分析. *河南农业科学*, 52 (5): 52–60]
- Guerinot ML (2000). The ZIP family of metal transporters. *BBA Biomembranes*, 1465 (1–2): 190–198
- Han JH, Wan ST, Yu J, et al (2019). Research progress of plant zinc-iron transporter ZIP involved in cadmium transport in plants. *Plant Physiol J*, 55 (10): 1449–1457 (in Chinese with English abstract) [韩佳慧, 万思涛, 俞娇等(2019). 参与植物体内镉元素转运的植物锌铁转运蛋白ZIP研究进展. *植物生理学报*, 55 (10): 1449–1457]
- Kavith PG, Kuruvilla S, Mathew MK (2015). Functional characterization of a transition metal ion transporter, *OsZIP6* from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol Bioch*, 97: 165–174
- Khan S, El-Latif Hesham A, Qiao M, et al (2010). Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environ Sci Pollut R*, 17 (2): 288–296
- Kozak K, Antosiewicz DM (2023). Correction to: tobacco as an efficient metal accumulator. *Biometals*, 36 (5): 1171
- Kozak K, Papierniak A, Barabasz A, et al (2019). *NtZIP11*, a new Zn transporter specifically upregulated in tobacco leaves by toxic Zn level. *Environ Exp Bot*, 157: 69–78
- Lee S, An G (2009). Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant Cell Environ*, 32 (4): 408–416
- Li S, Li M, Liu ZH, et al (2017). Cloning and salt stress identification of *TaZTP29* gene in wheat (*Triticum aestivum*). *J Agric Biotechnol*, 25 (10): 1555–1565 (in Chinese with English abstract) [李嵩, 李敏, 刘子辉等(2017). 小麦*TaZTP29*基因的克隆及耐盐性鉴定. *农业生物技术学报*, 25 (10): 1555–1565]
- Li S, Zhou X, Huang Y, et al (2013). Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biol*, 13: 114
- Liu H, Lyu H M, Zhu K, et al (2021). The emergence and evolution of intron-poor and intronless genes in intron-rich plant gene families. *Plant J*, 105 (4): 1072–1082
- Mäser P, Thomine S, Schroeder J, et al (2001). Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126 (4): 1646–1667
- Meng L, Sun L, Tan LT (2018). Progress in ZIP transporter gene family in rice. *Genetics*, 40 (1): 33–43 (in Chinese with English abstract) [孟璐, 孙亮, 谭龙涛(2018). 水稻锌铁转运蛋白ZIP基因家族研究进展. *遗传*, 40 (1): 33–43]
- Palusińska M, Barabasz A, Kozak K, et al (2020). Zn/Cd status-dependent accumulation of Zn and Cd in root parts in tobacco is accompanied by specific expression of ZIP genes. *BMC Plant Biol*, 20 (1): 37
- Papierniak A, Kozak K, Kendziorek M, et al (2018). Contribution of *NtZIP1*-like to the regulation of Zn homeostasis. *Front Plant Sci*, 9: 185

- Pedas P, Schjoerring JK, Husted S. (2009). Identification and characterization of zinc-starvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiol Bioch*, 47 (5): 377–383
- Pedas P, Ytting CK, Fuglsang AT, et al (2008). Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant Physiol*, 148 (1): 455–466
- Vert G, Barberon M, Zelazny E, et al (2009). *Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells. *Planta*, 229 (6): 1171–1179
- Wang M, Xu Q, Yu J, et al (2010). The putative *Arabidopsis* zinc transporter ZTP29 is involved in the response to salt stress. *Plant Mol Biol*, 73 (4–5): 467–479
- Wang X, Li P, Yin LP (2007). Transport system and regulation of zinc in yeast and plants. *Chin Bull Bot*, (6): 799–806 (in Chinese with English abstract) [王祥, 李鹏, 印莉萍 (2007). 酵母和植物的锌转运系统及其调控. *植物学通报*, (6): 799–806]
- Wang Y, Yang J, Miao R, et al (2021). A novel zinc transporter essential for *Arabidopsis* zinc and iron-dependent growth. *J Plant Physiol*, 256: 153296
- Yang Y, Li Y, Wang T, et al (2022). Exposure to potentially toxic elements through the soil-tobacco-human pathway: causative factors and probabilistic model. *Sci Total Environ*, 811: 151379
- Zhang C, Tong C, Cao L, et al (2023). Regulatory module WRKY33-ATL31-IRT1 mediates cadmium tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 46 (5): 1653–1670