

蒺藜苜蓿中 CDF 家族锌转运体 MtMTP3 的鉴定和表达调控分析

赵圣博 李友国 赵斌 林会

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 植物体内阳离子扩散协助蛋白(cation diffusion facilitator proteins, CDF)也称为金属耐受蛋白(metal tolerance protein, MTP), 在提高植物对锌抗性和调节锌在植物体内分布起到重要作用。本研究根据拟南芥 *AtMTP1* 基因序列从模式豆科植物蒺藜苜蓿基因组中鉴定了一个 CDF 家族锌转运体基因 *MtMTP3*。生物信息学分析表明 *MtMTP3* 编码 385 个氨基酸, 属于 CDF 家族锌转运体; 酵母功能互补实验证实 *MtMTP3* 具有转运 Zn 的功能; 基因表达检测结果显示 *MtMTP3* 主要在蒺藜苜蓿根部表达, 高浓度 Zn、Mn 或者缺 Fe 处理均能促进 *MtMTP3* 的表达, 表明该蛋白与根部重金属转运有关; RT-PCR 和定量 PCR 检测结果显示该基因在低磷条件下表达量升高, 接种丛枝菌根真菌能显著抑制 *MtMTP3* 表达, 即使在高浓度锌处理下, *MtMTP3* 表达也明显受到抑制。这些研究结果表明, 丛枝菌根真菌可能通过促进磷吸收, 进而调控 *MtMTP3* 基因的表达。

关键词 蒺藜苜蓿; 阳离子扩散协助蛋白家族; 金属耐受蛋白; 锌; 丛枝菌根真菌

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0052-09

锌是植物体内许多酶和辅助因子的组成成分, 对植物新陈代谢和生长发育有重要作用^[1]。世界上大约有 30% 的耕地缺乏锌, 长期以谷类为主食会使人体缺锌, 而锌也是人体缺少的第二大微量元素, 所以提高谷物锌含量对人类健康很重要^[2-3]。然而人类采矿、工业污水排放等活动使土壤中锌浓度达到毒性浓度, 对植物生长产生危害。植物在进化中已经形成一个稳态系统来调控锌的吸收、转运、储存和再利用^[4]。在植物体内, 阳离子扩散协助蛋白(cation diffusion facilitator proteins, CDF)也被称为金属耐受蛋白(metal tolerance protein, MTP), MTP 能将细胞质中过量的 Zn 等金属离子转运到液泡中, 对提高植物锌抗性和调节锌在植物体内分布起重要作用^[5]。

丛枝菌根真菌能与 80% 以上陆生植物共生形成丛枝菌根(arbuscular mycorrhiza, AM) 共生体^[6]。丛枝菌根真菌与植物共生能提高宿主植物营养水平和增强植物抗逆性^[7-9]。有研究证实, 在缺锌条件下丛枝菌根真菌能将其吸收的锌转运给植物, 从而提高植物锌营养水平^[10-12]。而在高锌条件下

AM 能够降低植物对锌的吸收和转运^[13-15]。丛枝菌根真菌最显著效应是能促进植物磷吸收, 并且 AM 在促进植物磷吸收和锌吸收间存在相互作用^[16-17]。

目前丛枝菌根真菌对植物重金属吸收转运影响的研究主要集中于生理方面, 而对于其分子机制研究所知甚少。由于大部分农作物都能与丛枝菌根真菌形成共生关系, 研究丛枝菌根真菌改善植物 Zn 营养的机制对提高农作物品质有重要意义。本研究根据拟南芥 *AtMTP1* 基因序列从蒺藜苜蓿基因组中鉴定到一个 CDF 家族锌转运体 *MtMTP3*, 并探讨丛枝菌根、磷、重金属对 *MtMTP3* 基因表达的影响, 以为丛枝菌根真菌调节植物锌吸收的分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) A17 和农杆菌 MSU440 由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室张志明教授提供。质粒 pBI121、pUG23、pGADT7 和 AM 真菌 *Rhizophagus irregularis* 均

收稿日期: 2017-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670243); 广西自然科学基金面上项目(2015GXNSFAA139048); 华中农业大学预研项目

赵圣博, 硕士研究生, 研究方向: 菌根真菌分子生物学. E-mail: shengbo_ab@163.com

通信作者: 林会, 博士, 副教授, 研究方向: 菌根真菌分子生物学. E-mail: linhui@mail.hzau.edu.cn

由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室菌根室提供。

1.2 引物

本研究中用到的引物见表 1。

表 1 本研究中用到的引物

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
adh1-f	GCGAGCTCATCCTTTTGTGTTTCCGGGTGTAC
adh1-r	TGCTCTAGAGCTTGGAGTTGATTGTATGCTTGG
M13-r	ACATGCATGCCAGGAAACAGCTATGACCATG
MET-r	GGCTGCAGGAATTCGATATCAAG
Pmtp3-f	CTTTTGGTGGTATATACCTTG
Pmtp3-r	GCTCTAGACTGCAATATATTAATGAAAATGATT
MTP3-qf	GATCACATTCACCATCACGCAC
MTP3-qr	CTGCTCCTCCGATCATTACTCC
MtEF-f	ACTGGTGGTTTTGAAGCTGGT
MtEF-r	TGGTGGACCTCTCAATCATGT
MTP3-f	GCTCTAGAATGGATGCGCACAGCTCT
MTP3-r	CGGAATTCGGAACACTAGCGCTCTATCTGAATAGT

1.3 盆栽试验

对蕨藜苜蓿种子进行灭菌和催芽,当幼苗根部长到 2 cm 时进行移栽。盆栽用到的沙子和土于 121 °C 灭菌 3 h,沙子和土以 3 : 1 的体积比混匀后使用,每盆装 500 g。接种丛枝菌根真菌处理每盆加入 50 g *Rhizophagus irregulari* 接种剂,不接种丛枝菌根真菌的空白对照中加入 50 g 灭菌后的接种剂。盆栽试验于 22 °C 光照室内进行,光照 16 h,黑暗 8 h。前 2 周每 3 d 浇 1 次 1/2 浓度的 Hoagland 营养液,2 周后分别用含有 1 mmol/L ZnCl₂ 的 Hoagland 营养液、2 mmol/L MnCl₂ 的 Hoagland 营养液、不含 FeSO₄ 的 Hoagland 营养液、300 μmol/L CoCl₂ 的 Hoagland 营养液、0.065 mmol/L KH₂PO₄ 的 Hoagland 营养液对蕨藜苜蓿植株进行处理,每 3 d 浇 1 次。第 28 天收样,植物样品在液氮中速冻后放到 -80 °C 冰箱保存。试验重复 3 次,每个试验处理设置 4 个生物重复。菌根共生水平按照韩亚超等^[18]的方法进行计算。

1.4 蕨藜苜蓿总 DNA 和 RNA 提取以及 cDNA 合成

用植物总 DNA 提取试剂盒(天根试剂,Plant DNA mini kit)提取蕨藜苜蓿 DNA。用 Trizol(天根试剂,TRNzol 总 RNA 提取试剂)提取蕨藜苜蓿总 RNA,用 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性,用核酸定量仪(Thermo NANO Drop 2000)检测 RNA 的浓度。参考 Thermo 公司的反转录试剂盒操作手册进行反转录,合成第一链 cDNA,于 -20 °C 冰箱保存。

1.5 MtMTP3 基因克隆

根据 NCBI GenBank 中基因 MTR_8g024240 的 RNA 序列设计引物 MTP3-f (含有 *Xba* I 酶切位点)和 MTP3-r(含有 *Eco*R I 酶切位点)扩增 *MtMTP3* 的开放阅读框。反应程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 15 s,54 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 40 s,32 个循环;72 °C 延伸 10 min,降温至 16 °C 保存。将 PCR 产物连接到 T 载体(pMD19T,TaKa-Ra)上测序。

1.6 蕨藜苜蓿 MtMTP3 基因表达检测

设计 *MtMTP3* 基因的特异性引物(Mtp3q-F/R)和内参泛素结合酶 E2 基因(*E2 ubiquitin-conjugating enzyme, UBC2*)的引物(MtUBC2-F/R),对 *MtMTP3* 基因的表达情况进行检测。荧光定量染料为 FastStart Universal SYBR Green Master (ROX),反应体系为 10 μL,模板为 1 μL,正向和反向引物终浓度都为 30 μmol/L。反应在 ABI ViiA7 PCR 仪上进行,程序为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,54 °C 退火 25 s,72 °C 延伸 25 s,40 个循环。反应后对熔解曲线进行分析,用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *MtMTP3* 的相对表达量。用 SPSS 20 对结果进行统计分析。参考 Marone 等^[19]的方法进行半定量分析。

1.7 酵母互补实验

构建用于酵母功能互补实验的质粒 pYul2 (图 1),将带终止密码子的 *MtMTP3* 基因的开放阅读框片段连接到 pYul2 上,得到质粒 pYul2/MtMTP3。参考 Yeast Protocols 中的方法构建酵母 By4741 的突变株 Δ*zrc1cot1(zrc1 :: Ural, cot1 ::*

HIS)^[20]。将 pYul2 和 pYul2/MtMTP3 导入酵母突变株中,得到 $\Delta zrc1cot1/pYul2$ 、 $\Delta zrc1cot1/MtMTP3$ 酵母菌株,用于 MtMTP3 功能验证。

酵母 By4741 和突变株 $\Delta zrc1cot1$ 在含有完全氨基酸的 SD 液体培养基中过夜培养,收集酵母细胞并用无菌水洗 2 次后重悬酵母,使 D_{600} 为 1.0,然

后进行 10 倍梯度稀释。取 2 μ L 菌液点到不含 $ZnSO_4$ 和含 5 mmol/L $ZnSO_4$ 的固体 SD 培养基上,置于 30 $^{\circ}C$ 培养箱中生长 3 d 后拍照。对酵母菌株 $\Delta zrc1cot1/pYul2$ 和 $\Delta zrc1cot1/MtMTP3$ 也进行同样的点菌实验检测 MtMTP3 对 Zn 的转运能力,用到的 SD 培养基缺少尿嘧啶、组氨酸和亮氨酸等

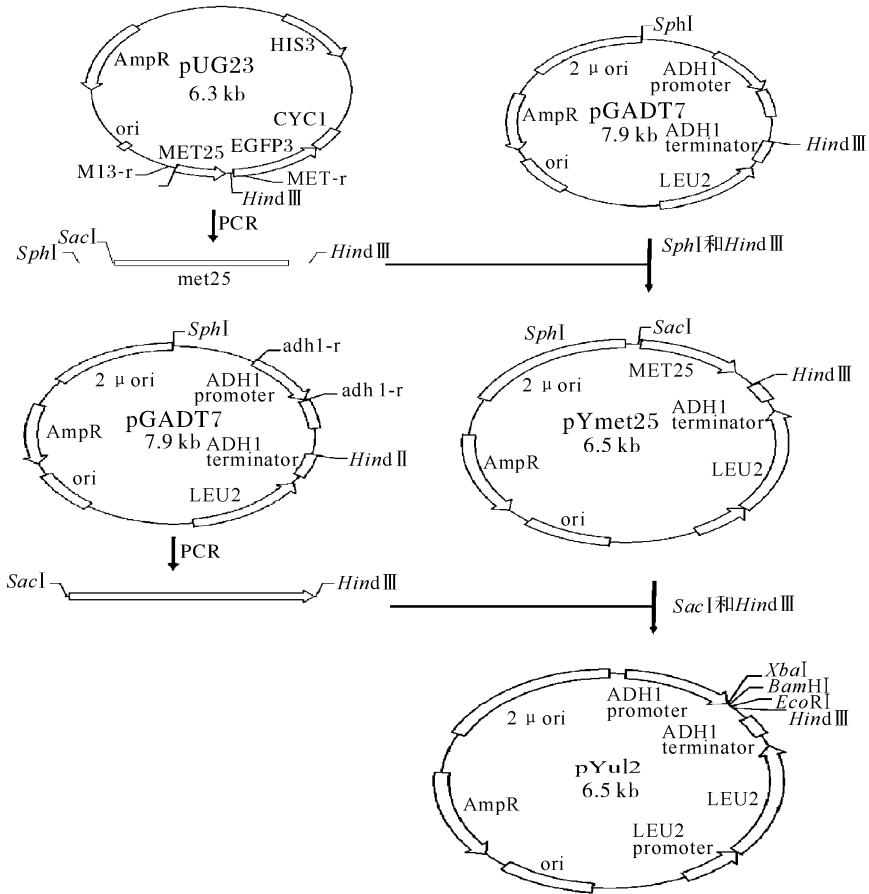


图 1 酵母功能互补质粒 pYul2 的构建

Fig.1 Construction of yeast functional complementation plasmid pYul2

3 种必需氨基酸。

2 结果与分析

2.1 蒺藜苜蓿 MtMTP3 基因的生物信息学分析

用拟南芥 *AtMTP1* 基因的蛋白质序列在 NCBI GenBank 进行 Blastp 比对,发现蒺藜苜蓿中有 2 个与其同源性很高的蛋白: MtMTP1 (基因序列号为 MTR_2g036390)^[21] 和 XP_013444540 (基因序列号为 MTR_8g02424)。蛋白 XP_013444540 与 MtMTP1 一致性为 77.89%, 并且和拟南芥 *AtMTP3* 进化关系较近, 将其命名为 MtMTP3。MtMTP3 基因开放阅读框有 1 155 个碱基序列, 编码 385 个

氨基酸。将 MtMTP3 蛋白质序列与拟南芥、水稻等植物中的同源 MTP 进行比对(图 2), 发现 MtMTP3 与 *AtMTP1* 的一致性为 58.11%, 与 *AtMTP3* 的一致性为 53.59%, 与 *OsMTP1* 的一致性为 56.06%。蛋白质结构分析发现 MtMTP3 蛋白与其他同源 MTP 蛋白一样, 都有 6 个保守的跨膜结构域, 在第四和第五跨膜结构域之间是一个富含组氨酸的多变区。这个多变区对锌转运并非必需, 其功能可能是感应液泡中锌浓度或者缓冲胞质中的锌^[22]。选取拟南芥的 12 个 MTP、蒺藜苜蓿 MtMTP3 及其他物种中的同源蛋白序列, 用 MEGA 6.0 程序以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建进化树(图 3), 结果显

示MtMTP3属于CDF家族锌转运体。通过ProtComp 9.0 (softberryhttp://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=rograms&subgroup=proloc)预测MtMTP3可能定位在植物液泡膜上,这和其他已经报道过的CDF家族锌转运体相同^[5],由此推测MtMTP3具有将锌转运到植物液泡中的功能。

2.2 蒺藜苜蓿 MtMTP3 的表达特征

为检测MtMTP3基因在各组织中的表达情况,分别提取生长在正常磷浓度(0.5 mmol/L)条件下的蒺藜苜蓿根、茎、新叶、成熟叶、老叶部位的RNA,反转录后进行荧光定量分析。定量PCR结果如图4所示,MtMTP3在根中表达水平最高,显

著高于其他组织;其次,在植物茎中表达较高,叶中表达最低;而在植物叶片中,成熟叶中表达较高。

2.3 不同重金属处理对MtMTP3基因表达的影响

用定量PCR检测不同重金属处理下MtMTP3在根部表达情况,结果如图5所示,在施加含有高浓度锌(1 mmol/L ZnCl₂)和缺铁(0 mmol/L FeSO₄)的Hoagland营养液时,MtMTP3的表达量是施加正常Hoagland营养液时的3倍,而在施加高浓度锰(2 mmol/L MnCl₂)后,MtMTP3表达量提高了5.5倍。但在高浓度钴(0.3 mmol/L Co)处理下,MtMTP3表达量有所下降,和施加正常Hoagland营养液时相比差异并不显著。因此,高浓度锌、锰和缺铁处理都能促进MtMTP3基因的表达。

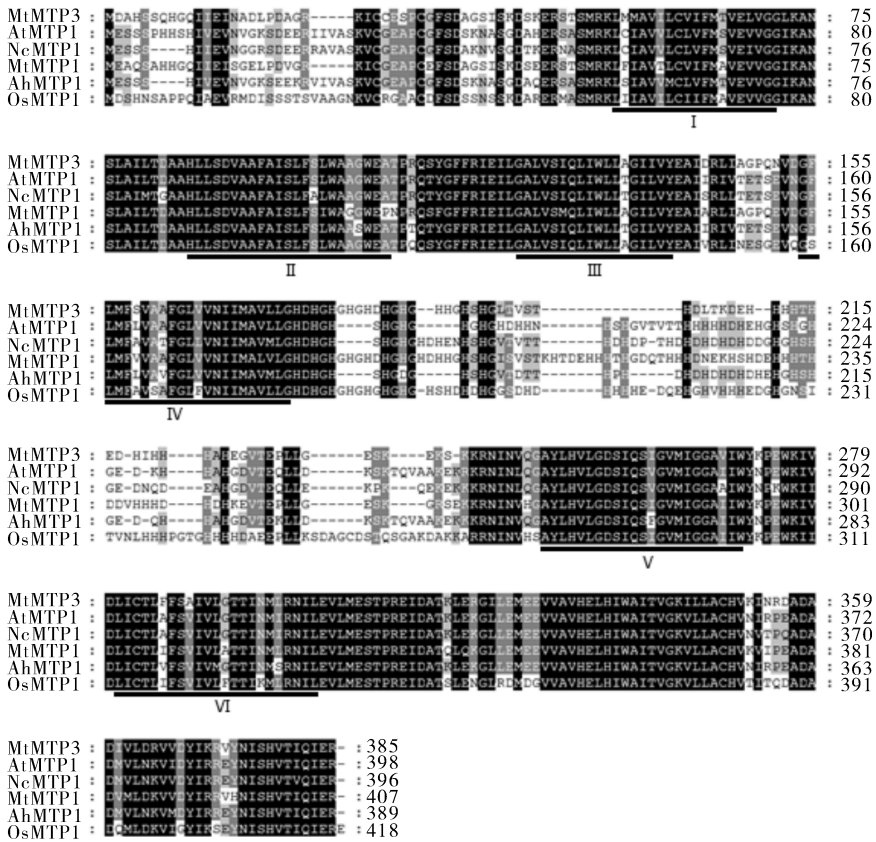


图2 预测的MtMTP3氨基酸序列及其同源蛋白的多序列比对

采用ClustalW 2.1对序列进行比对,相同和相似氨基酸用GENEDOC进行着色,参数为默认值。用横线标出的序列为跨膜结构域(I-VI)。图中显示的蛋白分别为:蒺藜苜蓿金属耐受蛋白MtMTP1(ACR54454)、MtMTP3(XP_013444540)、拟南芥金属耐受蛋白AtMTP1(Q9ZT63)、天蓝遏蓝菜金属耐受蛋白NcMTP1(AAK69428)、鼠耳芥金属耐受蛋白AhMTP1(CAY39366)、水稻金属耐受蛋白OsMTP1(ANH61875),下图同。Sequences were aligned using ClustW 2.1, identical and similar amino acids were shaded by GENEDOC. The spanning membrane domains were indicated as lines under the sequences (I-VI). The accession numbers of aligned MTPs are: *Medicago truncatula* MtMTP1 (ACR54454), MtMTP3 (XP_013444540), *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 (Q9ZT63), *Noccaea caerulea* NcMTP1 (AAK69428), *Arabidopsis halleri* AhMTP1(CAY39366), *Oryza sativa* OsMTP1 (ANH61875). The same as below.

Fig.2 Multiple alignment of predicted MtMTP3 protein with its homologous protein sequence

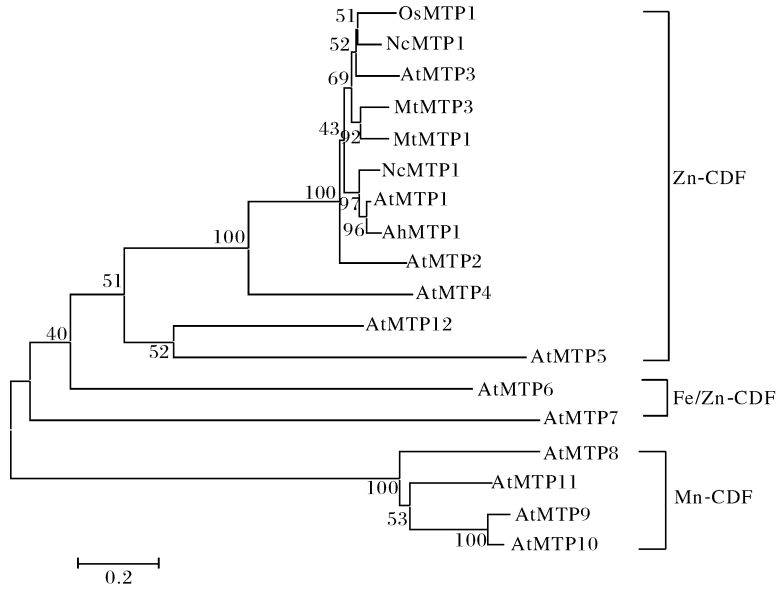


图 3 蕨藜苜蓿 MtMTP3 蛋白质序列和其他物种的 MTP 序列的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of MtMTP3 with MTP sequences from other species

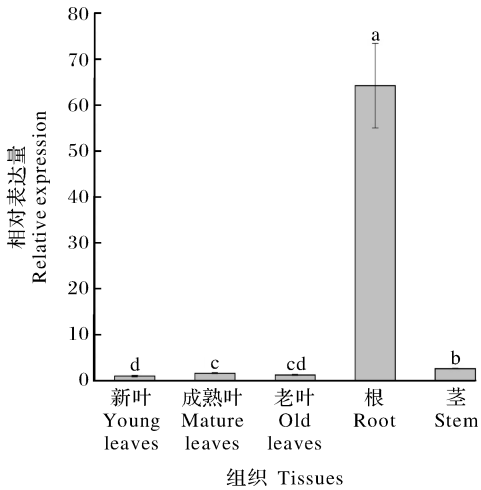


图 4 MtMTP3 在不同组织中的相对表达量
Fig.4 The relative expression of MtMTP3 in different tissues

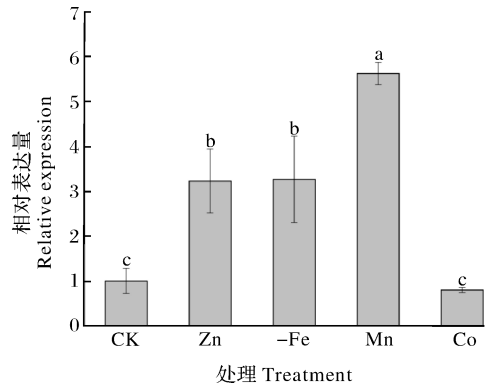


图 5 MtMTP3 基因在不同金属处理下的相对表达量
Fig.5 The relative expression of MtMTP3 in roots under different metal treatments

2.4 接种菌根真菌对 MtMTP3 基因表达的影响

分析 MtMTP3 基因的上游序列,发现上游序列中含有 2 个磷饥饿诱导的特异顺式元件—P1BS^[23],显示该基因的表达可能受到磷的调控。RT-PCR 检测低磷(0.065 mmol/L)和正常磷浓度(0.5 mmol/L)处理时 MtMTP3 基因的表达情况(图 6A),结果显示在低浓度磷条件下,MtMTP3 表

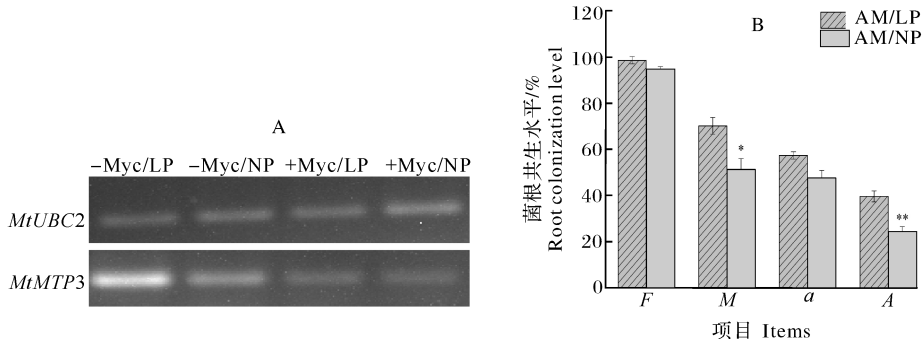
达量显著提高,说明该基因受到 P1BS 元件的调控,低浓度磷能诱导该基因的表达。

由于 P1BS 元件在菌根诱导表达基因调控中也有重要的作用^[24],因此,接种丛枝菌根真菌 *Rhizophagus irregulari* 后对低磷(0.065 mmol/L)和正常磷浓度(0.5 mmol/L)条件下的 MtMTP3 表达也进行了检测(图 6),结果显示低浓度磷能够增加

菌根侵染强度 *M* 和绝对侵染率 *A*, 接种丛枝菌根真菌后 *MtMTP3* 表达显著降低。

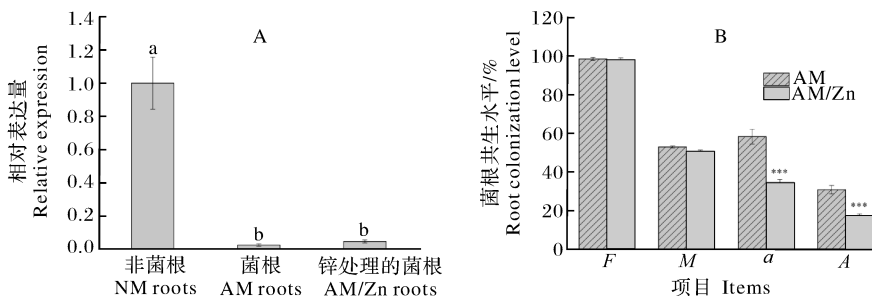
采用定量 PCR 检测蒺藜苜蓿不接种丛枝菌根真菌(NM root)、接种丛枝菌根真菌(AM root)以及丛枝菌根真菌和加锌(AM/Zn root)共同处理下 *MtMTP3* 基因表达水平(图 7A), 结果显示 *MtMTP3* 在 NM 根中表达量最高, 分别是 AM 根和 AM/Zn 根

的 40 倍和 21 倍。表明接种丛枝菌根真菌能够显著降低 *MtMTP3* 基因表达, 即使在高浓度锌处理下, *MtMTP3* 基因的表达也明显受到抑制。而统计加锌和不加锌处理下的共生情况(图 7B), 发现在 2 种处理条件下侵染率 *F* 和侵染强度 *M* 相近, 但加锌处理后相对丛枝率 *a* 和绝对丛枝率 *A* 都明显低于不加锌处理, 说明加锌处理能够明显抑制丛枝的形成。



A: 半定量 RT-PCR 检测 *MtMTP3* 在不同浓度磷和菌根真菌处理下的表达情况, 内参基因为 *MtUBC2*; -Myc 为不加菌根真菌, +Myc 为加菌根真菌, LP 为低磷, NP 为正常磷, 下同; B: 在低磷和正常磷处理下菌根共生水平, *F* 为侵染率, *M* 为侵染强度, *a* 为相对丛枝率, *A* 为绝对丛枝率, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, 下同。A: Semi-quantitative RT-PCR analysis the expression of *MtMTP3* in the arbuscular mycorrhizal under low and normal P conditions, *MtUBC2* is reference gene; -Myc indicated the uncolonized roots, +Myc indicated the roots colonized with *Rhizophagus irregularis*; LP and NP indicated the plant grew under low and normal phosphate condition; B: Estimation of mycorrhizal colonization level under low and normal P conditions; *F* indicated the frequency of mycorrhiza in the root system, *M* indicated the intensity of the mycorrhizal colonization in the root system, *a* indicated the arbuscule abundance in mycorrhizal parts of root fragments, *A* indicated the arbuscule abundance in the root system; * show $P < 0.05$ level, ** show $P < 0.01$ level, the same as below.

图 6 在低磷和正常磷处理下 *MtMTP3* 在菌根中的表达情况以及菌根共生水平
Fig.6 Estimation of mycorrhizal colonization and the expression of *MtMTP3* in the arbuscular mycorrhizal under low and normal P conditions



A: 在正常锌和高锌处理下 *MtMTP3* 在菌根中的相对表达量; B: 在正常锌和高锌处理下菌根共生水平, *** 表示与正常锌处理的差异显著水平 $P < 0.001$ 。A: The relative expression of *MtMTP3* in the arbuscular mycorrhizal under normal and high Zn conditions; B: Estimation of mycorrhizal colonization grown under normal and high Zn conditions; *** show $P < 0.001$.

图 7 在正常锌和高锌处理下菌根共生水平以及 *MtMTP3* 在丛枝菌根中的相对表达量
Fig.7 Estimation of mycorrhizal colonization and the relative expression of *MtMTP3* in the arbuscular mycorrhizal under normal and high Zn conditions

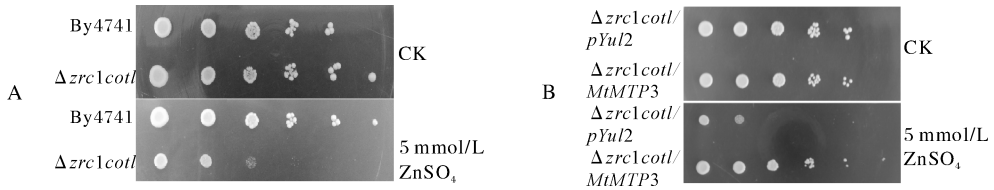
2.5 *MtMTP3* 锌转运功能的验证

在酵母中 *Zrc1* 和 *Cot1* 定位到液泡膜上, 能将

过量的 Zn 和 Co 转运到酵母液泡中, 突变后 *zrc1* 和 *cot1* 会使酵母对 Zn 敏感^[25]。由于植物 MTP 锌

转运体主要转运 Zn 到植物液泡中,因此构建酵母突变株 $\Delta zrc1cot1(zrc1::Ura1,cot1::HIS)$ 用于酵母功能互补实验。用野生型酵母 By4741 作阳性对照检测酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 对锌的敏感性(图 8A),结果显示:在不加 $ZnSO_4$ 的 SD 培养基上,突变株 $\Delta zrc1cot1$ 和野生型菌株 By4741 长势相近,而在含有 5 mmol/L $ZnSO_4$ 的 SD 培养基上,野生型酵母 By4741 生长不受影响,而 $\Delta zrc1cot1$ 突变株生长明显受到抑制。将空载体 pYul2 和 pYul2/MtMTP3 质粒导入 $\Delta zrc1cot1$ 突变株中,通过点菌

实验来检测 MtMTP3 锌转运功能。结果如图 8B 所示,在不加 $ZnSO_4$ 的 SD 培养基上,含空载质粒的突变株 $\Delta zrc1cot1/pYul2$ 和导入 pYul2/MtMTP3 质粒的突变菌株 $\Delta zrc1cot1/MtMTP3$ 长势相近,而在含有 5 mmol/L $ZnSO_4$ 的 SD 培养基上, $\Delta zrc1cot1/MtMTP3$ 和在不加 $ZnSO_4$ 的 SD 培养基上长势相同,而 $\Delta zrc1cot1/pYul2$ 生长明显受抑制。说明在酵母中表达 MtMTP3 能够增强酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 对锌的抗性, MtMTP3 具有锌转运功能。



A: 酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 对 Zn 的敏感性, $\Delta zrc1cot1$ 为酵母 By4741 的 *zrc1* 和 *cot1* 基因双突变菌株, By4741 为野生型酵母; B: 在酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 中表达 MtMTP3 对锌的敏感性。 $\Delta zrc1cot1/pYul2$ 是导入空载质粒 pYul2 的酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$, $\Delta zrc1cot1/MtMTP3$ 是导入含有 MtMTP3 质粒的酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 。 A: Zinc sensitivity of the yeast *zrc1cot1* double mutant strain $\Delta zrc1cot1$ compared with wild type strain By4741; B: Zinc resistance of the yeast mutant $\Delta zrc1cot1$ expressing MtMTP3, $\Delta zrc1cot1/pYul2$ indicated the yeast strain $\Delta zrc1cot1$ transformed with pYul2, $\Delta zrc1cot1/MtMTP3$ indicated the yeast strain $\Delta zrc1cot1$ transformed with pYul2/MtMTP3.

图 8 酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 以及在酵母突变株 $\Delta zrc1cot1$ 中表达 MtMTP3 对 Zn 的敏感性

Fig.8 Zinc sensitivity of the yeast mutant $\Delta zrc1cot1$ and the yeast mutant $\Delta zrc1cot1$ expressing MtMTP3

3 讨论

蒺藜苜蓿中的 MtMTP3 蛋白具有典型的 CDF 家族锌转运体特征:水溶性的 N 端和 C 端,6 个保守的跨膜结构域以及在跨膜结构域 4 和 5 之间富含组氨酸的多变区。进化分析显示 MtMTP3 处于 CDF 家族锌转运体分支,因此,推测 MtMTP3 是一个 CDF 家族锌转运体。

MTPs 具有转运 Zn 等金属离子到液泡中的作用。拟南芥中 *AtMTP3* 基因主要在植物根部表达,它能将根部过量的锌转运到液泡中,减少锌向地上部位转运^[26]。组织表达分析显示 MtMTP3 主要在植物根部表达,在高浓度锌处理下, MtMTP3 在根部表达量明显升高,表明 MtMTP3 可能具有拟南芥 *AtMTP3* 相同的功能,通过将过量的 Zn 转运到根部液泡中,降低 Zn 向地上部位转运,从而提高植物对 Zn 的抗性。而在蒺藜苜蓿中的同源锌转运蛋白 MtMTP1 在蒺藜苜蓿根部也有表达,但其在叶子中表达最高并且高浓度锌能抑制它在根中表达^[21],其表达模式与 MtMTP3 相反。因此, MtMTP1 和

MtMTP3 在 Zn 的转运和储存中可能担负着不同的功能。高浓度 Zn 处理时, MtMTP1 主要在地上叶中隔离 Zn,减少锌对叶的危害,而 MtMTP3 在植物根部固定 Zn,减少向地上部分转运。

CDF 家族锌转运体除了转运 Zn 以外,也具有转运其他重金属的功能。在缺铁处理下 MtMTP3 表达升高,虽然可能是由于缺铁条件下植物过量吸收锌,从而使 MtMTP3 表达升高,但也有研究证实植物缺铁本身会增强 MTP 基因表达^[27]。在缺铁条件下植物能够非特异性地过量吸收 Zn、Cd 等金属离子,除高亲和性铁吸收转运体 IRT1 表达升高外,其他转运 Zn、Cd 等金属的转运体表达也随着升高^[28],这些金属转运体表达量的提高能够降低非特异性吸收的金属离子对植物的危害^[29]。因此, MtMTP3 在缺铁条件下表达量升高很可能与维持缺铁条件下植物体内 Zn 稳态相关。Mn 不是 CDF 家族锌转运体的底物,但高浓度 Mn 处理能够增强 MtMTP3 基因表达。说明 MtMTP3 也与 Mn 的转运相关,其机制还需进一步研究。

植物缺磷时会通过 P1BS 元件调节相关基因表

达^[23],低磷处理对 *MtMTP3* 基因表达的影响很可能是通过启动子上的 P1BS 元件起作用的。在低磷条件下植物会吸收过量的锌^[30],此时 *MtMTP3* 的高表达能促进 Zn 向液泡内转运,从而能降低过量吸收的 Zn 对植物的危害。菌根真菌是一种有益的土壤微生物,它与植物共生能促进植物磷吸收,抑制低磷诱导基因的表达^[31]。菌根真菌可能通过促进植物磷吸收进而抑制 *MtMTP3* 的表达,但是也不能排除 *MtMTP3* 基因启动子中菌根特异性调控元件的存在,这需要进一步验证。菌根共生抑制 *MtMTP3* 基因表达,会减少 Zn 在蒺藜苜蓿根中的积累,从而使更多的 Zn 被转运到地上部,促进植物生长和光合作用。而在高锌处理下接种菌根真菌, *MtMTP3* 表达明显受到抑制,此时菌根中丛枝明显减少,菌丝体增多;菌丝体细胞壁上含有丰富的几丁质、纤维素等,对重金属有很强的吸附作用^[32]。在高锌处理下菌丝体增多,会吸附更多的 Zn 到菌根真菌的细胞壁上,减少植物对锌的吸收。这说明在高锌处理下菌根真菌除了通过增加植物磷吸收来抑制 *MtMTP3* 表达外,还能通过吸附作用来减少植物对 Zn 的吸收,降低植物体内 Zn 浓度,从而使 *MtMTP3* 表达量降低。

参 考 文 献

- [1] VALLEE B L, AULD D S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzyme and other proteins[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(24):5647-5659.
- [2] HACISALIHOGU G, KOCHIAN L V. How do some plants tolerate low levels of soil zinc mechanisms of zinc efficiency in crop plants? [J]. *New phytologist*, 2003, 159:341-350.
- [3] WELCH R M, GRAHAM R D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective[J]. *Journal of experimental botany*, 2004, 55(396):353-364.
- [4] CLEMENS S, PALMGREN M G, KRÄMER U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation [J]. *Trends in plant science*, 2002, 7(7):1360-1385.
- [5] RICACHENEVSKY F K, MENGUSER P K, SPEROTTO R A, et al. Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies[J]. *Frontiers in plant science*, 2013, 4:144-159.
- [6] SMITH S E, GIANINAZZI-PEARSON V. Physiological interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal plants[J]. *Annual review plant physiology plant molecular biology*, 1988, 39:221-244.
- [7] ORTAKÇI D, KAYA Z, ÇINAR A, et al. Mycorrhizal dependency of sour orange in relation to phosphorus and zinc nutrition [J]. *Journal of plant nutrition*, 2002, 25:1263-1279.
- [8] GAO X, KUYPER T W, ZOU C, et al. Mycorrhizal responsiveness of aerobic rice genotypes is negatively correlated with their zinc uptake when nonmycorrhizal [J]. *Plant and soil*, 2007, 290:283-291.
- [9] CAVAGNARO T R, JACKSON L E, SIX J, et al. Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production[J]. *Plant and soil*, 2006, 282:209-225.
- [10] COOPER K M, TINKER P B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas: II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur[J]. *New phytologist*, 1978, 81:43-52.
- [11] MEHRAVARAN H, MOZAFAR A, FROSSARD E. Uptake and partitioning of ³²P and ⁶⁵Zn by white clover as affected by eleven isolates of mycorrhizal fungi[J]. *Journal of plant nutrition*, 2000, 23(10):1385-1395.
- [12] JANSÁ J, MOZAFAR A, FROSSARD E. Long-distance transport of P and Zn through the hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus in symbiosis with maize[J]. *Afronomie*, 2003, 23:481-488.
- [13] DIAZ G, AZCÓN-AGUILAR C, HONRUBIA M. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metals (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygeum spartum* and *Anthyllis cytisoides* [J]. *Plant soil*, 1996, 180:241-249.
- [14] CHEN B, LI X, TAO H, et al. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc[J]. *Chemosphere*, 2003, 50(6):839-846.
- [15] WATTS-WILLIAMS S J, PAATTI A F, CAVAGNARO T R. Arbuscular mycorrhizas are beneficial under both deficient and toxic soil zinc conditions[J]. *Plant soil*, 2013, 317:299-312.
- [16] WATTS-WILLIAMS S J, CAVAGNARO T R. Arbuscular mycorrhizas modify tomato responses to soil zinc and phosphorus addition[J]. *Biology and fertility of soils*, 2012, 48:285-294.
- [17] WATTS-WILLIAMS S J, TURNEY T W, PATTI A F, et al. Uptake of zinc and phosphorus by plants is affected by zinc fertiliser material and arbuscular mycorrhizas[J]. *Plant and soil*, 2013, 376:165-175.
- [18] 韩亚超, 谢贤安, 耿聪, 等. 百脉根 *LysM* 型受体 *LcLRK1* 参与菌根真菌丛枝形成[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(3):38-48.
- [19] MARONE M, MOZZETTI S, RITIS D D, et al. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample[J]. *Biological procedures online*, 2001, 3:19-25.
- [20] WEI X. Yeast protocols [M]. 2nd edition. Totowa: Humana Press, 2008:129-144.
- [21] CHEN M, SHEN X, LI D, et al. Identification and characterization of MtMTP1, a Zn transporter of CDF family, in the *Medicago truncatula* [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2009, 47:1089-1094.

- [22] KAWACHI M, KOBAYASHI Y, MORI H, et al. A mutant strain *Arabidopsis thaliana* that lacks vacuolar membrane zinc transporter MTP1 revealed the latent tolerance to excessive zinc[J]. *Plant and cell physiology*, 2009, 50(6): 1156-1170.
- [23] RUBIO V, LINHARES F, SOLANO R, et al. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae[J]. *Genes development*, 2001, 15: 2122-2133.
- [24] CHEN A, GU M, SUN S, et al. Identification of two conserved cis-acting elements, MYCS and P1BS, involved in the regulation of mycorrhiza-activated phosphate transporters in eudicot species[J]. *New phytologist*, 2011, 189: 1157-1169.
- [25] MACDIARMID C W, MILANICK M A, EIDE D J. Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock[J]. *Journal of biological chemistry*, 2003, 278: 15065-15072.
- [26] SINCLAIR S A, KRÄMER U. The zinc homeostasis network of land plants[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2012, 1823: 1553-1567.
- [27] ARRIVAVULT 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]. *The plant journal*, 2006, 46(5): 861-879.
- [28] COLANGELO E P, GUERINOT M L. The Essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response[J]. *Plant cell*, 2004, 16: 3400-3412.
- [29] KERKEB L, MUKHERJEE I, CHATTERJEE I, et al. Iron-induced turnover of the *Arabidopsis* iron-regulated transporter1 metal transporter requires lysine residues[J]. *Plant physiology*, 2008, 146: 1964-1973.
- [30] MISSON J, RAGHOTHAMA K G, JAIN A, et al. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation[J]. *PNAS*, 2005, 102(33): 11934-11939.
- [31] CARBONNEL S, GUTJAHR C. Control of arbuscular mycorrhiza development by nutrient signals[J]. *Frontiers in plant science*, 2014, 5: 462-466.
- [32] GÖHRE V, PASZKOWSKI U. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation[J]. *Planta*, 2006, 223: 1115-1122.

Identification and expression analyses of MtMTP3, a zinc transporter of CDF family in *Medicago truncatula*

ZHAO Shengbo LI Youguo ZHAO Bin LIN Hui

*State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Sciences & Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract Zinc is an essential micronutrient for plant growth and development. The deficiency and excess of Zn is harmful to plants. In plants, CDF (cation diffusion facilitator proteins) also known as metal tolerance proteins (metal tolerance protein, MTP) can transport Zn to vacuole, thus regulate the absorption and translocation of Zn in plants. In current work, a zinc transporter of CDF family MtMTP3 was identified in model plant *Medicago truncatula*. The results of bioinformatics analyses showed that MtMTP3 encoded 385 amino acids. The results of phylogenetic analysis and sequence alignment showed that MtMTP3 is belonged to zinc transporter of CDF family. Expressing of *MtMTP3* in yeast increased the resistance of yeast to zinc. The results of expression analysis showed that *MtMTP3* was mainly expressed in root. When growing at high concentration of zinc, manganese or iron deficiency condition, the expression of *MtMTP3* were increased in root, indicating that *MtMTP3* may function as metal transporter in root. The results of semiquantitative RT-PCR showed that the expression of *MtMTP3* were significantly increased under low P condition. The expression of *MtMTP3* were decreased when it was inoculated AMF, even in high Zn condition. It is indicated that mycorrhiza may decrease the expression of *MtMTP3* via enhancing the absorption of phosphate.

Keywords *Medicago truncatula*; cation diffusion facilitator proteins; metal tolerance protein; zinc; arbuscular mycorrhiza fungi

(责任编辑:张志钰)