网络出版时间:2026-05-11 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.11.004

灰杨COPT蛋白家族成员鉴定及镉胁迫下的表达分析

程遥[1],邓澍荣[1],罗志斌[1,2,3]

(1 中国林业科学研究院 林业研究所 林木遗传育种全国重点实验室,北京 100091;2 中国林业科学研究院 生态保护与修复研究所,北京 100091;3 中国林业科学研究院 黄河三角洲综合试验中心,山东 东营 257000)

[摘 要] 【目的】鉴定灰杨(*Populus*×*canescens*)铜转运蛋白(PcCOPT)家族成员,明确*PcCOPTs*基因响应Cd胁迫的表达模式。【方法】以灰杨(*Populus*×*canescens*)为试验材料,利用生物信息学方法对*PcCOPT*家族成员进行鉴定、蛋白质序列特征分析、亚细胞定位预测、系统发育分析、共线性分析及顺式作用元件分析;使用MEGA11构建系统进化树;使用TBtools对*PcCOPT*家族成员的基因结构、保守基序、染色体定位、共线性等进行可视化分析;通过RT-qPCR技术分析*PcCOPT*家族成员的组织表达模式以及响应Cd胁迫的表达特征。【结果】从灰杨基因组中共鉴定出7个无内含子的*COPT*基因,分布在1,6和9号染色体上。蛋白质序列特征分析结果表明,编码PcCOPT家族蛋白的氨基酸序列长度为141~159个氨基酸,相对分子质量为15.73~17.64,理论等电点为6.15~9.99。亚细胞定位预测结果表明,PcCOPT1、PcCOPT2、PcCOPT3、PcCOPT6和PcCOPT7定位在细胞质膜上,PcCOPT4和PcCOPT5定位在液泡膜上。系统发育分析显示,*PcCOPT*家族分为3个进化分支,其中第一分支包含*PcCOPT*1,*PcCOPT*6和*PcCOPT*7,第二分支包含*PcCOPT*2和*PcCOPT*3,第三分支包含*PcCOPT*4和*PcCOPT*5。共线性分析结果显示,在灰杨基因组内有2对共线性基因,灰杨与拟南芥之间有6对共线性基因,灰杨与水稻之间有4对共线性基因。顺式作用元件分析结果表明,*PcCOPTs*基因启动子区包含多个光响应、激素应答和非生物胁迫响应元件。*PcCOPTs*基因表达具有组织特异性,其中*PcCOPT*2、*PcCOPT*3在根中高度表达,*PcCOPT*1在木质部特异性表达,*PcCOPT*4、*PcCOPT*6和*PcCOPT*7在幼叶中表达水平较高,*PcCOPT*5在根和木质部中表达水平较高。与对照相比,在Cd胁迫下,第一分支成员*PcCOPT*1、*PcCOPT*6和*PcCOPT*7表达量显著升高;第二分支*PcCOPT*2和*PcCOPT*3在Cd胁迫72 h后表达量显著降低;第三分支成员*PcCOPT*5表达量升高,但*PcCOPT*4表达量显著降低。【结论】从灰杨基因组中共鉴定出7个*PcCOPT*基因,分为3个分支。其中第一分支成员*PcCOPT*1、*PcCOPT*6和*PcCOPT*7的表达受Cd胁迫诱导表达,第二分支成员*PcCOPT*2和*PcCOPT*3的表达受Cd胁迫抑制,第三分支成员*PcCOPT*4和*PcCOPT*5在Cd胁迫下表达量变化趋势相反。表明*PcCOPTs*成员可能具有功能分化,在灰杨响应Cd胁迫过程中发挥不同作用。

[关键词] 灰杨;*COPT*基因家族;基因表达;Cd胁迫

[中图分类号] S792.11 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)11-0028-11

Identification of COPT protein family members in *Populus*× *canescens* and expression analysis under cadmium stress

CHENG Yao[1],DENG Shurong[1],LUO Zhibin[1,2,3]

(1 *State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding*,*Research Institute of Forestry*,*Chinese Academy of Forestry*,*Beijing* 100091,*China*;2 *Institute of Ecological Protection and Restoration*,*Chinese Academy of Forestry*,*Beijing* 100091,*China*;3 *Comprehensive Experimental Center of Chinese Academy of Forestry in Yellow River Delta*,*Dongying*,*Shandong* 257000,*China*)

[收稿日期] 2025-10-11 [修回日期] 2025-12-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32371841)

[作者简介] 程遥(1997—),女,陕西华阴人,在读博士,主要从事林木抗逆分子生理研究。E-mail:cy15829011936@163.com

[通信作者] 邓澍荣(1984—),男,湖南安化人,副研究员,博士,主要从事林木抗逆分子生理研究。E-mail:danceon@126.com

罗志斌(1973—),男,湖南湘乡人,研究员,博士,博士生导师,主要从事林木抗逆分子生理研究。E-mail:luozbbill@163.com

Abstract：【Objective】The study aims to identify the COPT family members in *Populus*×*canescens* and clarify the expression patterns of *PcCOPT* genes in response to cadmium（Cd）stress.【Method】Using *Populus*×*canescens* as materials，bioinformatic approaches were used to identify the members of the *PcCOPT* family，analyze the characteristics of protein sequences，predict the subcellular localization，and conduct phylogenetic analysis，collinearity analysis，and cis-acting element analysis. MAGE11 was used to construct a phylogenetic tree. The gene structures，conserved motifs，chromosome locations，and collinearity of *PcCOPT* family members were visualized using TBtools. Reverse transcription-quantitative PCR was carried out to analyze the tissue-specific expression patterns of *PcCOPT* family members and their expression characteristics in response to Cd exposure.【Result】Seven putative intron-lacking *PcCOPT* genes were identified in the genome of *Populus*×*canescens*，located on chromosome 1，6 and 9. Protein sequence analysis showed that the encoded PcCOPT family proteins consisted of 141 — 159 amino acid residues，with relative molecular weights ranging from 15.73 to 17.64 and the theoretical isoelectric point between 6.15 and 9.99. The prediction of subcellular localizations showed that PcCOPT1，PcCOPT2，PcCOPT3，PcCOPT6 and PcCOPT7 were located on the plasma membrane，while PcCOPT4 and PcCOPT5 were located on the vacuole membrane. The phylogenetic analysis exhibited that the *PcCOPT* family members were divided into three clades. The first clade included *PcCOPT*1，*PcCOPT*6，and *PcCOPT*7，the second clade included *PcCOPT*2 and *PcCOPT*3，and the third clade included *PcCOPT*4 and *PcCOPT*5. Collinearity analysis showed that there were two pairs of collinear genes within the *Populus*×*canescens* genome，six pairs of collinear genes between the genomes of *Populus*×*canescens* and *Arabidopsis thaliana*，and four pairs of collinear genes between the genomes of *Populus*×*canescens* and *Oryza sativa*. Cis-acting element analysis revealed that the promoters of *PcCOPTs* genes contained multiple regulatory elements related to light，hormone or abiotic stress response. RT-qPCR analysis revealed tissue-specific expression patterns among *PcCOPT* genes. *PcCOPT*2 and *PcCOPT*3 were highly expressed in the roots of *P.* ×*canescens*，*PcCOPT*1 was relatively highly expressed in xylem，*PcCOPT*4，*PcCOPT*6 and *PcCOPT*7 exhibited high expression levels in the young leaves，and *PcCOPT*5 were expressed at relatively high levels in roots and xylem. Under cadmium（Cd）stress，the expression levels of *PcCOPT*1，*PcCOPT*6 and *PcCOPT*7 in the first clade were markedly upregulated. In contrast，the transcript levels of *PcCOPT*2 and *PcCOPT*3 in the second clade were obviously decreased after 72 h of Cd treatment. In the third clade，the mRNA level of *PcCOPT*5 was increased，while that of *PcCOPT*4 was significantly decreased upon Cd exposure.【Conclusion】This study identified seven *PcCOPTs* in *Populus*×*canescens*，which were divided into three clades. Under Cd stress，*PcCOPT*1，*PcCOPT*6 and *PcCOPT*7 in the first clade were induced，*PcCOPT*2 and *PcCOPT*3 in the second clade were repressed，and *PcCOPT*4 and *PcCOPT*5 of the third clade showed opposite trends. These results demonstrated that different *PcCOPTs* may have functional differentiation and play different roles in mediating Cd response.

Key words：*Populus*×*canescens*；*COPT* gene family；gene expression；cadmium stress

镉（cadmium，Cd）是一种毒性大、迁移性强的重金属，全球约有9%的表层土壤Cd含量超标[1]。土壤中的Cd通过食物链进入人体，严重威胁人类健康[2-3]。目前，Cd污染土壤的修复方法主要有3类：物理修复法、化学修复法和生物修复法[4]。其中生物修复法中的植物修复法通过植物根系吸收土壤中的Cd，将其转移、贮存到地上部分，进而通过收割地上部分进行集中处理。与物理修复法和化学修复法相比，植物修复法具有环境友好、成本低廉等优点[5]。多种草本植物如天蓝遏蓝菜（*Noccaea caerulescens*）[6]、宝山堇菜（*Viola baoshanensis*）[7]和龙葵（*Solanum nigrum*）[8]等被鉴定为Cd超积累植物，其地上部分Cd含量超过100 μg/g。近年来，杨树（*Populus* L.）等速生木本植物因其适应能力强，根系发达，生物量大，地上部分Cd积累量大，被认为是修复Cd污染土壤的优良材料[9-10]。金属转运蛋白在杨树吸收、转运和积累Cd的过程中发挥重要作用。天然抗性相关巨噬细胞蛋白（natural resistance-associated macrophage protein，NRAMP）和镉诱导蛋白AS（cadmium-induced protein AS，CIPAS）等

参与杨树根系对Cd的吸收[11-12]。灰杨PcNRAMP1定位在细胞质膜上,主要在根中表达,介导根从土壤中吸收Cd[11]。胡杨(*P. euphratica*)细胞质膜定位的PeCIPAS8也在根中高表达,过表达*PeCIPAS*8会增加转基因杨树根对Cd的吸收速率,提高了根中Cd含量[12]。黄色条纹样蛋白(yellow stripe-like protein)参与杨树茎中Cd的横向运输过程[13]。灰杨PcYSL3是质膜定位蛋白,在木质部特异性高表达,参与木质部导管向相邻木射线细胞卸载Cd过程,显著增加木材和皮中的Cd含量[13]。利用基因工程技术调控金属转运蛋白表达,可进一步增强杨树富集Cd的能力,提高植物修复效率[13-15]。

吸收型铜转运蛋白(copper transporter,COPT/Ctr)是一类定位在细胞质膜或内膜系统上的二价阳离子转运体[16]。COPT蛋白具有3个保守的跨膜结构域(transmembrane domain,TMD),其中TMD2包含1个MXXM基序(M为甲硫氨酸,Met),负责调节转运蛋白孔径;TMD3包含1个GXXG基序(G为甘氨酸,Gly),使3个跨膜结构域(TMD)形成紧密的螺旋结构[17-19]。研究表明,MXXM和GXXG基序对二价阳离子的转运活性至关重要[18]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中有6个COPTs成员[20],其中AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6氨基酸序列相似度高,且均定位在细胞质膜上,主要负责将胞外的Cu^{2+}转运到细胞内[20];AtCOPT3和AtCOPT5分别定位在内质网膜和液泡膜上,负责将Cu^{2+}外排到细胞质中[21-22];AtCOPT4本身不具备Cu^{2+}转运活性,但可通过与其他COPT蛋白形成复合体转运二价阳离子[23]。COPT蛋白不仅参与Cu^{2+}稳态调控过程,而且参与细胞对Cd的吸收和转运[24-25]。拟南芥*AtCOPT*1基因主要在主根和侧根根尖表达,*AtCOPT*2基因主要在根毛细胞表达,在Cd胁迫后二者的表达水平均显著上升[25-26]。*AtCOPT*6在茎、叶和侧根中高表达,但其表达同样受Cd胁迫诱导[20,25]。与野生型植株相比,在Cd胁迫下,拟南芥*copt*1-1突变体的根长显著变短,且*copt*1,2,6三重突变体根长的降低幅度进一步加剧[25]。*AtCOPT*3主要在叶和花中表达,*AtCOPT*4和*AtCOPT*5在主根中高水平表达[21-23]。在Cd胁迫后,*AtCOPT*3,*AtCOPT*4和*AtCOPT*5的表达量均无显著变化[25]。然而,鲜有*COPTs*在杨树中参与Cd转运过程的报道。

课题组前期对7种杨树Cd富集能力的比较发现,与美洲黑杨(*P. deltoides*)、欧美杨(*P. ×euramericana*)、84K杨(*P. alba*×*P. glandulosa*)、欧洲黑杨(*P. nigra*)、群众杨(*P. popularis*)和中华长青杨(*P. cathayana*)相比,灰杨(*P. ×canescens*)对Cd的吸收和耐受能力最强,其地上部分Cd富集总量可达到3 000 μg/g[27-28]。表达谱分析发现,*PcCOPT*5在灰杨茎木质部和根中高表达,在Cd胁迫后表达上调。在酵母细胞中异源表达*PcCOPT*5导致其对Cd胁迫的敏感性增加[13]。这表明*PcCOPT*基因可能参与灰杨对Cd的转运过程。然而,目前灰杨*COPT*基因家族尚未得到系统性鉴定。为此,本研究以灰杨为对象,利用生物信息学技术,从全基因组水平鉴定*PcCOPT*家族成员,并分析*PcCOPTs*的基因结构、系统进化和蛋白保守基序,明确*PcCOPTs*基因的组织表达模式以及对Cd胁迫的响应特征,为解析*PcCOPTs*基因的生物学功能及其调控杨树响应Cd胁迫的作用机制奠定基础,同时也为利用基因工程技术提高杨树Cd富集能力提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 灰杨*PcCOPT*家族成员鉴定

从Phytozome基因组数据库(https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)下载灰杨基因组序列。从拟南芥基因组网站(https://www.arabidopsis.org/)下载*AtCOPT*家族基因的氨基酸序列,通过BLASTP和hmmsearch程序(TBtools,v2.056)对灰杨基因组进行搜索,利用在线工具CD-Seach(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi)对搜索到的灰杨*PcCOPTs*进行结构域鉴定,最终筛选出7个灰杨*PcCOPT*基因。毛果杨和水稻COPTs氨基酸序列来自Phytozome基因组数据库(https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)。利用Expasy ProtParam tool(http://us.expasy.org/tools/protparam.html)得到*PcCOPT*家族成员的相对分子质量和理论等电点。利用在线工具(https://wolfpsort.hgc.jp)预测PcCOPT蛋白的亚细胞定位。

1.2 灰杨*PcCOPT*家族系统进化树的构建

利用Clustal软件将7条灰杨(*P. ×canescens*)、7条毛果杨(*P. trichocarpa*)、6条拟南芥(*A. thaliana*)和7条水稻(*Oryza sativa*)COPT氨基酸序列进行多重序列比对。在MEGA11软件中,将上述比对的COPTs氨基酸序列使用邻接法(neighbor-joining

method）构建系统进化树。

1.3　灰杨*PcCOPTs*基因结构和蛋白保守基序分析

利用灰杨基因组注释文件，采用TBtools软件的Gene Density Profile程序计算灰杨基因组的基因密度，并提取灰杨PcCOPT家族成员的染色体位置信息。在MEME网站（http://meme-suite.org/tools/streme）进行PcCOPT蛋白的保守基序分析。利用TBtools软件将灰杨*PcCOPTs*基因结构和保守基序进行可视化。

1.4　灰杨*PcCOPTs*染色体定位及共线性分析

基于灰杨基因组GFF注释文件，使用TBtools软件绘制*PcCOPTs*的染色体定位图。利用TBtools软件的MCScanX程序对灰杨种内及灰杨与拟南芥、水稻种间的*COPTs*进行共线性分析，并通过TBtools软件对种内和种间共线性结果进行可视化。

1.5　灰杨*PcCOPTs*顺式作用元件分析

使用TBtools软件从灰杨基因组中提取*PcCOPTs*基因起始密码子上游2 000 bp序列作为启动子，将灰杨7个*PcCOPT*基因启动子序列上传至PlantCARE网站（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/htm），预测*PcCOPTs*基因启动子区域的顺式作用元件，并利用Excel对预测结果进行统计与整理。

1.6　灰杨*PcCOPTs*基因组织表达模式分析

灰杨组培苗保存于中国林业科学研究院林木遗传育种全国重点实验室。将灰杨在含有1/2 MS培养基中生长5周，选择生长状态一致的灰杨组培苗移栽至人工气候室中进行水培，培养溶液为1/4 Hoagland营养液，培养条件：昼/夜温度为25 ℃/18 ℃，相对湿度为50%～60%，光照周期16 h/8 h。水培2月后，选择长势一致的杨树，收集每个植株的幼叶、成熟叶、皮、木质部和根组织。使用CTAB法提取各组织RNA，参考CHANG等[29]建立的方法略有改动。利用PrimeScript™ RT reagent Kit（Perfect Real Time）（TaKaRa，大连）试剂盒去除灰杨基因组DNA，并将纯化后的RNA反转录为cDNA。利用Oligo 7软件设计*PcCOPTs*特异引物（详见表1），并利用TB Green® Premix Ex Taq™（Tli RNase H Plus）（TaKaRa，大连）进行实时荧光定量PCR（RT-qPCR）分析。RT-qPCR反应体系为：TB Green® Premix Ex Taq™（Tli RNase H Plus）（2×）10 μL，cDNA 1 μL，上、下游引物各0.5 μL，ddH_2O 8 μL。RT-qPCR反应程序：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，40个循环。每个组织3个生物学重复和4个技术重复。以*PcActin*2/7作为内参基因，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组织中*PcCOPTs*的相对表达量。

表1　*PcCOPTs*基因RT-qPCR扩增引物信息

Table 1　Primers used for RT-qPCR analysis of *PcCOPTs* genes

基因名称 Gene name	引物序列（5′→3′） Primer sequence（5′→3′）	基因名称 Gene name	引物序列（5′→3′） Primer sequence（5′→3′）
*PcCOPT*1	F：GCCCCCCATGAACAACACAG R：ATGTATGGTCTCTTCTCAAA	*PcCOPT*5	F：GGAGGAGCTGTGCTTTTTGG R：CAACCCCAAGACAACAGCCA
*PcCOPT*2	F：TGTTGGCTGCTGCTATCGAG R：CACCCGCTCTGGGATTGTCG	*PcCOPT*6	F：CATGGTCATGATATGCCGGG R：TCATGTGCATCATCATCATC
*PcCOPT*3	F：TCACGCATCCCCACCGCAAA R：AAGACAAAGGTCAAGGCCAC	*PcCOPT*7	F：CCAGACTCTACTGCACGCTT R：CAGGAACCCCAGAGTATGCC
*PcCOPT*4	F：ATTCAAGGCCATCGCTGTCT R：AACAACAAAGCGGTGGCGAA	*PcActin*2/7	F：CCCATTGAGCACGGTATTGT R：TACGACCACTGGCATACAGG

1.7　灰杨*PcCOPTs*基因表达对Cd胁迫的响应

选择生长1个月的灰杨组培苗，在人工气候室中水培2月后，将长势相同的灰杨水培苗平均分为5组，每组3株，其中1组作为对照，其余4组分别用100 μmol/L $CdCl_2$处理6，12，36和72 h，处理结束后，收获灰杨的木质部。使用CTAB法提取灰杨木质部RNA，参考CHANG等[29]建立的方法略有改动，并将其反转录为cDNA，以cDNA作为模板进行RT-qPCR扩增。*PcCOPTs*特异性引物信息详见表1。RT-qPCR反应体系：TB Green® Premix Ex Taq™（Tli RNase H Plus）（2×）10 μL，cDNA 1 μL，上、下游引物各0.5 μL，ddH_2O 8 μL。RT-qPCR反应程序：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，扩增40个循环。每个样品4次技术重复。以*PcActin*2/7作为内参基因，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算Cd胁迫处理后不同时间点*PcCOPTs*基因的相对表达量。

1.8　数据统计与分析

使用Statgraphics Centurion软件对试验数据进行统计分析，采用单因素方差分析对基因的表达模

式进行分析。使用最小显著性差异法对组间差异显著性进行检验,以 $P<0.05$ 被认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 灰杨 *PcCOPT* 家族成员分析

通过 BLASTP 和 hmmsearch 程序对灰杨基因组进行搜索,鉴定得到 7 个灰杨 *COPT* 成员。根据基因在染色体上的位置,将灰杨 COPT 蛋白命名为 PcCOPT1~PcCOPT7。蛋白质序列特征分析结果表明,编码 PcCOPT 家族蛋白的氨基酸序列长度为 141~159 个氨基酸,相对分子质量为 15.73~17.64 ku,理论等电点为 6.15~9.99。通过对 7 个 PcCOPT 成员进行亚细胞定位预测,发现 PcCOPT1、PcCOPT2、PcCOPT3、PcCOPT6 和 PcCOPT7 均定位在细胞质膜上,PcCOPT4 和 PcCOPT5 定位在液泡膜上(表 2)。

表 2 灰杨 *PcCOPT* 家族基因编码蛋白的特征分析

Table 2 Characterization of proteins encoded by *PcCOPT* genes in *P.* ×*canescens*

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	染色体 Chromosome	氨基酸数 Number of amino acids	相对分子质量 Relative molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亚细胞定位 Subcellular location
PcCOPT1	PtXaTreH.01G202800.1	1	159	17.64	9.51	细胞质膜 Plasma membrane
PcCOPT2	PtXaTreH.06G081600.1	6	148	15.87	6.15	细胞质膜 Plasma membrane
PcCOPT3	PtXaTreH.06G081700.1	6	148	15.89	9.99	细胞质膜 Plasma membrane
PcCOPT4	PtXaTreH.06G122200.1	6	141	15.73	9.00	液泡膜 Vacuole membrane
PcCOPT5	PtXaTreH.06G180800.1	6	149	16.29	8.86	液泡膜 Vacuole membrane
PcCOPT6	PtXaTreH.09G029300.1	9	159	17.36	8.55	细胞质膜 Plasma membrane
PcCOPT7	PtXaTreH.09G029400.1	9	159	17.35	8.55	细胞质膜 Plasma membrane

2.2 灰杨 *PcCOPT* 家族系统进化分析

为分析 *PcCOPTs* 的进化关系,将灰杨、毛果杨、拟南芥和水稻中的 COPTs 氨基酸序列进行多重序列比对,并构建系统进化树。结果(图 1)显示,4 个物种共 27 个 COPT 蛋白被分成 4 个分支。其中第一分支包含 3 个 PcCOPT 蛋白,分别为 PcCOPT1,PcCOPT6 和 PcCOPT7;第二分支包含 2 个 PcCOPT 蛋白,分别为 PcCOPT2 和 PcCOPT3,二者均与拟南芥 AtCOPT4 的亲缘关系较近;第三分支包含 2 个 PcCOPT 蛋白,分别为 PcCOPT4 和 PcCOPT5,均与拟南芥 AtCOPT5 的亲缘关系相近;第四分支不包含灰杨 PcCOPTs。

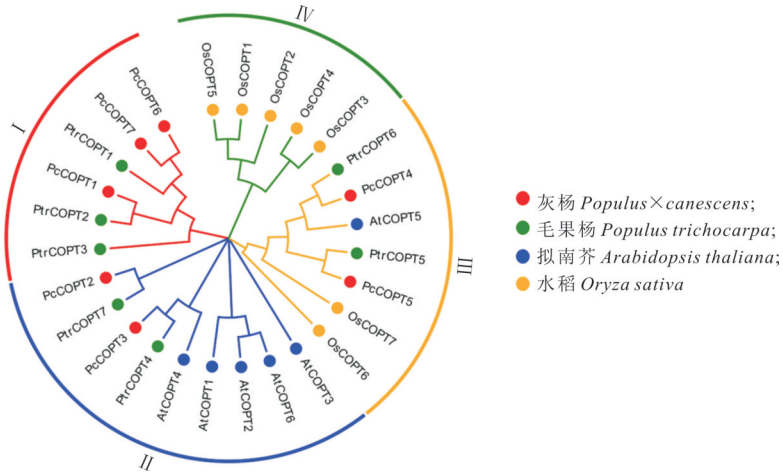


图 1 灰杨 COPT 家族成员的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of COPT family members in *P.* ×*canescens*

2.3 灰杨 *PcCOPT* 家族基因结构及其编码蛋白的保守基序分析

为进一步分析 *PcCOPTs* 的序列特征,对其基因结构及蛋白保守基序进行分析,结果(图 2)显示,7 个灰杨 *PcCOPT* 均无内含子。由图 2 还可知,利用 MEME 网站对 7 个灰杨 PcCOPT 蛋白进行保守基序预测,共鉴定到 5 个保守基序,且所有 PcCOPT 家族成员的 N-端均含有基序 2(motif 2),C-端均含有基序 1(motif 1)。位于第一分支的 PcCOPT1、PcCOPT6 和 PcCOPT7 均含有 5 个保守基序,且保

守基序的分布一致。与其他分支中的 COPT 蛋白不同，第一分支中 COPT 蛋白 N-端包含 motif 4，C-端包含 motif 5。位于第二分支的 PcCOPT2 和 PcCOPT3 均含有 motif 1、motif 2、motif 3，且保守基序的位置相同。位于第三分支的 PcCOPT4 和 PcCOPT5 只在 N-端含有 motif 2，C-端含有 motif 1。上述结果表明，同一进化分支内 PcCOPTs 含有相似的保守基序，说明其可能具有相似的功能；不同分支 COPT 蛋白 C-端和 N-端保守基序具有差异，暗示其基因功能可能出现分化。

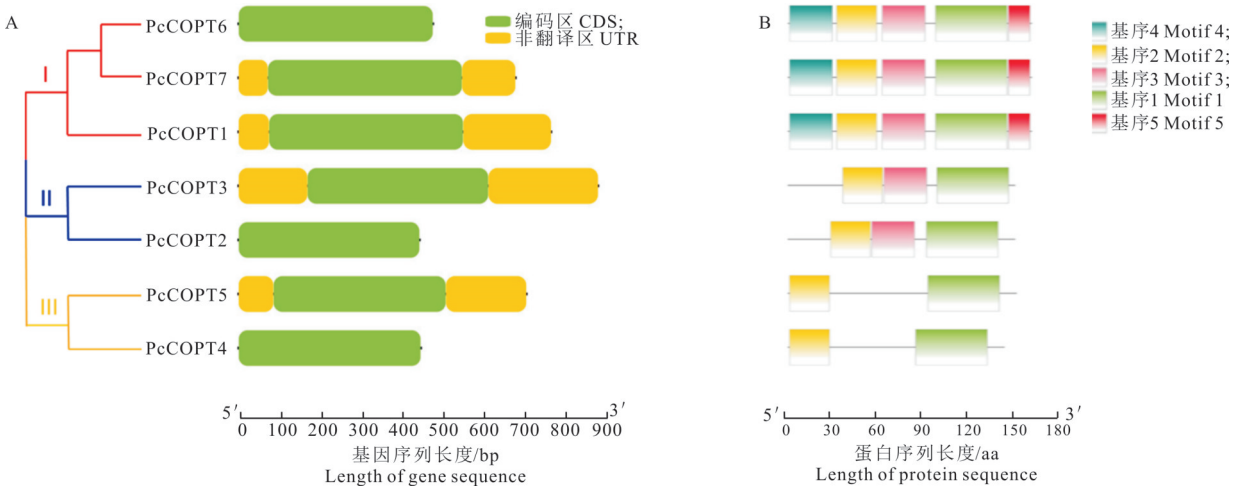
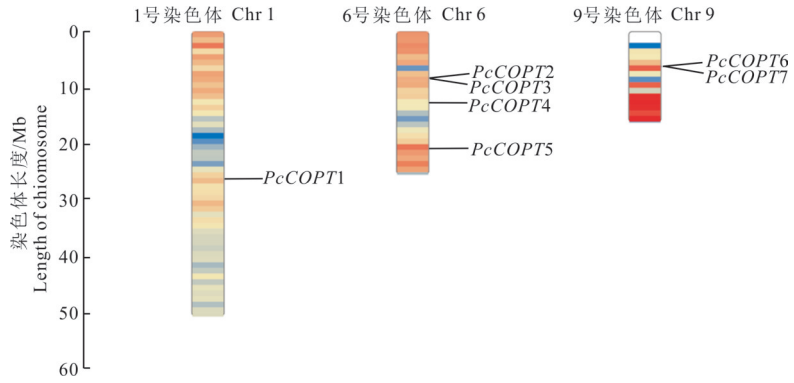


图 2　灰杨 *PcCOPTs* 基因结构（A）及其编码蛋白的保守基序（B）分析

Fig. 2　Gene structure (A) of *PcCOPTs* and conserved motifs of their encoded proteins (B) in *P.* ×*canescens*

2.4　灰杨 *PcCOPT* 家族基因的染色体定位

如图 3 所示，7 个灰杨 *PcCOPT* 基因分布在 Chr1、Chr6 和 Chr9 等 3 条染色体上。其中位于 6 号染色体的 *PcCOPTs* 数量最多，分别是 *PcCOPT2*、*PcCOPT3*、*PcCOPT4* 和 *PcCOPT5*；9 号染色体包含 *PcCOPT6* 和 *PcCOPT7*；1 号染色体仅包含 *PcCOPT1*。



染色体上的不同颜色表示不同的基因密度，红色表示基因密度高，蓝色表示基因密度低。

Different colors on the chromosome indicate different gene densities, with red indicating high gene density and blue indicating low gene density.

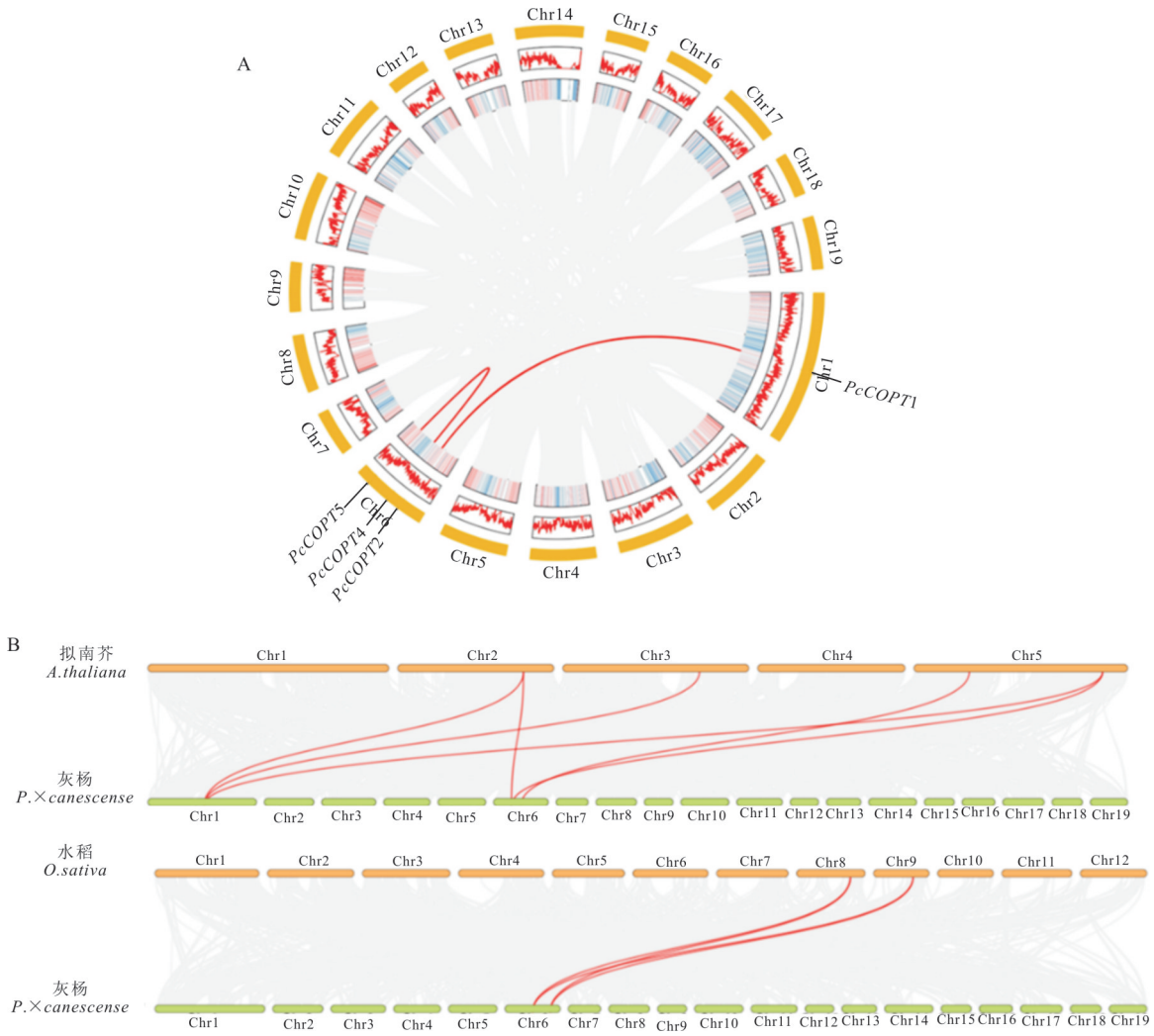
图 3　*PcCOPTs* 基因在灰杨染色体上的定位

Fig. 3　Chromosome localization of the *PcCOPT* genes in *P.* ×*canescens*

2.5　灰杨 *PcCOPT* 家族基因的共线性分析

为了分析 *PcCOPTs* 在灰杨基因组中的复制事件，对 *PcCOPTs* 进行种内共线性分析。结果（图 4-A）显示，在 7 个灰杨 *PcCOPT* 基因中共存在 2 对共线性关系，分别是 *PcCOPT1* 与 *PcCOPT2* 和 *PcCOPT4* 与 *PcCOPT5*。

为进一步探究 *PcCOPTs* 在不同植物间的进化关系，分别对灰杨与拟南芥、灰杨与水稻的 *PcCOPTs* 进行种间共线性分析。结果（图 4-B）显示，灰杨与拟南芥之间有 6 组基因存在共线性关系，灰杨与水稻之间有 4 组基因存在共线性关系。其中位于灰杨 1 号染色体的 *PcCOPT1* 与拟南芥之间存在 3 个共线性基因对。与水稻相比，灰杨 *PcCOPTs* 可能与拟南芥的亲缘关系更近，推测上述基因可能从共同祖先的基因组中进化而来。



Chr1～Chr19. 代表染色体编号;A、B图中的红色线条表示具有共线性关系的*COPT*基因对;A、B图中的灰色线条表示所有基因之间的共线性区块。

Chr1－Chr19 represent chromosome numbers. In Figure A and B, the red lines represent the syntenic *COPT* gene pairs, while the gray lines represent the collinear blocks across the genomes.

图4 *PcCOPTs*基因在物种内(A)和物种间(B)的共线性

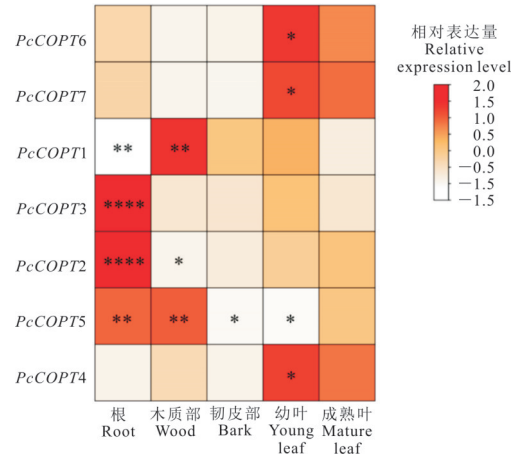
Fig. 4 Collinearity of *PcCOPTs* genes within species (A) and between species (B)

2.6 灰杨*PcCOPT*家族基因顺式作用元件分析

为了预测*PcCOPTs*的生物学功能,对*PcCOPTs*基因上游启动子区域的顺式作用元件进行分析。结果表明,*PcCOPTs*基因上游启动子区域主要有4类顺式作用元件,分别为植物生长与发育响应元件、激素响应元件、光响应元件及生物与非生物胁迫响应元件,且生物与非生物胁迫响应元件分布数量最多。激素响应元件主要包含乙烯响应元件,光响应元件主要包括Box 4和GT1-motif元件,生物与非生物胁迫响应元件数量最多的是MYB元件,在所有*PcCOPTs*基因上游启动子区域均有分布,且数量最多。上述结果表明,*PcCOPTs*基因可能在光响应、激素响应以及生物与非生物胁迫中发挥作用,尤其是在响应环境因子胁迫方面发挥着重要作用。

2.7 灰杨*PcCOPTs*基因的组织表达模式

基因的组织表达模式与其功能密切相关。为探究灰杨*PcCOPTs*基因的生物学功能,对7个灰杨*PcCOPT*基因进行组织表达分析。结果(图5)表明,*PcCOPT6*和*PcCOPT7*在幼叶中表达量较高,*PcCOPT1*在木质部表达量较高,*PcCOPT3*和*PcCOPT2*在根中特异性高表达,*PcCOPT5*在根和木质部中表达量较高,*PcCOPT4*在幼叶中具有较高的表达量。上述结果表明,灰杨*PcCOPTs*基因在不同组织中的相对表达量不同,暗示灰杨*PcCOPT*家族基因可能在功能上存在差异。



将不同组织中 *PcCOPTs* 的表达水平与所有基因表达量的中位数进行比较，每个 *PcCOPTs* 基因的相对表达水平通过各 *PcCOPTs* 相对表达量的 log 2 值计算。*. $P<0.05$；**. $P<0.01$；****. $P<0.0001$。

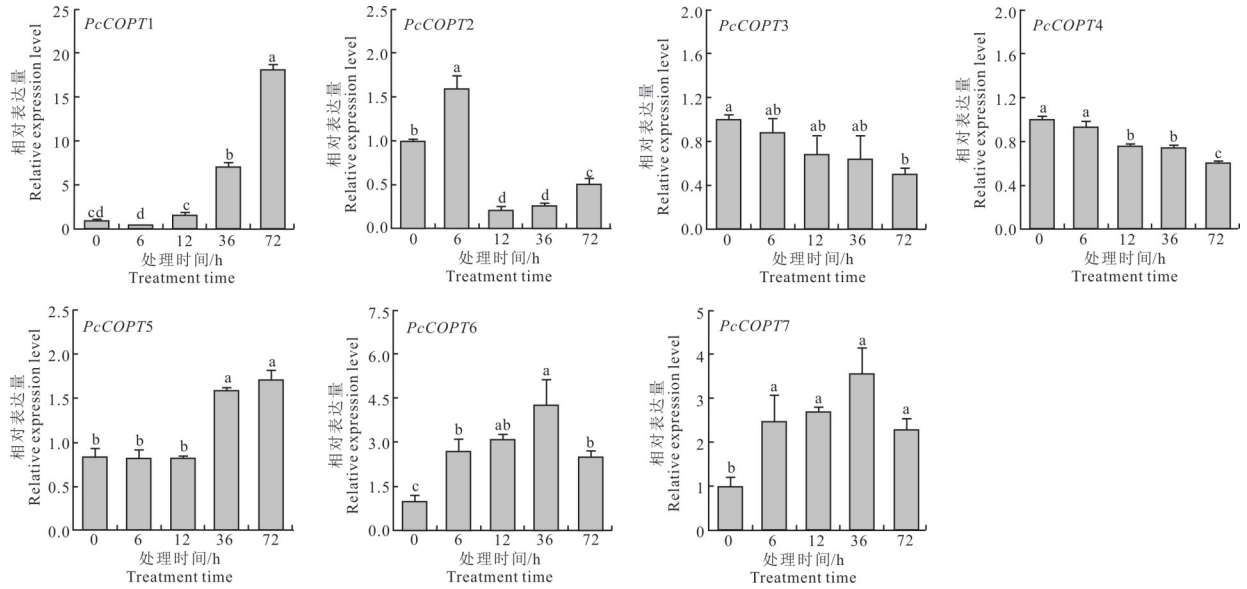
The expression level of each *PcCOPT* in different tissues was compared with the median of all genes. The relative expression level of each *PcCOPT* was calculated as the log 2 fold-change values. *. $P<0.05$；**. $P<0.01$；****. $P<0.0001$.

图 5　灰杨 *PcCOPTs* 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 5　Expression patterns of *PcCOPT* genes in different tissues of *P.* ×*canescens*

2.8　灰杨 *PcCOPTs* 基因表达对 Cd 胁迫的响应

由图 6 可知，与对照相比，在 Cd 胁迫 6 h 时，*PcCOPT2*、*PcCOPT6* 和 *PcCOPT7* 的表达量显著上调；在 Cd 胁迫 12 h 时，*PcCOPT6* 和 *PcCOPT7* 的表达量显著上调，*PcCOPT2* 和 *PcCOPT4* 的表达量显著下调；在 Cd 胁迫 36 h 时，*PcCOPT1*、*PcCOPT5*、*PcCOPT6* 和 *PcCOPT7* 的表达量显著上调，*PcCOPT2* 和 *PcCOPT4* 表达量的显著下调；在 Cd 胁迫 72 h 时，7 个 *PcCOPT* 家族成员的相对表达量均发生了显著变化，其中 *PcCOPT1*、*PcCOPT5*、*PcCOPT6* 和 *PcCOPT7* 的表达量显著上调，且以 *PcCOPT1* 表达量上调幅度最大（是对照相对表达量的 18.1 倍）；*PcCOPT2*、*PcCOPT3* 和 *PcCOPT4* 的表达量显著下调，且 *PcCOPT2* 和 *PcCOPT3* 表达量下调幅度较大。上述结果表明，*PcCOPT* 家族成员在 Cd 胁迫下具有不同的表达特征。



图柱上的不同小写字母表示不同处理时间之间差异显著（$P<0.05$）。

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among different treatment time ($P<0.05$).

图 6　灰杨 *PcCOPTs* 基因在 Cd 胁迫下的表达模式

Fig. 6　Expression patterns of *PcCOPT* genes under Cd stress in *P.* ×*canescens*

3　讨　论

近年来，关于 COPT 家族成员参与二价阳离子吸收和转运的研究主要集中在拟南芥等草本植物中，而对木本植物 *COPT* 成员的系统性鉴定及响应 Cd 胁迫的表达模式研究甚少[25]。有研究表明，定位在细胞质膜上的拟南芥 AtCOPT1、AtCOPT2 和 AtCOPT6 氨基酸序列相似程度高，在 Cd 胁迫下，*AtCOPT1*、*AtCOPT2* 和 *AtCOPT6* 均上调表达，增加植物根部 Cu^{2+} 含量[20]。相似地，在本研究中，AtCOPT1、AtCOPT2 和 AtCOPT6 与预测定位在细胞质膜上的 PcCOPT2、PcCOPT3 处于同一分支，表明 PcCOPT2、PcCOPT3 与 AtCOPT1、AtCOPT2 和 AtCOPT6 氨基酸序列相似度较高，暗

示PcCOPT2、PcCOPT3可能也具有转运二价阳离子的功能。酵母互补试验结果表明,在7个水稻COPT蛋白中,只有OsCOPT7能够互补酵母突变体*ctr1Δctr3Δ*的生长缺陷,表明仅有OsCOPT7是高亲和力的铜转运蛋白,其他OsCOPTs多为低亲和力铜转运蛋白,多数低亲和力的水稻OsCOPTs蛋白需要与其他OsCOPTs蛋白形成复合体才能转运Cu^{2+}[16,30]。在本研究中,水稻OsCOPT1、OsCOPT2、OsCOPT3、OsCOPT4和OsCOPT5均处于第四分支,而OsCOPT6、OsCOPT7与PcCOPT4、PcCOPT5位于第三分支,暗示PcCOPT4、PcCOPT5有可能与OsCOPT7类似,具有独立转运Cu^{2+}的功能。还有研究显示,COPT蛋白不仅参与Cu^{2+}稳态调控过程,而且还参与细胞对Cd的吸收和转运[24-25]。因此,PcCOPT4、PcCOPT5也可能具有Cd转运活性。在毛果杨中,*PtrCOPTs*的表达受到Cd诱导,在Cd胁迫3 h时,茎中*PtrCOPT7*的表达量显著上升[18]。类似地,在Cd胁迫6 h时,与*PtrCOPT7*位于同一分支的*PcCOPT2*在木质部中表达量显著上调,表明灰杨*COPTs*也响应Cd胁迫。另外,不同物种之间COPT家族基因数目和序列具有一定的差异性,这可能与环境适应性、进化路径及基因复制事件等有关[31-32]。在Cu^{2+}缺乏条件下,缺失N-端的拟南芥COPT6的Cu^{2+}转运功能被严重抑制[20],由此可见,N-端对于COPTs行使二价阳离子转运功能具有重要作用。灰杨COPTs保守基序分析结果显示,不同进化分支的PcCOPTs成员在N-端和C-端的保守基序类型有所不同,这可能会导致灰杨COPTs在转运二价阳离子的功能上出现差异。此外,基因复制事件有助于基因家族扩张,促进新基因的产生和功能分化[33-34]。种内共线性分析结果发现,*PcCOPT*家族成员中有2个复制基因对,说明这些基因在进化过程中发生了扩张事件。种间共线性分析结果表明,灰杨与拟南芥之间的共线性关系对较多,暗示灰杨与拟南芥的*COPTs*基因可能具有共同祖先。*PcCOPT1*在灰杨基因组内,以及与拟南芥*COPTs*之间存在多个共线性关系对,表明*PcCOPT1*在进化过程中比较保守。

基因的组织表达模式与其功能密切相关。本研究发现,7个*PcCOPTs*基因在不同组织之间的表达量具有显著差异,暗示其功能可能不同。*PcCOPTs*基因启动子区含有多个光响应元件、激素响应元件以及生物与非生物胁迫响应元件,且所有*PcCOPTs*成员启动子区都存在多个MYB元件。由于MYB是一类参与Cd等逆境胁迫的重要转录因子[35-36],推测在应对Cd胁迫过程中,*PcCOPTs*可能受到MYB类转录因子的调控。Cd等二价金属离子的吸收和转运依赖于质膜定位的金属转运体活性。位于第二分支的*PcCOPT2*和*PcCOPT3*主要在根中表达,其编码蛋白预测定位在细胞质膜上。与之类似的是,拟南芥同源蛋白AtCOPT1、AtCOPT2和AtCOPT6定位在细胞质膜上,也在根中高度表达[20, 24-25]。与对照相比,在Cd胁迫下,过表达*AtCOPT6*的拟南芥根长增加,但*copt*1,2,6三重突变体的根长显著缩短[25]。本研究结果表明,PcCOPT1、PcCOPT6和PcCOPT7定位在细胞质膜上。与*AtCOPT6*相似,*PcCOPT1*在灰杨木质部高水平表达,在Cd胁迫72 h后相对表达量上调18.1倍,推测*PcCOPT1*可能参与Cd在灰杨木质部的转运。PcCOPT5定位在液泡膜上,在灰杨根中高水平表达。在Cd胁迫36~72 h下,*PcCOPT5*的表达水平显著升高,推测*PcCOPT5*可能介导液泡对Cd的跨膜转运过程。在Cd胁迫下,第一分支成员*PcCOPT1*、*PcCOPT6*和*PcCOPT7*总体显著上调表达,暗示*PcCOPT1*可能参与灰杨木质部Cd的运输。在Cd胁迫72 h后,第二分支成员*PcCOPT2*和*PcCOPT3*显著下调表达。在Cd处理下,位于第三分支的*PcCOPT4*显著下调表达,而*PcCOPT5*则显著上调表达。说明*PcCOPTs*基因不同分支中的成员之间可能存在功能分化,相同分支的不同成员也可能存在功能上的差异。结合*PcCOPTs*的结构分析,发现其所有成员都不包含内含子结构,能够减少转录后RNA的剪切过程[37],在植物受到Cd胁迫后,实现快速转录后加工和翻译。关于*PcCOPT*家族关键成员在调控杨树Cd富集过程中的分子生理功能有待进一步研究。

4 结 论

本研究利用生物信息学方法对灰杨*PcCOPT*家族进行了系统分析,从灰杨基因组中共鉴定出7个无内含子的*COPTs*,分布在1,6,9等3条染色体上。系统发育分析结果显示,PcCOPTs可分为3个进化分支。*PcCOPTs*的表达具有组织特异性,与对照相比,在Cd胁迫72 h时,第一分支成员表达水平显著升高,第二分支成员表达量显著下降,第三分支成员*PcCOPT5*的表达量显著升高,但*PcCOPT4*

的表达水平则显著降低。表明*PcCOPTs*成员在灰杨响应Cd胁迫过程中可能存在功能分化。该研究结果为后续解析*PcCOPTs*基因调控杨树富集Cd的分子生理机制提供了参考。

[参考文献]

[1] HOU D Y, JIA X Y, WANG L W, et al. Global soil pollution by toxic metals threatens agriculture and human health[J]. Science, 2025, 388(6744): 316-321.

[2] CLEMENS S, AARTS M G M, THOMINE S, et al. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(2): 92-99.

[3] NORDBERG G F. Historical perspectives on cadmium toxicology[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 238(3): 192-200.

[4] SHARMA S, RANA S. Physical, chemical and phytoremediation technique for removal of heavy metals[J]. Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases, 2016, 1(2): 100010.

[5] ALI H, KHAN E, SAJAD M A. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications[J]. Chemosphere, 2013, 91(7): 869-881.

[6] DO NASCIMENTO C W A, HESTERBERG D, TAPPERO R. Imaging Zn and Ni distributions in leaves of different ages of the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* by synchrotron-based X-ray fluorescence[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 408: 124813.

[7] LI J T, DENG D M, PENG G T, et al. Successful micropropagation of the cadmium hyperaccumulator *Viola baoshanensis* (Violaceae)[J]. International Journal of Phytoremediation, 2010, 12(8): 761-771.

[8] FENG S S, TAN J J, ZHANG Y X, et al. Isolation and characterization of a novel cadmium-regulated yellow stripe-like transporter (SnYSL3) in *Solanum nigrum*[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(2): 281-296.

[9] LUO Z B, HE J L, POLLE A, et al. Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: paving the way for enhancing phytoremediation efficiency[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(6): 1131-1148.

[10] ABHILASH P C, POWELL J R, SINGH H B, et al. Plant - microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies[J]. Trends in Biotechnology, 2012, 30(8): 416-420.

[11] YU W J, DENG S R, CHEN X, et al. PcNRAMP1 enhances cadmium uptake and accumulation in *Populus*×*canescens*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7593.

[12] SHAN Q H, GUAN J, YANG Y H, et al. Cadmium-induced protein AS8: a protein to improve Cd accumulation and transport *via* Cd uptake in poplar[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 216: 109199.

[13] CHEN X, ZHANG Y H, CHENG Y, et al. PcWRKY1 represses transcription of *yellow stripe-like* 3 (*PcYSL3*) to negatively regulate radial cadmium transport in poplar stems[J]. Advanced Science, 2025, 12(1): e2405492.

[14] CHENG Y, CHEN X, LIU W Z, et al. Homolog of human placenta-specific gene 8, *PcPLAC8-10*, enhances cadmium uptake by *Populus* roots[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 460: 132349.

[15] YADAV R, ARORA P, KUMAR S, et al. Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities[J]. Ecotoxicology, 2010, 19(8): 1574-1588.

[16] YUAN M, LI X H, XIAO J H, et al. Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11: 69.

[17] VATANSEVER R, OZYIGIT I I, FILIZ E. Genome-wide identification and comparative analysis of copper transporter genes in plants[J]. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 2017, 9(2): 278-291.

[18] ZHANG H Z, YANG J L, WANG W D, et al. Genome-wide identification and expression profiling of the copper transporter gene family in *Populus trichocarpa*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 97: 451-460.

[19] HUSSAIN Q, YE T, LI S H, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the copper transporter (*COPT/ctr*) gene family in *Kandelia* obovata, a typical mangrove plant[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(21): 15579.

[20] JUNG H I, GAYOMBA S R, RUTZKE M A, et al. COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of *SQUAMOSA* promoter-binding protein-like 7[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(40): 33252-33267.

[21] ANDRÉS-COLÁS N, CARRIÓ-SEGUÍ A, ABDEL-GHANY S E, et al. Expression of the intracellular COPT3-mediated Cu transport is temporally regulated by the TCP16 transcription factor[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 910.

[22] GARCIA-MOLINA A, ANDRÉS-COLÁS N, PEREAGARCÍA A, et al. The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency[J]. The Plant Journal, 2011, 65(6): 848-860.

[23] SANCENÓN V, PUIG S, MIRA H, et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(4): 577-587.

[24] CARRIÓ-SEGUÍ A, GARCIA-MOLINA A, SANZ A, et al. Defective copper transport in the COPT5 mutant affects cadmium tolerance[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(3): 442-454.

[25] GAYOMBA S R, JUNG H I, YAN J P, et al. The CTR/COPT-dependent copper uptake and SPL7-dependent copper deficiency responses are required for basal cadmium tolerance in *A. thaliana*[J]. Metallomics, 2013, 5(9): 1262-1275.

[26] PEREA-GARCÍA A, GARCIA-MOLINA A, ANDRÉSCO-

LÁS N, et al. *Arabidopsis* copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling[J]. Plant Physiology, 2013, 162(1):180-194.

[27] HE J L, LI H, MA C F, et al. Overexpression of bacterial γ-glutamylcysteine synthetase mediates changes in cadmium influx, allocation and detoxification in poplar[J]. The New Phytologist, 2015, 205(1):240-254.

[28] HE J L, LI H, LUO J, et al. A transcriptomic network underlies microstructural and physiological responses to cadmium in *Populus*×*canescens*[J]. Plant Physiology, 2013, 162(1):424-439.

[29] CHANG S, PURYEAR J, CAIRNEY J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1994, 11(2):113-116.

[30] YUAN M, CHU Z H, LI X H, et al. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution[J]. The Plant Cell, 2010, 22(9):3164-3176.

[31] XU Z C, PU X D, GAO R R, et al. Tandem gene duplications drive divergent evolution of caffeine and crocin biosynthetic pathways in plants[J]. BMC Biology, 2020, 18(1):63.

[32] 吴铭旭,肖嘉元,陈天红,等. 杜氏盐藻Lhc基因家族的鉴定及镉胁迫下的表达特征[J]. 海洋与湖沼, 2025, 56(1):143-155.
WU M X, XIAO J Y, CHEN T H, et al. Identification of the Lhc gene family in *Dunaliella salina* and its expression response under different cadmium concentrations[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2025, 56(1):143-155.

[33] GU Z L, STEINMETZ L M, GU X, et al. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations[J]. Nature, 2003, 421(6918):63-66.

[34] LYNCH M, CONERY J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes[J]. Science, 2000, 290(5494):1151-1155.

[35] WANG Y Y, WU J, LI J H, et al. The R2R3-MYB transcription factor *ThRAX2* recognized a new element MYB-T (CTTCCA) to enhance cadmium tolerance in *Tamarix hispida*[J]. Plant Science, 2023, 329:111574.

[36] ZHANG P, WANG R L, JU Q, et al. The R2R3-MYB transcription factor MYB49 regulates cadmium accumulation[J]. Plant Physiology, 2019, 180(1):529-542.

[37] JEFFARES D C, PENKETT C J, BÄHLER J. Rapidly regulated genes are intron poor[J]. Trends in Genetics, 2008, 24(8):375-378.

(责任编辑:陈丽)

(上接第20页)

[25] SANTANA B F, RISER M, HAY E H A, et al. Alternative SNP weighting for multi-step and single-step genomic BLUP in the presence of causative variants[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2023, 140(6):679-694.

[26] HORNE B D, CAMP N J. Principal component analysis for selection of optimal SNP-sets that capture intragenic genetic variation[J]. Genetic Epidemiology, 2004, 26(1):11-21.

[27] 林雨浓,王泽昭,陈燕,等. 不同筛选方法的低密度SNP集合填充准确性比较[J]. 中国农业科学, 2023, 56(8):1585-1593.
LIN Y N, WANG Z Z, CHEN Y, et al. Comparison of imputation accuracy for different low-density SNP selection strategies [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(8):1585-1593.

[28] AKEY J, JIN L, XIONG M M. Haplotypes vs single marker linkage disequilibrium tests: what do we gain[J]. European Journal of Human Genetics, 2001, 9(4):291-300.

[29] 史顺宇,杨涛,庞博,等. 海岛棉叶绿素含量的全基因组关联分析及候选基因预测[J]. 中国农业科学, 2025, 58(10):1878-1895.
SHI Shunyu, YANG Tao, PANG Bo, et al. Genome-wide association analysis and prediction of candidate genes for chlorophyll content in Gossypium barbadense[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2025, 58(10):1878-1895.

(责任编辑:马秋明)