

• 农业生物技术 •

转录组分析拟南芥对锰胁迫及恢复过程中的分子响应

杨丽, 彭佳师, 唐婷*

湖南科技大学生命科学与健康学院, 湖南 湘潭 411100

杨丽, 彭佳师, 唐婷. 转录组分析拟南芥对锰胁迫及恢复过程中的分子响应[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1138-1156.
YANG Li, PENG Jiashi, TANG Ting. Transcriptional analysis of the molecular response of *Arabidopsis* to manganese stress and recovery[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1138-1156.

摘 要: 锰是植物必需元素, 参与多种代谢过程, 然而, 锰过量会对植物造成毒害。为探究植物在锰胁迫和恢复期的各种生理生化活动规律, 本研究以拟南芥(*Arabidopsis*)为实验对象, 将在 MS 培养基上生长 5 d 的幼苗, 分别置于含 1 mmol/L $MnCl_2$ 的 MS 培养基上 1 d 和 3 d, 随后将锰处理 3 d 的幼苗转移到 MS 培养基上恢复 1 d 进行各种生理指标检测及转录组分析。结果显示, 拟南芥在恢复阶段叶片出现轻微变黄症状, 叶绿素和类胡萝卜素浓度显著减少, 而丙二醛(malondialdehyde, MDA)和可溶性糖含量在恢复阶段增加。转录组测序数据显示, 差异基因的表达模式呈现三大类型: 早期响应、晚期响应和恢复期响应。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopaedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析发现, 差异代谢通路包括植物激素信号传导(plant hormone signal transduction)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、苯丙烷合成代谢途径(phenylpropanoid biosynthesis)、ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporters)和甘油磷脂代谢(glycerophospholipid biosynthesis)等。在锰胁迫及恢复阶段, 筛选到了与苯丙烷合成代谢途径、ABC 转运蛋白和甘油磷脂代谢相关的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 随机选取 16 个差异基因进行 qRT-PCR 验证, 结果与 RNA-seq 数据表达趋势一致。结果表明, 植物可能通过调节苯丙烷类合成代谢途径, 促进多酚类物质的积累以清除在恢复阶段产生的过氧化物; 激活 ABC 转运蛋白, 提高锰离子在植物体内的运输, 减轻锰离子对植物的毒害作用; 通过启动甘油磷脂代谢, 调整细胞膜脂组成和含量, 以适应锰胁迫。本研究结果为拟南芥应对锰胁迫并恢复时作出反应的分子机理提供了新见解, 也为植物耐锰新品种培育提供了参考。

关键词: 拟南芥; 锰胁迫; 转录组分析; 甘油磷脂; ABC 转运蛋白

资助项目: 湖南省教育厅项目(21A0312)

This work was supported by the Hunan Provincial Department of Education Project (21A0312).

*Corresponding author. E-mail: tangting@hnust.edu.cn

Received: 2023-07-19; Accepted: 2023-11-14

Transcriptional analysis of the molecular response of *Arabidopsis* to manganese stress and recovery

YANG Li, PENG Jiashi, TANG Ting*

School of Life and Health Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411100, Hunan, China

Abstract: Manganese (Mn) is an essential element for plants and plays a role in various metabolic processes. However, excess manganese can be toxic to plants. This study aimed to analyze the changes in various physiological activities and the transcriptome of *Arabidopsis* under different treatments: 1 mmol/L MnCl_2 treatment for 1 day or 3 days, and 1 day of recovery on MS medium after 3 days of MnCl_2 treatment. During the recovery phase, minor yellowing symptoms appeared on the leaves of *Arabidopsis*, and the content of chlorophyll and carotenoid decreased significantly, but the content of malondialdehyde and soluble sugar increased rapidly. Transcriptome sequencing data shows that the expression patterns of differentially expressed genes exhibit three major models: initial response model, later response model, recovery response model. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis identified several affected metabolic pathways, including plant hormone signal transduction, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling, phenylpropanoid biosynthesis, ATP binding cassette transporters (ABC transporter), and glycosphingolipid biosynthesis. Differentially expressed genes (DEGs) involved in phenylpropanoid biosynthesis, ABC transporter, and glycosphingolipid biosynthesis, were identified. Sixteen randomly selected DEGs were validated through qRT-PCR and showed consistent results with RNA-seq data. Our findings suggest that the phenylpropanoid metabolic pathway is activated to scavenge reactive oxygen species, the regulation of ABC transporter improves Mn transport, and the adjustment of cell membrane lipid composition occurs through glycerophospholipid metabolism to adapt to Mn stress in plants. This study provides new insights into the molecular response of plants to Mn stress and recovery, as well as theoretical cues for cultivating Mn-resistant plant varieties.

Keywords: *Arabidopsis*; manganese stress; transcriptome analysis; glycerophospholipids; ABC transporter protein

锰作为植物生长所必需的微量元素之一，在植物的光合作用、生长、发育和酶促活化等方面发挥重要作用^[1]。锰主要参与光合作用中电子传递系统的氧化还原和光系统 II 中水的光解过程^[2]、ATP 合成、脂肪酸和蛋白质代谢过程^[3]。然而，锰过量则抑制植物生长发育，造成锰毒害^[1]。锰毒害症状主要表现在叶片上，如出现褐色锰氧化斑、坏死斑和叶片失绿等^[4]。锰毒害抑制植物光合作用，破坏代谢过程中关

键酶的活性，影响根系对其他营养元素的吸收、运输和分配，损坏根系组织结构^[5]。例如，锰浓度过高，会抑制紫花苜蓿(*Medicago sativa*)生长^[6]，影响黄花草(*Cleome viscosa*)种子萌发和幼苗生长发育^[7]。高锰胁迫会抑制欧美杨(*Populus euramericana*)光合速率^[8]；使博落回(*Macleaya cordata*)叶绿素含量降低^[9]。综上所述，高锰胁迫严重影响植物的生长发育和生理生化活动。

面对锰胁迫,植物通过将过量锰积累在液泡和细胞壁等非活性部位,增强抗氧化能力,增加根系分泌物螯合根际锰离子和减少根系对锰吸收^[10]等一系列策略积极应对。近年来,众多与锰吸收、转运及解毒等信号途径相关的保护性物质和基因陆续被挖掘^[11]。例如,在锰胁迫下,水稻(*Oryza sativa*) *OsYSL6* 将 Mn^{2+} 从质外体转移到共质体^[12]。锰处理后,青杨(*Populus cathayana*)中脱落酸(abscisic acid, ABA)、多胺和游离氨基酸水平显著升高,其中脯氨酸、组氨酸和苯丙氨酸参与 Mn^{2+} 的金属螯合过程^[13]。西南木荷(*Shima wallichii*)叶片中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成途径相关的莽草酸脱氢酶基因表达受锰胁迫显著上调,从转录水平上表明植物通过合成酪氨酸和苯丙氨酸响应锰胁迫^[14]。桂花草(*Stylosanthes guianensis*)在锰胁迫下,通过调控次级代谢物的含量,如苯丙氨酸合成途径以适应和耐受长期的高锰胁迫^[15]。

转录组测序(RNA-seq)技术在探索水稻^[16]、玉米(*Zea mays*)^[17]、小麦(*Triticum aestivum*)^[18]和高粱(*Sorghum bicolor*)^[19]等多种植物对高锰胁迫的响应过程应用广泛。然而,关于植物对锰胁迫中不同时期及恢复过程中的转录响应仍不清楚。本研究以模式植物拟南芥(*Arabidopsis*)为试验材料,利用 RNA-seq 技术探索拟南芥在锰胁迫处理不同时期及恢复过程中的关键代谢途径及响应基因,并通过后续 qRT-PCR 验证差异基因的表达,旨在进一步探讨植物对锰胁迫的耐受机制及后续恢复过程,为今后抗性品种选育和遗传改良提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料培养及实验设计

将拟南芥 *Columbia* 生态型(Col-0)种子用乙醇(75%)和次氯酸钠(5%)分别灭菌 2 min,然后

用无菌水洗涤 3 次。将种子在 4 °C 冰箱春化 2 d 后,置于含有 1%蔗糖的 Murashige 和 Skoog (MS)培养基上生长,在温度 22 °C、光周期 12 h、光强 120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 条件下培养 5 d 后,将幼苗(Control)转移到含有 1 mmol/L $MnCl_2$ 的 MS 培养基上 1 d (Treat1)及 3 d (Treat2),随后将 Treat2 转移到正常 MS 培养基上恢复 1 d (Treat3)后取样,用于生理生化指标检测和转录组学分析。

1.2 叶绿素含量的测定

用 N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)提取样品,在 4 °C 避光条件下过夜。在 480、647、664 nm 处测量上清液的吸光度。根据以下公式分别计算出叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的浓度。

$$\text{叶绿素 a (Chla)} (\mu\text{mol/L}) = 12 \times A_{664} - 3.11 \times A_{647}$$

$$\text{叶绿素 b (Chlb)} (\mu\text{mol/L}) = 20.78 \times A_{647} - 4.88 \times A_{664}$$

$$\text{总叶绿素} (\mu\text{mol/L}) = c(\text{Chla}) + c(\text{Chlb})$$

1.3 丙二醛(malondialdehyde, MDA)和可溶性糖的测定

将样品用液氮研磨,用 10%三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)提取,6 000 r/min 离心 10 min 后,取 1 mL 上清液与 1 mL 硫代巴比妥酸溶液(thiobarbituric acid, TBA)混合后,沸水浴 20 min。室温冷却后,在 450、532、600 nm 处测量上清液的吸光度。根据以下公式分别计算出丙二醛和可溶性糖的浓度。

$$c(\text{MDA}) (\mu\text{mol/L}) = 6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$$

$$c(\text{soluble sugar}) (\mu\text{mol/L}) = 11.71 \times A_{450}$$

1.4 RNA-seq 分析

各处理组样品经液氮研磨后,利用 TRIzol 试剂法提取总 RNA。RNA 完整性、含量和纯度由 Nano Drop 2 000 核酸分析仪和琼脂糖凝胶电泳进行检测。用含 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA,随机打断 mRNA,获得 cDNA 链,将 cDNA 纯化后进行末端修复,加 polyA 尾和测序接头,通过 PCR 富集获得 cDNA 文库。文库检测合格

后,采用 BGISEQ 平台进行高通量测序。采用 fastp (version 0.23.0)软件进行数据质控,去除含有衔接子、接头序列或低质量序列($Q < 20$)的测序读数后,使用 Trinity 软件组装得到高质量的测序数据(clean data)。利用 TopHatv2.0.9 将 clean data 与拟南芥参考基因组数据库(<https://www.Arabidopsis.org/>)进行比对。通过 DEGseq 软件对数据进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析,用 FDR (false discovery rate, $FDR < 0.05$ 且 $\text{fold change} \geq 2$)作为差异表达基因筛选的指标。采用基因本体论(gene ontology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)和京都基因及基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genome, KEGG)数据库对 DEGs 进行 KEGG 富集分析。

1.5 qRT-PCR 验证

采用与转录组测序相同的样品材料,随机选取差异表达基因进行 qRT-PCR 分析,验证转录组测序分析数据的可靠性。通过 Primer Premier 5 软件设计 qRT-PCR 引物(表 1)。使用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 和 SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒测定基因表达量,内参基因为 *Actin2*,设置 3 次技术重复,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达并换算成 $\log_2 FC$ 。PCR 反应体系: $2 \times \text{Ultra SYBR Green qPCR Mix (with ROX)}$ 10 μL ,模板 1 μL ,上、下游引物各 0.4 μL ,加灭菌蒸馏水至 20 μL ;PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环。

2 结果与分析

2.1 Mn 胁迫对拟南芥生长状况及生理的影响

为了解植物从锰胁迫到恢复期的生长状况,拟南芥幼苗经过锰胁迫处理 1 d 和 3 d,随后

将锰处理 3 d 的幼苗转移到 MS 培养基恢复 1 d,观察拟南芥幼苗的表型(图 1A–1D)。锰处理 1 d,植株叶片呈现轻微绿色;随着锰处理延长至 3 d,植株叶片呈现深绿色,根在一定程度上生长;而转移至正常条件下恢复 1 d 后,植株叶片出现轻微的发黄症状,根不再继续生长,表明拟南芥生长已经受到了锰胁迫的不利影响。

为探索植物从锰胁迫到恢复期的生理生化活动,检测了整个过程中叶绿素、类胡萝卜素、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和可溶性糖的含量(图 1E)。锰处理 1 d 时,植株叶绿素和类胡萝卜素含量跟处理前相比无显著变化;锰处理 3 d 时,叶绿素和类胡萝卜素含量显著增加;恢复 1 d 后,二者含量比锰处理前更低,说明植物的光合色素在恢复阶段发生了降解。锰处理 1 d 后,MDA 含量显著增加;锰处理 3 d 后,MDA 含量略微下降;在恢复期 MDA 却急剧升高。可溶性糖含量在整个锰处理及恢复过程中与 MDA 的变化趋势一致。以上结果说明植物在锰胁迫恢复过程中积累产生了大量脂质过氧化物和渗透性保护性物质。

2.2 转录组测序分析

为探究拟南芥在锰胁迫和恢复期间转录水平的变化,通过 BGISEQ-500 平台对总共 12 个样品进行转录组测序,每个样品平均获得 7.09 Gb 原始数据。从 51.96–59.73 M raw reads 中过滤掉低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的 reads 后,得到了 45.75–50.18 M clean reads。将各样品过滤后,88.79%–91.32% clean reads 能够与拟南芥参考基因组 TAIR10_Araport 11 (<https://www.Arabidopsis.org/>)进行序列比对分析(表 2),4 组样品的总比对效率的范围是 89.27%–91.02%。最终,获得了 24 613 个高质量基因,24 399 个基因被功能注释,其中 217 个基因被预测为新基因。

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Gene names	Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>Act2</i>	<i>Act2F</i>	CTTGACCAAGCAGCATGAA
	<i>Act2R</i>	CCACCGATCCAGACACTGTACTT
<i>PLD1</i>	<i>PLD1-F</i>	CGGGAATAGAATCGAAGGGCTG
	<i>PLD1-R</i>	AAGGGAAGTATGTACCGGGAAC
<i>PLA2</i>	<i>PLA2-F</i>	TTCCCTCAAAAAACATAACCACC
	<i>PLA2-R</i>	TGCACTGTCTCCAACCTCTACA
<i>PLA3</i>	<i>PLA3-F</i>	AAGTGGAAAAAGCAACCAGAGA
	<i>PLA3-R</i>	GGATAGCAAAGTTAAAGGGCAA
<i>DGK</i>	<i>DGK-F</i>	TGCGAAGTGGTGATTTTTGTC
	<i>DGK-R</i>	TCCTTAGCTCCCTGCGTGTAG
<i>PLDα</i>	<i>PLDα-F</i>	AGGAAGAGACGGTCAAAGAAAAAG
	<i>PLDα-R</i>	TTAGGAAACCCACAAGAAAGATG
<i>ABCB1</i>	<i>ABCB1-F</i>	CGGTCTTTAACACCACCCAAT
	<i>ABCB1-R</i>	CGTCCTCTCACTCTCTCCAT
<i>ABCG40</i>	<i>ABCG40-F</i>	GAGTGGACGGCGGTGAAGTT
	<i>ABCG40-R</i>	CTGGGACGAGGGATGAGGAA
<i>ABCG1</i>	<i>ABCG1-F</i>	CGTCGTTGCTATTTTGGCTT
	<i>ABCG1-R</i>	ATCACTTCCGGTAGTTCCCC
<i>ABCG2</i>	<i>ABCG2-F</i>	AGCCATCTCCTGCTGCTGTT
	<i>ABCG2-R</i>	GTATTCGTGTCGCCGTTCTT
<i>ABCC4</i>	<i>ABCC4-F</i>	GTGTTCAACCACCACAACCATT
	<i>ABCC4-R</i>	TATTACCATCACAACCCAGGG
<i>CAD</i>	<i>CAD-F</i>	TCTATGCTCAGTTCTTGGGTCG
	<i>CAD-R</i>	TTCTTTGGGGATTGGTTTTTTG
<i>CCR</i>	<i>CCR-F</i>	TGTCTTCCACACTGCTTCACC
	<i>CCR-R</i>	TCTACTACATCGTTTGGTCCC
<i>CCoAMT</i>	<i>CCoAMT-F</i>	ACACCTTGTGGTTTGGTTTTG
	<i>CCoAMT-R</i>	CTCTCCGACTTTGGTTCTGCT
<i>FLS</i>	<i>FLS-F</i>	GTGTCTGATTTGCTCCTCCTCC
	<i>FLS-R</i>	CGCAACGGTTTGCATTTTATT
<i>SKO</i>	<i>SKO-F</i>	TCTACCCACCAGCCAATGAGG
	<i>SKO-R</i>	TTTGAGGATGCGACGAAGCAT
<i>PAL</i>	<i>PAL-F</i>	TCAGCCACAATTAGTCCCCCAG
	<i>PAL-R</i>	AAAACGGTATTCCATTACCTC

随后,对4组样品的表达量数据进行主成分分析(principal component analysis, PCA),结果显示其中3组样品(“Control”,“Treat1”和“Treat2”)向PC2方向呈现逐渐聚拢的趋势,而

“Treat3”与其他类群分离形成一个独立的分支,说明随着锰胁迫处理加强,存在许多响应基因,然而,在恢复阶段大量基因的表达呈现不一样的响应模式(图2A)。计算了12个样本的基因表

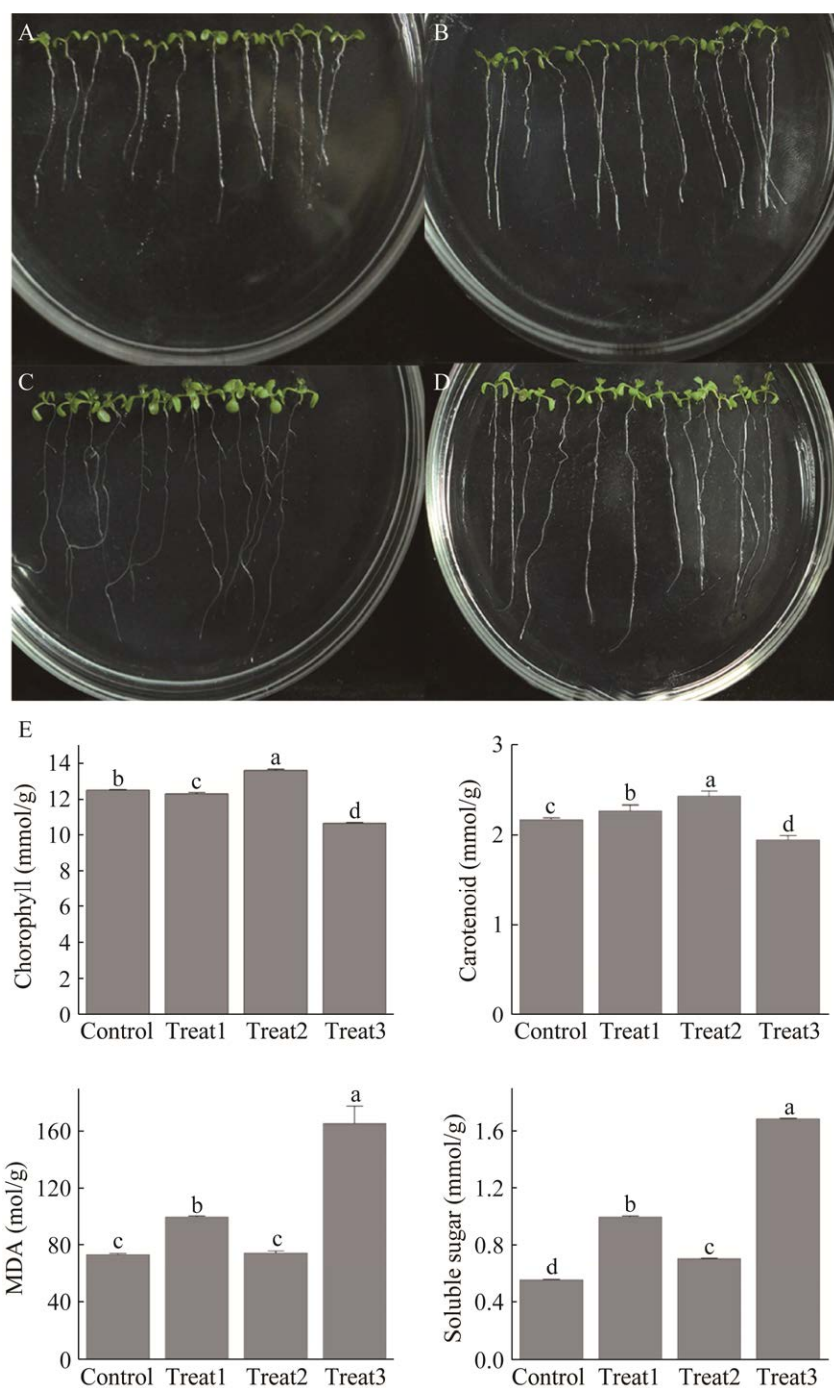


图 1 拟南芥从锰胁迫到恢复期表型和生理分析

Figure 1 Phenotype and physiological analysis of *Arabidopsis* seedlings during the period of Mn stress and recovery. A: Phenotype of seedlings grown under normal conditions for 5 days. B: Phenotype of 5-day-old seedlings after 1 day of Mn treatment. C: Phenotype of 5-day-old seedlings after 3 days of Mn treatment. D: Phenotype of 5-day-old seedlings at 1 day of recovery after 3 days of Mn treatment. E: The content of chorophyll, carotenoid, MDA and soluble sugar from the Mn stress stage to the recovery stage. The letters a, b, c, and d represent significant differences according to one-way ANOVA ($P < 0.05$).

表 2 转录组测序数据统计

Table 2 Statistics of transcriptome sequencing data

Sample	Total clean reads (M)	Total mapping (%)	Uniquely mapping (%)
Control_1	46.51	91.18	65.51
Control_2	46.12	91.32	64.86
Control_3	47.15	90.56	64.18
Treat1_1	50.18	88.79	62.53
Treat1_2	47.12	89.46	62.56
Treat1_3	45.75	89.57	64.53
Treat2_1	46.87	90.21	63.32
Treat2_2	48.02	90.87	65.18
Treat2_3	48.17	90.75	64.90
Treat3_1	46.79	90.13	63.04
Treat3_2	46.21	90.83	64.14
Treat3_3	48.01	89.78	62.75

达水平的皮尔逊相关系数 r , 并以热图的形式呈现出来(图 2B)。结果显示各样品间的 r^2 均大于 0.900, 表明样本间存在较强的相关性, 均可用于后续分析。此外, 研究了每个样品中基因表达分布的分散程度(图 2C)。结果发现“Control”和“Treat1”均显示了较高的表达水平, 而“Treat2”和“Treat3”显示了稍低且稳定的基因表达, 表明锰胁迫影响了植物的生长代谢过程, 拟南芥可通过上调或下调基因表达来响应锰胁迫及恢复过程。

2.3 差异基因表达模式分析

为探索植物在锰胁迫不同时期及恢复阶段的基因响应模式, 利用 Mfuzz 软件获得了 12 个与锰处理及恢复过程相关的 Cluster (图 3)。根

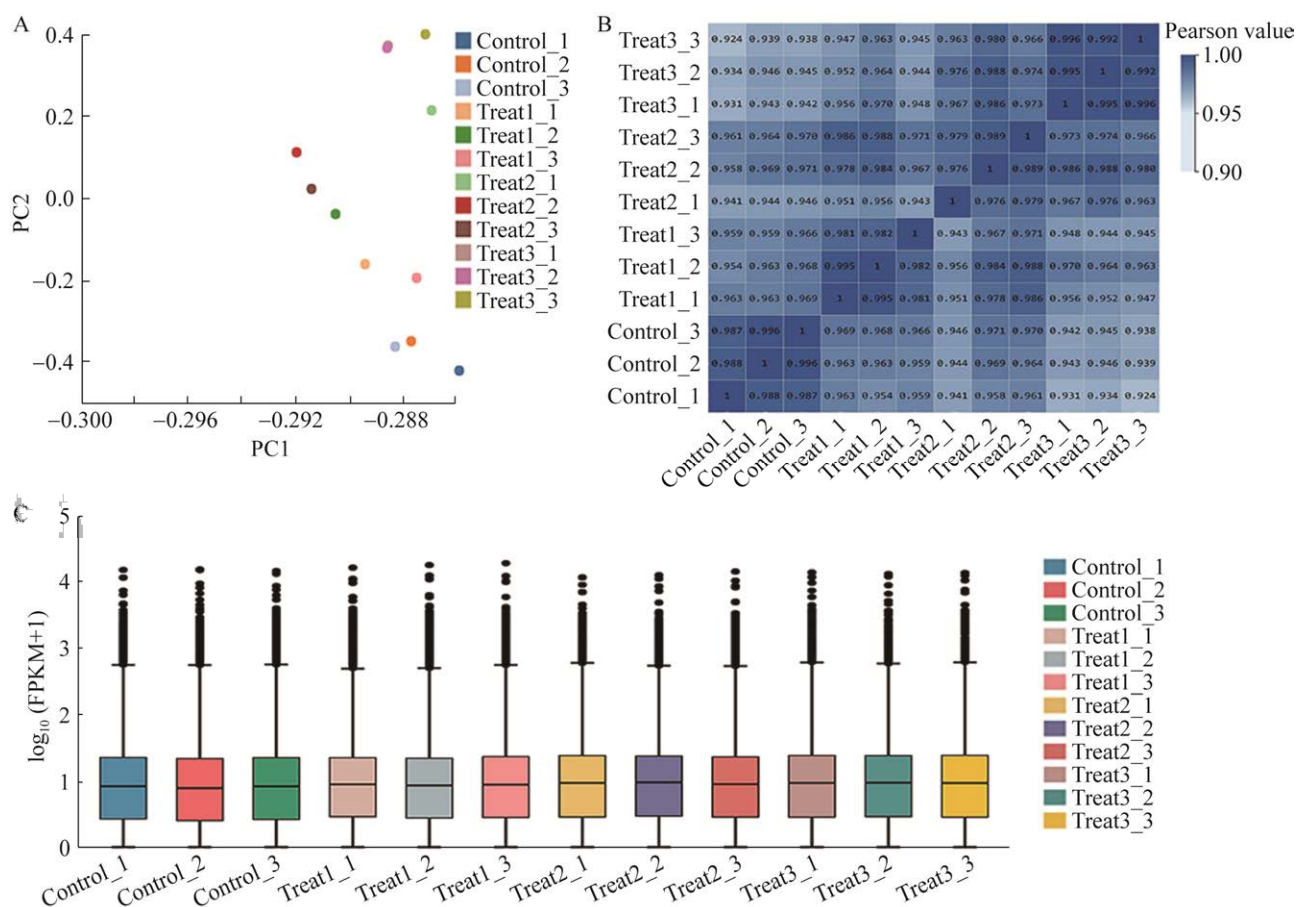


图 2 样本数据分布及相关性分析

Figure 2 Distribution and correlation analysis of sample data. A: Principal component analysis. B: Heat map of Pearson correlation coefficient. C: Distribution of the gene expression.

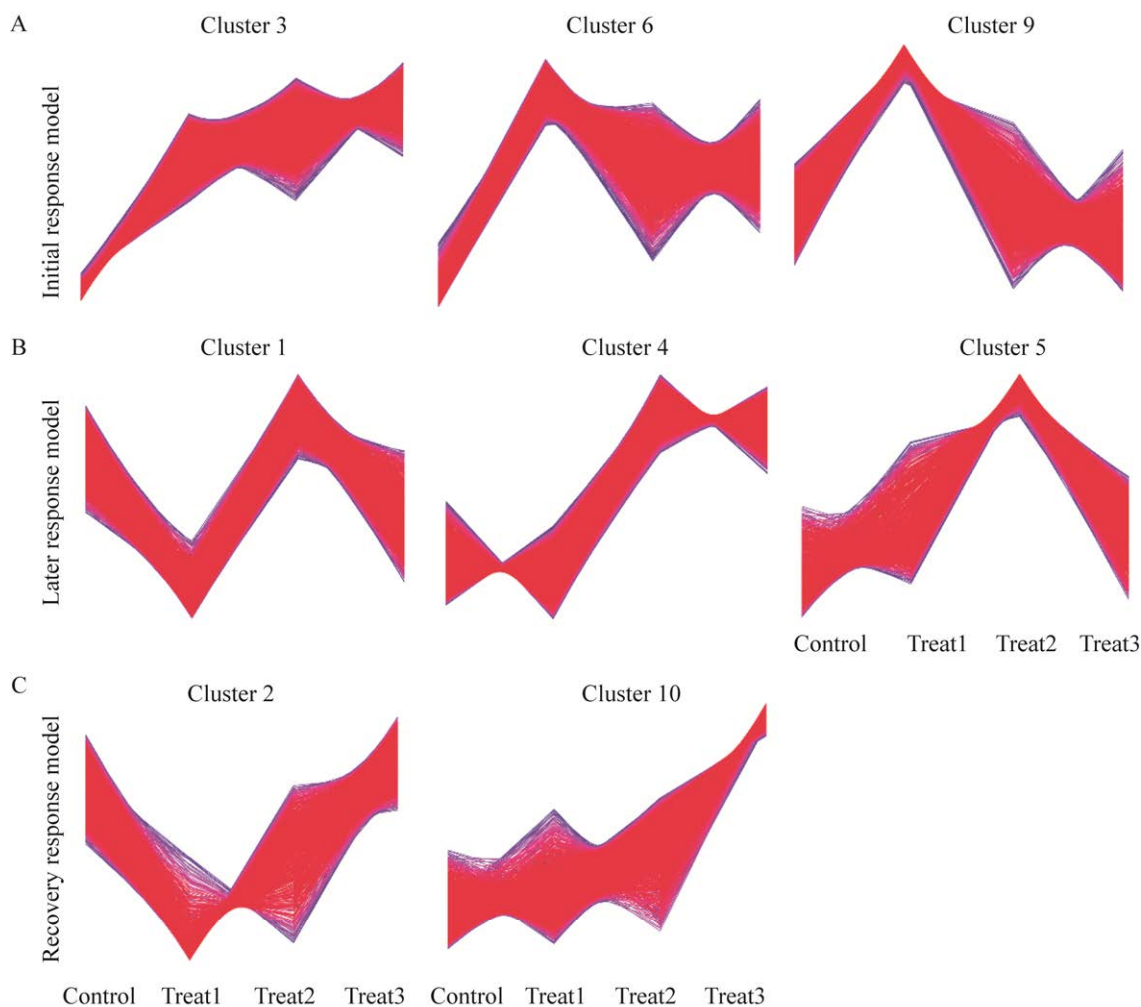


图3 锰处理及恢复过程中基因表达模式

Figure 3 Expression patterns of manganese response genes. A: Initial response model. B: Later response model. C: Recovery response model.

据植物在锰处理及恢复过程中的基因表达趋势,可以分为三大类:早期响应模式、晚期响应模式、恢复期响应模式。早期响应模式包括 Cluster 3、Cluster 6 和 Cluster 9,即在锰胁迫 1 d 时,基因被显著诱导表达;在锰胁迫 3 d 后,基因表达迅速下降,恢复 1 d 时基因表达趋于稳定。晚期响应模式包括 Cluster 1、Cluster 4 和 Cluster 5,即在锰胁迫 1 d 时,基因表达呈现下降趋势;在锰处理 3 d 后表达量显著上升,且超过对照组含量;在恢复 1 d 时,基因表达量显著下

降。恢复期响应模式包括 Cluster 2 和 Cluster 10,即在恢复 1 d 后基因表达迅速上调。以上结果表明,从锰胁迫早期、晚期到恢复期等各个阶段植物具有不同的响应基因在发挥作用。

2.4 差异基因表达筛选及分析

利用 DESeq 方法,进一步筛选了拟南芥响应锰胁迫不同时期及恢复过程的差异基因(图 4)。结果发现, Treat1 组相比于 Control 组,上调基因为 1 588 个,下调基因为 1 920 个; Treat2 组相比于 Control 组,上调基因为 2 583 个,下调

基因为 1 063 个; Treat3 组相比于 Control 组, 上调基因为 2 823 个, 下调基因为 1 891 个; Treat2 组相比于 Treat1 组, 上调基因为 1 951 个, 下调基因为 223 个; Treat3 组相比于 Treat1 组, 上调基因为 1 797 个, 下调基因为 518 个; Treat3 组相比于 Treat2 组, 上调基因为 207 个, 下调基因为 585 个。总体而言, 在锰胁迫及恢复过程中, 上调基因显著多于下调基因, 说明锰胁迫及恢复过程对拟南芥基因转录调控产生了影响。韦恩图显示, Control 和 Treat1 组间存在特有差异基因 960 个; Control 和 Treat2 组间存在特有差异基因 433 个; Control 和 Treat3 组间存在特有差异基因 1 155 个; Control 组与锰处理组的共有差异表达基因为 1 826 个。

2.5 KEGG 功能富集分析

通过 KEGG 富集分析, Control 组与 Treat1 组间有 1 356 个 DEGs, 可分类至 134 个代谢通

路; Control 组与 Treat2 组间有 1 465 个 DEGs, 可分类至 130 个代谢通路; Control 组与 Treat3 组间有 1 889 个 DEGs, 可分类至 132 个代谢通路。上述各组间, DEGs 注释数量排在前 30 的代谢通路如图 5 所示, 前 4 个共同代谢通路分别是植物-病原互作(plant-pathogen interaction)、植物激素信号传导(plant hormone signal transduction)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路和苯丙烷生物合成(phenylpropanoid biosynthesis)。ABC 转运蛋白(ATP binding cassette transporters)是 Control 和 Treat1、Control 和 Treat2 组间的共同差异代谢途径, 表明 ABC 转运蛋白与植物早期和晚期响应锰胁迫相关。甘油磷脂代谢(glycerophospholipid biosynthesis)为 Control 和 Treat2、Control 和 Treat3 组间的共同差异代谢途径, 说明甘油磷脂代谢途径与植物晚期响应锰胁迫及后期恢复相关。

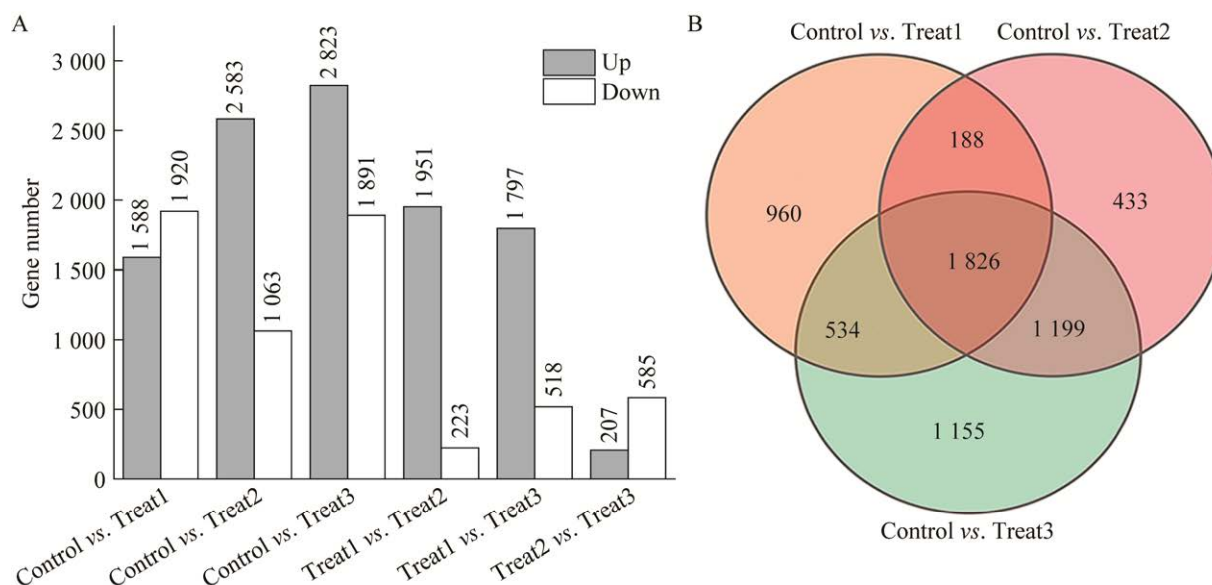
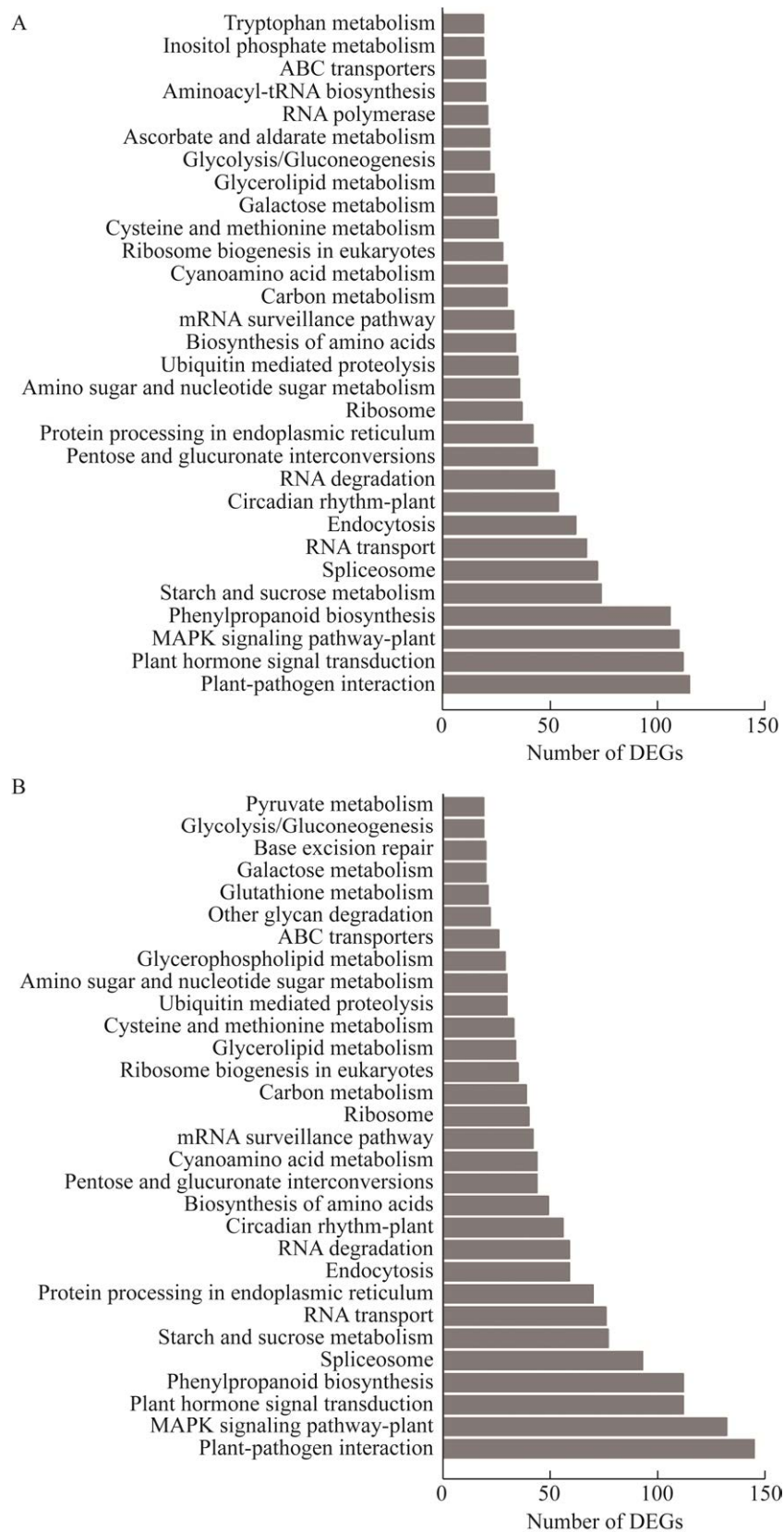


图 4 不同处理组间差异表达基因数目统计

Figure 4 The number of differentially expressed genes observed in different treatment group. A: The number of up-regulated and down-regulated genes in the Control, Treat1, Treat2, and Treat3 group. B: Venn diagram showing the overlapping and unique differentially expressed genes among the Control, Treat1, Treat2, and Treat3 group.



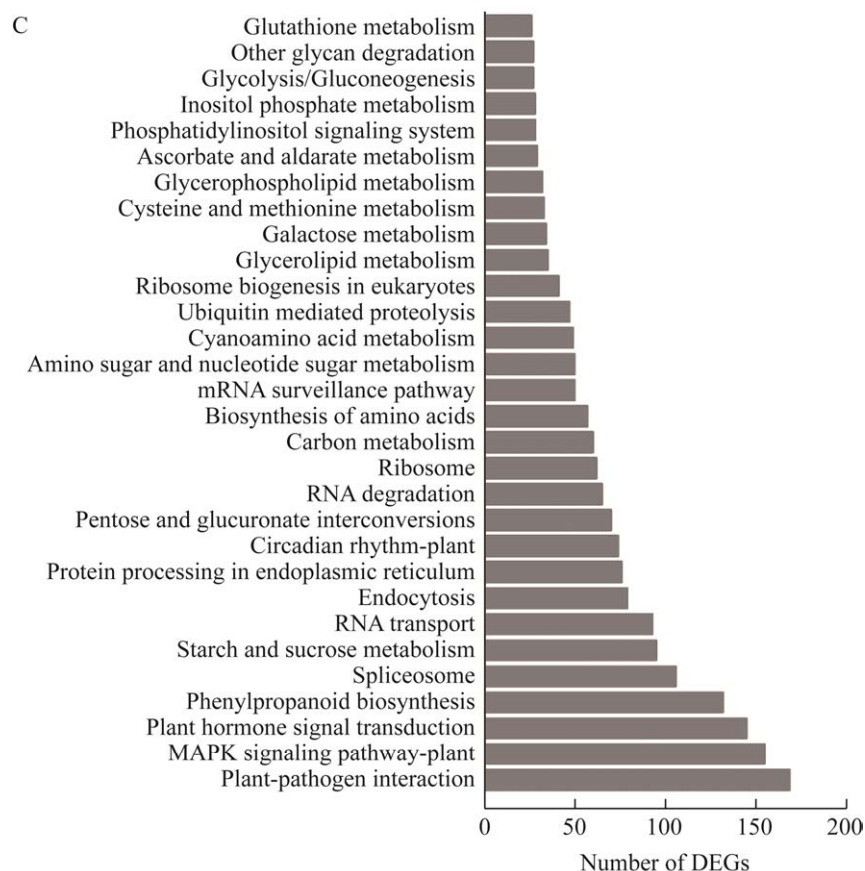


图5 差异基因的 KEGG 通路注释和富集

Figure 5 KEGG pathway annotation and enrichment of DEGs. A: Control vs. Treat1. B: Control vs. Treat2. C: Control vs. Treat3.

2.6 重要差异表达基因的筛选

在锰处理不同时期和恢复期间,大量 DEGs 显著富集在苯丙烷生物合成通路。为此,重点分析了与苯丙烷生物合成相关的 40 个 DEGs 的表达模式(图 6)。结果显示,大部分 DEGs 在锰处理 3 d 时表达量上调最显著,在恢复期逐渐下调,但显著高于对照组。例如, Treat2 组相比于 Control 组,过氧化物酶(oxidase, POD)、 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase, β -Glu)和肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)基因表达水平分别上调了 30、7.2、6.6 倍。这表明植物在锰处理晚期,通过上调苯丙烷生物合成途径相关基因的表达耐受锰胁迫。

植物 ABC 转运蛋白参与重金属离子的转运过程。为了解拟南芥 ABC 转运蛋白是否响应锰胁迫及恢复过程,筛选了 27 个 ABC 转运蛋白的 DEGs (图 7)。在锰处理 1 d 时,少量 DEGs 开始诱导表达;锰处理 3 d 至恢复 1 d 时,大量 DEGs 表达量显著增加并保持稳定,例如, *ABCA3*、*ABCA4*、*ABCB1*、*ABCB9*、*ABCB16*、*ABCC4*、*ABCG2* 和 *ABCG40* 基因表达水平随锰处理时间延长而逐渐增强,直至恢复 1 d 时,其表达量显著上调。然而, *ABCC9* 的转录水平却随锰处理时间增加而降低。结果表明,锰胁迫诱导了大多数 ABC 转运蛋白的基因表达,并在恢复阶段维持稳定,这可能对拟南芥从锰胁迫到恢复具有重要作用。

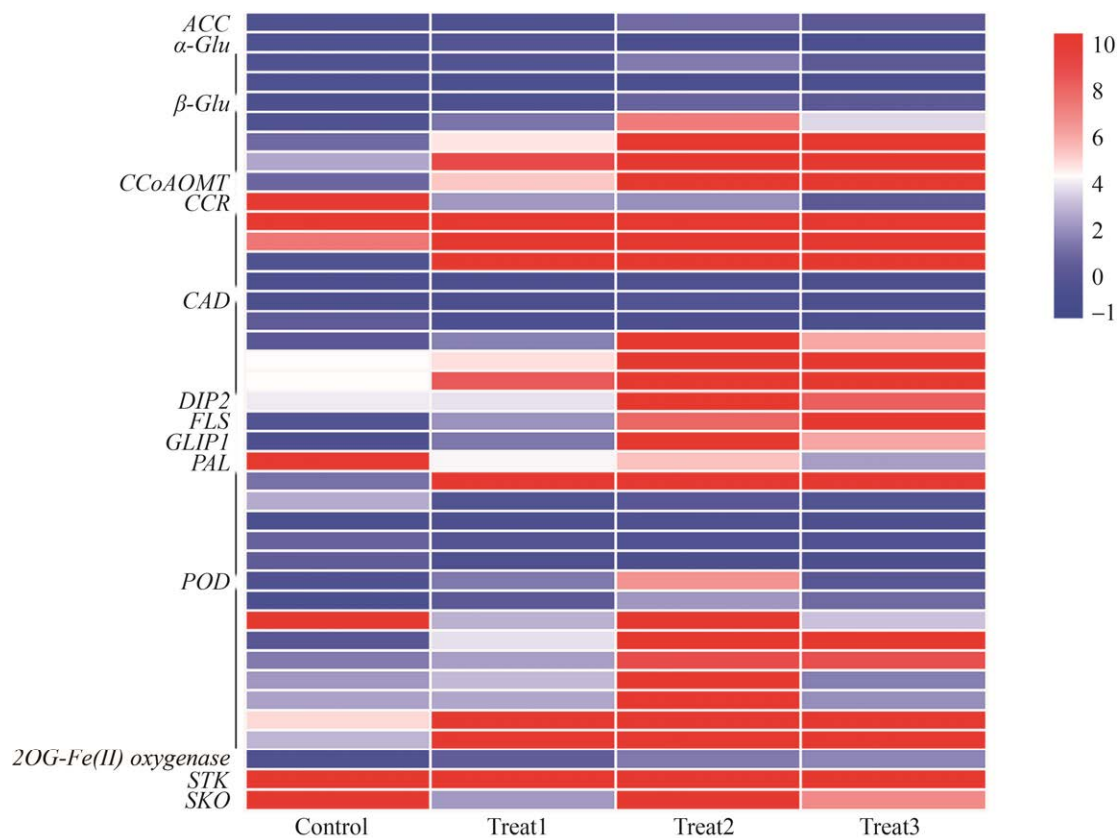


图 6 苯丙烷生物合成相关差异基因的表达
Figure 6 Expression level of differentially expressed genes associated with phenylpropanoid biosynthesis.

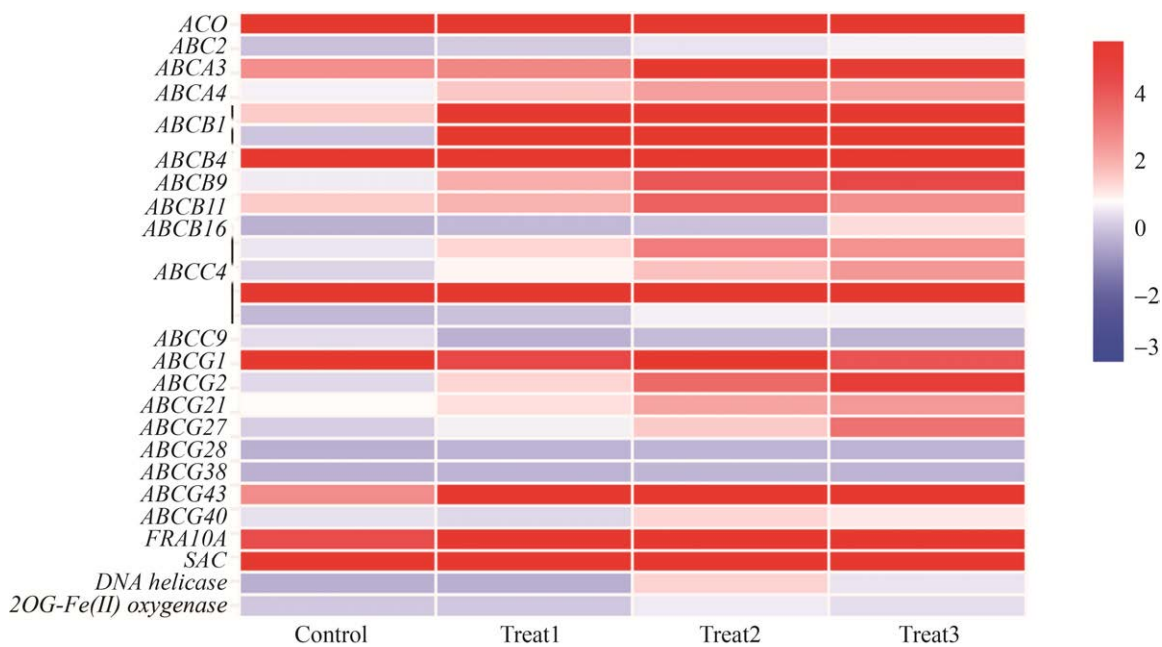


图 7 ABC 转运蛋白相关差异基因的表达
Figure 7 Expression level of differentially expressed genes associated with ABC transporter.

在锰处理及恢复时,大量 DEGs 显著富集在甘油磷脂代谢通路,为此,筛选了甘油磷脂代谢相关的 32 个 DEGs (图 8)。在锰处理 1 d 时,多数 DEGs 的表达水平显著上调;在锰处理 3 d 时,其表达量达到峰值。例如,二酰基甘油激酶(diacylglycerol kinase, DGK)随着锰处理时间增加而持续表达,在锰处理 3 d 时,其表达量跟对照相比,显著上调。然而,磷脂酶 A1 (phospholipase A1, PLA1)和磷脂酶 D (phospholipase D, PLD)在锰处理初期表达量变化不显著,却在锰处理后期及恢复期表达量上升。结果表明,植物甘油磷脂代谢通路不仅参与锰胁迫的响应,还参与锰胁迫后续的恢复过程。

2.7 qRT-PCR 验证

为了验证转录组测序数据的准确性,从苯丙烷生物合成、ABC 转运蛋白和甘油磷脂代谢途径相关基因中随机挑选了 16 个 DEGs 进行实时荧光定量 PCR 验证分析(图 9)。结果显示,qRT-PCR 验证结果与转录组测序结果一致,表明 RNA-seq 测序分析结果可靠,可用于后续功能分析。

3 讨论

锰是植物生长发育的必需元素,但过量锰对植物的生理、代谢和发育过程造成严重影响^[20]。不同植物对锰胁迫的生理响应具有一定特异性。例如,在锰胁迫下,柑橘(*Citrus reticulata*)

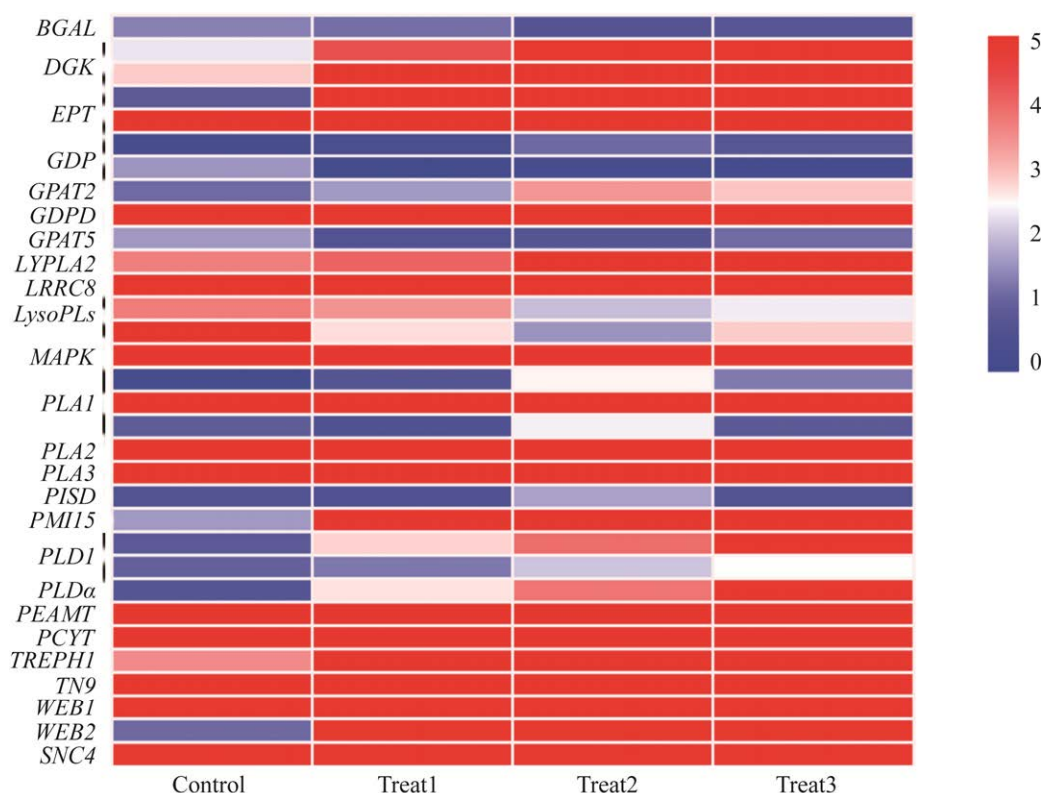


图 8 甘油磷脂代谢相关差异基因的表达

Figure 8 Expression patterns of differentially expressed genes associated with glycerophospholipid synthesis.

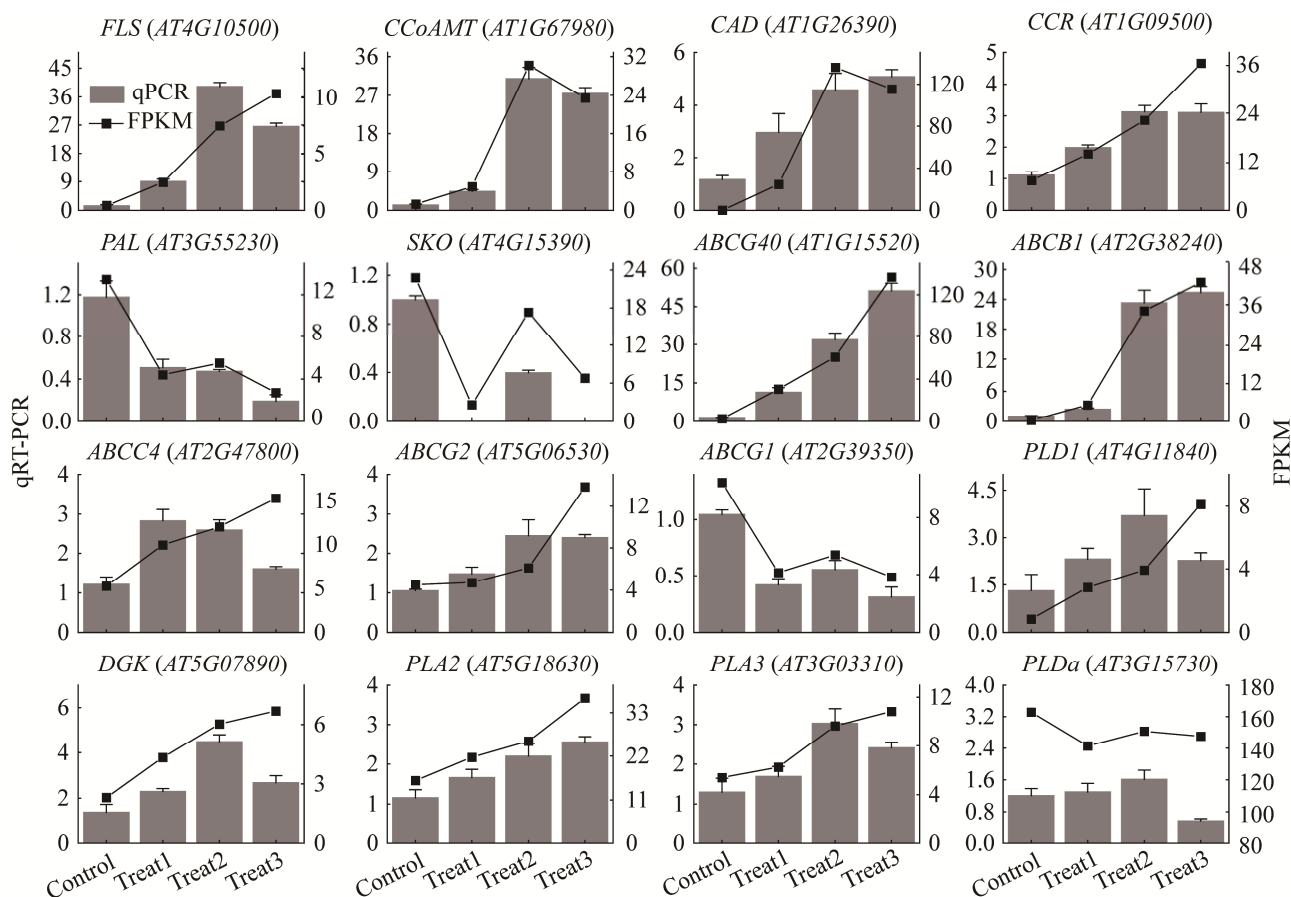


图9 部分差异基因的 qRT-PCR 验证

Figure 9 qRT-PCR validation of some differentially expressed genes.

砧木叶片不同程度地失绿，叶缘发黄，严重时全叶黄化^[21]。柱花草叶绿素含量、光合速率和生物量受锰胁迫抑制^[16]。然而，随着锰离子浓度的增加与胁迫时间的延长，盐肤木(*Rhus chinensis*)^[22]和构树^[23](*Broussonetia papyrifera*)的叶绿素 a、叶绿素 b 含量均呈现先升后降的趋势。在本研究中，在锰处理早期，拟南芥叶片呈现轻微绿色，随着处理延长转变为深绿色，在恢复阶段，叶片呈现轻微发黄的症状，这可能是叶绿素和类胡萝卜素含量在锰处理后期增加，在恢复阶段显著下降的结果。故推测在一定耐受范围内，锰可以促进叶绿素的合成使叶片更绿，当锰处理时间超过了植物的耐受极限，

过量积累的锰在恢复阶段抑制叶绿素合成相关酶活性，使叶绿素含量下降，叶片呈现发黄等症状。由此可见，植物在恢复阶段的生理生化活动同样值得关注。

为从分子层面解析植物对锰胁迫和恢复过程的动态响应规律，本研究对拟南芥在锰处理早期、晚期和恢复阶段进行比较转录组分析，通过 KEGG 富集分析，筛选到与锰胁迫响应相关的若干代谢途径及差异表达基因。通过前期研究发现，超积累锰植物圆锥南芥(*Arabis paniculata*)在锰胁迫及恢复过程中，大量 DEGs 显著富集在苯丙烷生物合成通路、ABC 转运蛋白和甘油磷脂代谢通路^[24]。为探索非超积累锰

植物拟南芥在锰胁迫不同处理阶段及恢复过程中的分子响应规律,本研究重点分析了苯丙烷生物合成通路、ABC转运蛋白和甘油磷脂代谢通路所富集的差异基因。

苯丙烷代谢途径是黄酮类、木质素以及酚类等植物防御性次生代谢物的主要来源,能够有效减缓细胞中活性氧的积累,避免细胞形态结构与生理代谢功能被破坏,在植物抵抗非生物胁迫中发挥了防御作用^[25]。目前,关于锰胁迫影响植物苯丙烷代谢途径的转录组学分析和锰处理后恢复过程中相关基因的研究鲜有报道。例如,柱花草通过增强苯丙烷合成代谢,促进酚类和类黄酮的积累,以提高植物对锰胁迫的耐受能力^[26],表明源于苯丙氨酸代谢途径的酚类化合物在植物抵御锰胁迫中清除活性氧物质发挥了重要作用。本研究发现,苯丙烷代谢途径是拟南芥受锰胁迫显著影响的次生代谢途径,与上述结果一致,并进一步补充了该途径相关基因在锰胁迫后恢复阶段的表达分析。具体而言,POD是苯丙烷代谢途径中重要的抗氧化酶^[27]。构树POD酶活性在锰处理初期出现短暂的激活,但随着锰处理时间增加而呈现下降的趋势^[28]。在大豆中,POD酶活性随着锰处理浓度的增加而增强^[29]。本研究中,POD在锰处理的早期阶段基因表达无显著变化,主要在锰处理晚期及恢复阶段呈现先上升后下降的趋势,与上述研究存在一定的差异,表明POD在锰胁迫不同处理阶段发挥的作用存在物种特异性。另外,CAD是苯丙烷代谢途径中最后一步限速酶^[30]。近年来,关于CAD基因的功能研究主要集中在其他重金属胁迫,而CAD在锰胁迫及恢复过程中的响应和功能有待研究。前人报道发现,铜胁迫下小麦细胞壁木质素含量与CAD基因表达水平呈正相关^[31]。在镉和锌胁迫下,秋茄(*Kandelia Obovata*)根和叶中CAD酶活

性显著增强,总酚类物质含量明显增加^[32]。本研究中,CAD在锰胁迫晚期及恢复阶段,基因表达呈现先升后降的趋势,与前人结果相近,表明该基因主要在锰胁迫晚期发挥作用。综上所述,推测拟南芥可能在锰处理晚期提早上调苯丙氨酸代谢途径相关基因如POD和CAD的表达,以促进酚类物质的积累,帮助植物清理在恢复阶段积累的过氧化物例如丙二醛,最终适应锰胁迫。然而,关于这些基因在植物锰处理及恢复阶段中的具体功能,有待进一步验证。

ABC转运蛋白由两个跨膜结构域和两个胞间核苷酸结合结构域组成,根据其序列同源性,保守结构域和系统进化地位分为ABCA、ABCB、ABCC、ABCD和ABCG这5个亚家族,对植物生长发育和重金属胁迫的响应具有重要功能^[33]。例如,ABC转运蛋白能将螯合的锰和锌离子运输至液泡^[34]。在镉和铅胁迫下,共表达ABCC9能够促进镉和铅离子在地上部分液泡中积累^[35]。野生大麦HvABCB25通过将铝离子在液泡区隔化以提高对铝胁迫的抗性^[36]。拟南芥AtABCB25和AtABCG36参与将镉和铅离子排出细胞外,以提高植物的镉和铅抗性^[37]。以上说明ABC转运蛋白在其他重金属离子的转运方面发挥了重要作用,然而,关于ABC转运蛋白是否参与锰胁迫响应目前鲜有报道。前期研究发现,在锰胁迫及恢复过程中,圆锥南芥ABCB、ABCC和ABCG的转录水平显著上调^[24]。在本研究中,拟南芥AtABCA、AtABCB、AtABCC和AtABCG的转录水平随锰处理时间而呈线性上升,并且在恢复阶段还保持高表达状态,支持了前期研究的结果。因此,推测拟南芥ABC转运蛋白在锰处理及恢复阶段可能参与锰离子的转运,以减轻锰毒害对植物的不利影响,这是植物响应锰胁迫的一种通用策略。至于ABC转运蛋白在锰胁迫中具体如何发挥转运功能,

尚需开展相关研究进行验证。

细胞膜是锰离子进入细胞的第一道屏障, 磷脂是组成细胞膜的主要支架, 植物通过调整磷脂分子组成和含量适应不同的环境胁迫^[38], 磷脂可以被 PLD、磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)、PLA 等磷脂酶水解形成磷脂酸(phosphatidic acid, PA)、二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)和溶血磷脂, 其中 DAG 可以被 DAG 激酶(DAG kinases, DGK)磷酸化成 PA^[39]。目前, 关于磷脂酶在植物抗金属胁迫的功能报道较少。拟南芥 PLD α 1 可以通过部分调节钾离子的动态平衡, 提高植物对镁胁迫的耐受能力^[40]。DGK 广泛存在于高等植物中, 容易受到重金属胁迫镉和铝等诱导表达^[41], 但是否响应锰胁迫鲜有报道。油菜 *BnaDGK1-1*、*BnaDGK2-2*、*BnaDGK7-2* 和 *BnaDGK5-4* 受到镉胁迫的诱导表达^[42]。前期研究发现, 随着锰处理时间增加, 圆锥南芥 *PLD*、*PLA* 和 *DGK* 的转录水平呈线性上升, 推测这些酶的激活可能会导致 PA 产生, 以提高植物对锰毒害的抗性^[24]。本研究发现, 拟南芥 *DGK* 基因早期响应锰胁迫, *PLA* 基因只在晚期响应锰胁迫, *PLD* 基因在晚期响应锰胁迫, 在恢复阶段其表达水平持续上升。该结果与前人研究结果相似, 但补充了甘油磷脂代谢途径相关基因在锰胁迫后恢复过程中的表达分析。据此推测植物在早期响应锰胁迫时, 可能激活 *DGK* 酶活性; 在晚期响应锰胁迫时, 可能启动 *PLD* 和 *PLA* 基因表达; 在恢复阶段时, 可能诱导 *PLD* 酶活性而调整细胞膜脂组分 PA 和溶血磷脂含量以适应锰胁迫。关于这些基因是单独还是协同响应锰胁迫, 以及如何在锰胁迫及恢复过程中调整细胞膜脂组分还需进一步研究。

4 结论

本研究对拟南芥在锰胁迫不同阶段及恢复

过程进行了生理生化活动检测和转录组学分析, 结果表明一定时间的锰处理促进光合色素的合成, 但长时间锰胁迫导致过氧化物积累和光合色素降解, 在恢复阶段呈现伤害症状。转录组研究发现, 通过比较锰胁迫早期、晚期及恢复期基因的表达趋势, 初步筛选了植物在锰胁迫及恢复过程中与苯丙烷类代谢途径、ABC 转运蛋白和甘油磷脂代谢途径相关的差异基因。而这些候选差异基因在锰胁迫不同阶段的功能还有待深入研究。本研究结果为深入研究植物响应锰胁迫的分子机理奠定了基础, 也为耐锰作物的培育提供了理论参考。

REFERENCES

- [1] HOU LX, WANG ZX, GONG GX, ZHU Y, YE Q, LU SC, LIU X. Hydrogen sulfide alleviates manganese stress in *Arabidopsis*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(9): 5046.
- [2] SCHMIDT SB, PERSSON DP, POWIKROWSKA M, FRYDENVANG J, SCHJOERRING JK, JENSEN PE, HUSTED S. Metal binding in photosystem II super and sub complexes from barley thylakoids[J]. Plant Physiology, 2015, 168(4): 1490-1502.
- [3] SHAO JF, YAMAJI KN, SHEN RF, MA JF. The key to Mn homeostasis in plants: regulation of Mn transporters[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(3): 215-224.
- [4] YANG SK, CHANG MM, LING GZ, ZHAO ZK, LI XF. Sequestration of Mn into the cell wall contributes to Mn tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)[J]. Plant and Soil, 2019, 436(1/2): 475-487.
- [5] FERNANDO DR, LYNCH JP. Manganese phytotoxicity: new light on an old problem[J]. Annals of Botany, 2015, 116(3): 313-319.
- [6] 曹婧, 李向林, 万里强. 锰胁迫对紫花苜蓿生理和生长特性的影响[J]. 中国草地学报, 2019, 41(6): 15-22. CAO J, LI XL, WAN LQ. Effects of manganese stress on physiological and growth characteristics of alfalfa[J]. Chinese Journal of Grassland, 2019, 41(6): 15-22 (in Chinese).
- [7] 肖泽华, 李欣航, 潘高, 吴耀文, 杨灿鑫, 匡雪韶, 刘文胜. 锰胁迫对黄花草种子萌发及幼苗生理生化

- 特征的影响[J]. 草业学报, 2019, 28(12): 75-84.
- XIAO ZH, LI XH, PAN G, WU YW, YANG CX, KUANG XS, LIU WS. Effects of manganese stress on seed germination, and seedling physiological and biochemical characteristics of *Cleome viscosa*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(12): 75-84 (in Chinese).
- [8] 申娟. 雌雄兄妹系欧美杨(*Populus×euramericana*)对锰胁迫的生理响应差异及其叶绿体蛋白质组学分析[D]. 芜湖: 安徽师范大学硕士学位论文, 2019.
- SHEN J. Differences in physiological responses of male and female siblings of *Populus×euramericana* to manganese stress and its chloroplast protein genome analysis[D]. Wuhu: Master's Thesis of Anhui Normal University, 2019 (in Chinese).
- [9] 刘鹏. 博落回对锰的富集效应及胁迫响应研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2019.
- LIU P. Study on manganese enrichment effect and stress response of *Macleaya cordata*[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2019 (in Chinese).
- [10] YAO YN, XU G, MOU DL, WANG JR, MA JB. Subcellular Mn compartation, anatomic and biochemical changes of two grape varieties in response to excess manganese[J]. Chemosphere, 2012, 89(2): 150-157.
- [11] DELHAIZE E, KATAOKA T, HEBB DM, WHITE RG, RYAN PR. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance[J]. The Plant Cell, 2003, 15(5): 1131-1142.
- [12] SASAKI A, YAMAJI N, XIA JX, MA JF. OsYSL6 is involved in the detoxification of excess manganese in rice[J]. Plant Physiology, 2011, 157(4): 1832-1840.
- [13] 类延宝. 青杨组(*Section Tacamahaca Spach*)杨树不同种群对土壤干旱和重金属锰污染的生态生理响应[D]. 成都: 中国科学院研究生院(成都生物研究所)博士学位论文, 2007.
- LEI YB. Ecophysiological responses to drought stress and manganese toxicity in different populations of *Section tacamahaca spach*[D]. Chengdu: Doctoral Thesis of Graduate School of China Academy of Sciences (Chengdu Institute of Biology), 2017 (in Chinese).
- [14] 金政. 锰超富集植物西南木荷对锰胁迫的生理响应及代谢组和转录组分析[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2017.
- JIN Z. Physiological response of manganese hyperaccumulator *Schima wallichii* to manganese stress and metabonomics and transcriptomics analysis[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2017 (in Chinese).
- [15] 贾怡丹, 韩佳芮, 李季肤, 王桂花, 刘攀道, 刘国道, 罗丽娟, 陈志坚. 过量锰处理对柱花草次级代谢物、酶活性和 *SgPALs* 基因表达的影响[J]. 热带作物学报, 2020, 41(3): 513-520.
- JIA YD, HAN JR, LI JF, WANG GH, LIU PD, LIU GD, LUO LJ, CHEN ZJ. Effects of excess manganese on secondary metabolites, enzyme activity and *SgPALs* gene expression in *Stylosanthes*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(3): 513-520 (in Chinese).
- [16] 林觅, 郑益平, 林智敏. 油菜素内酯对水稻矮化突变体幼苗生长影响转录组学分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(20): 6622-6630.
- LIN M, ZHENG YP, LIN ZM. Transcriptomic analysis for the effect of brassinolide on seedling growth in rice dwarf mutant[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(20): 6622-6630 (in Chinese).
- [17] 尹丽兴. 基于转录组测序和生化分析揭示盐碱胁迫对玉米木质素生物合成的影响[J]. 西南农业学报, 2023, 36(3): 454-464.
- YIN LX. Effect of saline-alkaline stress on lignin biosynthesis in maize revealed by transcriptome and biochemical analysis[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2023, 36(3): 454-464 (in Chinese).
- [18] 张慧. 小麦菌根侵染率的基因型差异及其转录组学机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2022.
- ZHANG H. Genotypic differences of mycorrhizal infection rate in wheat and its transcriptomics mechanism[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2022 (in Chinese).
- [19] 于文慧, 杨明川, 王雅利, 张子路, 康振辉. 高粱幼苗响应镉离子胁迫的转录组分析[J]. 分子植物育种, 2023, 1-15.
- YU WH, YANG MC, WANG YL, ZHANG ZL, KANG ZH. Transcriptome analysis of *sorghum* seedlings in response to cadmium stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 1-15 (in Chinese).
- [20] YOU X, YANG LT, LU YB, LI H, ZHANG SQ, CHEN LS. Proteomic changes of *Citrus* roots in response to long-term manganese toxicity[J]. Trees, 2014, 28(5): 1383-1399.

- [21] 邱洁雅, 袁梦, 朱攀攀, 凌丽俐, 曹立, 付行政, 彭良志. 不同柑橘砧木对锰过量胁迫的耐受性及生理响应[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(1): 109-121. QIU JY, YUAN M, ZHU PP, LING LL, CAO L, FU XZ, PENG LZ. Tolerance and physiological response of *Citrus* rootstock cultivars to manganese toxicity[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2021, 27(1): 109-121 (in Chinese).
- [22] 王悟敏, 匡雪韶, 胡佳瑶, 刘文胜. 锰胁迫对盐肤木种子萌发、幼苗生长及理化特性的影响[J]. 生态学报, 2022, 42(9): 3706-3715. WANG WM, KUANG XS, HU JY, LIU WS. Effects of manganese stress on seed germination, seedling growth and physiological and biochemical characteristic of *Rhus chinensis*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(9): 3706-3715 (in Chinese).
- [23] 刘洋. 组织培养条件下构树对重金属镉和锰的耐受性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2021. LIU Y. Study on tolerance of *Broussonetia papyrifera* to heavy metals cadmium and manganese in tissue culture[D]. Changsha: Master's Thesis of Central South University of Forestry & Technology, 2021 (in Chinese).
- [24] TANG T, TAO FQ, LI WQ. Characterisation of manganese toxicity tolerance in *Arabis paniculata*[J]. Plant Diversity, 2021, 43(2): 163-172.
- [25] 辛建攀, 李燕, 赵楚, 田如男. 镉胁迫下梭鱼草叶片转录组测序及苯丙烷代谢途径相关基因挖掘[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 198-210. XIN JP, LI Y, ZHAO C, TIAN RN. Transcriptome sequencing in the leaves of *Pontederia cordata* with cadmium exposure and gene mining in phenylpropanoid pathways[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 198-210 (in Chinese).
- [26] LIU PD, HUANG R, HU X, JIA YD, LI JF, LUO JJ, LIU Q, LUO LJ, LIU GD, CHEN ZJ. Physiological responses and proteomic changes reveal insights into *Stylosanthes* response to manganese toxicity[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 1-21.
- [27] WANG JB, SU C, CUI ZB, HUANG LX, GUS, JIANG SX, FENG J, XU H, ZHANG WZ, JIANG LL, ZHAO MH. Transcriptomics and metabolomics reveal tolerance new mechanism of rice roots to Al stress[J]. Frontiers in Genetics, 2023, 13: 1063984.
- [28] XU ZG, FAN L, ZHENG MX, ZHAO YL, HUANG HM, YANG GY. Physiological dynamics as indicators of plant response to manganese binary effect[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1145427.
- [29] SANTOS EF, KONDO SANTINI JM, PAIXÃO AP, JÚNIOR EF, LAVRES J, CAMPOS M, REIS AR. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 113: 6-19.
- [30] PARK H, KIM T, BHOO S, LEE TE, LEE SW, CHO MH. Biochemical characterization of the rice cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family[J]. Molecules, 2018, 23(10): 2659.
- [31] LI YP, SHI SQ, ZHANG Y, ZHANG AM, WANG ZF, YANG YL. Copper stress-induced phytotoxicity associated with photosynthetic characteristics and lignin metabolism in wheat seedlings[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 254: 114739.
- [32] CHEN S, WANG Q, LU H, LI JW, YANG D, LIU JC, YAN CL. Phenolic metabolism and related heavy metal tolerance mechanism in *Kandelia Obovata* under Cd and Zn stress[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 169: 134-143.
- [33] LANE TS, REMPE CS, DAVITT J, STATON ME, PENGYH, SOLTIS DE, MELKONIAN M, DEYHOLOS M, LEEBENS-MACK JH, CHASE M, ROTHFELS CJ, STEVENSON D, GRAHAM SW, YU J, LIU T, EDGER PP, ZHANG Y, XIE YL, ZHU Y, CARPENTER E, et al. Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology[J]. BMC plant Biotechnology, 2016, 16(1): 47.
- [34] JOGAWAT A, YADAV B, CHHAYA, NARAYAN OP. Metal transporters in organelles and their roles in heavy metal transportation and sequestration mechanisms in plants[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(1): 259-275.
- [35] LIU ZC, ZHOU LZ, GAN CC, HU LJ, PANG B, ZUO D, WANG GY, WANG HC, LIU YL. Transcriptomic analysis reveals key genes and pathways corresponding to Cd and Pb in the hyperaccumulator *Arabis paniculata*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 254: 114757.
- [36] LIU WX, FENG X, CAO FB, WU DZ, ZHANG GP, VINCZE E, WANG YZ, CHEN ZH, WU FB. An ATP binding cassette transporter *HvABCB25* confers

- aluminum detoxification in wild barley[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 401: 123371.
- [37] KIM DY, BOVET L, KUSHNIR S, NOH EW, MARTINOIA E, LEE Y. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006, 140(3): 922-932.
- [38] HONG YY, ZHAO J, GUO L, KIM SC, DENG XJ, WANG GL, ZHANG GY, LI MY, WANG XM. Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses[J]. Progress in Lipid Research, 2016, 62: 55-74.
- [39] HONG YY, ZHENG SQ, WANG XM. Dual functions of phospholipase D α 1 in plant response to drought[J]. Molecular Plant, 2008, 1(2): 262-269.
- [40] KOCOURKOVÁ D, KRČKOVÁ Z, PEJCHAR P, KROUMANOVÁ K, PODMANICKÁ T, DANĚK M, MARTINEC J. Phospholipase D α 1 mediates the high-Mg²⁺ stress response partially through regulation of K⁺ homeostasis[J]. Plant, Cell & Environment, 2020, 43(10): 2460-2475.
- [41] ESCOBAR-SEPÚLVEDA HF, TREJO-TÉLLEZ LI, PÉREZ-RODRÍGUEZ P, HIDALGO-CONTRERAS JV, GÓMEZ-MERINO FC. Diacylglycerol kinases are widespread in higher plants and display inducible gene expression in response to beneficial elements, metal, and metalloids ions[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 129.
- [42] TANG F, XIAO ZC, SUN FJ, SHEN SL, CHEN S, CHEN R, ZHU MC, ZHANG QW, DU H, LU K, LI JN, QU CM. Genome-wide identification and comparative analysis of diacylglycerol kinase (*DGK*) gene family and their expression profiling in *Brassica napus* under abiotic stress[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 1-17.

(本文责编 郝丽芳)