

«مقاله پژوهشی»

مطالعه گسترده خانواده ژنی پروتئین‌های متحمل به فلز (MTP) در یونجه (*Medicago truncatula*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و سویا (*Glycine max*)

زهرا پاکباز^۱، آسا ابراهیمی^{۱*}، مارتینا ریکاور^۲، سسیل بن^۲، عبدالله محمدی^۳

۱. گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. آزمایشگاه اکولوژی و محیط زیست کاربردی، دانشگاه تولوز، CNRS، تولوز، فرانسه.

۳. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۱)

Genome-wide study of metal tolerance protein (MTP) gene family in *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*

Zahra Pakbaz¹, Asa Ebrahimi^{1*}, Martina Rickauer², Cecile Ben², Abdollah Mohammadi³

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France.

3. Associate Professor, Department of Plant Breeding, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

(Received: Aug. 16, 2021 - Accepted: Dec. 2, 2021)

Abstract

Metal tolerance proteins (MTP) are plant membrane divalent cation transporters, which plays an important role during plant growth and development. They involve in minerals uptake and provide resistance for plants in polluted soil by heavy metal. However, information about MTPs proteins in Fabaceae family are scarcely known. Therefore, in this study we provided an extensive evaluation of MTP genes in three important members of this family including: *Glycine max*, *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris* by providing phylogenetic assessments, chromosomal distributions, gene structures and expression in different tissue. According to the results 14, 12 and 23 MTP genes respectively were found in *M. truncatula*, *P. vulgaris* and *G. max*. 13 duplicated MTP genes in *G. max* were found meanwhile we did not find any duplication in the MTP genes of *M. truncatula* and *P. vulgaris*. All studied MTPs were classified into three major cation diffusion facilitator (CDFs) groups; Mn-CDFs, Zn-CDFs, and Fe/Zn-CDFs. *In silico* subcellular location results revealed that these proteins have the maximum activity in the vacuole in all three plants, and a small number are located in the cell wall and nucleus. According to gene structure and protein motifs of studied MTPs, they are highly conserved but their expression measurement showed that each one of them have different levels of expression during growth stage. It confirms their importance for plants during growth and development.

Keywords: Fabaceae, Heavy metal, Bioinformatics, Gene family.

E-mail: dr.asaebrahimi@gmail.com

چکیده

پروتئین‌های مسئول تحمل به فلزات (MTP) از جمله ناقل‌های کاتیونی دو ظرفیتی در دیواره سلولی گیاهان هستند که نقش مهمی را در رشد گیاهان ایفا می‌کنند. آن‌ها در فرایند جذب فلزات ریزمغذی و ایجاد مقاومت در گیاهان در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین شرکت می‌کنند. با این حال اطلاعات کافی در مورد ژن‌های MTP در خانواده گیاهی بقولات به‌اندازه کافی وجود ندارد. بنابراین ما در این مطالعه، ارزیابی گسترده‌ای از ژن‌های MTP در سه عضو مهم این خانواده شامل: یونجه (*Medicago truncatula*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و سویا (*Glycine max*) با بررسی روابط فیلوژنتیکی، نحوه توزیع کروموزومی، ساختار ژنی و بیان آن‌ها در بافت‌های مختلف فراهم آوردیم. با توجه به نتایج به‌دست آمده ۱۴، ۱۲ و ۲۳ عدد ژن MTP به‌ترتیب در یونجه، لوبیا و سویا یافت شد. ۱۳ ژن MTP مضاعف در سویا یافت شد در حالی که در لوبیا و یونجه هیچ مضاعف‌شدگی یافت نشد. همه MTP های مورد مطالعه در هر سه گیاه در سه گروه Mn-CDFs، Zn-CDFs و Fe/Zn-CDFs دسته‌بندی شدند. نتایج بررسی جایگاه زیر سلولی به روش *In silico* نشان داد که بیشترین فعالیت این پروتئین‌ها در هر سه گیاه در واکوئل می‌باشد و تعداد کمی در دیواره سلولی و هسته قرار دارند. بررسی ساختار ژنی و پروتئینی این ژن‌ها در این گیاهان حاکی از حفاظت‌شدگی بالای این پروتئین‌ها بود اما هرکدام از آن‌ها سطوح مختلفی از بیان ژن را در طی رشد نشان دادند. این امر می‌تواند حاکی از نقش مهم این پروتئین‌ها در طی رشد و نمو گیاهان باشد.

واژه‌های کلیدی: بقولات، بیوانفورماتیک، خانواده ژنی، فلزات سنگین.

* نویسنده مسئول: آسا ابراهیمی

مقدمه

فلزات سنگین شامل گروه بزرگی از فلزات است که از وزن مولکولی بالاتر از ۴۰ گرم بر مول برخوردار هستند. از ۹۲ عنصر طبیعی، کم و بیش ۳۰ فلز و متالوئید به‌طور بالقوه برای انسان سمی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به کادمیوم، آرسنیک، جیوه، آلومینیوم و لیتیوم اشاره نمود (Morais et al., 2012). تمام فلزات سنگین در غلظت‌های بیش از اندازه برای موجودات زنده سمی هستند، اما برخی از آن‌ها برای رشد طبیعی در غلظت‌های پایین ضروری‌اند و در فعالیت‌های عملکردی تعداد زیادی از پروتئین‌ها نقش دارند (Ricachenevsky et al., 2013). اما گروه دیگری از این فلزات که فلزات غیرضروری نامیده می‌شوند علاوه بر تأثیرات منفی در رشد و نمو گیاهان، می‌توانند از طریق گیاهان زراعی وارد زنجیره غذایی شده و سلامت انسان را تهدید کنند (Liu et al., 2019). گیاهان با مکانیسم‌های پیچیده‌ای مانند کنترل جذب و حرکت یون‌های فلزی در دو سطح سلول و بافت، کلاته کردن، تجزیه و سم‌زدایی، و همچنین انبار یون‌های فلزی در داخل سلول‌ها قادر به مهار یون‌های فلزی هستند (Montanini et al., 2007; Seregin and Kozhevnikova, 2020). در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها CDF¹ها که خانواده‌ای از پروتئین‌های متصل به غشا هستند قادر به انتقال یون‌های فلزات سنگین می‌باشند. اعضای این خانواده ناقل‌های غشایی کاتیون‌های دو ظرفیتی هستند که موجب جریان یون‌های فلزی از سیتوپلاسم به خارج سلول می‌شوند (Liu et al., 2019; Takemoto et al., 2017). ناقلین CDF در غشاهای مختلف مانند غشای سلول باکتریایی، دستگاه گلژی پستانداران و گیاهان، غشاهای واکوئل مخمر و گیاهان یافت

می‌شوند که در جریان فلزی از سیتوپلاسم، یا به فضای خارج سلول یا به اندامک‌ها نقش دارند (Peiter et al., 2007). خانواده CDF شامل سه زیرخانواده اصلی به نام‌های Mn-CDF، Fe/Zn-CDF و Zn-CDF است (Gao et al., 2020). CDFهای موجود در سلول‌های گیاهی به‌طور کلی پروتئین‌های متحمل به فلز (MTP)² نامیده می‌شوند (Menguer et al., 2013) و به هفت گروه فیلوژنیک در آرکیدوپسیس تقسیم می‌شوند که اعضای زیرگروه‌های ۱ (MTP1-MTP4)، ۵ (MTP5) و ۱۲ (MTP12) در گروه Zn-CDF، زیرگروه‌های ۶ (MTP6) و ۷ (MTP7) در گروه Fe/Zn-CDF و زیرگروه‌های ۸ (MTP8) و ۹ (MTP9-MTP11) در گروه Mn-CDF قرار می‌گیرند (Gu et al., 2020). در حالی که ژن‌های MTP در آرکیدوپسیس بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند اما در سایر گونه‌های گیاهی کمتر شناخته شده‌اند. CDFهای گروه ۱ نه تنها توانایی انتقال روی (Zn) را دارند بلکه قادرند سایر یون‌های فلزی از جمله کبالت، کادمیوم، مس، نیکل و آهن را به درون واکوئل نیز انتقال دهند (Shirazi et al., 2019). پروتئین‌های MTP8 در برنج، خیار، جو، پرتقال، گندم و آرکیدوپسیس، منگنز را به درون واکوئل یا دستگاه گلژی منتقل می‌کنند (Andresen et al., 2018; Eroglu et al., 2017; Zhang et al., 2021). پروتئین‌های MTP9 در انتقال دو طرفه H⁺/Mn²⁺ و H⁺/Cd²⁺ نقش دارند و باعث افزایش انتقال منگنز و کادمیوم از ریشه به شاخه‌ها می‌شوند. همچنین انتقال روی و کادمیوم از طریق MTP1 یا MTP4 با خارج شدن H⁺ از واکوئل به سیتوپلاسم همراه است و بنابراین به شیب پروتون تولیدشده توسط پمپ‌های پروتون تونوپلاست نیاز دارد (Migocka et al., 2015). در مطالعات صورت

مواد و روش‌ها

شناسایی و استخراج توالی ژن‌های *MTP* از نرم‌افزار TBLAST و روش هم‌ردیفی گنجانده شده در پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم (phytozome.jgi.doe.gov) برای به‌دست آوردن اعضای خانواده ژنی *MTP* در یونجه (GCA_003473485)، لوبیا (GCA_000499845) و سویا (GCF_000004515) استفاده شد. در این روش از توالی‌های شناخته شده ژن‌های *MTP* گیاهان آراییدوپسیس و برنج برای یافتن ژن‌های *MTP* در سه گیاه مورد بررسی استفاده شد. بعد از یافتن توالی‌هایی با تشابه بالا، از پایگاه اطلاعاتی Pfam (pfam.xfam.org) جهت بررسی توالی‌ها به‌منظور داشتن دمین^۲ Cation efflux (PF01545) استفاده شد و توالی‌های فاقد دمین مورد نظر از ادامه بررسی حذف شدند.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی

با به‌کارگیری نرم‌افزار Clustal W هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی *MTP* آراییدوپسیس، یونجه، لوبیا و سویا انجام شد (Larkin et al., 2007). سپس درخت فیلوژنتیکی این توالی‌ها با روش نزدیکترین همسایه^۳ و بوت‌استرپ^۴ ۱۰۰ با به‌کارگیری نرم‌افزار MEGA7 ترسیم شد (Kumar et al., 2016; Mohammadian Roshan, 2020). در ادامه نواحی حفاظت‌شده روی توالی‌ها مشخص شدند و با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده از پایگاه اطلاعاتی Pfam محل دمین‌ها روی توالی‌ها مشخص شد.

گرفته در آراییدوپسیس نشان داده شده که *AtMTP11* در کنترل غلظت منگنز فعالیت می‌کند (Erbasol and Ozan, 2013). *AtMTP12* با تشکیل یک هتروداایمر^۱ در انتقال Zn به اجسام گلزی نقش دارد (Migocka et al., 2018a). در برنج پنج عدد از *MTP*‌ها در گروه Mn-CDF قرار می‌گیرند که از آن‌ها *OsMTP8.1* و *OsMTP8.2* به‌عنوان حامل‌های منگنز مستقر شده در تونوپلاست عمل کرده و *OsMTP9* در جذب مؤثر منگنز در ریشه نقش دارد (Liu et al., 2019). گیاهان تیره بقولات از مؤلفه‌های اصلی تأمین امنیت غذایی در سراسر جهان است و مطالعات اخیر نشان داده است که گیاهان خانواده بقولات با باکتری‌های همزیست آن‌ها می‌توانند نقش مهمی را در رفع آلودگی خاک به فلزات سنگین داشته باشند (Hall et al., 2011). امروزه به‌دلیل وجود روش‌های سریع و پیشرفته در زمینه توالی‌یابی، ژنوم بسیاری از گیاهان براحتی قابل دسترس است و مطالعه خانواده‌های ژنی نیز با وجود نرم‌افزارهای دقیق نسبت به قبل بسیار آسان‌تر شده است (Mirzaei et al., 2014). در مطالعه حاضر بررسی و تفسیر گسترده خانواده ژنی *MTP* در گیاه یونجه (*Medicago truncatula*)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) و سویا (*Glycine max*) با بهره‌بردن از داده‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی مانند NCBI و Phytozome انجام شده است. این مطالعه به درک بهتر ژن‌های *MTP* و ارتباط تکاملی آن‌ها در سه گیاه یادشده کمک می‌کند که با استفاده از نتایج آن می‌تواند به برنامه‌های آتی در زمینه تولید گیاهان با راندمان بالا در زمین‌های آلوده کمک نماید. همچنین این مطالعه با هدف ارائه اطلاعات مهم برای درک ارتباط *MTP*‌ها برای رشد و نمو این گیاهان مهم انجام شده است.

2. Domain
3. Neighbor joining
4. Bootstrap

1. Heterodimer

Lescot *et al.*, 2002;) PlantCARE انجام شد (Chalekaei *et al.*, 2020). برای بررسی بیان ژن‌های *MTP* در بافت‌های مختلف سه گیاه یادشده، از داده‌های RNA-seq موجود در پایگاه اطلاعاتی LegumeIP (<http://plantgrn.noble.org/>) استفاده شد (Dai *et al.*, 2021). این داده‌ها میزان بیان هر ژن در بافت‌های متفاوت استخراج شد و با استفاده از نرم‌افزار R و پکیج ggplot پروفایل بیان ژن‌های *MTP* در هر گیاه ترسیم گردید.

نتایج و بحث

بررسی تنوع توالی‌های *MTP*

خانواده ژنی *MTP* که نقش مهمی را در ثبات سلولی در زمان حضور فلزات دارند در گونه‌های متفاوت دارای تعداد اعضای متغیری هستند. این پروتئین‌ها کانال‌های انتقال کاتیونی در سلول فراهم می‌کنند که مسئولیت حرکت غشایی عرضی فلزات را بر عهده دارند و نقش اساسی در دستیابی به مواد معدنی برای سلول بازی می‌کنند. علاوه بر این، *MTP* پروتئین‌ها در گیاهان رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، نقش کلیدی را در تحمل به این فلزات بازی می‌کنند. تعداد اعضای خانواده ژنی *MTP* در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله آرابیدوپسیس، برنج و انگور به ترتیب ۱۲، ۱۰ و ۱۴ ژن *MTP* گزارش شده است که در گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق تعداد آن‌ها در یونجه، لوبیا و سویا به ترتیب ۱۴، ۱۲ و ۲۳ عدد بود (جدول ۱) (Yuan *et al.*, 2012; Arrivault *et al.*, 2006; Shirazi *et al.*, 2019). طول پروتئین‌های *MTP* در گیاهان مورد مطالعه همانند سایر گیاهان بسیار متغیر بود. طول کوچک‌ترین توالی‌ها در یونجه، لوبیا و سویا به ترتیب ۳۸۵ (MtMTP-14)، ۳۶۹ (PvMTP-9) و ۲۹۴ (GmMTP-13) اسیدآمینو بود و طول بزرگ‌ترین توالی‌ها در یونجه ۹۰۵ (MtMTP-1)، ۸۱۳ (PvMTP-10) در لوبیا و ۷۸۷ (GmMTP-21) اسیدآمینو در سویا بود.

پیش‌بینی موتیف‌ها^۱ و محاسبه خواص بیوشیمیایی توالی‌های *MTP*

وزن مولکولی (kDa)^۲ و نقطه ایزوالکتریک (pI)^۳ پروتئین‌های *MTP* با به‌کارگیری نرم‌افزار ProtParam تعیین شد (Garg *et al.*, 2016; Arab *et al.*, 2020). مکان‌یابی درون‌سلولی پروتئین‌ها با به‌کارگیری نرم‌افزار Plant-mPLOC (Chou and Shen, 2010). پیش‌بینی شد موتیف‌های حفاظت‌شده نیز با استفاده از ابزار MEME (پیش‌فرض‌ها شامل ۵ موتیف با طول ۵ تا ۶۰ اسیدآمینو در هر توالی) پیش‌بینی شدند و ویژگی‌های این موتیف‌ها با به‌کارگیری نرم‌افزار Hmmscan تعیین گردید (Finn *et al.*, 2011).

بررسی ساختار ژنی و مکان کروموزومی توالی‌های *MTP*

ORFها^۴ و جایگاه کروموزومی ژن‌های *MTP* در ژنوم یونجه، لوبیا و سویا با استفاده از اطلاعات به‌دست آمده از پایگاه اطلاعاتی فیتوزوم مشخص شدند. جهت بررسی وجود ژن‌های مضاعف، توالی‌های نوکلئوتید ORFهای هر پروتئین هم‌ردیف شدند و ژن‌هایی که حداقل ۸۰ درصد مشابهت و هم‌پوشانی نسبت به ژن دیگر *MTP* داشتند به‌عنوان ژن‌های مضاعف در نظر گرفته شدند (Mirzaei *et al.*, 2020). تجزیه و تحلیل توزیع‌های اگزون-اینترون با به‌کارگیری نرم‌افزار GSDS صورت گرفت (Hu *et al.*, 2015).

بررسی پروموترها و بیان ژن‌های *MTP*

شناسایی پروموترها و عناصر تنظیمی سیس^۵ با دریافت توالی DNA به طول ۱۵۰۰ جفت باز از بالادست کدون شروع ژن‌های *MTP* و آنالیز آن‌ها با نرم‌افزار

1. Motif
2. Kilo Dalton
3. Isoelectric Point
4. Open Reading Frame
5. Cis-regulatory elements

جدول ۱. ویژگی‌های پروتئین‌های MTP در سه گیاه یونجه (MeMTP)، لوبیا (PhMTP) و سویا (GIMTP). اسم توالی‌های هر گیاه با دو حرف نام علمی آن‌ها آغاز می‌شود.

Name نام	Loci لوکوس	Chromosome کروموزوم	Position جایگاه	Strand رشته	Isoform number تعداد ایزوفرم	Weight وزن	Isoelectric point نقطه ایزوالکتریک	Length طول	Cell location محل سلولی
MeMTP-1	Medtr6g463330	Chr6	21913825-21916862	+	۰	۱۰۲	۶/۷۲۶	۹۰۵	واکوتل
MeMTP-2	Medtr4g064893	Chr4	24244048-24246190	+	۰	۴۳	۶/۳۶	۳۹۴	واکوتل
MeMTP-3	Medtr1040s0010	Sca1040	1246-2854	+	۰	۵۴	۶/۲۹۱	۵۰۷	هسته، واکوتل
MeMTP-4	Medtr4g008150	Chr4	1407153-1412421	+	۰	۴۸	۶/۸۲	۴۳۸	واکوتل
MeMTP-5	Medtr2g064405	Chr2	27307303-27312209	-	۲	۴۵	۶/۶۶	۳۹۳	دیواره سلولی، واکوتل
MeMTP-6	Medtr8g046550	Chr8	18643078-18647092	-	۰	۴۴	۶/۵۶۸	۳۹۴	واکوتل
MeMTP-7	Medtr7g022890	Chr7	7450138-7456295	-	۱	۴۵	۴/۸۵۳	۴۰۰	دیواره سلولی، واکوتل
MeMTP-8	Medtr3g062610	Chr3	28294352-28297483	-	۱	۴۵	۶/۶۷	۴۰۳	واکوتل
MeMTP-9	Medtr7g093290	Chr7	37063412-37072046	+	۰	۴۵	۷/۴۶۲	۳۹۰	واکوتل
MeMTP-10	Medtr1g088870	Chr1	39797416-39804874	-	۹	۵۳	۶/۴۳	۴۹۵	واکوتل
MeMTP-11	Medtr5g075680	Chr5	32205752-32208510	-	۳	۴۴	۵/۰۵۸	۳۹۵	واکوتل
MeMTP-12	Medtr3g080090	Chr3	36221334-36224014	-	۰	۴۶	۷/۲	۴۰۱	دیواره سلولی، واکوتل
MeMTP-13	Medtr2g036390.3	Chr2	15756787-15761166	+	۲	۴۵	۷/۹۳۹	۴۰۷	واکوتل
MeMTP-14	Medtr8g024240.2	Chr8	8885947-8888988	-	۱	۴۲	۶/۰۷	۲۸۵	واکوتل
PhMTP-1	Phvul.008G254900	Chr08	60275655-60280726	+	۰	۴۶	۸/۵۴۴	۴۳۲	واکوتل
PhMTP-2	Phvul.008G015500	Chr08	1278190-1282357	+	۴	۴۴	۴/۹۰۷	۳۹۶	واکوتل
PhMTP-3	Phvul.005G049300	Chr05	5742223-5745905	-	۰	۴۵	۸/۰۶۱	۳۹۶	دیواره سلولی، واکوتل
PhMTP-4	Phvul.011G178800	Chr11	48990728-48998083	-	۱	۴۶	۶/۸۰۲	۴۰۷	دیواره سلولی، واکوتل
PhMTP-5	Phvul.007G165166	Chr07	27868704-27875618	-	۰	۵۳	۶/۵۷	۴۹۰	واکوتل
PhMTP-6	Phvul.008G244200	Chr08	59266794-59270519	+	۰	۴۴	۵/۸۴	۳۹۶	واکوتل
PhMTP-7	Phvul.006G080700	Chr06	19279972-19283798	-	۰	۴۶	۵/۳۴	۴۱۳	واکوتل
PhMTP-8	Phvul.003G021300	Chr03	2036314-2039093	-	۰	۴۶	۶/۸۴	۴۰۰	دیواره سلولی، واکوتل
PhMTP-9	Phvul.001G142750	Chr01	38584393-38590197	+	۰	۴۱	۷/۶۲	۳۶۹	واکوتل
PhMTP-10	Phvul.002G176300	Chr02	33458683-33461476	-	۰	۹۱	۶/۶۶	۸۱۳	واکوتل
PhMTP-11	Phvul.011G061200	Chr11	5461191-5463025	-	۰	۴۲	۵/۹۶	۲۸۹	واکوتل
PhMTP-12	Phvul.010G119900	Chr10	40027163-40032105	+	۱	۴۶	۶/۰۱	۴۱۷	واکوتل
GIMTP-1	Glyma.08G222000	Chr08	18021880-18025538	+	۰	۴۷	۸/۳۷	۴۳۷	واکوتل
GIMTP-2	Glyma8G286100	Chr18	56628728-56632642	-	۱	۴۴	۴/۹۲	۳۹۶	دیواره سلولی، واکوتل
GIMTP-3	Glyma.02G095400	Chr02	8561703-8565611	+	۱	۴۴	۴/۸۶	۳۹۶	واکوتل
GIMTP-4	Glyma.07G020100	Chr07	1571863-1576248	-	۰	۴۷	۸/۳۷	۴۳۲	واکوتل
GIMTP-5	Glyma5G262300	Chr15	49484391-49488666	+	۰	۴۵	۷/۹	۳۹۵	دیواره سلولی، واکوتل
GIMTP-6	Glyma.08G164800	Chr08	12978532-12982936	-	۰	۴۵	۷/۲۶	۳۹۶	دیواره سلولی، واکوتل
GIMTP-7	Glyma5G262400	Chr15	49495728-49499550	+	۰	۴۵	۷/۷۲	۳۹۷	واکوتل
GIMTP-8	Glyma.03G146700	Chr03	36196590-36203201	+	۰	۴۴	۵/۲۶	۳۹۸	واکوتل
GIMTP-9	Glyma.09G122600	Chr09	29452578-29456779	+	۰	۴۶	۶/۹۱	۴۰۰	دیواره سلولی، واکوتل
GIMTP-10	Glyma.02G153800	Chr02	15783095-15791188	+	۰	۵۳	۶/۴۹	۴۹۱	واکوتل
GIMTP-11	Glyma9G148200	Chr19	40881463-40886282	+	۰	۴۰	۷/۹۳	۳۶۳	واکوتل
GIMTP-12	Glyma.03G145200	Chr03	36056661-36061391	+	۰	۴۰	۶/۹۹	۳۶۷	واکوتل
GIMTP-13	Glyma8G050400	Chr18	4353324-4358090	+	۰	۳۳	۶/۵۲	۲۹۴	واکوتل
GIMTP-14	Glyma4G206600	Chr14	47200208-47203172	-	۳	۴۳	۵/۳۷	۳۹۲	واکوتل
GIMTP-15	Glyma.07G049200	Chr07	4187619-4191765	-	۳	۴۵	۶/۲۷	۴۰۸	واکوتل
GIMTP-16	Glyma.02G237600	Chr02	42597212-42600960	-	۰	۴۷	۵/۶۵	۴۲۶	واکوتل
GIMTP-17	Glyma9G150000	Chr19	41018746-41025024	+	۰	۴۰	۵/۲۱	۳۵۷	واکوتل
GIMTP-18	Glyma.09G099500	Chr09	18099034-18105167	+	۲	۴۷	۵/۷۳	۴۱۰	واکوتل
GIMTP-19	Glyma.08G164700	Chr08	12972477-12975940	-	۰	۳۶	۷/۳	۳۳۱	واکوتل
GIMTP-20	Glyma2G059000	Chr12	4270381-4272387	-	۰	۴۲	۵/۸۸	۳۸۸	واکوتل
GIMTP-21	Glyma.08G102000	Chr08	7828786-7831334	+	۰	۸۸	۵/۸۱	۷۸۷	هسته، واکوتل
GIMTP-22	Glyma1G135500	Chr11	10310228-10312318	-	۰	۴۳	۸/۰۴۵	۳۹۵	واکوتل
GIMTP-23	Glyma6G017800	Chr16	1586339-1591621	-	۰	۴۶	۵/۴۵	۴۳۲	واکوتل

مورد بررسی در لوبیا، سویا و یونجه بسیار متفاوت بود و الگوی مشابهی از نحوه پراکنش آن‌ها مشاهده نشد. در آراییدوپسیس و انگور نیز چنین الگوی بی‌نظمی از پراکنش ژن‌های *MTP* در ژنوم گزارش شده است و همانند نتایج تحقیق ما در سه گیاه لوبیا، سویا و یونجه ارتباطی بین نحوه پراکنش و ارتباط فیلوژنتیکی توالی‌ها یافت نشد. بیشترین نقطه ایزوالکتریک مشاهده‌شده در بین خانواده پروتئین‌های *MTP* در لوبیا، سویا و یونجه به ترتیب ۸/۵۵ (PvMTP-1)، ۷/۴۶ (MtMTP-9) و ۸/۲۷ (GmMTP-4) بود. کمترین نقطه ایزوالکتریک مشاهده شده در اعضای خانواده پروتئین‌های *MTP* در لوبیا ۴/۹ (PvMTP-2)، در سویا ۴/۸۶ (GmMTP-3) و در یونجه ۴/۸۵ (MtMTP-7) بود. نقطه ایزوالکتریکی توالی پروتئینی *MTP* مربوط به آراییدوپسیس و انگور به ترتیب بین ۴/۸۷-۸/۱ و ۴/۸-۹/۵۹ متغیر بود که با پروتئین‌های *MTP* در لوبیا، سویا و یونجه مشابه بود. با توجه به نتایج بررسی محل فعالیت این پروتئین‌ها در سلول، آن‌ها بیشتر در واکوئل و تعداد بسیار کمی در دیواره سلولی و هسته یافت شدند (جدول ۱). بررسی تعداد ایزوفرم‌های (توالی ایزوفرم‌های هر ژن در سایت Pytozome موجود می‌باشد) بیان شده ژن‌های *MTP* در گیاهان مطالعه شده نشان داد که تعداد زیادی (۳۵ ژن) از آن‌ها ایزوفرم ندارند. اما در ۱۴ ژن *MTP*، به واسطه پیرایش متناوب^۱، تعداد ایزوفرم‌های هر ژن از ۱ تا ۹ عدد متغیر بود (جدول ۱). با افزایش سطح پیرایش متناوب در زمان رونویسی یک ژن، میزان تنوع پروتئین تولید شده افزایش می‌یابد که یکی از واکنش‌های سلول در جهت افزایش انعطاف‌پذیری در برابر تنش‌های محیطی می‌باشد (Mirzaei et al., 2020).

در میان توالی‌های مورد بررسی *MtMTP-1* بیشترین طول و وزن (۱۰۲ کیلوالتون) و *GmMTP-13* با طول ۲۹۴ اسیدآمین و ۳۳ کیلو دالتون وزن ملکولی کمترین طول و وزن را دارا بود. میانگین طول و وزن در کل توالی‌های مورد بررسی به ترتیب ۴۳۰ اسیدآمین و ۴۸ کیلو دالتون بود که این مقدار با میانگین اندازه‌گیری شده در میان توالی‌های مورد بررسی در هر سه گیاه یونجه، لوبیا و سویا به صورت مجزا نیز تقریباً مشابه بود (جدول ۱). در مقایسه طول و وزن پروتئین‌های *MTP* به دست آمده در لوبیا، یونجه و سویا با پروتئین‌های *MTP* در انگور و آراییدوپسیس (Arrivault et al., 2006; Shirazi et al., 2019) تفاوت معناداری مشاهده نشد (جدول ۱). مضاعف‌شدگی در ژن‌ها یکی از منابع مهم ایجاد صفات جدید در گونه‌های مختلف است که باعث افزایش انعطاف‌پذیری در برابر شرایط محیطی است. دانشمندان همواره از جهش و مضاعف‌شدگی در ژنوم به عنوان نیروهای محرکه تکامل یاد کرده‌اند (Mirzaei et al., 2014). نتایج حاصل از بررسی ژن‌های مضاعف در این توالی‌ها مورد بررسی نشان داد که در بین ۱۳ عدد از *MTP*‌های به دست آمده در سویا که شامل *GmMTP-11* و *GmMTP-12*، *GmMTP-8* و *GmMTP-2*، *GmMTP-4* و *GmMTP-23*، *GmMTP-15* و *GmMTP-7*، *GmMTP-5* و *GmMTP-6*، *GmMTP-4* و *GmMTP-1* و *GmMTP-22* و *GmMTP-20* مضاعف‌شدگی رخ داده است ولی در لوبیا و یونجه مضاعف‌شدگی بین ژن‌های *MTP* مشاهده نشد (شکل ۱). با توجه به اینکه در آراییدوپسیس و انگور نیز مضاعف‌شدگی در ژن‌های *MTP* گزارش نشده است و این رخداد فقط در سویا مشاهده شد. بنابراین یکی از دلایل تعداد بالای ژن *MTP* در سویا در مقایسه با لوبیا، یونجه، آراییدوپسیس، برنج و انگور می‌تواند رخداد مضاعف‌شدگی باشد. جایگاه کروموزومی توالی‌های

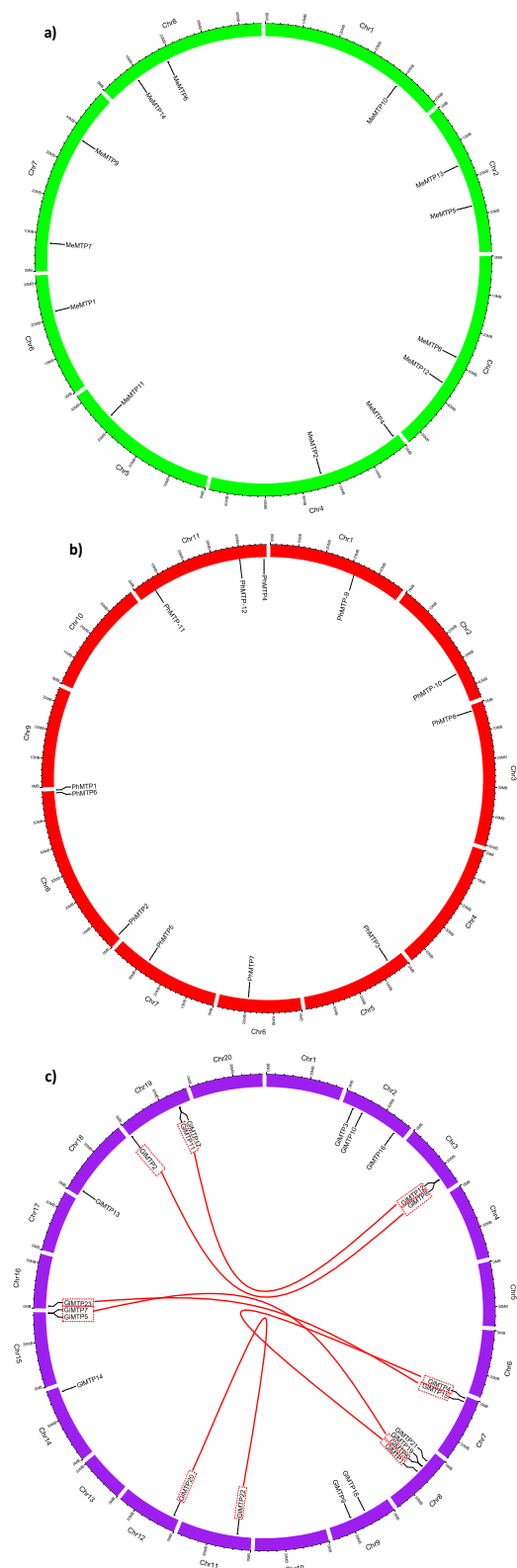
1. Alternative splicing

بررسی فیلوژنتیکی ژن‌های MTP و تفاوت گروه‌های تشکیل شده

نتایج حاصل از بررسی فیلوژنی توالی‌های پروتئینی MTP در لوبیا، سویا، یونجه و آرابیدوپسیس با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه نشان داد که این پروتئین‌ها در سه گروه عمده قرار می‌گیرند که چنین الگویی دسته‌بندی نیز در MTP‌های انگور، برنج و آرابیدوپسیس مشاهده شده است (شکل ۲).

گروه‌بندی توالی‌های پروتئینی MTP بررسی شده نشان داد که ۲۵ عدد از آن‌ها در گروه Mn-CDF، ۷ عدد در گروه Fe/Zn-CDF و ۱۷ عدد در گروه Zn-CDF جای گرفتند (شکل ۲). تعداد بالای اعضای گروه Mn-CDF و تعداد کم اعضای گروه Fe/Zn-CDF نیز در سایر گیاهان مانند انگور و آرابیدوپسیس نیز مشاهده شده است. مکان‌های کروموزومی ژن‌ها می‌توانند سرخ‌هایی از نحوه تکامل ژن‌ها، الگوهای تکراری آنها و احتمال وجود خوشه‌های ژنی را فراهم کند. الگوی گروه‌بندی این توالی‌ها با نحوه محل قرارگیری آنها در هر کروموزوم مقایسه گردید که ارتباطی بین این دو یافت نشد و توالی‌های با منشأ کروموزومی یکسان در یک گروه قرار نگرفتند (شکل ۲).

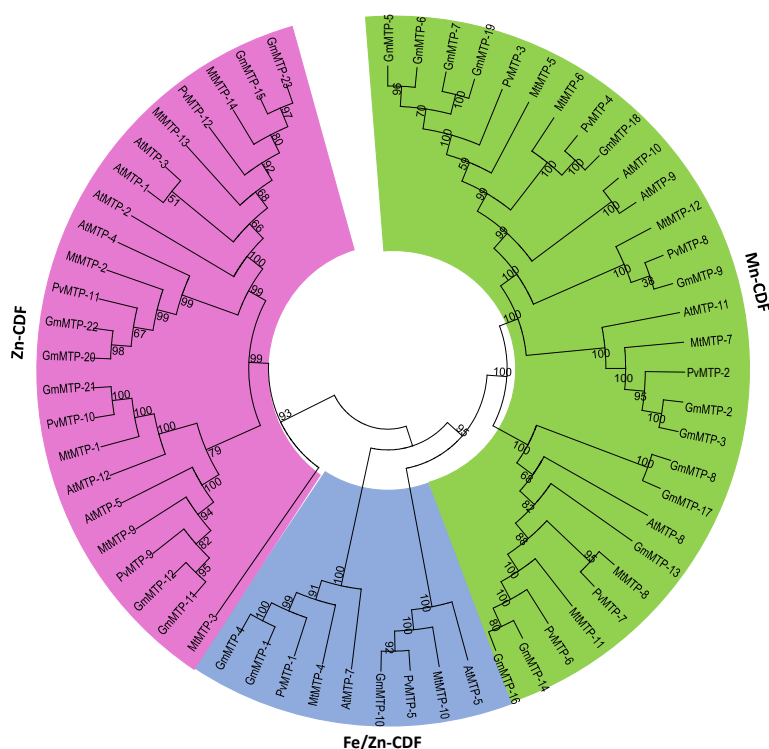
با توجه به نتایج حاصل از بررسی اینترون و اگزون در همه ژن‌های MTP تعداد اگزون‌ها از ۱ تا ۱۳ عدد متفاوت بود. در گروه Mn-CDF تعداد اگزون‌ها از ۶ تا ۸ عدد، در گروه Fe/Zn-CDF از ۱۲ تا ۱۳ عدد و در گروه Zn-CDF از ۱ تا ۱۰ عدد تعداد اگزون‌ها متغیر بود. در دو گروه Mn-CDF و Fe/Zn-CDF تقریباً تنوع زیادی از نظر تعداد اینترون و اگزون مشاهده نشد اما در گروه Zn-CDF تعداد آنها بسیار متغیر بود. عمده توالی‌های قرار گرفته در این گروه حاوی یک اگزون بودند بجز توالی‌هایی مانند *GmMTP-11*، *GmMTP-12*، *PvMTP-9* و *MtMTP-9* که در یک زیرگروه قرار گرفتند دارای ۱۰



شکل ۱. جایگاه ژن‌های MTP روی کروموزوم‌های یونجه (a)، لوبیا (b) و سویا (c). خطوط قرمز نشان دهنده این است که ژن‌های به هم متصل شده دچار مضاعف شدگی شده‌اند که تنها در ژن‌های MTP سویا فقط مشاهده شد.

اگزون هستند. اعضای هر گروه در درخت فیلوژنتیکی تعداد و اندازه مشابهی از اینترون‌ها و اگزون‌ها را نشان دادند که حاکی از حفاظت شدگی بالای ژن‌های *MTP* بود. پس از بررسی موتیف‌های موجود در توالی‌های مورد مطالعه، پنج موتیف شناسایی شد (شکل ۳). موتیف اول مربوط به دمین دایمیریزاسیون انتقال‌دهنده روی^۱ و بقیه موتیف‌های یافت‌شده مربوط به انتقال‌دهنده‌های

جریان کاتیونی^۲ بودند (جدول ۲). این نتایج با مطالعات انجام شده در انگور و صنوبر کاملاً مشابه بود (Gao et al., 2020; Shirazi et al., 2019). به صورت کلی اعضای هر گروه از درخت فیلوژنی دارای موتیف‌های مشابه و ساختار ژنی مشابه بودند که و این نشان‌دهنده حفاظت شدگی این پروتئین‌ها را در گیاهان مختلف بود (شکل‌های ۳ و ۴).

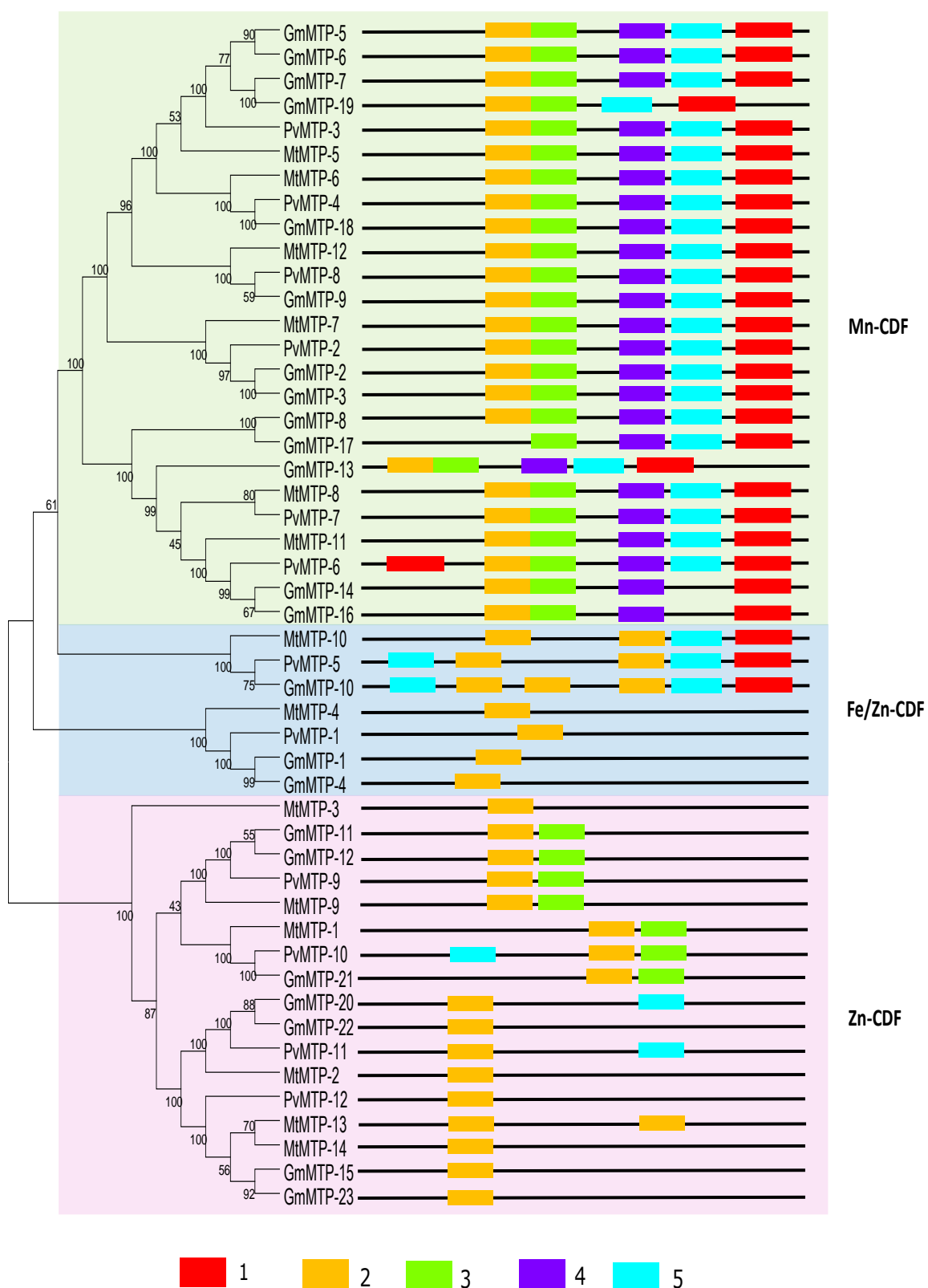


شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های *MTP* مربوط به یونجه (*MeMTP*)، لوبیا (*PhMTP*)، سویا (*GIMTP*) و آرابیدوپسیس (*AtMTP*) با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه. این پروتئین‌ها در سه گروه عمده قرار گرفتند که ۲۵ عدد از آن‌ها در گروه Mn-CDF، ۷ عدد در گروه Fe/Zn-CDF و ۱۷ عدد در گروه Zn-CDF جای گرفتند. اسم توالی‌های هر گیاه با دو حرف نام علمی آن‌ها آغاز می‌شود.

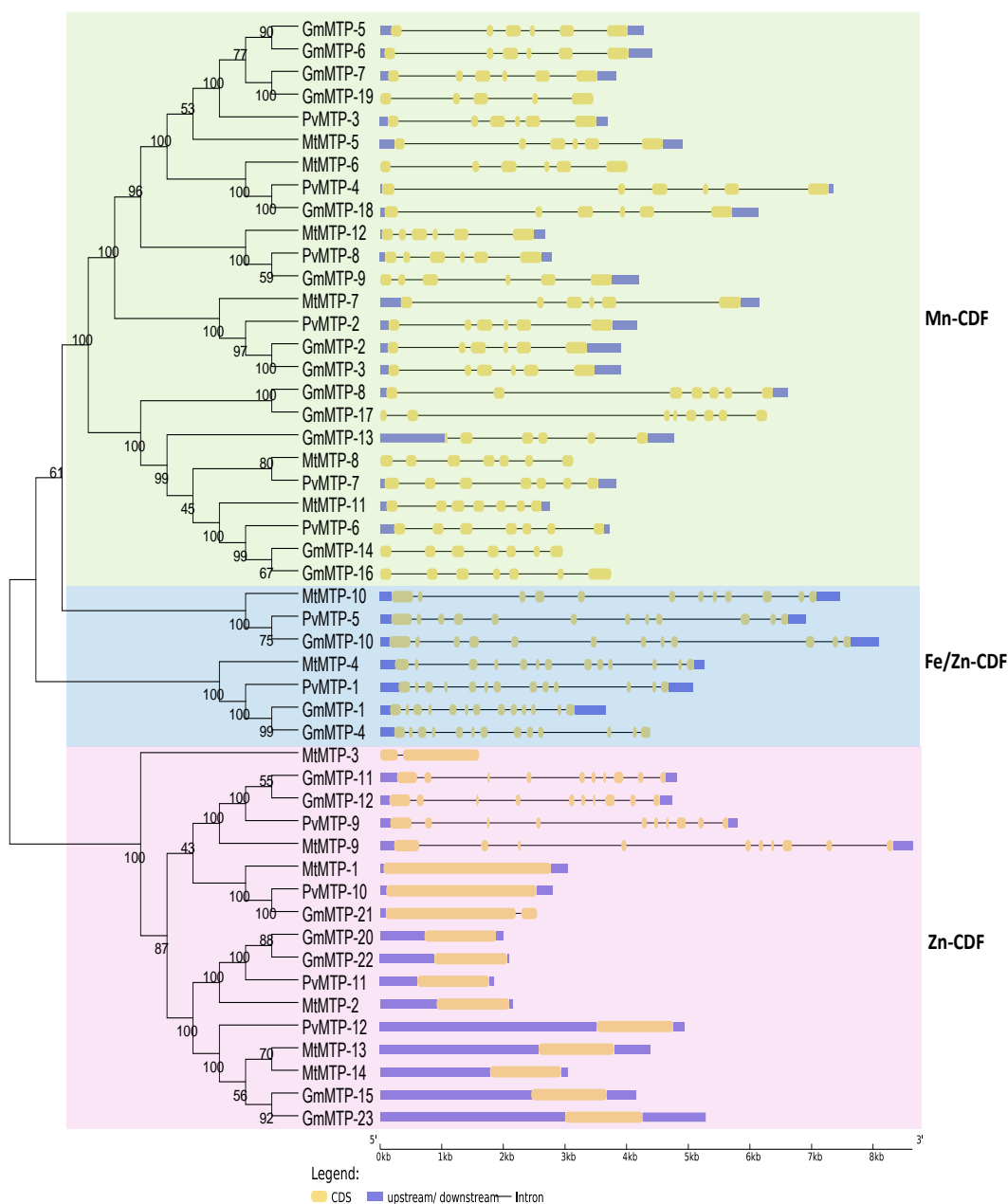
جدول ۲. مشخصات موتیف‌های به‌دست آمده و عملکردهای آن‌ها

Motif name نام موتیف	Motif sequence توالی موتیف	Function عملکرد
۱	DTVRA YTFGAHYFVEVDIVLPEDMPLKZ AHNIGETLQEKLEKPEVERAF	دایمیریزاسیون انتقال دهنده روی
۲	YWWIDPVGAIJALYTINTWSKTVMEN VWSLIGRTAPPEFLAKLYLIWN	انتقال جریان کاتیونی
۳	WFTALAMKNPNQYQYPIGKKRMQPVGII VFASVMATLGLQI	انتقال جریان کاتیونی
۴	VKFILMVYCRRFKNEIVRAYAQDHFDDV ITNSVGLAAAVLA	انتقال جریان کاتیونی
۵	SNAANLVFAAKVYASIRSGSLAVIAS TLDSLDDLLSGFIL	انتقال جریان کاتیونی

1. Dimerisation domain of Zinc Transporter
2. Cation efflux family



شکل ۳. جایگاه موتیف بر روی توالی‌های *MTP* مربوط به یونجه (*MeMTP*)، لوبیا (*PhMTP*) و سویا (*GIMTP*). به‌طور کلی در توالی‌های مورد مطالعه، پنج موتیف شناسایی شد و موتیف اول (قرمز) مربوط به دامین دایمریزاسیون انتقال دهنده روی و بقیه موتیف‌های ۲، ۳، ۴، ۵ یافت شده در توالی‌ها مربوط به انتقال دهنده‌های جریان کاتیونی هستند.



شکل ۴. جایگاه اگزون و اینترون روی هر توالی ژن‌های *MTP* مربوط به یونجه (*MeMTP*)، لوبیا (*PhMTP*) و سویا (*GmMTP*). توالی‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند از الگوی مشابه از نظر تعداد و الگوی پراکنش اگزون و اینترون بودند.

CAAT و TATA و عناصر مربوط به فاکتورهای رونویسی مانند MYC و MYB بیشترین تعداد را در مقایسه با سایر عناصر تنظیمی داشتند اما در کل تنظیم‌کننده‌های عمومی در مقایسه با سایر عناصر تنظیمی تعداد کمتری را داشتند. تعداد عناصر تنظیمی مربوط به تنش یا نور در بالادست این ژن‌ها در گیاهان مانند انگور و آرابیدوپسیس نیز فراوان مشاهده شده است. وجود این عناصر تنظیمی با تنوع زیاد در بالادست

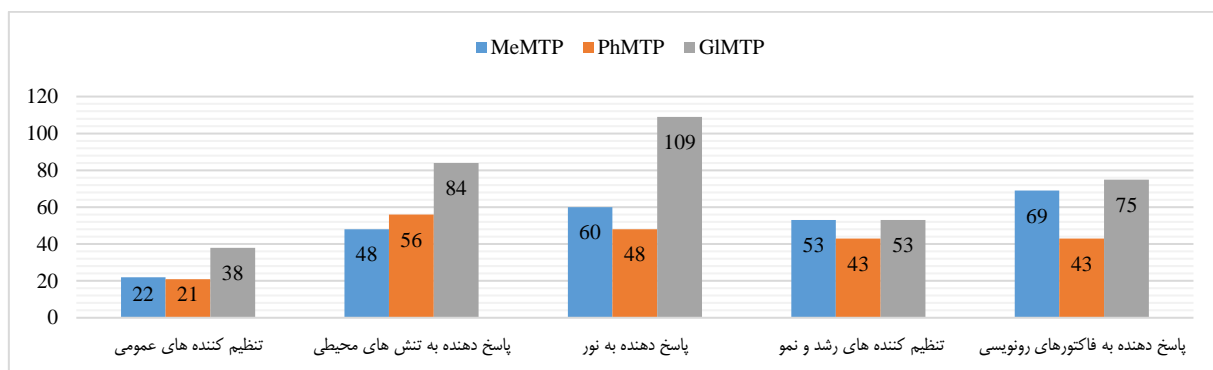
تنوع پرموترها و بیان گسترده ژن‌های *MTP*

در مجموع ۷۱ عنصر تنظیمی سیس در بالادست ژن‌های *MTP* گیاهان مورد مطالعه یافت شد که آن‌ها در پنج گروه متفاوت در برگ‌برنده تنظیم‌کننده‌های عمومی، پاسخ‌گو به تنش‌های محیطی، پاسخ‌گو به نور، تنظیم‌کننده‌های رشد و نمو و پاسخ‌گو به فاکتورهای رونویسی طبقه‌بندی شدند (شکل ۵). در این میان، عناصر مربوط به تنظیم‌کننده‌های عمومی شامل

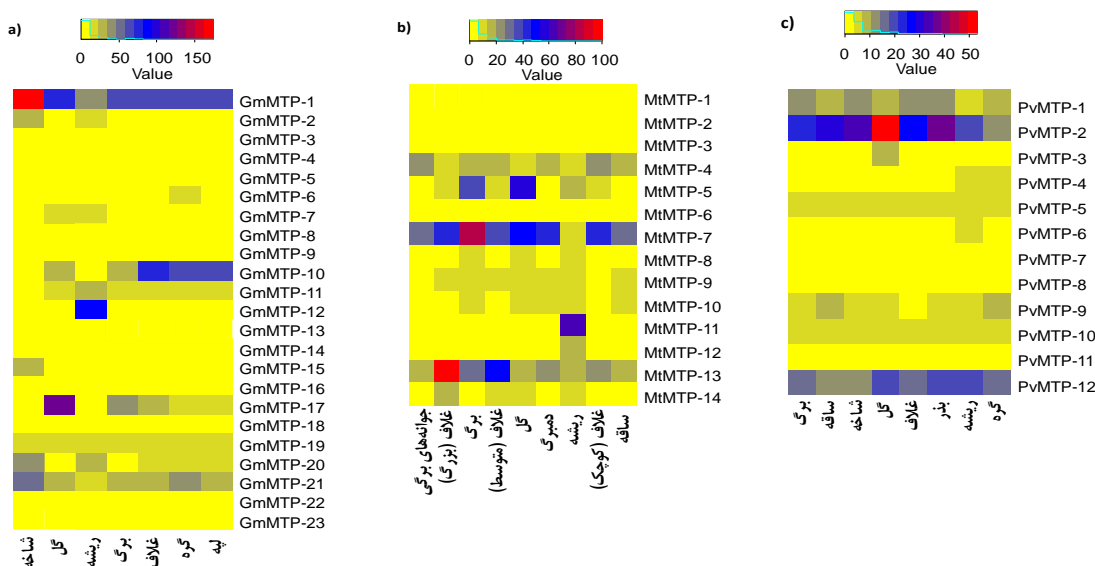
حاصل از بیان این ژن‌ها بیشتر در شرایط عادی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و بیان این ژن‌ها می‌تواند در شرایط تنش متفاوت باشد. اطلاعات استفاده شده در این مطالعه مربوط به بافت‌های برگ، شاخه، لپه، غلاف گل، ریشه، بذر، ساقه و جوانه‌های برگی بود. در سویا بیان ژن *GmMTP-1* که یکی از اعضای گروه Fe/Zn-CDF بود در همه بافت‌ها بیشتر از دیگر ژن‌های *MTP* بود به خصوص در ساقه که بیشترین بیان را در مقایسه با سایر بافت‌ها نشان دادند (شکل ۶).

ژن‌های *MTP* حاکی از دخالت عوامل گوناگون در بیان آن‌ها است که یا به صورت مجزا و یا به صورت گروهی بیان این ژن‌ها را کنترل می‌کنند. مطالعه ژن *OsMTP11* در برنج نشان داد که در بالادست این ژن عناصر تنظیم کننده سیس وجود دارد که در زمان تنش فلزات سنگین موجب افزایش بیان آن می‌شود (Zhang and Liu, 2017).

پروفایل بیان ژن‌های خانواده *MTP* در سه گیاه سویا، لوبیا و یونجه با تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-seq که در پایگاه اطلاعاتی LegumeIP در دسترس است انجام شد. داده‌های



شکل ۵. تعداد عنصر تنظیمی سیس یافت شده در بالادست ژن‌های *MTP* مربوط به یونجه (*MeMTP*)، لوبیا (*PhMTP*) و سویا (*GIMTP*) که در پنج گروه متفاوت که شامل تنظیم کننده‌های عمومی، پاسخ‌گو به تنش‌های محیطی، پاسخ‌گو به نور، تنظیم کننده‌های رشد و نمو و پاسخ‌گو به فاکتورهای رونویسی طبقه‌بندی شدند.



شکل ۶. پلات بیان ژن‌های *MTP* در بافت‌های مختلف سویا (a)، یونجه (b) و لوبیا (c). داده‌های حاصل از بررسی بیان این ژن‌ها در

بافت‌های متفاوت در شرایط بدون استرس نشان داد که در بسیاری از مراحل رشد بیان می‌شوند.

باشد. در مطالعه‌ای که بر روی بیان ژن‌های مختلف در گیاه توتون انجام شد نشان دادند که بیان ژن‌های *MTP* که در یک گروه در فیلوژنی قرار گرفته‌اند مشابه بود (Liu et al., 2019). با این حال بیان این ژن‌ها در زمانی که گیاه تحت تنش فلزات سنگین قرار گرفته بود در بافت‌های مختلف متفاوت بود. همچنین میزان بیان ژن‌های *MTP* در مطالعات گذشته در مورد *OsMTP11* برنج نشان داد که این ژن به‌طور گسترده‌ای در طی رشد و توسعه گیاه در بافت‌های مختلف در برنج بیان می‌شود (Zhang and Liu, 2017). همچنین ژن *OsMTP 1* در برگ‌های بالغ و ساقه‌ها به‌ویژه در سطوح بالا بیان می‌شوند (Yuan et al., 2012). بررسی بیان ژن *CsMTP6* در خیار نشان داده است که بیان آن توسط یون‌های آهن کنترل می‌شود و در توزیع آهن و منگنز بین سیتوزول و میتوکندری سلول‌های گیاهی نقش ایفا می‌کند (Migocka et al., 2018b). این یافته‌ها به همراه نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های *MTP* در سه گیاه سویا، یونجه و لوبیا نشان می‌دهد که *MTP*‌ها در رشد و نمو گیاه بسیار فعال هستند. در مطالعاتی که به بررسی بیان ژن‌های *MTP* در گیاه آرابیدوپسیس، انگور و صنوبر پرداخته بودند نیز چنین بیان متفاوتی مشاهده شد. در صنوبر از ۲۲ ژن *MTP* نزدیک به ۱۵ تای آن‌ها بیان‌های متفاوت و مجزایی را در طی رشد گیاه نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی ارتباط میزان بیان ژن‌های قرار گرفته در یک گروه در فیلوژنتیکی نشان داد که اعضای هر گروه بیان متفاوتی در بافت‌های مختلف دارند و به‌صورت مشابه به یک محرک واکنش نشان نمی‌دهند که با نتایج حاصل از بررسی بیان ژن‌های *MTP* در گیاه شلغم تیمار شده با فلزات سنگین مختلف مشابه بود. در نهایت این الگوی بیان ژن‌های *MTP* در زمان‌های متفاوت در طی رشد گیاه نشان‌دهنده یک مکانیسم تنظیمی پیچیده است

سایر ژن‌ها مانند *GmMTP-19* و *GmMTP-* 21 از اعضای گروه Zn-CDF نیز در همه بافت‌ها بیان شده بودند اما میزان بیان آن‌ها به‌اندازه *GmMTP-1* نبود. *GmMTP-10* و *GmMTP-17* نیز تقریباً بجز در ریشه و شاخه در همه بافت‌ها بیان شده‌اند. با این حال برخی از ژن‌های مورد بررسی در سویا به‌صورت اختصاصی در بافت‌هایی بیان زیادی داشتند و یا اینکه بیان آن‌ها تنها در یک بافت مشاهده شد (شکل ۶). به‌طور مثال *GmMTP-12* تنها در ریشه، *GmMTP-15* تنها در گل، *GmMTP-6* در گره بیان آن‌ها مشاهده شد و ژن *GmMTP-17* در گل از بیان بسیار بالایی برخوردار بود. سایر ژن‌های دیگر مانند *GmMTP-3*، *GmMTP-4*، *GmMTP-5*، *GmMTP-13*، *GmMTP-14*، *GmMTP-22* و *GmMTP-23* بیان بسیار پایینی را در همه بافت‌ها نشان دادند. در یونجه و لوبیا نیز ژن‌های *MtMTP-4* از گروه Mn-CDF، *MtMTP-7*، Fe/Zn-CDF از گروه *MtMTP-13* از گروه Zn-CDF، *PvMTP-1*، *PvMTP-2* و *PvMTP-12* در همه بافت‌ها بیان شده بودند با این حال برخی از آن‌ها مانند *MtMTP-7* و *MtMTP-13* در یونجه و *PvMTP-2* و *PvMTP-12* در لوبیا بیان بیشتری در مقایسه با دیگر ژن‌ها داشتند. در این گیاهان نیز بیان برخی از ژن‌ها مانند *MtMTP-1*، *MtMTP-2*، *MtMTP-3* و *MtMTP-6* در یونجه و ژن‌های *PvMTP-7*، *PvMTP-8* و *PvMTP-11* در لوبیا در مقایسه با سایر ژن‌ها بسیار پایین بود. اما ژن‌هایی مانند *MtMTP-11* و *MtMTP-12* در یونجه و *PvMTP-6* در لوبیا تنها در ریشه بیان شده بودند. در کل نتایج حاصل از بیان این ژن‌ها نشان داد که *MTP*‌ها در بافت‌های مختلف بیان‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند که این می‌تواند به‌دلیل عناصر تنظیمی متفاوتی که در بالادست این ژن‌ها قرار دارند

MTP در یونجه، لوبیا و سویا با ارتولوگ‌های آن‌ها در آرآیدوپسیس حاکی از مشابهت بالایی آن‌ها بود که می‌تواند نشان‌دهنده پتانسیل عملکردی مشابه این ژن‌ها در گیاهان یاد شده باشد. بررسی بیان این ژن‌ها در بافت‌های متفاوت نشان داد که در بسیاری از مراحل رشدی گیاهان به صورت عادی بیان می‌شوند. این نتایج اطلاعات پایه‌ای را برای درک بهتر مکانیسم انتقال فلزات سنگین به واسطه پروتئین‌های MTP در گیاهان خانواده بقولات فراهم کرد. تعداد بالایی ژن‌های MTP در سویا می‌تواند ناشی از مضاعف‌شدگی گسترده ژنومی باشد اما اینکه آیا این افزایش تعداد می‌تواند نشان‌دهنده توانایی بهتر این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان در پالایش گیاهی فلزات سنگین باشد نیازمند مطالعات بیشتری است.

که بیان MTP ها را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین، لازم است تغییرات سطح پروتئین MTP در زمان اعمال استرس‌های متفاوت بررسی شود تا مشخص شود که کدام‌یک به صورت عمومی در همه‌ی تنش‌ها و کدام‌یک به صورت اختصاصی در پاسخ به یک تنش مجزا بیان می‌شود.

در این مطالعه ژن‌های MTP در ژنوم سه گیاه یونجه، لوبیا و سویا مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌بندی به‌دست آمده از بررسی ساختار تکاملی آن‌ها و همچنین ساختار ژنی و موتیف‌های یافت شده نشان داد که آن‌ها از حفظ شدگی بالایی برخوردار هستند. مقایسه گروه‌های به‌دست آمده در فیلوژنی نشان داد که از نظر نوع و تعداد موتیف و ساختار ژنی تفاوت‌های چشمگیری با هم دارند. مقایسه توالی‌های

REFERENCES

- Andresen, E., Peiter, E., & Küpper, H. (2018). Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany*, 69(5), 909-954.
- Arab, M., Najafi Zarrini, H., Nematzadeh, G., & Hashemi-petroudi, S. H. (2021). In silico analysis of CBL gene family in the halophyte plant *Aeluropus litoralis* and the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Crop Biotechnology*, 10(32), 17-35.
- Arrivault, S., Senger, T., & Krämer, U. (2006). The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant Journal*, 46(5), 861-879.
- Chalekaei, M., Dehestani, A., Abbasi, A., Hashemi-petroudi, S. (2021). Identification and evaluation of relation between regulatory elements of the promoter region of DLV gene family and gene expression in *Aeluropus litoralis*. *Crop Biotechnology*, 10(32), 95-109. doi: 10.30473/cb.2021.58873.1836
- Chou, K. C., & Shen, H. B. (2010). Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One*, 5(6), e11335.
- Dai, X., Zhuang, Z., Boschiero, C., Dong, Y., & Zhao, P. X. (2021). LegumeIP V3: from models to crops-an integrative gene discovery platform for translational genomics in legumes. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1472-D1479.
- Erbasol, I., Bozdag, G. O., Koc, A., Pedas, P., & Karakaya, H. C. (2013). Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from *Beta vulgaris* subspecies *maritima* that confers manganese tolerance in yeast. *Biometals*, 26(5), 795-804.
- Eroglu, S., Giehl, R. F., Meier, B., Takahashi, M., Terada, Y., Ignatyev, K.,... & Von Wieren, N. (2017). Metal tolerance protein 8 mediates manganese homeostasis and iron reallocation during seed development and germination. *Plant Physiology*, 174(3), 1633-1647.

- Finn, R. D., Clements, J., & Eddy, S. R. (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W29-W37.
- Gao, Y., Yang, F., Liu, J., Xie, W., Zhang, L., Chen, Z.,... & Yao, Y. (2020). Genome-wide identification of metal tolerance protein genes in *Populus trichocarpa* and their roles in response to various heavy metal stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1680.
- Garg, V. K., Avashthi, H., Tiwari, A., Jain, P. A., Ramkete, P. W., Kayastha, A. M., & Singh, V. K. (2016). MFPPi-multi FASTA ProtParam interface. *Bioinformatics*, 12(2), 74.
- Gu, D., Zhou, X., Ma, Y., Xu, E., Yu, Y., Liu, Y.,... & Zhang, W. (2021). Expression of a *Brassica napus* metal transport protein (BnMTP3) in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to Zn and Mn. *Plant Science*, 304, 110754.
- Hall, J., Soole, K., & Benthams, R. (2011). Hydrocarbon phytoremediation in the family Fabaceae—a review. *International Journal of Phytoremediation*, 13(4), 317-332.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets Brief communication. *Mol. Biol. Evol.*, 33, 1870-1874.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H.,... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y.,... & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325-327.
- Liu, J., Gao, Y., Tang, Y., Wang, D., Chen, X., Yao, Y., & Guo, Y. (2019). Genome-wide identification, comprehensive gene feature, evolution, and expression analysis of plant metal tolerance proteins in tobacco under heavy metal toxicity. *Frontiers in Genetics*, 10, 345.
- Menguer, P. K., Farthing, E., Peaston, K. A., Ricachenevsky, F. K., Fett, J. P., & Williams, L. E. (2013). Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 2871-2883.
- Migocka, M., Małas, K., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Posyniak, E., Migdal, I., & Szczech, P. (2018). Cucumber Golgi protein CsMTP5 forms a Zn-transporting heterodimer with high molecular mass protein CsMTP12. *Plant Science*, 277, 196-206.
- Migocka, M., Małas, K., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Papierniak, A., Posyniak, E., & Garbiec, A. (2018). Retracted: Cucumber metal tolerance protein 7 (CsMTP7) is involved in the accumulation of Fe in mitochondria under Fe excess. *The Plant Journal*, 95(6), 988-1003.
- Migocka, M., Papierniak, A., Kosieradzka, A., Posyniak, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Biskup, R.,... & Marchewka, T. (2015). Retracted: Cucumber metal tolerance protein Cs MTP 9 is a plasma membrane H⁺-coupled antiporter involved in the Mn²⁺ and Cd²⁺ efflux from root cells. *The Plant Journal*, 84(6), 1045-1058.
- Migocka, M., Papierniak, A.,

- Maciaszczyk-Dziubińska, E., Poździk, P., Posyniak, E., Garbiec, A., & Filleur, S. (2014). Retracted: Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis Thaliana*.
- Mirzaei, K., Bahramnejad, B., & Fatemi, S. (2020). Genome-wide identification and characterization of the bZIP gene family in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Gene*, 24, 100257.
- Mirzaei, K., Bahramnejad, B., Shamsifard, M. H., & Zamani, W. (2014). In silico identification, phylogenetic and bioinformatic analysis of argonaute genes in plants. *International Journal of Genomics*, 2014.
- Mohammadian Roshan, N. (2020). Phylogenetic, structure and expression analysis of growth regulatory factors (GRF) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) using in silico methods. *Crop Biotechnology*, 10(31), 45-60.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., & Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, 8(1), 1-16.
- Morais, S. (2012). Garcia e Costa F, Pereira M. *Environmental Health-Emerging Issues and Practice. Reviewed Edition. London: IntechOpen*, 227-246.
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F. J.,... & Sanders, D. (2007). A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8532-8537.
- Ricachenevsky, F. K., Menguer, P. K., Sperotto, R. A., Williams, L. E., & Fett, J. P. (2013). Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Frontiers in Plant Science*, 4, 144.
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2021). Low-molecular-weight ligands in plants: role in metal homeostasis and hyperaccumulation. *Photosynthesis Research*, 150(1), 51-96.
- Shirazi, Z., Abedi, A., Kordrostami, M., Burritt, D. J., & Hossain, M. A. (2019). Genome-wide identification and characterization of the metal tolerance protein (MTP) family in grape (*Vitis vinifera* L.). *3 Biotech*, 9(5), 1-17.
- Takemoto, Y., Tsunemitsu, Y., Fujii-Kashino, M., Mitani-Ueno, N., Yamaji, N., Ma, J. F.,... & Ueno, D. (2017). The tonoplast-localized transporter MTP8. 2 contributes to manganese detoxification in the shoots and roots of *Oryza sativa* L. *Plant and Cell Physiology*, 58(9), 1573-1582.
- Yang, L., Ji, J., Harris-Shultz, K. R., Wang, H., Wang, H., Abd-Allah, E. F.,... & Hu, X. (2016). The dynamic changes of the plasma membrane proteins and the protective roles of nitric oxide in rice subjected to heavy metal cadmium stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, 190.
- Yuan, L., Yang, S., Liu, B., Zhang, M., & Wu, K. (2012). Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. *Plant cell reports*, 31(1), 67-79.
- Zhang, M., & Liu, B. (2017). Identification of a rice metal tolerance protein OsMTP11 as a manganese transporter. *PloS One*, 12(4), e0174987.
- Zhang, Z., Fu, D., Sun, Z., Ju, C., Miao, C., Wang, Z.,... & Wang, C. (2021). Tonoplast-associated calcium signaling regulates manganese homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 14(5), 805-819.