



苹果*Nramp*基因组鉴定及其对不同重金属离子的反应

石宇佳, 李佳琦, 宋建飞, 严俊红, 朱晓悦, 张晓健, 张玮玮, 杨洪强*

山东农业大学园艺科学与工程学院作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

*通信作者(hqyang@sdau.edu.cn)

摘要: 天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance-associated macrophage protein)是一类能够转运 Fe^{2+} 和 Cd^{2+} 等二价金属离子的蛋白。本文从苹果(*Malus pumila*)基因组内分离鉴定出8个*Nramp*同源基因, 根据其进化关系、编码蛋白的氨基酸数及理化性质的相似性分为3组; WoLF PSORT预测它们所编码的蛋白全部定位于质膜; PlantCARE显示8个*MpNramps*的启动子序列中含有多个激素响应及非生物胁迫响应元件; 表达谱分析表明它们在叶片中的表达量因苹果品种不同而有较大差异。在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 五种重金属离子处理下, 8个*MpNramps*在‘嘎啦’苹果组培苗叶片的表达水平差异显著, 其中, *MpNramp4*对 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 反应较敏感, *MpNramp1*和*MpNramp6*对 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 较敏感, *MpNramp2*和*MpNramp3*对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 处理都比较敏感。8个*MpNramps*在 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 处理下都明显上调表达, 对毒性重金属均呈现出较高的敏感性。

关键词: 苹果; *Nramp*基因; 重金属; 基因表达

Genome identification of apple *Nramp* and its response to different heavy metal ions

SHI Yujia, LI Jiaqi, SONG Jianfei, YAN Junhong, ZHU Xiaoyue, ZHANG Xiaojian, ZHANG Weiwei, YANG Hongqiang*

State Key Laboratory of Crop Biology, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

*Corresponding author (hqyang@sdau.edu.cn)

Abstract: Natural resistance-associated macrophage proteins are a class of proteins capable of transporting divalent metal ions, such as Fe^{2+} and Cd^{2+} . Eight *Nramp* homologous genes were isolated and identified from apple (*Malus pumila*) genome which were divided into three groups based on their evolutionary relationship, amino acid numbers and physicochemical properties. WoLF PSORT predicted that all the proteins were located in the plasma membrane. PlantCARE showed that their promoter sequences contained multiple hormone response elements and abiotic stress response elements. Analysis of expression profiles showed that the levels of their expression in apple leaves varied considerably with different varieties. When treated with Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} , the expression levels of eight *MpNramps* were significantly different in the leaves of ‘Gala’ apple (*M. pumila* ‘Gala’) tissue culture seedlings. Among them, *MpNramp4* was sensitive to Fe^{2+} and Mn^{2+} , *MpNramp1* and *MpNramp6* were sensitive to Mn^{2+} and Zn^{2+} , while *Mp-*

收稿 2022-10-10 修定 2023-03-15

资助 国家自然科学基金(32172517)和国家重点研发计划(2019YFD100103)

Nramp2 and *MpNramp3* were sensitive to Fe^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} . All eight *MpNramps* were up-regulated under Cu^{2+} and Cd^{2+} treatment, indicating a high sensitivity to toxic heavy metals.

Key words: apple; *Nramp* genes; heavy metals; gene expression

果树等植物在生长过程中, 会受到环境中各类金属元素的影响。通常密度在 $4.5 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 以上的金属称作重金属(王向前等2016; 张舒玄等2019)。有些重金属, 如铁、锰、锌等, 是果树等植物生长发育所必需的, 当它们缺乏或过多时, 植物生长发育以及作物产量和品质形成会受到干扰; 另一些重金属元素, 如汞、铅、镉等, 在较低水平就会对植物和动物造成毒害(Ovečka和Takáč 2014; Zhao等2022)。但不论哪类重金属元素, 它们都会被植物吸收, 并影响植物正常生长发育。因此, 研究植物对重金属的反应和重金属吸收、转运及其调控机制, 对于控制重金属危害以及农产品质量安全具有重要意义(Ovečka和Takáč 2014)。

天然抗性相关巨噬蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, Nramp)是一类在细菌、酵母和动植物中都有分布并且高度保守的膜蛋白, 能够转运 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cd^{2+} 等多种二价金属离子, 对调控和维持植物体内金属离子的稳态起重要作用(Nevo和Nelson 2006; Bozzi和Gaudet 2021)。在拟南芥中已发现*AtNramp1~6*六种基因, 其中, *AtNramp1*能够转运 Fe^{2+} (Curie等2000)和 Mn^{2+} (Cailliatte等2010), *AtNramp2*被鉴定为 Mn^{2+} 转运蛋白(Gao等2018), *AtNramp3*和*AtNramp4*都能够转运 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} (Thomine等2000; Lanquar等2010; Bastow等2018), *AtNramp6*具有转运 Cd^{2+} 的能力(Cailliatte等2009), 并参与调控细胞铁稳态(Li等2019)。在水稻中也确定了8个*Nramp*基因家族成员, 其中, *OsNramp1*可转运 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} (Takahashi等2011; Chang等2020), *OsNramp2*能将 Fe^{2+} 从液泡转运到细胞质(Li等2021b), 并影响Cd在水稻籽粒中的分布(Chang等2022), *OsNramp3*可转运 Mn^{2+} (Yang等2013), *OsNramp5*负责 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 吸收等(Ishimaru等2012; Sasaki等2012)。在其他植物中, 已发现番茄*LeNramp1*在低铁胁迫下可以将 Fe^{2+} 转运到相应细胞器(Bereczky等2003), 杨树*PaNramp1*能够转运 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} (Romé等2016; Chen等2019), 芥

麦*FeNramp5*具有 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 转运活性(Yokosho等2021), 小白菜*BcNramp1*能够促进 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 吸收和积累(Yue等2021)等。

上述研究主要探讨了Nramp吸收和转运金属离子的功能, 较少关注其基因表达对外界金属离子的反应。苹果是全球四大水果之一, 也是世界上栽培比较广泛的果树。目前苹果*Nramp*基因特征及其对重金属的反应尚不够清楚。本研究运用生物信息学方法, 从苹果基因中鉴定*Nramp*基因, 分析*MpNramp*家族成员的基因结构、基序组成、顺式作用元件及差异表达, 并以‘嘎啦’苹果(*Malus pumila* ‘Gala’)组培苗为研究对象, 重点探讨*MpNramp*在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 处理下的表达特征, 以期为深入揭示苹果*Nramp*家族基因对重金属离子的应答机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料和重金属处理方法

实验的植物材料为‘嘎啦’苹果(*Malus pumila* Mill. ‘Gala’)组培苗, 培养基为 $\text{MS}+1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA}+0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}+0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ GA}_3+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 蔗糖}+7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 琼脂}(\text{pH}=5.8\sim6.0)$ 。

处理时将长势一致的组培苗, 分别移栽到添加了 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ FeSO}_4$ 、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MnSO}_4$ 、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4$ 、 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ 和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdSO}_4$ 的培养基中进行培养处理, 以在没有添加上述重金属盐的培养基中培养的组培苗为对照。每瓶培养基移栽3棵组培苗, 每2瓶为1个处理, 每个处理重复3次。在处理第4天和第12天后剪下组培苗叶片, 进行*Nramp*基因的qRT-PCR分析。

1.2 *MpNramp*基因的鉴定和系统发育

从Ensembl数据库(<http://plants.ensembl.org/index.html>)下载苹果基因组及其注释文件, 通过TB-tools (Chen等2020)提取其CDS并翻译成蛋白。从tair网站(<https://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥中已鉴别出来的6个Nramp成员的蛋白序列, 通过

TBtools对苹果蛋白数据库进行本地BLAST, 得出候选蛋白。利用Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)中*Nr-amp*基因保守结构域的隐马可夫模型(PF01566)通过HMMER 3.3.2软件, 从苹果蛋白数据库搜索*Nr-amp*基因(最终选取*MpNramp*基因E-value的截断值为 1.6×10^{-74}), 并通过SMART (<https://smart.embl-heidelberg.de/>)对候选基因进行结构域验证。综合以上两种方法, 最终确定出苹果*MpNramp*基因家族成员。

将AtNramp蛋白序列与MpNramp蛋白序列用MEGA 7软件自带的ClustalW进行比对, 并利用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树, Bootstrap重复设为1 000。

1.3 *MpNramp*基因的理化性质、基因结构、保守基序、顺式作用元件及亚细胞定位分析

利用在线工具ExPASy-ProtParamtool (<https://web.expasy.org/protparam/>)分析Nramp家族成员的理化性质。根据从EnSembl数据库中下载苹果基因组注释文件, 通过TBtools绘制*Nramp*基因结构图。通过MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)搜索其保守基序, 利用TBtools绘制其保守基序图。利用phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)截取基因上游2 000 bp的序列, 将其提交到PlantCARE数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测顺式作用元件。通过WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位预测。

1.4 不同组织中的表达谱分析

利用NCBI的GEO数据库中的*MpNramp*数据, 分析苹果不同品种中的*Nramp*在不同器官的表达

(GSE42873), 通过TBtools绘制热图。

1.5 ‘嘎啦’组培苗叶片*Nramp*基因qRT-PCR分析方法

总RNA提取使用RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], 并立即使用HiScriptIII[®] 1st Strand cDNA synthesis Kit (+gDNA wiper) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行cDNA合成。采用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)用表1的引物对‘嘎啦’苹果8个*Nramp*基因进行实时荧光定量PCR (qRT-PCR), 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法(Livak和Schmittgen 2001)计算相对表达量。

2 实验结果

2.1 苹果*Nramp*家族基因的鉴定和系统发育

依据拟南芥Nramp信息, 从苹果基因组鉴定到8个*Nramp*基因, 分别命名为*MpNramp1*~*MpNramp8* (表2)。系统发育树显示MpNramp蛋白与拟南芥具有良好的亲缘关系, 其中, 苹果MpNramp2、4、5、8与拟南芥AtNramp1、5、6亲缘关系较近, 苹果MpNramp1、7与拟南芥AtNramp2亲缘关系较近, 苹果MpNramp3、6与拟南芥AtNramp3、4亲缘关系较近(图1)。

2.2 *MpNramp*理化性质、基因结构及保守基序分析

依据8个*MpNramp*的进化关系、编码蛋白的氨基酸数及理化性质的相似性, 将其分为3组(表2)。

第I组中*MpNramp*基因编码蛋白的氨基酸数为507~537; 蛋白分子量为55.44~58.96 kDa; 为酸性蛋白; 属于较稳定蛋白; 不具有良好的亲水性。

第II组中*MpNramp*基因编码蛋白的氨基酸数

表1 苹果*Nramp*基因家族qRT-PCR引物
Table 1 qRT-PCR primers of *Nramp* gene family in apple

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>MpNramp1</i>	GCTCTTGTGGTCTGCAGTGG	TAAGGAAGAACACCACTCCGTG
<i>MpNramp2</i>	GGGAGATAACTGGGAGCCTG	CTGCTCCCCAAATCATCACCT
<i>MpNramp3</i>	TTCGCCTCTGAAGTGACTGG	TGATACGTTGATGTCCCGCA
<i>MpNramp4</i>	ACCGCTCATTGAGGACACAG	CCCTGACTGCAAAATCCGTCT
<i>MpNramp5</i>	TTCAGAACCCACACCACCAC	CAGGGCCAACATGTGCTAGA
<i>MpNramp6</i>	AGTGTCGGAGTGCTCTGCTTTT	TGATCCGCACCAGCTTGAAA
<i>MpNramp7</i>	AGGACGGGTTCAAGAGGCAC	CCCTTGCGGAAAACCTGTGGTG
<i>MpNramp8</i>	TGAGGGAGATACCTGGGAGC	CTTCCTCCATCGTCGCCTTT

表2 *MpNramp*基因的基本信息
Table 2 Basic information about the *MpNramp* gene

分组	基因名	Ensembl基因号	NCBI基因号	序列位置	氨基酸数 量/aa	编码区长 度/bp	分子量/ kDa	理论等 电点	不稳定 系数	疏水性	脂肪指数
I	<i>MpNramp1</i>	MD15G0065000	LOC103455925	Chr15: 5069080-5072464	537	1 614	58.96	5.17	36.10	0.544	118.92
	<i>MpNramp7</i>	MD08G0075800	LOC103441073	Chr8: 7421143-7424346	535	1 608	58.71	5.05	36.08	0.521	118.47
	<i>MpNramp3</i>	MD15G0254100	LOC103401474	Chr15: 26938012-26941405	507	1 524	55.44	5.43	34.92	0.627	119.63
	<i>MpNramp6</i>	MD02G0154800	LOC103422020	Chr2: 16188484-16192113	507	1 524	55.44	5.46	27.96	0.621	118.66
II	<i>MpNramp2</i>	MD12G0096000	LOC103450050	Chr12: 18816691-18824283	1 313	3 942	142.28	5.25	43.38	-0.019	90.97
	<i>MpNramp8</i>	MD04G0080000	LOC103433224	Chr4: 17797655-17805124	1 329	3 990	144.30	5.57	42.98	-0.076	86.97
III	<i>MpNramp4</i>	MD17G0190400	LOC103417812	Chr17: 27213823-27220964	545	1 638	62.25	8.60	41.10	0.608	117.17
	<i>MpNramp5</i>	MD14G0137500	LOC103455130	Chr14: 25294808-25302019	550	1 653	61.65	8.32	38.02	0.486	116.68

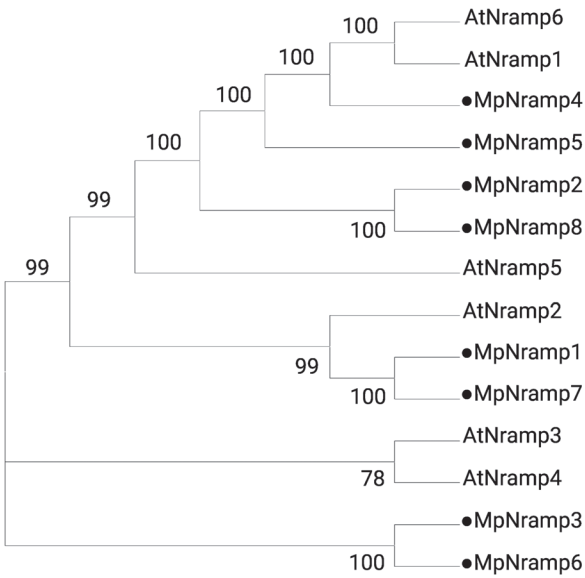


图1 拟南芥(*At*)和苹果(*Mp*)的Nramp家族系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree of Nramp family in *A. thaliana* (*At*) and *M. pubula* (*Mp*)

为1 313~1 329; 蛋白分子量为142.28~144.30 kDa; 为酸性蛋白; 属于不稳定蛋白; 具有良好的亲水性。

第III组中*MpNramp*基因编码蛋白的氨基酸数为545~550; 蛋白分子量为61.65~62.25 kDa; 为碱性蛋白; 其中*MpNramp4*为不稳定蛋白, *MpNramp5*为较稳定蛋白; 不具有良好的亲水性。

第I组中*MpNramp*长度小于4 000 bp, 第II和III组中*MpNramp*长度都大于7 000 bp。因为第I和II组内含子较少, 而第III组内含子较多(图2-A), 所以虽然第III组基因较长, 但其编码的氨基酸链较短。*MpNramp*家族成员具有较多相同的motif, 每个*MpNramp*家族成员5'→3'都包含motif4、motif2、motif3、motif1、motif6(图2-B)。整体来看, 苹果Nramp家族具有高度保守性, 同一组中的*MpNramp*相似性更高。

2.3 *MpNramp*顺式作用元件及其编码蛋白的亚细胞定位

PlantCARE数据库预测8个*MpNramp*基因启动子区域的顺式作用元件主要有脱落酸、生长素、茉莉酸甲酯、水杨酸响应元件, 环境应激相关元件, 还有胚乳、分生组织表达相关元件和光响应元件等, 其中*MpNramp4*包含的顺式作用元件种类(13

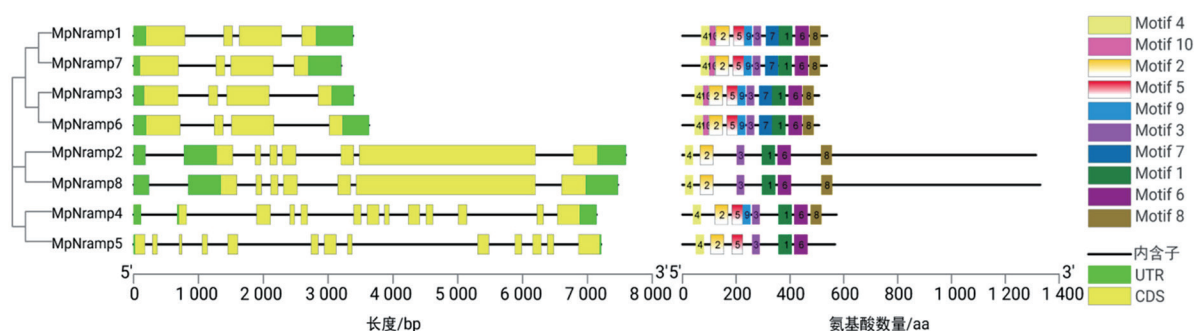


图2 MpNramp家族基因结构(A)和蛋白保守基序(B)

Fig. 2 Gene structure (A) and conserved motif (B) of MpNramp family

种)和数量(20个)均最多, *MpNramp7*包含的顺式作用元件(主要是胁迫相关元件)数量也多达20个(表3)。

利用在线工具WoLF PSORT进行亚细胞定位预测, 结果显示8个*MpNramp*蛋白全部位于质膜。

2.4 *MpNramp*在苹果不同器官的表达谱

8个*MpNramp*基因在苹果不同器官中的表达水平存在明显差异(图3)。第I组中, *MpNramp1*、*MpNramp3*、*MpNramp6*在M74花及成熟的果实中的表达量较高, 而*MpNramp7*在金冠、X8877的根和茎中的表达量较高。第II组中, *MpNramp2*在X3609×X922和X4442×X2596种子中的表达量较高, *MpNramp8*在M74花和M49的叶中表达量较高。第III组中, *MpNramp4*在M20果实中表达量最高, 在金冠、X8877茎中的表达量也相对较高; *MpNramp5*在M74花中表达量最高。在幼苗中, *MpNramp5*的表达量最高, *MpNramp3*和*MpNramp4*的表达量较低。

就*MpNramp*在叶片的表达而言, M14和M49差异很大。在M14叶片中, 8个*MpNramp*表达量均普遍较低, 其中*MpNramp2*最低; 而在M49叶片中, 除*MpNramp7*外, 7个*MpNramp*表达量均较高。与在其他器官表达相比而言, *MpNramp*在叶片的表达量总体处于中等水平。

2.5 ‘嘎啦’苹果叶片中*MpNramp*基因对不同重金属离子的反应

由图4可见, 在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 五种重金属离子处理下, 8个*MpNramp*在‘嘎啦’苹果组培苗叶片的表达水平差异显著, 主要表现如下。

在 Fe^{2+} 处理第4天, *MpNramp3*表达下调, *Mp-*

Nramp2、4、7、8表达上调。在 Fe^{2+} 处理第12天, 除*MpNramp5*、7的表达上调外, 其他*MpNramp*均恢复到了对照水平。

在 Mn^{2+} 处理第4天, *MpNramp1*、3、6表达上调, *MpNramp2*、4、7、8表达下调。在 Mn^{2+} 处理第12天, 除*MpNramp3*表达下调外, 其他*MpNramp*为对照水平。

在 Zn^{2+} 处理第4天, *MpNramp1*、3、6、7和8表达下调, *MpNramp2*表达上调。在 Zn^{2+} 处理第12天, *MpNramp1*、3、5表达下调, *MpNramp2*、8表达上调, *MpNramp4*、6、7为对照水平。

在 Cu^{2+} 处理第4天, 所有*MpNramp*都表现上调; 在 Cu^{2+} 处理第12天, 除*MpNramp5*恢复到对照水平外, 其他*MpNramp*仍明显上调。

在 Cd^{2+} 处理下, 除*MpNramp6*在处理第4天的表达稍下调外, 其他*MpNramp*无论在 Cd^{2+} 处理第4天还是第12天, 都呈上调表达趋势。

综上所述, 所有*MpNramp*都对 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 很敏感, *MpNramp4*对 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 比较敏感, *MpNramp1*和*MpNramp6*对 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 比较敏感, *MpNramp2*和*MpNramp3*对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 都比较敏感。 *MpNramp7*和*MpNramp8*对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 都不太敏感, *MpNramp5*的表达只在 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 较长时间处理下(第12天)才有反应。除*MpNramp5*外, 其他7个*MpNramp*的表达量在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 处理第12天都趋于恢复到对照水平。

3 讨论

*Nramp*是能够转运二价重金属离子的蛋白, 迄

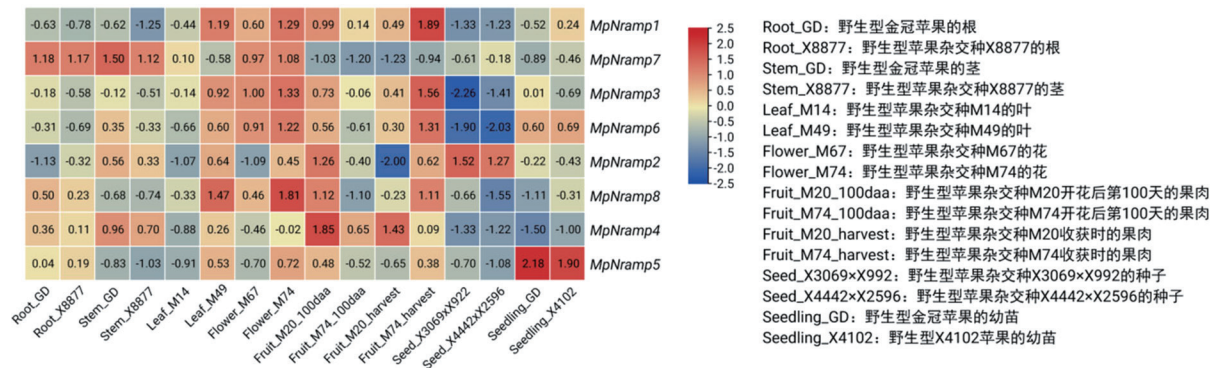
表3 MpNramp基因启动子区域的顺式作用元件及数量
Table 3 Cis-acting elements and their number in the promoter region of MpNramp genes

顺式作用元件	功能	MpNramp1	MpNramp2	MpNramp3	MpNramp4	MpNramp5	MpNramp6	MpNramp7	MpNramp8
TGA-element	生长素响应元件	1	1	0	0	0	1	0	0
AuxRR-core	生长素响应元件	0	0	0	1	0	0	0	0
ABRE	参与脱落酸反应的顺式作用元件	4	0	4	1	0	6	6	1
CGTCA-motif	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用元件	3	0	2	3	3	1	4	2
TGACG-motif	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用元件	3	0	2	3	3	1	4	2
TCA-element	参与水杨酸反应的顺式作用元件	0	0	0	1	1	0	0	0
LTR	参与低温响应的顺式作用元件	1	1	1	1	0	0	1	0
MBS	参与干旱反应的MYB结合位点	1	2	0	2	0	1	1	2
ARE	参与厌氧反应的顺式作用元件	1	5	2	3	2	0	2	2
TC-rich repeats	参与防御和应激反应的顺式作用元件	0	1	0	1	0	1	1	0
MRE	参与光响应的MYB结合位点	0	2	0	1	2	2	0	1
CAT-box	与分生组织表达相关的顺式作用元件	1	0	0	1	0	2	1	1
GCN4_motif	参与胚乳表达的顺式作用元件	1	0	0	1	0	0	0	0
CCAAT-box	MYBHv1结合位点	1	0	1	1	0	0	0	2

今为止,已从拟南芥、水稻、马铃薯、茶树等多种植物中发现5~11个Nramp成员(Curie等2000; Takahashi等2011; Li等2021a; Tian等2021)。本研究从苹果基因组鉴定到8个*MpNramp*基因,它们的基序组成模式和排列顺序基本一致,在进化上高度保守。来自多种植物的Nramp均定位于细胞质膜(陈可欣等2020),苹果的8个Nramp蛋白全部定位于质膜;质膜将细胞内外的分开,位于质膜便于Nramp调控金属离子跨膜转运。

一般来说,阳离子转运蛋白家族对转运相同价态和相似尺寸的金属离子的选择性较低,这样便于植物利用同一类转运蛋白吸收多种金属离子(Rogers等2000),但也可能会使植物吸收不需要甚至有剧毒的金属离子,例如 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 等。Nramp是一组二价阳离子转运体,它们既可以促进 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等植物必需元素跨细胞膜转运,也能够以有毒金属离子(即 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Ni^{2+})为转运底物。但是Nramp家族的不同成员对所转运的二价阳离子有不同的选择性(Ishida和Corcino 2022),比如,水稻OsNramp1在酵母中表达时能够运输镉和锰离子,但不能运输铁或砷离子(Chang等2020)。不仅如此,Nramp家族成员对外界金属离子处理的表达响应,也有选择性,比如,本研究发现,*MpNramp1*表达对铁离子处理不敏感,但在锰和锌处理4 d后分别上调和下调,*MpNramp2*和*MpNramp3*的表达量在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 处理4 d后都有或升或降的变化,即对这5种离子都有响应(图4)。

有意思的是,在 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 处理下,所有*MpNramp*都表达上调,并且8个*MpNramp*在 Cd^{2+} 处理12 d后的表达量都很高,其中*MpNramp1*、2、4、5、8最高(图4)。 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 都是对植物有毒性的重金属离子,在它们处理下,8个*MpNramp*都上调表达,这会促进 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 进入植物体内而使植物中毒,这可能是 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 呈现毒性原因之一。镉是毒性最强的重金属,8个*MpNramp*表达量在 Cd^{2+} 处理下普遍很高,一方面说明MpNramp对 Cd^{2+} 有更高的选择性,也说明MpNramp会促进更多的 Cd^{2+} 进入植物而使毒害更重。相应地, Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 是植物必需营养离子,大部分*MpNramp* (尤其是*MpNramp7*和*MdNramp8*)都不太敏感,说明大部分*MpNramp*

图3 *MpNramp*在不同苹果品种的不同器官中的表达模式Fig. 3 Expression patterns of *MpNramp* in different organs of different apple varieties

(尤其是*MpNramp7*和*MdNramp8*)对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 的吸收贡献不大,比如,*MpNramp1*、6的表达,在 Fe^{2+} 长期和短期处理下,都没有明显变化,即不受外源铁的影响,这与水稻*OsNramp1*不能运输铁离子(Chang等2020)可能有些共性特征。

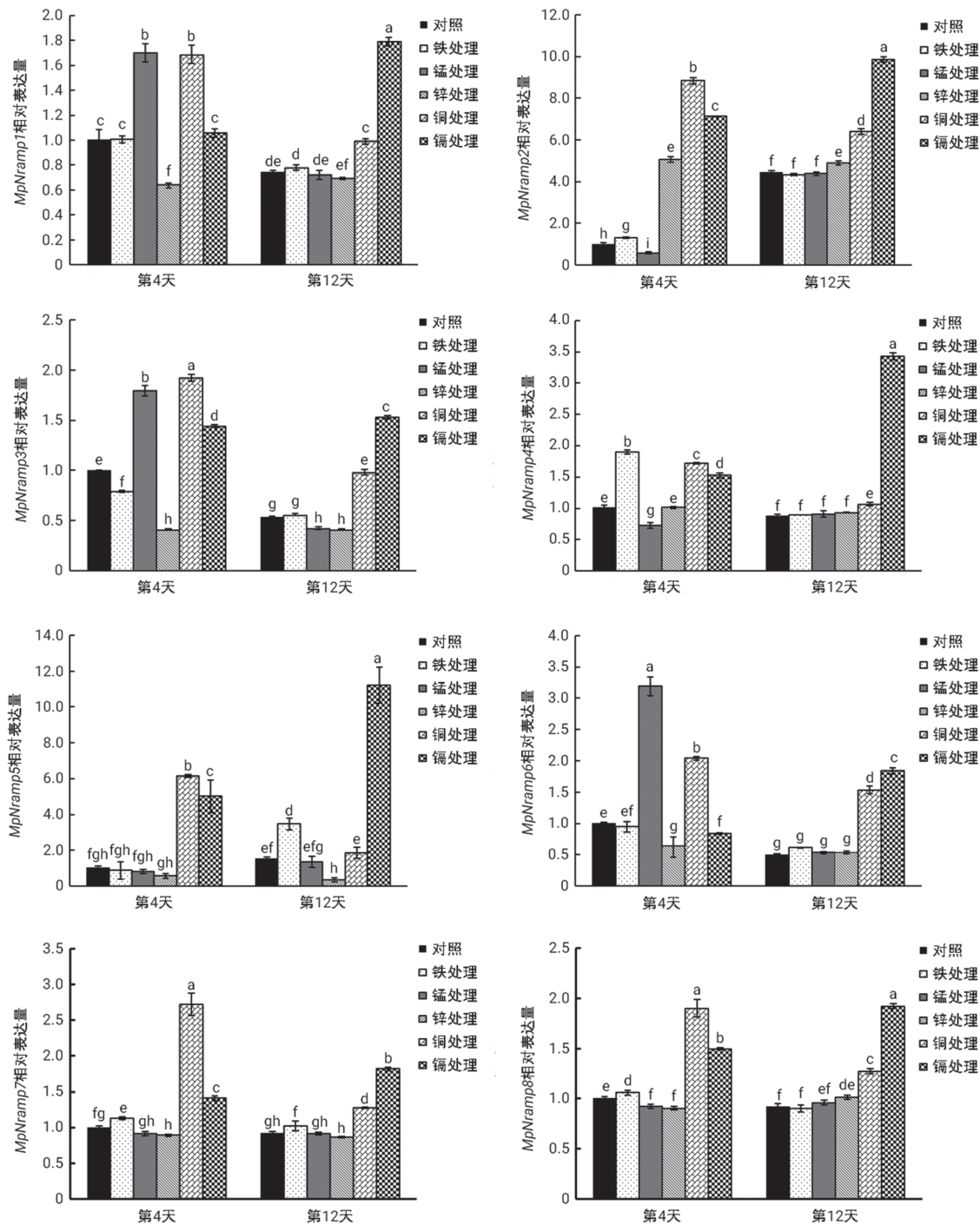
由于重金属离子在土壤中首先由植物根系感知和吸收,然后再向地上部进行转运,根系*Nramp*对重金属的反应普遍比叶片的敏感。比如,在 Zn^{2+} 处理下,马铃薯*StNramp*在根系中的上调表达明显早于在叶片中,上调幅度也显著高于叶片(Tian等2021);在 Fe^{2+} 处理24 h,大豆3个*GmNramp*在根中表达下调,而在叶中的表达量没有明显变化(Qin等2017)。苹果同属植物湖北海棠根系*MhNramp1*在 Cd^{2+} 处理显著上调, Cd^{2+} 的吸收也被显著促进,说明根系*MhNramp1*具有促进镉吸收的功能(Zhang等2020)。土壤重金属首先被根系吸收,苹果根系*MpNramp*对于重金属离子的反应也可能比叶片的更加迅速。

拟南芥*AtNramp2*被鉴定为 Mn^{2+} 转运蛋白(Gao等2018),*MpNramp1*与*AtNramp2*亲缘关系近,且对 Mn^{2+} 处理敏感,因此预测其在苹果中应能够参与 Mn^{2+} 的转运。在8个*MpNramp*中,只有*MpNramp2*表达对 Zn^{2+} 处理反应最敏感,在 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 三种营养离子中, Zn^{2+} 使*MpNramp2*上调表达最高,这些暗示*MpNramp2*在 Zn^{2+} 吸收转运中会发挥作用。苹果*MpNramp3*、6在 Mn^{2+} 处理第4天均表达上调(图4),这两个基因与拟南芥*AtNramp3*、4有较近的亲缘关系(图1),而*AtNramp3*、4均有转运 Mn^{2+} 的功能

(Lanquar等2010),因此,*MpNramp3*、6也可能参与苹果对 Mn^{2+} 的跨膜转运。拟南芥*AtNramp1*具有明显的铁转运功能(Curie等2000),将苹果同属植物湖北海棠的*MhNramp1*转入烟草和苹果愈伤组织,明显促进转基因株系对镉的吸收和转运(Zhang等2020),而与*AtNramp1*和*MhNramp1*亲缘关系最近的苹果*MpNramp4*在铁离子处理第4天表达显著上调,在镉离子处理第4天和第12天后表达都显著上调,这说明*MpNramp4*也应具有转运铁和镉离子的功能,并且外界较高浓度的镉离子会增强苹果对镉的吸收。在 Cu^{2+} 处理第4天,*MpNramp3*、7和8表达量最高,在处理第12天也呈现较高的上调表达,暗示*MpNramp3*、7和8可能会参与苹果对铜离子转运。

参考文献(References)

- Bastow EL, Garcia de la Torre VS, Maclean AE, et al (2018). Vacuolar iron stores gated by NRAMP3 and NRAMP4 are the primary source of iron in germinating seeds. *Plant Physiol*, 177 (3): 1267–1276
- Berezky Z, Wang HY, Schubert V, et al (2003). Differential regulation of *nramp* and *irt* metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *J Biol Chem*, 278 (27): 24697–24704
- Bozzi AT, Gaudet R (2021). Molecular mechanism of nramp-family transition metal transport. *J Mol Biol*, 433 (16): 166991
- Cailliatte R, Lapeyre B, Briat JF, et al (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem J*, 422 (2): 217–228
- Cailliatte R, Schikora A, Briat JF, et al (2010). High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is

图4 *MpNramp*在重金属胁迫下的表达模式Fig. 4 Expression pattern of *MpNramp* under heavy metal stress不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. Plant Cell, 22 (3): 904–917
 Chang JD, Huang S, Yamaji N, et al (2020). OsNRAMP1

transporter contributes to cadmium and manganese uptake in rice. Plant Cell Environ, 43 (10): 2476–2491
 Chang JD, Xie Y, Zhang H, et al (2022). The vacuolar trans-

- porter OsNRAMP2 mediates Fe remobilization during germination and affects Cd distribution to rice grain. *Plant Soil*, 476 (1-2): 79–95
- 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 HM, Wang YM, Yang HL, et al (2019). NRAMP1 promotes iron uptake at the late stage of iron deficiency in poplars. *Tree Physiol*, 39 (7): 1235–1250
- Chen KX, Jiang XD, Zhu ZJ, et al (2020). Advances in the study of plant Nramp family involved in metal ion absorption and distribution. *Plant Physiol J*, 56 (3): 345–355 (in Chinese with English abstract) [陈可欣, 蒋贤达, 朱祝军等(2020). 植物Nramp家族参与金属离子吸收和分配的研究进展. *植物生理学报*, 56 (3): 345–355]
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, et al (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem J*, 347 (3): 749–755
- Gao H, Xie W, Yang C, et al (2018). NRAMP2, a trans-Golgi network-localized manganese transporter, is required for *Arabidopsis* root growth under manganese deficiency. *New Phytol*, 217 (1): 179–193
- Ishida JK, Corcino D (2022). Role of natural resistance-associated macrophage proteins in metal ion transport in plants. In: Upadhyay SK (ed). *Cation Transporters in Plants*. Academic Press, 337–356
- Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, et al (2012). Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Scient Rep*, 2: 286
- Lanquar V, Ramos MS, Lelièvre F, et al (2010). Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency. *Plant Physiol*, 152 (4): 1986–1999
- Li J, Duan Y, Han Z, et al (2021a). Genome-wide identification and expression analysis of the NRAMP family genes in tea plant (*Camellia sinensis*). *Plants (Basel)*, 10 (6): 1055
- Li J, Wang Y, Zheng L, et al (2019). The intracellular transporter AtNRAMP6 is involved in Fe Homeostasis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 10: 1124
- Li Y, Li J, Yu Y, et al (2021b). The tonoplast-localized transporter OsNRAMP2 is involved in iron homeostasis and affects seed germination in rice. *J Exp Bot*, 72 (13): 4839–4852
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Nevo Y, Nelson N (2006). The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1763 (7): 609–620
- Ovečka M, Takáč T (2014). Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. *Biotechnol Adv*, 32 (1): 73–86
- Qin L, H PP, Chen LY, et al (2017). Genome-wide identification and expression analysis of NRAMP family genes in soybean (*Glycine Max* L.). *Front Plant*, 8: 1436
- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML (2000). Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (22): 12356–12360
- Romè C, Huang XY, Danku J, et al (2016). Expression of specific genes involved in Cd uptake, translocation, vacuolar compartmentalisation and recycling in *Populus alba* Villafrañca clone. *J Plant Physiol*, 202: 83–91
- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, et al (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell*, 24 (5): 2155–2167
- Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, et al (2011). The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J Exp Bot*, 62 (14): 4843–4850
- Thomine S, Wang R, Ward JM, et al (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (9): 4991–4996
- Tian W, He G, Qin L, et al (2021). Genome-wide analysis of the NRAMP gene family in potato (*Solanum tuberosum*): Identification, expression analysis and response to five heavy metals stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 208: 111661
- Wang XQ, Hu XY, Chen YJ, et al (2016). Effect of biochar and modified biochar on the adsorption and immobilization of heavy metals in water environment. *Environ Eng*, 34 (12): 32–37 (in Chinese with English abstract) [王向前, 胡学玉, 陈窃君等(2016). 生物炭及改性生物炭对水环境中重金属的吸附固定作用. *环境工程*, 34 (12): 32–37]
- Yang M, Zhang W, Dong H, et al (2013). OsNRAMP3 is a vascular bundles-specific manganese transporter that is responsible for manganese distribution in rice. *PLOS One*, 8 (12): e83990
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF (2021). Buckwheat FeNramp5 mediates high manganese uptake in roots. *Plant Cell Physiol*, 62 (4): 600–609
- Yue X, Song J, Fang B, et al (2021). BcNRAMP1 promotes the absorption of cadmium and manganese in *Arabidopsis*. *Chemosphere*, 283: 131113
- Zhang SX, Lu HY, Li YQ, et al (2019). Recent advances of researches on detection methods of heavy metals in agricultural products. *Physical Chemic Examin (Chem)*, 55 (8): 976–983 (in Chinese) [张舒玄, 卢海燕, 李优琴等(2019). 农产品中重金属的检测方法研究进展. *理化检验(化学分册)*, 55 (8): 976–983]
- Zhang W, Yue S, Song J, et al (2020). MhNRAMP1 from *Malus hupehensis* exacerbates cell death by accelerating Cd uptake in tobacco and apple calli. *Front Plant Sci*, 11: 957
- Zhao FJ, Tang Z, Song JJ, et al (2022). Toxic metals and metalloids: uptake, transport, detoxification, phytoremediation, and crop improvement for safer food. *Mol Plant*, 15 (1): 27–44