

杨树重金属相关异戊二烯化植物蛋白(HIPP s)基因的鉴定及表达分析

王 琪¹ 许志茹^{1 2} 陈瑾元² 张 双² 黄佳欢² 刘关君^{1 *}

(1. 东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室 哈尔滨 150040 ; 2. 东北林业大学生命科学学院 哈尔滨 150040)

摘 要 金属伴侣在植物的生理活动中发挥关键作用 , 负责结合金属离子并将其转运至靶蛋白以维持细胞的金属离子稳态。目前关于 HIPP (heavy metal – associated isoprenylated plant protein) 金属伴侣蛋白的特性和功能分析多集中于模式植物拟南芥。本研究在毛果杨(*Populus trichocarpa*) 中鉴定了 14 个 PtHIPP s 蛋白 , 均具有两个保守的金属离子结合基序 MXCXXC , 氨基末端可以形成 βαββαβ 二级结构 , 羧基末端具有保守的异戊二烯化基序 ; 一些 PtHIPP s 还具有赖氨酸和/或甘氨酸富集区。根据基因结构、蛋白质的保守基序和进化树分析 , PtHIPP s 蛋白可分为 3 个亚组。PlantGenIE 的组织特异性表达数据及荧光定量 PCR 鉴定结果显示 , 毛果杨 PtHIPP s 基因及小黑杨 (*Populus simonii* × *Populus nigra*) PnHIPP s 基因具有特定的组织表达特异性且存在差异。此外 , 利用缺铜及过量铜离子处理小黑杨植株不同时间后 , 不同组织部位中 PnHIPP s 基因的表达模式发生改变。本研究为鉴定木本模式植物杨树 HIPP s 蛋白在维持铜离子稳态过程中发挥的作用提供了参考依据。

关键词 杨树 HIPP s 蛋白 / 生物信息学分析 / 铜胁迫 / 基因表达

中图分类号 S792.11 **文献标志码** A **doi** 10.7525/j.issn.1673-5102.2019.06.017

Identification and Expression Analysis of Heavy Metal-associated Isoprenylated Plant Proteins(HIPP s) Genes in *Populus*

WANG Qi¹ XU Zhi-Ru^{1 2} CHEN Jin-Yuan² ZHANG Shuang² HUANG Jia-Huan² LIU Guan-Jun^{1 *}

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding , Northeast Forestry University , Harbin 150040 ; 2. College of Life Science , Northeast Forestry University , Harbin 150040)

Abstract Metal chaperones play key roles in plant physiological activities , and could bind metal ions and transport them to target proteins in order to maintain the metal ions homeostasis of cells. Currently , the properties and function analysis of the metal chaperones HIPP (heavy metal-associated isoprenylated plant protein) is mostly limited to the model plant *Arabidopsis thaliana*. In this study , 14 PtHIPP s were identified in *Populus trichocarpa* , all of which had two conserved metal ion binding motif MXCXXC , as well as the conserved isoprenylation motif in the carboxyl terminal. The amino terminal of PtHIPP s was form the βαββαβ secondary structure. Some PtHIPP s had lysine-rich and/or glycine-rich regions. PtHIPP s proteins could be divided into three subgroups according to gene structure , protein conservation motifs and phylogenetic analysis. The tissue-specific expression data of PlantGenIE and the results of fluorescence quantitative PCR identification showed that PtHIPP s genes of *P. trichocarpa* and PnHIPP s genes of *Populus simonii* × *Populus nigra* had tissue-specific expression characterizations and differences. In addition , the expression patterns of PnHIPP s in different tissues of *P. simonii* × *P. nigra* seedlings were changed after treated with copper deficiency or copper excess conditions

基金项目 : 黑龙江省自然科学基金项目(C2018009) ; 中央高校基本科研业务费专项基金 E 类项目(2572017EA05)

第一作者简介 : 王琪(1993—) 女 , 硕士研究生 , 主要从事林木遗传育种方面的研究。

* 通信作者 E-mail : liuguanjun2003@126.com

收稿日期 2019 - 04 - 24

Foundation item : Natural Science Foundation of Heilongjiang Province(C2018009) ; Special Fund for Basic Scientific research operation Fee of Central University(2572017EA05)

First author introduction : WANG Qi(1993—) female , master , mainly engaged in tree genetics and breeding.

* Corresponding author E-mail : liuguanjun2003@126.com

Received date 2019 - 04 - 24

for different times. This study provided theoretical groundwork for identifying the roles of HIPPs proteins in maintaining copper homeostasis in woody model plant *Populus*.

Key words *Populus*; HIPPs; bioinformatics analysis; copper stress; gene expression

金属离子在生物体内具有重要作用。据估计,生物体内大约超过一半的蛋白质都含有金属离子。这些金属离子在生物体的各种代谢反应中作为结构组分或催化因子发挥作用。但是过量的金属离子也具有潜在毒性。因此,生物体在进化过程中形成了复杂的调控机制确保各种金属离子稳态。此外,进入细胞的金属离子会被蛋白质和小分子配体螯合,这些金属离子的转运是通过金属伴侣蛋白完成的^[1~2]。在一些藻类、真菌和动物中,存在少量的金属伴侣-like 蛋白。在植物中,此类蛋白形成了大的基因家族,包括两种类型的蛋白质,即重金属相关植物蛋白(heavy metal-associated plant proteins, HPPs)和重金属相关异戊二烯化植物蛋白(heavy metal-associated isoprenylated plant protein, HIPPs)^[3~4]。

HIPPs 是维管植物特有的、在非生物胁迫和生物胁迫过程中发挥作用的蛋白质,一般含有 113 ~ 584 个氨基酸残基^[5]。此类蛋白包含一个或两个 HMA 结构域(heavy metal-associated domain)和羧基端(C 端)的异戊二烯化基序。大部分 HIPPs 蛋白在这两种元件之间存在甘氨酸富集区和/或脯氨酸富集区。异戊二烯化是蛋白质翻译后的一种修饰过程,异戊二烯化蛋白质的一个典型结构特点是蛋白质的 C 端都具有 CaaX 结构(C 代表半胱氨酸, a 代表脂肪族氨基酸, X 代表 C 端氨基酸,通常是甲硫氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸或丙氨酸),此结构对于蛋白质发挥生物学功能如蛋白质与膜互作、蛋白质之间的相互作用是十分重要的^[6~8]。1999 年, Dykema 等人首次描述并鉴定了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine max*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中的 HIPPs 蛋白,并证明此类蛋白可以通过 HMA 结构域的核心基序 M/LXCXXQ(M 代表甲硫氨酸, L 代表亮氨酸, X 代表任意氨基酸, C 代表半胱氨酸)与 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Zn^{2+} 结合^[9]。拟南芥 HIPP 蛋白家族包括 45 个成员,而水稻(*Oryza sativa*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)和粟米(*Setaria italica*)中分别含有 59、74 和 51 个 HIPPs 蛋白,这些蛋白被分为 5 个不同的类别(clusters)^[5]。

目前,关于 HIPPs 蛋白的研究多集中于此类

蛋白与病原菌侵染和非生物胁迫的相关关系等方面。小麦(*Triticum aestivum* L.)*TaHIPP1* 基因在生物及非生物胁迫条件下差异表达, Zhang 等通过病毒诱导的基因沉默证实, *TaHIPP1* 增强了植株对小麦条锈病(*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*, Pst)的易感性, 敲低 *TaHIPP1* 表达可以在一定程度上增强小麦对 P_{st} 的抗性^[10]。此外, 拟南芥 *HIPP27* 是甜菜胞囊线虫(*Heterodera schachtii*)的宿主易感性基因, 应答甜菜胞囊线虫侵染其表达量大量增加。过量表达 *HIPP27* 可以增加拟南芥对胞囊线虫的易感性。拟南芥 *hipp27* 突变体对胞囊线虫的易感性急剧降低^[11]。烟草敲除 *NbHIPP26* 后可以阻止马铃薯帚顶病毒(potato mop-top virus, PMTV)的长距离移动, 但不能阻止细胞-细胞之间的病毒移动。干旱和 PMTV 感染能够上调 *NbHIPP26* 基因表达, 而 PMTV 感染则可以保护烟草免受干旱胁迫^[12]。冬麦(*Hordeum vulgare* L. cv. Trixi) *HvFP1* 蛋白含有 HMA 结构域、核定位信号和异戊二烯化基序, 定位于细胞核。干旱胁迫、ABA 处理及叶片衰老能够诱导 *HvFP1* 基因表达^[13]。拟南芥 *HIPP26* 的表达受冷胁迫、盐胁迫和干旱胁迫诱导。定位于细胞核的 *HIPP26* 蛋白能够与锌指同源域转录因子 ATHB29 互作, 后者在脱水胁迫应答中发挥作用, 重金属结合基序 M/L/IXCXXC 的两个半胱氨酸在这种互作中至关重要。转录因子 ATHB29 也可以与拟南芥 *HIPP20*、*HIPP21*、*HIPP23*、*HIPP24*、*HIPP27*、*HIPP30* 互作。*HIPP26* 突变的拟南芥植株中 ATHB29 调控的胁迫相关靶基因的表达受抑制^[3]。拟南芥 *HIPP3* 是核定位的锌结合蛋白, 含有两个 HMA 结构域和 4 个核定位信号。ABA 处理和干旱胁迫抑制 *HIPP3* 基因表达。*HIPP3* 过量表达可以调控拟南芥 400 多个基因表达, 绝大多数基因与病原体应答有关, 尤其是水杨酸途径的基因。此外, *HIPP3* 过量表达也可以影响非生物胁迫应答基因及种子和花发育基因。*HIPP3* 过量表达植株开花延迟^[14]。小麦 *TaHIPP1* 基因在茎和叶中表达量较高, 且叶中的表达量受干旱和盐胁迫诱导。在施用 ABA 和创伤条件下, *TaHIPP1* 基因的表达量上调^[10]。

此外, HIPPs 蛋白也可能参与重金属稳态及解

毒机制。Tehseen 等的研究指出,拟南芥 HIPP20、HIPP22、HIPP26 和 HIPP27 蛋白都可以提高酵母 *ycf1* 突变体细胞的镉耐受性。拟南芥 *hipp20/21/22* 突变植株对镉敏感,地上部和根中镉的积累量低于野生型,由此推测此类蛋白通过结合镉参与镉解毒过程^[4]。拟南芥 *CdI19* 基因转化酵母后可以明显增加细胞对镉胁迫的耐受性。*CdI19* 蛋白含有两个重金属结合基序 M/LXCXXC,羧基末端有保守的异戊二烯化位点。*CdI19* 的转录可以被镉诱导,同时也可以被 Hg^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 诱导。过量表达 *CdI19* 的拟南芥植株镉耐受性增加^[8]。在酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中过量表达小麦 *TaHIPP1* 基因显著增加了细胞在铜胁迫($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuSO}_4$)和高盐胁迫条件下的生长率^[10]。Tehseen 等在研究拟南芥 HIPPs 蛋白和 HPPs 蛋白(包括已经鉴定的拟南芥铜伴侣蛋白 AtATX1、AtCCH 和 AtCCS)时发现,这些蛋白均含有 1 个或 2 个 HMA 结构域,HMA 结构域保守的氨基酸序列可以形成 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构^[4]。一部分拟南芥 HIPPs 蛋白的 HMA 结构域含有保守的 MXCXXC 基序,而此基序也是铜伴侣蛋白 AtATX1、AtCCH 和 AtCCS 共有的一致序列^[15-17],在结合铜及维持铜稳态过程中发挥重要作用^[18]。目前关于 HIPPs 蛋白与植物维持细胞铜稳态的相关关系还有待进一步研究证实。

杨树是重要的造林和用材树种,且已经成为林木分子生物学研究的模式植物^[19-20]。小黑杨(*P. simonii* × *P. nigra*)是小叶杨(*Populus simonii* Carr.)与欧洲黑杨(*Populus nigra* L.)的杂交种,生长速度快、适应能力强,具有较强的抗寒、抗旱、耐贫瘠及耐盐碱等生物学特性,在我国北方广泛种植^[21]。本研究利用生物信息学方法在毛果杨基因组中搜索鉴定了 14 个含有两个重金属结合基序 MXCXXC 的 *PtHIPPs* 基因家族成员,并分析了这些 *PtHIPPs* 的基因结构及编码蛋白的基序组成;鉴定了毛果杨 *PtHIPPs* 和小黑杨 *PnHIPPs* 基因的组织表达特异性,同时利用 qRT-PCR 技术检测了 *PnHIPPs* 基因应答铜胁迫的表达模式。本研究可以为初步阐明杨树 HIPPs 蛋白在维持细胞铜稳态过程中发挥的作用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 毛果杨 HIPP 蛋白家族成员的鉴定

从 phytozome(<https://phytozome.jgi.doe.gov/>

[pz/portal.html](https://portal.html))^[23]网站下载毛果杨的蛋白质数据库,并从 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载重金属结合结构域(HMA)的 HMM 文件。利用 HMMER(v 3.0)软件中的 *hmmer* 搜索命令,以 HMA.hmm 文件搜索杨树蛋白质数据库。此外,以含有 MXCXXC 基序的重金属结合结构域的毛果杨 PtATX1(POPTR_0008s02430)蛋白序列为探针,对毛果杨蛋白质数据库进行在线 BlastP 搜索。参数设置为:Target type = Proteome, Program = BLASTP-protein query to protein db, Expect(E) threshold = -5,其他参数默认。进一步筛选通过以上两种方法获得的蛋白质序列,筛选的标准为:蛋白质的氨基端(N端)含有 2 个 MXCXXC 保守基序,N 端可以形成 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构(利用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)软件进行二级结构预测),蛋白质 C 端含有 CaaX 异戊二烯化位点。筛选鉴定后最终获得了 14 个符合上述特征的毛果杨 *PtHIPPs* 蛋白。

1.2 *PtHIPPs* 蛋白的理化性质分析

根据筛选结果从数据库中下载毛果杨 *PtHIPPs* 蛋白的氨基酸序列。利用在线程序 ExPASy(<http://www.expasy.org/>)分析 *PtHIPPs* 蛋白的相关特征,包括氨基酸数目、分子量、等电点、脂肪系数和总平均亲水性等。利用 WoLF PSORT(http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)软件预测 *PtHIPPs* 蛋白的亚细胞定位。

1.3 外显子/内含子结构和保守基序分析

下载毛果杨 *PtHIPPs* 的基因组序列及 CDS 序列,利用 GSDS2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)软件鉴定 *PtHIPPs* 基因外显子和内含子的分布模式。进行 *PtHIPPs* 蛋白保守基序分析时使用 MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)软件,参数设置为:maximum number of different motifs to find = 10, minimum width = 6, maximum width = 50。

1.4 HIPPs 蛋白的同源序列比对及进化树分析

利用 BioEdit 软件比对 *PtHIPPs* 蛋白的氨基酸序列,并鉴定 MXCXXC 重金属结合保守基序、赖氨酸富集区、甘氨酸富集区及 CaaX 异戊二烯化位点。使用相同的方法和标准鉴定含有 2 个 MXCXXC 基序的拟南芥 AtHIPPs 和水稻(*Oryza sativa*)OsHIPPs 蛋白,并从数据库中下载这些蛋白的氨基酸序列。利用 *PtHIPPs*、AtHIPPs 和 OsHIPPs 蛋白的氨基酸序列,通过 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

1.5 毛果杨 *PtHIPP*s 基因组织表达特异性的鉴定

利用 PopGenIE 网站(<http://popgenie.org>)中毛果杨 *PtHIPP*s 基因在成熟叶片、幼叶、节点、节间和根中的表达数据构建组织特异性表达可视图。

1.6 植物材料及铜胁迫处理方法

小黑杨试材取自东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室实验林场。插条的培养、幼苗的截顶生根及培养条件参照 Xu 等的方法^[21]。生根后的幼苗移至蛭石中,每 2 d 浇灌一次 1/2 霍格兰德营养液(改良后的 Hoagland nutrient solution,含 0.5 μmol · L⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O)。2 周后,将一部分苗用于鉴定小黑杨 *PnHIPP*s 基因的组织表达特异性^[21]。将剩余部分苗利用不含 Cu²⁺(缺铜处理)入含 0.5 μmol · L⁻¹ Cu²⁺(正常铜浓度:对照组),10 μmol · L⁻¹ Cu²⁺(过量铜处理)的 1/2 霍格兰德营养液继续培养小黑杨幼苗 3、12、72 h。将叶片长度达到 2cm 的第一个展开的叶片命名为 LPI0

(LPI:leaf plastochron index)^[22]。取材方式为:分别对植株的根、茎、成熟叶片(LPI 7-9)和幼叶(LPI 0-2)进行取材,液氮速冻后 -80℃ 保存。每个处理重复 3 次。

1.7 RNA 的提取及 qRT-PCR 分析

利用 pBIOZOL 植物总 RNA 提取试剂盒(杭州 BioFlux)提取试材总 RNA。去除基因组 DNA 后,使用 PrimeScriptTM RT reagent Ki(TaKaRa)进行反转录合成 cDNA 第一条链。根据 *PtHIPP*s 基因序列设计定量引物,以毛果杨 *PtUBQ7* (XM_002306689.2)和 *PtCDC2*(XM_002305968.2)基因作为内参基因(表 1)^[21]。按照康为世纪的 Ultra-SYBR Mixture(LowROX)试剂盒中 20 μL 反应体系的说明加样,在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行 Real-time PCR 反应。每个样品重复 3 次,采用 2^{-ΔΔCT}法进行基因的相对定量分析^[24~25],鉴定小黑杨 *PnHIPP*s 基因应答铜胁迫处理的表达模式及 *PnHIPP*s 基因的组织表达特异性。

表 1 用于 qRT-PCR 的引物序列
Table 1 Primers used for qRT-PCR identification

基因 Gene	正向引物序列 Forward primer sequences (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequences (5'→3')	基因 Gene	正向引物序列 Forward primer sequences (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequences (5'→3')
<i>PtHIPP22.1</i>	ATGAAGGGCACTTTATGG	GAACATTTATGTAAGGTGGG	<i>PtHIPP59.7</i>	AGAAAGTAGAGGAGGAGAAGAC	AGCCCTCACAATGCATGTA
<i>PtHIPP49.1</i>	AGCTAACTGCTTCCTTCTCA	AGACTGGAAGCACACCACTA	<i>PtHIPP61.1</i>	CCTCCACCACAGCCACTTA	CACACGAGAAACTTCACCCAT
<i>PtHIPP59.1</i>	GGCCAAAGCAGAAGCTAAAGA	CCTGCCCTCATTTTCATAGTT	<i>PtHIPP63.1</i>	AGGACATGTAGATGCCGCC	CAGCCTCTCATAGACTGCC
<i>PtHIPP59.4</i>	GGCCAAAGCAGAAGCTAAAGA	TCCTGCCCTCATTTTCATAGTT	<i>PtUBQ7</i>	GGAACGGCTTGAGGAGAAAGAAG	GCAAGAACAAGTGAAGCACAGAGC
<i>PtHIPP59.6</i>	GGCCAAAGCAGAAGCTAAAGAI	TCCTGCCCTCATTTTCATAGTT	<i>PtCDC2</i>	ATTCGCCCAAGTGGCCTTCTAAG	TATTTCATGCTCCAAGCACTCC

2 结果与分析

2.1 毛果杨 *HIPP* 蛋白家族成员的理化性质分析

搜索鉴定后在毛果杨基因组中获得了 14 个含有 2 个重金属结合基序 MXCXXC 的 *PtHIPP*s 蛋白编码基因,其中部分成员是同一基因的不同转录本,包括 *PtHIPP22.1* 和 *PtHIPP22.2*,*PtHIPP49.1* 和 *PtHIPP49.2*,*PtHIPP59.1*、*PtHIPP59.2*、*PtHIPP59.4*、*PtHIPP59.5*、*PtHIPP59.6* 和 *PtHIPP59.7*,*PtHIPP61.1*、*PtHIPP61.2* 和 *PtHIPP61.3*(表 2)。利用 ExPASy 和 WoLF PSORT 软件分析了 14 个 *PtHIPP*s 蛋白的理化性质,包括基因登录号和染色体位置、氨基酸数目、蛋白质分子量、等电点、脂肪系数、总平均亲水性(GRAVY)和亚细胞定位信息等(表 2)。

*PtHIPP*s 蛋白含有的氨基酸数目为 225 ~ 334 个,等电点为 5.34 ~ 9.08,既有酸性氨基酸又有碱性氨基酸。GRAVY 值皆为负值,表明 14 个 *PtHIPP*s 蛋白都是亲水性蛋白质。亚细胞定位结果显示,*PtHIPP*s 主要定位于细胞质和细胞核。

2.2 毛果杨 *HIPP* 蛋白家族成员的二级结构预测

14 个毛果杨 *PtHIPP*s 蛋白的二级结构预测结果如图 1 所示,*PtHIPP*s 蛋白的 N 端都可以形成保守的 βαββαβ 二级结构;其中,*PtHIPP22.1*、*PtHIPP49.1*、*PtHIPP49.2*、*PtHIPP59.1*、*PtHIPP59.6*、*PtHIPP59.7*、*PtHIPP61.1*、*PtHIPP63.1* 蛋白可以形成 2 个完整的 βαββαβ 二级结构。重金属结合基序 MXCXXC 均位于 βαββαβ 二级结构的第一个 α 螺旋内。

表 2 毛果杨 HIPP 蛋白家族成员的相关参数

Table 2 Parameters for the 14 identified PtHIPP s genes and deduced polypeptides present in the *P. trichocarpa* genome

基因名称 Gene name	登录号 Locus name Phytozone v3.0	氨基酸数目 Amino acid no.	分子 Molecular weight(Da)	理论等电点 Isoelectric points	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水性 Total average hydrophilicity	染色体位置 Chromosome location	亚细胞定位 Cellular localization
PtHIPP22.1	Potri.006G006100.1	261	29771.77	5.34	62.30	-1.193	Chr06 #15310..419144	Nucleus
PtHIPP22.2	Potri.006G006100.2	225	25430.95	6.31	65.78	-1.021	Chr06 #15310..419039	Nucleus
PtHIPP49.1	Potri.012G101400.1	326	36851.07	7.54	54.11	-1.221	Chr12 12640257..12642713	Nucleus
PtHIPP49.2	Potri.012G101400.2	282	32725.73	8.31	59.36	-1.198	Chr12 12640366..12642688	Nucleus
PtHIPP59.1	Potri.015G099500.1	334	37653.80	5.60	56.32	-1.139	Chr15 11854979..11857316	Nucleus
PtHIPP59.2	Potri.015G099500.2	269	30201.39	6.12	60.86	-0.955	Chr15 11854979..11857316	Cytosol
PtHIPP59.4	Potri.015G099500.4	269	30201.39	6.12	60.86	-0.955	Chr15 11854979..11857316	Cytosol
PtHIPP59.5	Potri.015G099500.5	269	30201.39	6.12	60.86	-0.955	Chr15 11854979..11857316	Cytosol
PtHIPP59.6	Potri.015G099500.6	331	37267.40	5.68	56.83	-1.116	Chr15 11854979..11857316	Nucleus
PtHIPP59.7	Potri.015G099500.7	277	31984.10	8.23	63.25	-0.988	Chr15 11854979..11857316	Nucleus
PtHIPP61.1	Potri.016G006600.1	267	30648.73	5.38	57.60	-1.342	Chr16 319396..322820	Nucleus
PtHIPP61.2	Potri.016G006600.2	231	26307.91	6.33	60.26	-1.197	Chr16 319396..322579	Cytosol
PtHIPP61.3	Potri.016G006600.3	231	26307.91	6.33	60.26	-1.197	Chr16 319396..322579	Cytosol
PtHIPP63.1	Potri.016G017600.1	243	27228.33	9.08	67.33	-0.846	Chr16 946724..947856	Cytosol

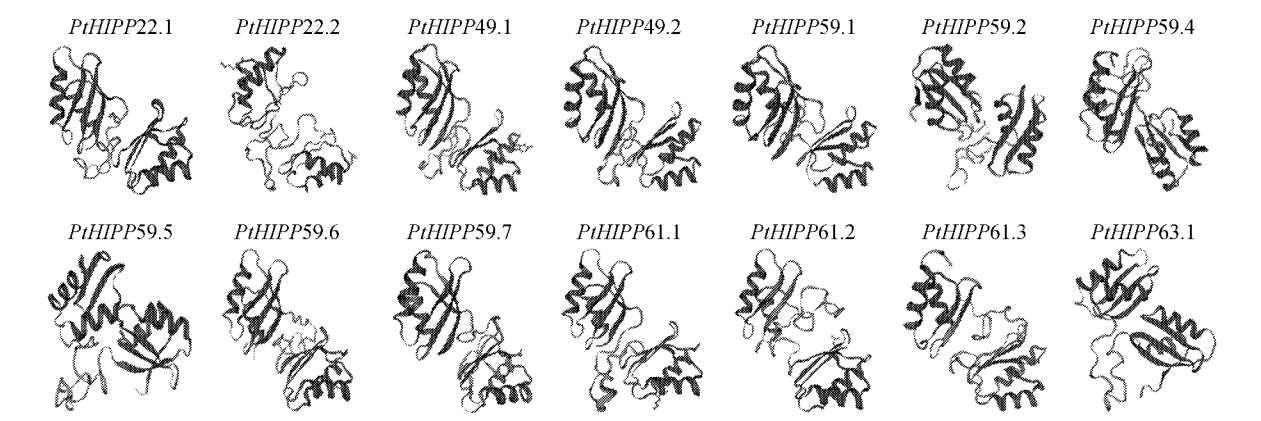


图 1 毛果杨 PtHIPP s 蛋白的二级结构预测结果

Fig.1 The predicted secondary structure of PtHIPP s in *P. trichocarpa*

2.3 毛果杨 PtHIPP s 蛋白氨基酸序列的同源性
比对

利用 BioEdit 软件对 14 个 PtHIPP s 蛋白的氨基酸序列进行同源性比对,结果显示(图 2),所有 PtHIPP s 蛋白的 N 端都具有 2 个重金属结合基序 MXCXXC,C 端具有异戊二烯化位点 CaaX ;某些 PtHIPP s 具有赖氨酸富集区(lysine-rich region)和甘氨酸富集区(glycine-rich region)。14 个 PtHIPP s 蛋白氨基酸序列的相似性为 36.67% ~ 100%。

2.4 HIPP s 蛋白的系统进化分析

使用相同的鉴定方法和标准获得了 2 个拟南

芥 AtHIPP s(AtHIPP07 和 AtHIPP08)和 3 个水稻 OsHIPP s(OsHIPP28、OsHIPP29 和 OsHIPP33)蛋白,这些蛋白质都含有 2 个 MXCXXC 重金属结合基序。通过 MEGA5.0 软件,利用 5 个 PtHIPP s(去除同一基因的不同转录本)、2 个 AtHIPP s 和 3 个 OsHIPP s 构建同源序列的系统进化树。结果表明(图 3),10 个 HIPP s 蛋白被归为 3 个亚组,亚组 I 包含 PtHIPP49、PtHIPP59、AtHIPP07、OsHIPP28 及 OsHIPP29 ,PtHIPP49、PtHIPP59 与 AtHIPP07 的亲缘关系较近;亚组 II 包含 PtHIPP22、PtHIPP61 和 OsHIPP33 ;亚组 III 包含 PtHIPP63 和 AtHIPP08。

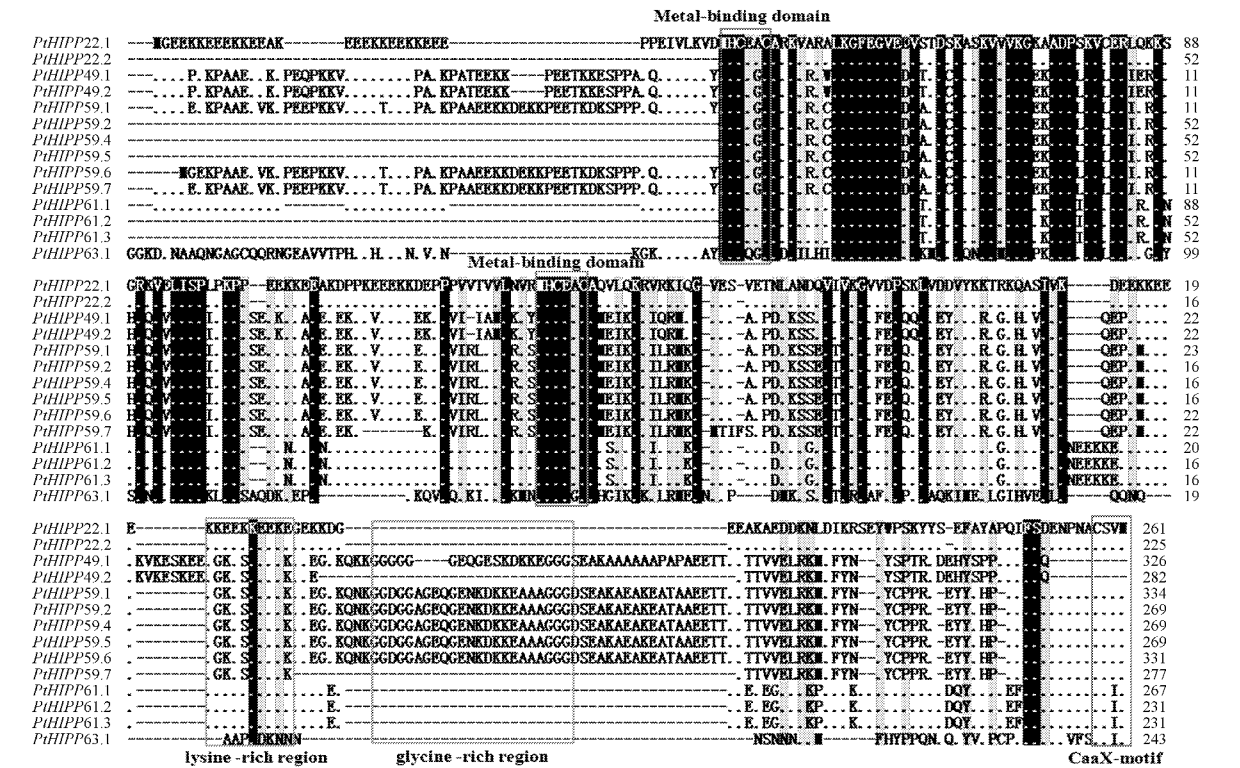


图2 PtHIPPs 蛋白氨基酸序列的同源性比较 红框表示保守的 MXCXXC 金属结合基序和 CaaX 异戊二烯化位点 绿框表示赖氨酸富集区和甘氨酸富集区 点(·)表示相同的氨基酸 连接号(-)是为了进行同源性比对加入的空格。

Fig.2 Homologous comparison of the amino acid sequences of PtHIPPs Red boxes indicate the conserved MXCXXC metal-binding motif and CaaX isoprenylation site ,and the green boxes indicate the lysine-rich region and glycine-rich region. Dots indicate the identical amino acids ,and dashes indicate gaps introduced to optimize the alignment.

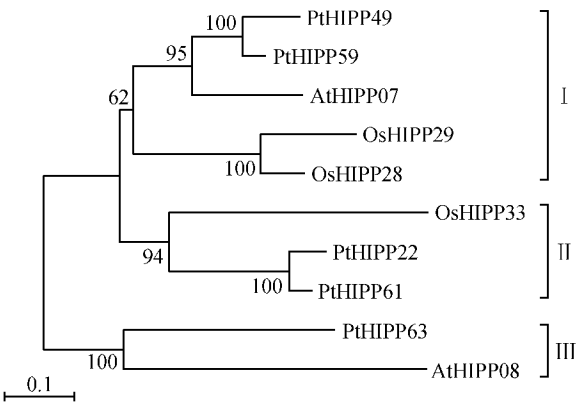


图3 毛果杨、拟南芥和水稻 HIPPs 蛋白的进化树分析
Fig.3 Phylogenetic analysis of HIPP proteins from *P. trichocarpa*, *A. thaliana* and *O. sativa*

2.5 PtHIPPs 外显子/内含子结构及编码蛋白的保守基序分析

PtHIPPs 基因的外显子/内含子结构分析结果显示(图4B) 5 个 PtHIPPs 基因具有相同的外显子/内含子结构,均含有 3 个内含子,但是内含子和外显子的长度存在差异。利用 MEME 软件在 PtHIPPs 蛋白序列中共预测了十个保守基序(命名

为 motif 1 ~ 10 (表 3, 图 4C)。PtHIPPs 蛋白都包含基序 1、2、3、4 和基序 5,且这 5 个基序在每个 PtHIPPs 蛋白中的排列顺序相同;基序 1 和基序 3 中分别包含一个重金属结合基序 MXCXXC。同一亚组中的 PtHIPPs 蛋白通常含有相似的基序组成,且基序的排列顺序也相同;不同亚组的 PtHIPPs 蛋白之间基序组成存在差异。基序 6 仅存在于 SI 亚组成员中;SII 亚组蛋白含有 8 ~ 9 个基序,且基序 7 和基序 10 仅存在于 SII 亚组蛋白中。SIII 与 SII 成员中基序 9 的位置存在明显差异。预测的这些基序在 PtHIPPs 蛋白中的相关功能还有待实验验证。

2.6 PtHIPPs 和 PnHIPPs 基因的组织表达特异性

利用 PopGenIE 网站中毛果杨 PtHIPPs 基因在成熟叶片、幼叶、节点、节间和根中的表达数据构建的组织特异性表达可视图显示, PtHIP22.1 和 PtHIP63.1 基因在成熟叶片中表达量较高, PtHIP61.1 基因在幼叶中大量表达; PtHIP49.1 在节间的表达量较高; PtHIP59.1、PtHIP59.4、PtHIP59.6 和 PtHIP59.7 基因具有相同的组织特异性表达模式,均在节点大量表达(图 5 A ~ H)。

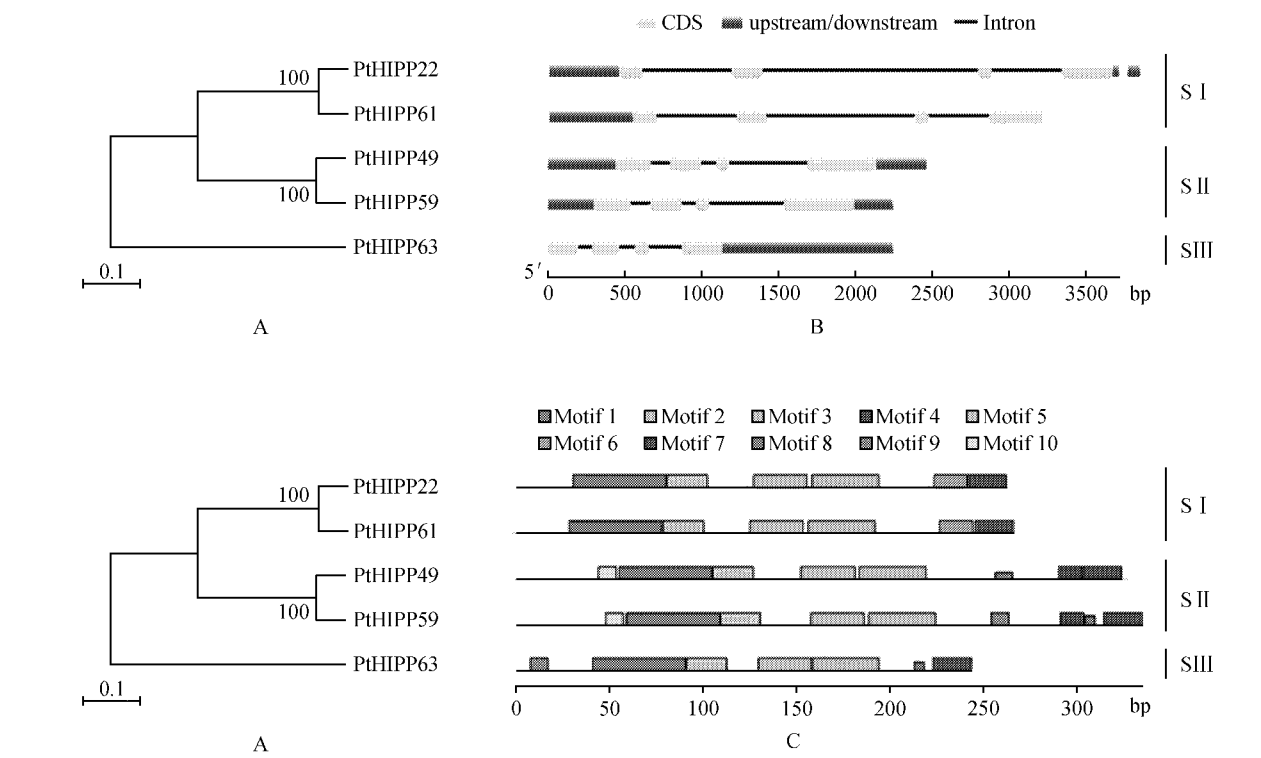


图 4 *PtHIPP_s* 基因结构及蛋白基序分析 A. *PtHIPP_s* 蛋白的进化分析 ;B. *PtHIPP_s* 基因的外显子/内含子结构(黄色表示 CDSs ; 蓝色表示上游/下游序列 黑线表示内含子) ;C. *PtHIPP_s* 蛋白的保守基序分析

Fig.4 Gene structure of *PtHIPP_s* and the motif analysis of *PtHIPP_s* A. Phylogenetic analysis of *PtHIPP_s* proteins ;B. The exons/introns structure of *PtHIPP_s* genes(Yellow indicates CDSs ,blue indicates upstream/downstream sequences and black line indicates introns) ; C. Conservation motifs analysis of *PtHIPP_s* proteins

表 3 毛果杨 <i>PtHIPP_s</i> 蛋白的基序序列			
Table 3 Motif sequences of <i>PtHIPP_s</i> proteins identified in <i>P. trichocarpa</i>			
基序 Motif	宽度 Width	<i>E</i> -值 <i>E</i> -value	匹配序列 Best matched sequences
1	50	2.4e-449	MHCEGCARKVRRCLKGFEGVEDVATDCKASKVVVKGEKADPLKVLERJQR
2	40	6.1e-297	AEPDLKSSZVIVKGVFEPQKLVEYVYKRTGKHAVIVKQEP
3	29	2.8e-240	VRLVVLRVSMHCEACAMEJKKRILRMKGV
4	16	9.6e-138	HPQIFSDENPNACSV
5	28	2.0e-142	TTEETTVVELRKMDFYNYCPRPYEYYA
6	21	8.5e-133	KSHRQVVLISJPKPPSEKK
7	41	3.6e-112	KKZEKEGEGGAGEZGENKDKKEAAIGGGEYEPKKEYKEATA
8	15	7.3e-30	EKEKPKVEEKKEEPP
9	25	2.9e-27	KDEKKPEETKDKSPPPQEIIVLVY
10	29	2.0e-11	PAAEEVKKPEEPKKVVEEKEEKPAPKPA

通过 qRT-PCR 技术鉴定小黑杨 *PnHIPP_s* 基因在根、茎、幼叶和成熟叶片中的组织表达特异性。*PtHIPP22.1* 和 *PtHIPP22.2*、*PtHIPP49.1* 和 *PtHIPP49.2*、*PtHIPP59.1* 和 *PtHIPP59.2* 是毛果杨基因组数据库中描述的同一基因的不同转录本,且分别具有高度同源的核苷酸序列,因此,没有设计 *PtHIPP22.2*、*PtHIPP49.2* 和 *PtHIPP59.2* 的定量引物。*PtHIPP61.1*、*PtHIPP61.2* 和 *PtHIPP61.3* 基因也存在此类情况。此外,利用设计的 *PtHIPP59.5* 定量引物进行 qRT-PCR 时未获得扩增结果。所以表 1

中不包括 *PtHIPP22. 2*、*PtHIPP49. 2*、*PtHIPP59. 2*、*PtHIPP59. 5*、*PtHIPP61. 2* 和 *PtHIPP61. 3* 基因的定量引物。qRT-PCR 结果显示(图 5 :A ~ H 中柱形图) , *PnHIPP63. 1* 在小黑杨根、茎、幼叶和成熟叶片中大量表达 ,表达水平无明显差异。 *PnHIPP22. 1* 和

PnHIPP61. 1 在检测的各组织部位均表达 ,且在根中的表达量最高。 *PnHIPP49. 1*、*PnHIPP59. 1*、*PnHIPP59. 4*、*PnHIPP59. 6* 和 *PnHIPP59. 7* 基因在茎中的表达量较高。由此可见 ,毛果杨 *PtHIPP*s 和小黑杨 *PnHIPP*s 基因的组织表达特异性存在一定差异。

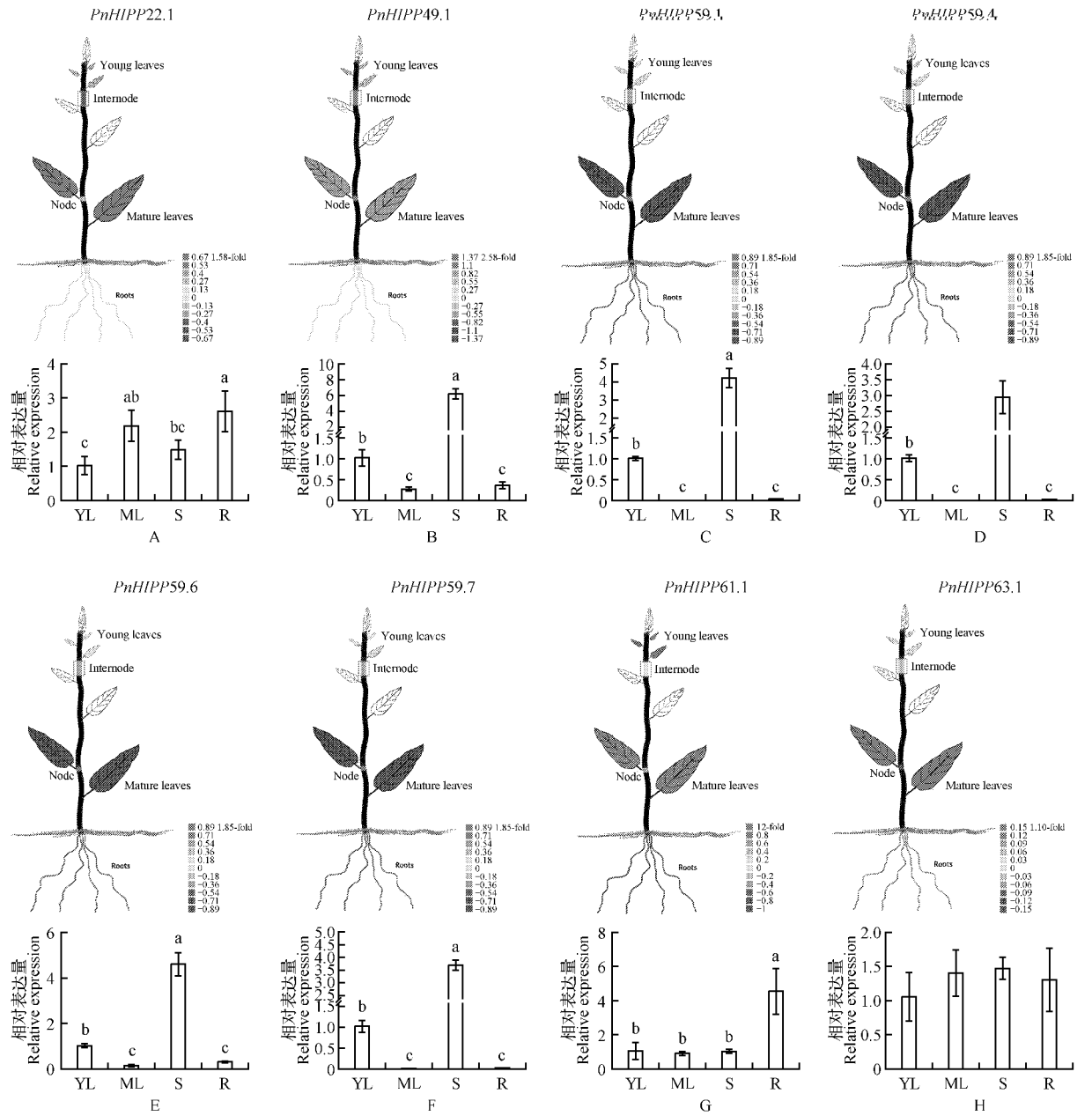


图 5 *PtHIPP*s 和 *PnHIPP*s 基因的组织表达特异性 毛果杨 *PtHIPP*s 基因的组织特异性表达可视图数据来自 <http://PlantGenIE.org> [26]。柱形图为小黑杨中相应的 *PnHIPP*s 基因在幼叶 (young leaves ,YL)、成熟叶片 (mature leaves ,ML)、茎 (stems ,S)和根 (roots ,R)中的组织特异性表达模式 ,不同的字母代表邓肯检验中统计学上的显著差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Tissue-specific expression characterization of *PtHIPP*s and *PnHIPP*s genes The tissue-specific expression visual images of *PtHIPP*s genes in *P. trichocarpa* were generated using the data derived from <http://PlantGenIE.org> [26]. The bar graphs indicated the tissue-specific expression profiles which generated using the expression data of *PnHIPP*s genes in young leaves (YL), mature leaves (ML), stems (S) and roots (R) of *P. simonii* \times *P. nigra* detected by qRT-PCR. The different letters represent statistical significant differences ($P < 0.05$) using Duncan 's test.

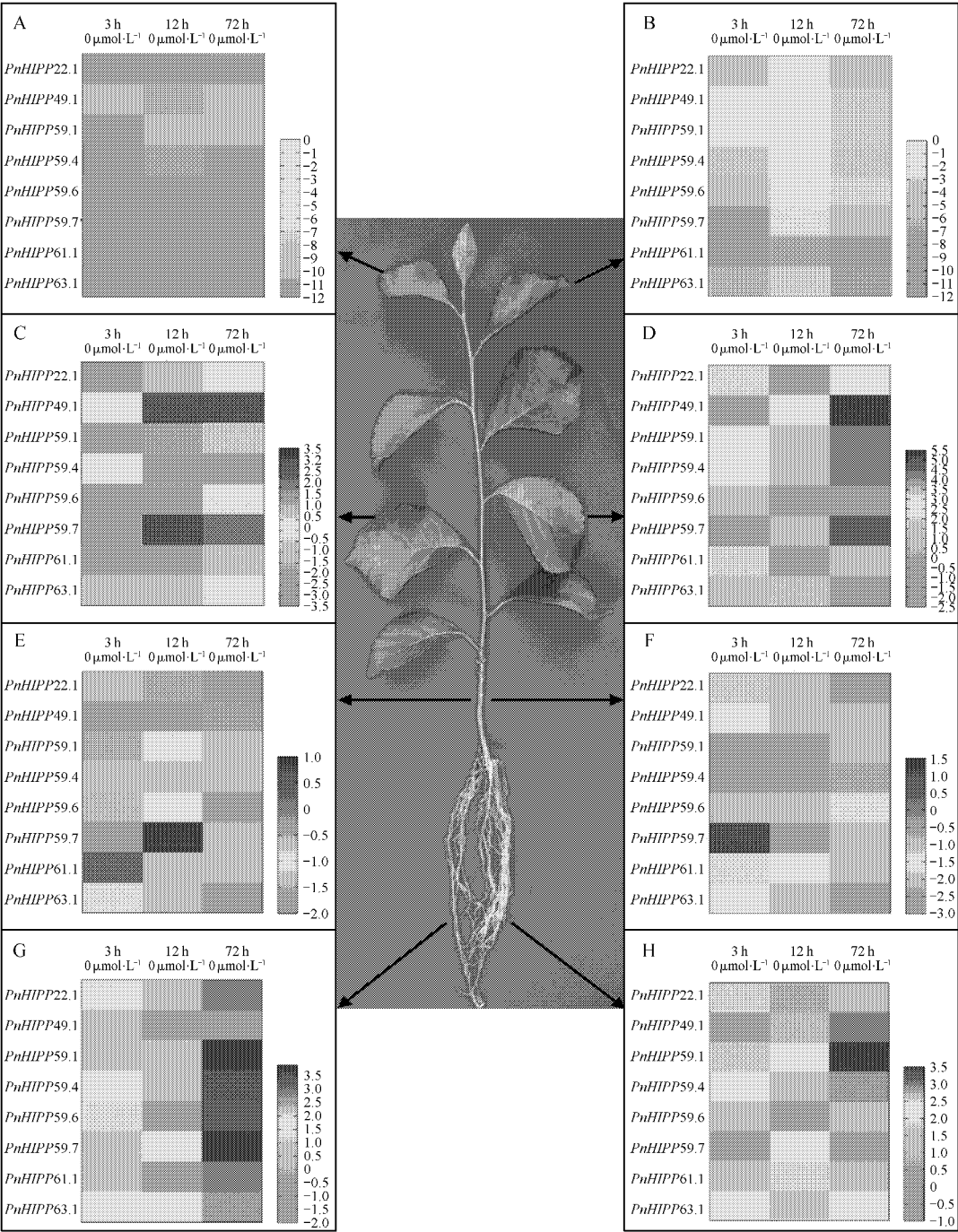


图 6 铜胁迫条件下小黑杨不同组织中 *PnHIPP*s 基因的表达模式 A、C、E、G 图为缺铜处理条件下幼叶、成熟叶片、茎、根中 *PnHIPP*s 基因的表达热图 B、D、F、H 图为过量铜处理条件下这些组织中 *PnHIPP*s 基因的表达热图。图中黑色箭头所示依次为幼叶、成熟叶片、茎和根。热图左侧为基因名称 顶部标注为处理时间及铜离子浓度。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析铜胁迫条件下不同组织中 *PnHIPP*s 的表达量。利用 $\log_2(\text{样品}/\text{对照})$ 值表示不同铜胁迫条件处理不同时间后每个 *PnHIPP* 基因的相对表达量。热图的右下角为标尺 热图中不同的颜色块表示处理后基因的表达量与对照相比上升或下降。

Fig. 6 Expression profiles of *PnHIPP*s genes in different tissues of *P. simonii* × *P. nigra* under copper stress conditions A、C、E 和 G 是热图 of *PnHIPP*s genes in young leaves、mature leaves、stems and roots under copper deficiency condition and figures B、D、F 和 H 是热图 of these genes in the tissues under excess copper treatment. The black arrows in the figure indicate the tissues of young leaves、mature leaves、stems and roots in turn. In the heatmaps the genes are shown on the left and the copper stress concentrations and treatment times are indicated on the top. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to analyze the expression levels of *PnHIPP*s in different tissues under copper stress conditions. The values of $\log_2(\text{sample}/\text{control})$ upon to copper stress conditions and different treated times were calculated as the relative expression levels of every *PnHIPP* gene. Scale bars are on the bottom right and the different color of the cells in the heatmaps indicated the expression level of the genes went up or down compared with their controls after treatments.

2.7 铜胁迫条件下小黑杨 *PnHPPs* 基因的表达模式分析

通过 qRT-PCR 鉴定 *PnHPPs* 基因应答铜缺乏 ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$) 和铜过量 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$) 胁迫条件的表达模式。结果如图 6 所示, 与对照 ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$) 处理相比, 不同组织中 *PnHPPs* 基因应答铜缺乏和铜过量胁迫的表达模式存在差异。根中, 除了 *PnHIPP49.1* 基因在缺铜处理 72 h 后表达量低于对照、*PnHIPP59.6* 基因在缺铜处理 12 h 后表达量与对照无差异、*PnHIPP49.1* 在过量铜处理 3 h 后表达水平与对照无差异之外, 其他 *PnHPPs* 基因在缺铜、过量铜处理不同时间后表达量均高于对照。茎中, 除了 *PnHIPP59.7* 基因在缺铜处理 12 h、*PnHIPP61.1* 在缺铜处理 3 h、*PnHIPP59.7* 在过量铜处理 3 h 后表达水平分别高于对照之外, 其他基因在缺铜、过量铜分别处理不同时间后表达量均低于对照。幼叶中, 缺铜、过量铜处理 3、12、72 h 后 8 个 *PnHPPs* 基因的表达量均低于对照。

成熟叶片中, *PnHIPP22.1*、*PnHIPP59.1*、*PnHIPP59.6*、*PnHIPP61.1* 和 *PnHIPP63.1* 基因的表达量在缺铜处理 3 和 12 h 后低于对照, 而 *PnHIPP49.1*、*PnHIPP59.4* 和 *PnHIPP59.7* 基因在缺铜处理 12 和 72 h 后表达量高于对照。*PnHIPP22.1*、*PnHIPP59.6* 和 *PnHIPP61.1* 基因的表达量在过量铜处理 3 h 后高于对照, 处理 12 h 后表达量低于对照; *PnHIPP22.1* 和 *PnHIPP61.1* 基因在过量铜处理 72 h 后表达量又高于对照。*PnHIPP49.1*、*PnHIPP59.4* 和 *PnHIPP59.7* 基因的表达水平在过量铜处理后均高于对照。

3 讨论

植物重金属耐受性是重金属吸收和分配的综合调控结果, 金属伴侣蛋白是金属离子在细胞内安全传输、维持细胞内金属稳态的关键蛋白质。HIPP 类蛋白是维管植物特有的在重金属稳态调节过程中发挥作用的伴侣蛋白。进化树分析结果显示, 拟南芥、水稻、毛果杨和粟米的 HIPP 蛋白家族成员分为 5 个类别, 本研究鉴定的 14 个含有 2 个重金属结合基序的 PtHPPs 也包含其中, 并采用相同的蛋白编号; de Abreu-Neto 等推测包括 HPPs 和 HPPs 在内的植物金属伴侣基因在植物进化的早期即已进行多样化分化, 这种多样化主要发生在维管植物的祖先世系中, 且这种高度分化的特性与此类基因家族在植物中的重要功能是一致

的。进化分析也表明, HPPs 和 HPPs 基因在陆地植物进化过程中也存在基因复制和功能分化等现象^[5]。HIPP 类蛋白具有一个或两个保守的重金属结合基序和 C 端的异戊二烯化位点; 已有的研究显示此类蛋白在不同植物物种中具有较多的家族成员^[9]。目前认为, HPPs 蛋白可能与 (1) 重金属稳态及解毒机制相关, 如镉耐受性; (2) 与应答其他非生物胁迫相关, 如 ABA 处理、寒冷或干旱; (3) 与植物和病原菌的互作相关^[5, 13~14]。

HPPs 蛋白的重金属结合基序 M/L/IXCXXC 可以通过形成半胱氨酰硫配体结合重金属, 参与金属转运和金属稳态^[9, 27]。应答镉胁迫的拟南芥 Cdi19 蛋白定位于细胞膜, 在细菌内表达后可以直接通过其 CXXC 基序与镉互作, 由此推测 Cdi19 蛋白可能作为重金属进入细胞的最初屏障在细胞的重金属稳态中发挥作用^[8]。Dykema 等的鉴定结果显示, 拟南芥 HIPP 蛋白 ATFP3 可以通过 MX-CXXC 基序与 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Zn^{2+} 结合^[9]。研究表明, 拟南芥的铜伴侣蛋白 AtATX1、AtCCH 和 AtCCS 的铜结合基序也是 MXCXXC, 这些蛋白在细胞铜稳态过程中发挥重要作用^[28]。拟南芥 AtATX1 属于 HPP 类蛋白, N 端可以形成典型的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构, C 端不含 CaaX 基序^[4, 15]。AtATX1 蛋白在细胞铜稳态过程中发挥关键作用, 铜结合基序 MXCXXC 是 AtATX1 应答铜胁迫所必须的。生长在铜过量土壤中的过量表达 AtATX1 的拟南芥植株具有较高的铜耐受性, 将 MXCXXC 突变成 MXGXXG 后, 过量表达 AtATX1 的转基因株系与野生型的铜敏感性相同^[18]。此外, 与拟南芥 AtATX1 同源的酵母 ScAtx1 也具有铜结合基序 MXCXXC 且可以形成 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构。ScAtx1 能够将一个 Cu^{+} 传递给 CCC2 蛋白, ScAtx1 的赖氨酸富集区与 CCC2 蛋白的酸性氨基酸之间的静电引力可以实现这两种蛋白的互作^[29~30]。人 Atx1 蛋白 HAH1 (Atox1) 具有运输铜和抗氧化损伤功能, HAH1 蛋白保守的赖氨酸突变后可以消除其抗氧化功能^[31]。本研究鉴定的 14 个毛果杨 PtHPPs 基因(包括同一基因的不同转录本)编码的 PtHPPs 蛋白都含有两个 MXCXXC 重金属结合基序, 8 个 PtHPPs 的 N 端可以形成 2 个完整的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构(图 1); PtHPPs 蛋白氨基酸序列同源性比对结果显示, 13 个 PtHPPs 蛋白具有赖氨酸富集区(图 2); 这些特征是铜伴侣蛋白 ATX1 具备的主要结构特点, 由此推测, 筛选到的毛果杨 PtHPPs 蛋白有可能与维持杨树细胞的铜稳态相关。

异戊二烯化是蛋白质的翻译后修饰方式,是通过酶促反应将聚异戊二烯基团以硫醚键连接到多肽链 C 端 CaaX 的半胱氨酸上,此蛋白可以进行进一步修饰,包括切除 aaX 三个氨基酸残基或半胱氨酸羧基端甲基化。异戊二烯化可以促进蛋白质与其他蛋白质或与膜的特异性相互作用,进而调节细胞周期、信号转导、组织或细胞内囊泡转运等过程^[7]。目前的研究表明,植物中某些具有异戊二烯化位点的 HIPPs 蛋白定位于细胞核,进而行使各种生理功能。冬麦 HvFP1 蛋白定位于细胞核,其表达受干旱和 ABA 诱导^[13]。烟草 Nb-HIPP26 是非生物胁迫应答过程中质膜-细胞核的信号分子,未脂化的 NbHIPP26 主要定位于细胞核,可以激活干旱胁迫应答,并促进 PMTV 病毒的长距离运输^[12]。拟南芥 HIPP26 蛋白在细胞核内与转录因子 ATHB29 互作进而应答脱水胁迫;HIPP26 的 M/L/IXCXXC 基序的两个 C 在这种互作中至关重要^[3]。拟南芥核定位的锌结合蛋白 HIPP3 含有两个 HMA 结构域,此蛋白可能通过结合锌作为应答病原体侵染的水杨酸依赖途径的上游调控因子,同时也与非生物胁迫应答、种子和花发育相关^[14]。此外,小麦核定位的 TaHIPP1 蛋白在酵母中过量表达明显增加了细胞在铜胁迫条件下的生长率^[10]。大豆 *GmHMADP* 基因含有 4 个外显子和 3 个内含子,编码的蛋白质具有 2 个 MX-CXXC 金属离子结合位点,定位于细胞膜与细胞核,此蛋白无异戊二烯化位点。*GmHMADP* 的表达量受 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 诱导上调。*GmHMADP* 过表达拟南芥植株在 Cu、Cd 胁迫后根长和干重均显著高于野生型植株^[32]。亚细胞定位预测结果显示,本研究鉴定的具有 2 个 MXCXXC 位点的毛果杨 PtHIPPs 蛋白定位于细胞核和细胞质的可能性较大。14 个 PtHIPPs 蛋白可以分为 3 个亚组,这些蛋白的编码基因具有相同的基因结构,均含有 3 个内含子;此外,同一亚组内的 PtHIPPs 蛋白具有相同的基序组成且基序的排列顺序相同(图 3);由此推测,同一亚组内的 PtHIPPs 蛋白可能具有相同或相似功能,且不同亚组之间的 PtHIPPs 蛋白可能存在功能差异。

表达数据分析及 qRT-PCR 检测结果显示, PtHIPPs 和 PnHIPPs 基因的组织特异性表达特性存在差异。大多数 PtHIPPs 和 PnHIPPs 基因在节(茎)中大量表达, PtHIPPs 基因在根中的表达量较低,除了 PnHIPP63.1,其他 PnHIPPs 基因在成熟叶片和幼叶中的表达量都较低(图 5)。PtHIPPs

和 PnHIPPs 基因之间组织特异性表达模式的差异有可能是毛果杨和小黑杨之间的物种差异导致的。此外,定量鉴定数据表明,铜缺乏和铜过量胁迫条件都可以导致 PnHIPPs 基因在小黑杨不同组织中的表达模式发生改变(图 6)。例如,缺铜和铜过量处理后幼叶 PnHIPPs 基因的表达模式相似,均低于对照。除了 PnHIPP59.7 和 PnHIPP61.1 基因,茎中其他基因在缺铜、过量铜处理不同时间后表达量均低于对照。根中大多数 PnHIPPs 基因的表达量在两种铜胁迫处理后普遍高于对照(PnHIPP49.1 基因缺铜处理 72 h 后表达量低于对照)。成熟叶片中, PnHIPP49.1、PnHIPP59.4 和 PnHIPP59.7 基因在缺铜和铜过量处理 12、72 h 后表达量均高于对照。

因此,根据重金属结合基序、异戊二烯化位点、赖氨酸富集区等结构特点,结合亚细胞定位预测结果、PtHIPPs 和 PnHIPPs 基因的组织特异性表达特点、铜胁迫条件下 PnHIPPs 基因在小黑杨不同组织中的表达模式推测, HIPP 蛋白家族成员可能在杨树的不同组织中参与结合铜及维持细胞铜稳态的复杂过程,但其功能的共性及特异性尚需进一步试验验证。

参 考 文 献

- Huffman D L, O'halloran T V. Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins[J]. Annual Review of Biochemistry 2001, 70: 677 - 701.
- Dupont C L, Butcher A, Valas R E, et al. History of biological metal utilization inferred through phylogenomic analysis of protein structures[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010, 107(23): 10567 - 10572.
- Barth O, Vogt S, Uhlemann R, et al. Stress induced and nuclear localized HIPP26 from *Arabidopsis thaliana* interacts via its heavy metal associated domain with the drought stress related zinc finger transcription factor ATHB29[J]. Plant Molecular Biology 2009, 69(1-2): 213 - 226.
- Tehseen M, Cairns N, Sherson S, et al. Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Metallomics 2010, 2(8): 556 - 564.
- De Abreu-Neto J B, Turchetto-Zolet A C, De Oliveira L F V, et al. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): characterization of a family of proteins exclusive to plants[J]. FEBS Journal 2013, 280(7): 1604 - 1616.
- Gao W, Xiao S, Li H Y, et al. *Arabidopsis thaliana* acyl-CoA-binding protein ACBP2 interacts with heavy-metal-binding farnesylated protein AtFP6[J]. New Phytologist,

- 2009 ,181(1) 89 – 102.
7. Crowell D N. Functional implications of protein isoprenylation in plants[J]. Progress in Lipid Research ,2000 ,39 (5) 393 – 408.
8. Suzuki N ,Yamaguchi Y ,Koizumi N ,et al. Functional characterization of a heavy metal binding protein CdH19 from *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal 2002 ,32(2) 165 – 173.
9. Dykema P E ,Sipes P R ,Marie A ,et al. A new class of proteins capable of binding transition metals[J]. Plant Molecular Biology ,1999 ,41(1) 139 – 150.
10. Zhang X ,Feng H ,Feng C ,et al. Isolation and characterisation of cDNA encoding a wheat heavy metal-associated isoprenylated protein involved in stress responses[J]. Plant Biology 2015 ,17(6) 1176 – 1186.
11. Radakovic Z S ,Anjam M S ,Escobar E ,et al. *Arabidopsis* HIPP27 is a host susceptibility gene for the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*[J]. Molecular Plant Pathology , 2018 ,19(8) 1917 – 1928.
12. Cowan G H ,Roberts A G ,Jones S ,et al. Potato mop-top virus co-opts the stress sensor HIPP26 for long-distance movement[J]. Plant Physiology 2018 ,176(3) 2052 – 2070.
13. Barth O ,Zschiesche W ,Siersleben S ,et al. Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence[J]. Physiologia Plantarum 2004 ,121(2) 282 – 293.
14. Zschiesche W ,Barth O ,Daniel K ,et al. The zinc-binding nuclear protein HIPP3 acts as an upstream regulator of the salicylate-dependent plant immunity pathway and of flowering time in *Arabidopsis thaliana*[J]. New Phytologist , 2015 ,207(4) 1084 – 1096.
15. Puig S ,Mira H ,Dorcey E ,et al. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2007 ,354(2) 385 – 390.
16. Himelblau E ,Mira H ,Lin S J ,et al. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology ,1998 ,117 (4) 1227 – 1234.
17. Abdel-Ghany S E ,Burkhead J L ,Gogolin K A ,et al. AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7[J]. FEBS Letters 2005 ,579(11) 2307 – 2312.
18. Shin L J ,Lo J C ,Yeh K C. Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis[J]. Plant Physiology 2012 ,159(3) 1099 – 1110.
19. Taylor G. *Populus* :*Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree ?[J]. Annals of Botany 2002 ,90(6) 681 – 689.
20. Tuskan G A ,Difazio S ,Jansson S ,et al. The genome of black cottonwood *Populus trichocarpa*(Torr. & Gray) [J]. Science 2006 ,313(5793) 1596 – 1604.
21. Xu Z R ,Gao L Y ,Tang M Q ,et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of CCH gene family in *Populus*[J]. PeerJ 2017 ,5(1) e3962.
22. Larson P R ,Isebrands J G. The plastochron index as applied to developmental studies of cottonwood[J]. Canadian Journal of Forest Research ,1971 ,1(1) 1 – 11.
23. Goodstein D M ,Shu S Q ,Howson R ,et al. Phytozome : a comparative platform for green plant genomics[J]. Nucleic Acids Research 2012 ,40(D1) D1178 – D1186.
24. Livak K J ,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods 2001 ,25(4) 402 – 408.
25. 丁一巍 ,詹亚光 ,张佳薇 ,等. 水曲柳 2 个 *PLT* 转录因子基因的克隆及表达分析[J]. 植物研究 ,2019 ,39(1) : 139 – 147.
- Ding Y W ,Zhan Y G ,Zhang J W ,et al. Cloning and expression analysis of two *PLT* transcription factors genes in *Fraxinus mandshurica*[J]. Bulletin of Botanical Research , 2019 ,39(1) 139 – 147.
26. Sundell D ,Mannapperuma C ,Netotea S ,et al. The plant genome integrative explorer resource :PlantGenIE. org[J]. New Phytologist 2015 ,208(4) 1149 – 1156.
27. Harrison M D ,Jones C E ,Solioz M ,et al. Intracellular copper routing :the role of copper chaperones[J]. Trends in Biochemical Sciences 2000 ,25(1) 29 – 32.
28. Chu C C ,Lee W C ,Guo W Y ,et al. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology 2005 ,139(1) 425 – 436.
29. Lin S J ,Culotta V C. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America ,1995 ,92(9) 3784 – 3788.
30. Arnesano F ,Banci L ,Bertini I ,et al. Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase[J]. The Journal of Biological Chemistry 2001 ,276(44) 41365 – 41376.
31. Hung I H ,Casareno R L B ,Lablesse G ,et al. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense[J]. The Journal of Biological Chemistry ,1998 ,273(3) 1749 – 1754.
32. 朱雅婧 ,周亚丽 ,刘骥骅 ,等. *GmHMADP* 参与高温高湿下大豆种子活力形成及铜胁迫响应的研究[J]. 中国农业科学 2018 ,51(14) 2642 – 2654.
- Zhu Y J ,Zhou Y L ,Liu S S ,et al. *GmHMADP* involved in seed vigor formation of soybean under high temperature and humidity stress and its study responsive to copper and cadmium stress[J]. Scientia Agricultura Sinica ,2018 ,51 (14) 2642 – 2654.