

Identification and Characterization of Genes Encoding Heavy Metal Tolerant Protein Family (MTP) in Euphrates Poplar (*Populus euphratica*)

Z. Shirazi

Assist. Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran Email: z.shirazi@rifr-ac.ir.

Received: 20.04.2024

Accepted: 26.06.2024

Extended Abstract

Background and Objectives:

Heavy metals are a major environmental issue, severely affecting plant growth. Phytoremediation, which involves using plants to extract, separate, or eliminate pollutants, offers a practical, cost-efficient, and environmentally friendly solution. Several protein families, such as the Metal Tolerant Protein (MTP) family, play a key role in the phytoremediation of heavy metals in plants like Euphrates poplar. With advances in genomics, especially the sequencing of various organisms' genomes and data availability from public databases, researchers can now identify relevant genes and their functions. This study aims to explore the genetic diversity and relationships among the members of the MTP family in Euphrates poplar.

Methodology:

Members of the MTP family in the Euphrates poplar genome were identified using homologous protein sequences of the MTP family from two model plants of Arabidopsis and rice using BlastP in the NCBI database. Sequence alignment was performed, followed by phylogenetic tree construction using the Neighbor-Joining method. Various software tools were used to predict the physicochemical properties and protein localization of MTP members and to assess the selection pressure, exon-intron distribution patterns, and specific motifs within gene family members. Gene ontology was performed at three levels: biological processes, molecular function, and cellular components, including identifying unique simple sequence repeat (SSR) markers. The microRNA network regulating gene expression for each member was also identified and, the communication network between genes and MicroRNA was drawn. Gene expression was evaluated in various Euphrates poplar tissues, and RNA-seq data were normalized and analyzed for expression under 200 mM salt stress. Heat map visualizations were generated using Mev4.0 software.

Results:

A total of 26 MTP gene family members were identified in the *P. euphratica* genome through bioinformatics analysis. Phylogenetic analysis classified these into three major groups (Mn-MTP, Zn/Fe-MTP, and Zn-MTP) and seven subgroups. The encoded proteins were found to be associated with the plasma membrane and the transfer of metals to the vacuole, supporting their role in detoxifying heavy metals. Negative selection pressure was observed across all members, indicating



the effect of gene divergence. Gene structure analysis showed the highest integration within groups and the lowest integration between groups. Out of the 15 gene sequences analyzed, 52 SSR markers were identified for marker-assisted selection. MTP11.2, MTP3.2, MTP12, and MTP7 genes exhibited the highest expression levels across various tissues. The MTP1.1 gene showed the most significant increase in gene expression 48 hours after salt application, indicating a potential role in plant responses to salinity and heavy metal stress.

Conclusion:

The presence of repeated gene sequences reflects the plant's high demand for the specific function of these genes and their differential expression during various growth stages and stress conditions. Euphrates poplar possesses numerous MTP family members, which contribute to removing metals from the soil and are linked to increased growth and wood production. This research demonstrates the utility of bioinformatics data in facilitating the identification of metal-resistant populations more efficiently and cost-effectively.

Keywords: Biological data mining, Gene family, Phylogenetic analysis, Phytoremediation.

شناسایی و خصیصه‌یابی ژن‌های رمزکننده خانواده پروتئینی متحمل به فلزات سنگین (MTP) در صنوبر پده (*Populus euphratica*)

زهرا شیرازی

استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

پست الکترونیک: z.shirazi@rifr-ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۶

چکیده

سابقه و هدف:

فلزات سنگین از رایج‌ترین مشکلات محیط‌زیست بوده و دارای تأثیرات منفی روی گیاهان هستند. روش گیاه‌پالایی با استفاده از گیاهان برای استخراج، جداسازی و یا از بین بردن انواع آلاینده‌های محیط‌زیست مقرون به صرفه و سازگار با محیط‌زیست است. توانایی گیاه‌پالایی فلزات سنگین در گیاهان از جمله صنوبریان با استفاده از خانواده‌های مختلف پروتئینی انجام می‌شود که می‌توان به خانواده MTP (پروتئین متحمل به فلزات) اشاره کرد. امروزه بدلیل شناسایی توالی ژنومی برخی از موجودات زنده، با استفاده از اطلاعات موجود در پایگاه‌های مختلف، می‌توان به تحقیق در زمینه یافتن ژن‌ها و عملکرد آنها پرداخت. این مطالعه برای شناسایی، بررسی تنوع و قرابت‌های ژنتیکی بین اعضای خانواده MTP در صنوبر پده (*Populus euphratica*) انجام شده است.

مواد و روش‌ها:

شناسایی اعضا خانواده MTP در ژنوم صنوبر پده با استفاده از توالی پروتئینی همولوگ خانواده MTP دو گیاه مدل آراییدوپسیس و برنج به روش BlastP در پایگاه داده NCBI انجام شد. پس از همردیف‌سازی توالی‌ها، ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-Joining انجام شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و مکان‌یابی اعضا پروتئینی پیش‌بینی شد و نوع فشار گزینش، الگوی توزیع اگزون-اینترون و موتیف‌های اختصاصی اعضای خانواده ژنی MTP توسط نرم‌افزارهای مختلف انجام شد. آنتولوژی (هستی‌شناسی) ژنها در سه سطح فرایندهای زیستی، عملکرد مولکولی و جزء سلولی انجام گردید و ژن‌ها از نظر وجود نشانگر توالی تکراری ساده منحصر بررسی شدند. پس از شناسایی MicroRNA تنظیم‌کننده بیان ژن هریک از اعضا، شبکه ارتباطی ژن‌ها و MicroRNA ترسیم شد. بررسی دیجیتال بیان ژن در بافت‌های مختلف و تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار پس از دریافت و نرمال‌سازی داده‌های RNA-seq انجام شد و نقشه حرارتی (heat map) با استفاده از نرم‌افزار Mev4.0 ترسیم گردید.

نتایج:

در بررسی بیوانفورماتیک ۲۶ عضو از خانواده ژنی MTP در ژنوم *P. euphratica* شناسایی شد. بررسی فیلوژنتیکی اعضا خانواده ژنی MTP را به سه گروه (Zn-MTP، Zn/Fe-MTP، Mn-MTP) و هفت زیرگروه تقسیم کرد. در بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و هستی‌شناسی پروتئین‌های رمزشونده، نقش آنها در ارتباط با غشای پلاسمایی و در انتقال فلزات به واکوئل مشخص شد که تاییدکننده نقش این خانواده در سم‌زدایی ناشی از تأثیر منفی فلزات سنگین است. فشار گزینش در تمامی اعضا از نوع انتخاب منفی بود که بیانگر

اثر جانشینی یا واگرایی در ساختار ژنی است. در تجزیه و تحلیل ساختار ژنی، بیشترین و کمترین یکپارچگی به ترتیب در داخل و بین گروه‌ها مشاهده شد. ۵۲ نشانگر اختصاصی SSR در ۱۵ توالی ژنی شناسایی شد که در انتخاب جمعیت‌های مورد نظر کمک می‌کند. در بررسی بیان ژن در بافت‌های مختلف ژن‌های *MTP12*, *MTP3.2*, *MTP11.2* و *MTP7* بیشترین بیان را نشان دادند. در میزان تغییرات بیان ژن‌ها در زمان‌های مختلف بعد از اعمال شوری، ژن *MTP1.1* بعد از ۴۸ ساعت بیشترین افزایش بیان ژن را نشان داد. نتایج با توجه به تشابه پاسخ‌های گیاه در شوری از طریق تولید بیش از حد یون‌ها و کاهش عملکرد، قابل تعمیم به تنش فلزات سنگین نیز است.

نتیجه‌گیری:

وجود نسخه‌های متعدد از یک ژن به دلیل نیاز بالای گیاه به عملکرد و محصول اختصاصی آن ژن و یا بیان متفاوت اعضای خانواده در مراحل مختلف رشد و نمو و تنش‌های مختلف است. صنوبر پده دارای تعداد بالایی از اعضای خانواده *MTP* بود که می‌تواند دلیلی بر استفاده از این گونه در پالایش خاک از فلزات سنگین باشد و با رشد بیشتر و تولید مقدار بیشتری چوب صنوبر نیز همراه است. نتایج بیانگر کاربرد داده‌های بیوانفورماتیک بدست آمده، برای تسهیل شناسایی جمعیت‌های متحمل به فلزات به صورت دقیق و با صرف هزینه و زمان کمتر است. با کمک داده‌های بیوانفورماتیک به صورت دقیق به سراغ ژن‌های مدنظر رفته و از آزمون و خطا در انجام آزمایش‌ها جلوگیری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، خانواده ژنی، داده‌کاوی زیستی، گیاه‌پالایی.

مقدمه

آلودگی فلزات سنگین در جوامع صنعتی یکی از جدیدترین مشکلات محیط‌زیست در حال حاضر است. بسیاری از فلزات سنگین حتی در غلظت‌های بسیار پایین سمی هستند. منابع اصلی ورود فلزات سنگین به بیوسفر شامل سوخت‌های فسیلی، معادن ذوب فلزات، فاضلاب‌ها و ترکیبات شیمیایی است (Memon and Schroder, 2009). با توجه به ماهیت غیرقابل تجزیه بودن آنها، فلزات سنگین در لایه فوقانی خاک تجمع یافته و برای مدت طولانی باقی می‌مانند که می‌توانند با ورود به محصولات زراعی و مواد غذایی با روش تجزیه خاک، خطری برای سلامت انسان و حیوان باشند. فلزاتی مانند آهن، منگنز، روی، مس، مولیبدن و نیکل در گیاهان تجمع یافته و مصرف می‌شوند. با این حال، تجمع بیش از حد این فلزات سنگین برای بسیاری از گیاهان سمی است. روش‌های فیزیکی و شیمیایی اصلاح خاک‌های آلوده، گران قیمت هستند. در نتیجه استفاده از گیاهان و میکروب‌ها برای استخراج، جداسازی و یا از بین بردن انواع آلاینده‌های محیط‌زیست از آب، رسوبات، خاک و هوا مقرون به صرفه بوده و گیاه‌پالایی نامیده می‌شود. چندین زیرمجموعه از فناوری گیاه‌پالایی فلزات سنگین در

حال توسعه است که در سالهای اخیر به عنوان یک تکنیک سبز و کم هزینه که نیازی به نیروی متخصص و فناوری خاص ندارد و برای پاک‌سازی مکانهای آلوده به فلزات سنگین پیشنهاد شده است. در این تکنیک از توانایی گیاهان برای تجمع فلزات سنگین در غلظت بالا در بخش هوایی گیاه استفاده می‌شود. گیاه مناسب گیاه‌پالایی باید دارای زیست‌توده بالا، توان جذب زیاد، تکثیر آسان و رشد سریع بوده و نسبت به شرایط نامساعد محیطی مقاوم باشد (Firouzan et al., 2015). گیاهان سازوکارهای پیچیده‌ای برای تنظیم غلظت سلولی از جمله کنترل جذب و حرکت یون‌های فلزی در هر دو سطح سلولی و بافت، کلات و جداسازی یا سم‌زدایی یون‌های فلزی را درون سلول‌ها دارند (Clemens et al., 2002; Hall, 2002). واکوئل‌های گیاهی مکان اصلی سم‌زدایی، توقف و ذخیره‌سازی فلزات است و تونوپلاست‌ها دارای تعداد زیادی پروتئین‌های انتقال‌دهنده یون‌های فلزی از گروه‌های مختلف پروتئین‌های انتقال‌دهنده هستند. پروتئین‌های خانواده تسهیل‌کننده انتشار

به ژنهای شناسایی شده در شناسایی کلون‌ها و اصلاح جمعیت مقاوم به فلزات کمک می‌کند.

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضا خانواده MTP

مهمترین بخش آنالیز یک خانواده ژنی، شناسایی اعضاء آن خانواده می‌باشد. بدین منظور، توالی پروتئینی خانواده MTP در دو گیاه مدل آراییدوپسیس *Arabidopsis thaliana* و برنج *Oryza saiva* از پایگاه داده دریافت شد. توالی‌های اولیه برای شناسایی توالی پروتئینی همولوگ در ژنوم *P. euphratica* در پایگاه داده NCBI با استفاده از روش BlastP و $E\text{-value} < 10^{-10}$ انجام شد. سپس توالی‌های تکراری حذف شده و توالی‌ها از نظر وجود دمین محافظت شده خانواده پروتئینی MTP به دست آمده از پایگاه داده Pfam که شامل cation efflux domain (PF01545) است، با استفاده از نرم‌افزار برخط HMMER-EMBL-EBI بررسی شدند (Letunic et al., 2012).

ترسیم درخت فیلوژنتیکی و نام‌گذاری

تقسیم‌بندی پروتئین‌های یک خانواده در گروه‌ها و بررسی روابط تکاملی بین آنها نیازمند همدریف‌سازی صحیح و رسم درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم مناسب می‌باشد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی، همدریف‌سازی توالی خانواده پروتئینی MTP شناسایی شده به همراه توالی پروتئینی MTP سایر گیاهان مانند آراییدوپسیس و برنج با استفاده از نرم‌افزار ClustalW 2010 انجام شد. درخت فیلوژنتیکی توالی‌ها براساس روش اتصال همسایگی و آزمون بوت‌استرپ و با تکرار ۱۰۰۰ بار توسط نرم‌افزار MEGA7 ترسیم شد (Larkin et al., 2007).

کاتیون‌ها^۱ (CDFs) در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها موجود بوده و عمدتاً انتقال‌دهنده کاتیون‌های دو ظرفیتی مانند کادمیوم، آهن، روی، منگنز، کبالت و نیکل، از سیتوسول به داخل اندامک‌های سلولی یا خارج سلول هستند (Migocka et al., 2015). CDF موجود در سلول‌های گیاهی، پروتئین‌های MTP^۲ یا پروتئین متحمل به فلزات سنگین نامگذاری شده‌اند و به هفت گروه فیلوژنتیک تقسیم می‌شوند. هر گروه توانایی عمده در نقل و انتقال گروه خاصی از فلزات را بر عهده دارند. به عنوان مثال CDF گروه یک، نه تنها توانایی حمل و نقل عنصر روی، بلکه یون‌های فلزی دیگر مانند کبالت را نیز بر عهده دارند (Gustin et al., 2011). بررسی تنوع در مورد قابلیت جذب فلزات سنگین و دیگر آلاینده‌ها توسط گونه‌های درختی انجام شده است. صنوبریان با رشد و تولید چوب بیشتر، جذب و نگهداری بیشتر عناصر و فلزات سنگین از خاک آبیاری شده با فاضلاب در اندام‌های خود و تعریق بیشتر نسبت به سایر گونه‌های درختی کند رشد، در پالایش خاک از آلاینده‌ها، نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Rad et al., 2010).

جنس صنوبر (*Populus sp.*) متعلق به خانواده بیدیان با حدود ۳۵ گونه در دنیا، پراکندگی وسیعی در نواحی معتدله دارد (Sukla et al., 2011). برخی گونه‌های این جنس در محدوده وسیعی از کشور و در مناطق روستایی و فضای سبز شهری به شکل مجتمع و پراکنده وجود دارند. این موضوع امکان قرارگرفتن آنها را در معرض فلزات سنگین که از آلاینده‌های مهم صنعتی هستند افزایش می‌دهد. توان بالای گونه‌های مختلف صنوبر در تجمع فلزهای سنگین در کنار سایر مزایای آن شامل درختی بودن، غیر خوراکی بودن، تکثیر آسان و تعریق بالا، آن را به عنوان گیاهی مناسب گیاه‌پالایی می‌نماید. در مطالعات مختلف به توان جذب فلزات سنگین در گونه‌های مختلف صنوبر اشاره شده است (Etemadi et al., 2016). هدف از این مطالعه شناسایی، ترسیم درخت فیلوژنتیکی و بررسی *in silico* بیان ژنهای متحمل به فلزات در صنوبر پده است که نتایج حاصل با توجه

² Metal Tolerance Proteins

¹ Cation diffusion facilitators

بررسی ویژگی پروتئین‌های MTP

وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و مکان‌یابی پروتئین در سلول از مهمترین ویژگی‌های هر پروتئین بوده که نقش مهمی در فعالیت آن دارند. به منظور مشخص کردن وزن مولکولی و pI پروتئین‌های MTP از سایت Expasy به عنوان یکی از معتبرترین سرورهای پروتئومیکس استفاده شد (Gasteiger et al., 2005). همچنین مکان‌یابی پروتئین‌ها با استفاده از Plant-mPLoc پیش‌بینی شده و وجود ناحیه بین غشایی با استفاده از TMHMM تعیین گردید (Krogh et al., 2001).

بررسی نوع فشار گزینش

به منظور بررسی مقدار جایگزینی مترادف (Ks) و نامترادف (Ka) محاسبه شد. نسبت $Ka/Ks > 1$ ، $Ka/Ks = 1$ و $Ka/Ks < 1$ که به ترتیب نشان‌دهنده انتخاب طبیعی، انتخاب مثبت و انتخاب منفی است، از نرم‌افزار DnaSP استفاده شد (Suyama et al., 2006). شاخص جایگزینی (r) نیز براساس مدل تامورا به روش حداکثر درست‌نمایی بین و درون گروه با استفاده از نرم‌افزار MEGA محاسبه گردید (Tamura et al., 2011).

بررسی ساختارهای ژنی و موتیف‌های حفاظت‌شده

الگوی توزیع اگزون-اینترون از طریق مقایسه توالی CDS در مقایسه با توالی DNA ژنومی مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار GSDS انجام شد (Hu et al., 2015). برای شناسایی موتیف‌های اختصاصی این خانواده از MEME استفاده شد. پارامترهای مورد استفاده شامل تعداد موتیف ۱۰ عدد، کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۶ و ۵۰ اسیدآمینو بود. از پایگاه داده Pfam و برنامه SMART برای بررسی موتیف‌های شناسایی‌شده استفاده شد (Bailey et al., 2009).

بررسی هستی‌شناسی ژن و نشانگرهای توالی تکراری ساده توالی ژن‌های شناسایی شده به منظور هستی‌شناسی آنها در سه سطح ذیل توسط نرم‌افزار String بررسی شدند. ۱- فرایندهای زیستی که به یک هدف زیستی اشاره دارد که ژن یا محصول ژنی به ایجاد آن کمک می‌کند. فرایندها اغلب شامل یک دگرگونی شیمیایی یا فیزیکی هستند، به این معنا که چیزی وارد یک فرایند می‌شود و چیز متفاوتی از آن خارج می‌شود. ۲- عملکرد مولکولی به عنوان فعالیت بیوشیمیایی (شامل اتصال خاص به لیگاندها یا ساختارها) در یک محصول ژنی تعریف می‌شود. ۳- جزء سلولی که به مکانی در سلول اشاره دارد که یک محصول ژن در آن فعال است (Conesa et al., 2005). همچنین وجود نشانگر توالی تکراری ساده منحصر به ژن‌های شناسایی شده توسط سرور BatchPrimer3v1 شناسایی شد (Yu et al., 2012).

شناسایی توالی MicroRNA

MicroRNA نقش مهمی در تنظیم بیان ژنها در سطح رونویسی و پس از آن دارد. برای شناسایی توالی MicroRNA مرتبط با هریک از ژنها، توالی رمزکننده از ژنوم گیاه دریافت شده و توسط پایگاه psRNATarget ارزیابی گردید. برای ترسیم شبکه ارتباطی ژنها و MicroRNA از نرم‌افزار Cytoscape استفاده شد (Draghici et al., 2007).

بررسی *in silico* بیان ژن

به منظور بررسی *in silico* بیان ژنهای خانواده MTP در پده، داده‌های RNA-seq مرتبط با گیاه دوساله، در چهار بافت مختلف برگ، ریشه، آوند چوبی و آبکش شامل SRX3140050, SRX3139977, SRX3139976, SRX3139499 از پروژه SRP116293 دریافت شد. همچنین داده‌های بیانی مرتبط با تنش ۲۰۰ mM کلرید سدیم در زمانهای ۴۸-۲۴-۱۲-۶-۰ ساعت بعد از تیمار شامل SRX335459, SRX335458, SRX335454,

۲۸ (Menzies, 2017; Vatansever et al., 2017a) توالی‌های شناسایی شده از نظر وجود دمین حفاظت شده این خانواده cation efflux domain (PF01545) در ژنوم *P. euphratica* تأیید شدند و در نهایت ۲۶ توالی پروتئینی MTP در ژنوم *P. euphratica* براساس شباهت با توالی‌های MTP آراییدوپسیس و نرم افزار MatGAT به تأیید نهایی رسید. گروه‌بندی پروتئین‌های MTP شناسایی شده و رسم درخت فیلوژنتیکی در ۲۶ توالی صنوبر با ۱۲ توالی آراییدوپسیس و ۱۰ توالی پروتئینی برنج براساس روش اتصال همسایگی و آزمون بوت استراپ با تکرار ۱۰۰۰ بار توسط نرم‌افزار MEGA 7 این خانواده پروتئینی را به سه گروه اصلی (Mn-MTP, Zn/Fe-MTP, Zn-MTP) و هفت زیرگروه (۱۲ و ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۱) تقسیم‌بندی کرد (شکل ۱). نکته جالب توجه در مورد این درخت فیلوژنتیکی، قرارگرفتن ژن‌هایی با کارکرد یکسان در یک گروه است.

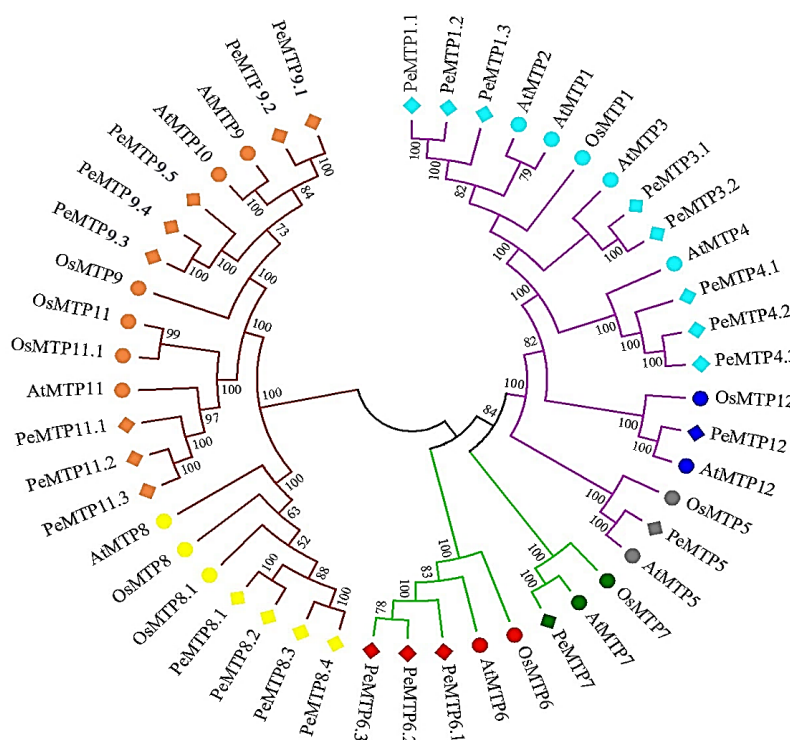
SRX335452, SRX335446 دریافت شد. فراوانی داده‌ها براساس تعداد قطعات کیلوباز رونوشت در هر میلیون خوانش مکان‌یابی شده (FPKM) نرمال شد. گروه‌بندی بیان ژنها در بافتهای مختلف براساس معیار لگاریتم دوم داده‌های بیانی و در شرایط تنش شوری براساس معیار لگاریتم دوم تغییرات بیان ژن انجام شده و نمودار حرارتی با استفاده از نرم‌افزار Mev4.0 ترسیم گردید.

نتایج

شناسایی، رسم درخت فیلوژنتیکی و طبقه‌بندی اعضای

MTP خانواده

رابطه فیلوژنتیکی توالی پروتئینی اعضا خانواده MTP در *P. euphratica* و اعضا موجود در *A. thaliana* و *O. sativa* در شکل ۱ مشاهده می‌شود. براساس توالی اعضای خانواده MTP موجود در آراییدوپسیس و برنج، ۳۰ کاندیدای توالی پروتئینی MTP در ژنوم صنوبر شناسایی شد (Fu and



شکل ۱- رابطه فیلوژنتیکی توالی پروتئینی اعضا خانواده MTP در *P. euphratica* و اعضا موجود در *A. thaliana* و *O. sativa* (دو حرف اول توالی‌ها معرف حروف اول جنس و گونه مدنظر است). توالی پروتئین‌ها به سه گروه Mn-MTP، Zn/Fe-MTP و Zn-MTP و هفت زیرگروه (۱۲ و ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۱) تقسیم‌بندی شد که هر گروه با خطوط رنگی مجزا و هر زیرگروه نیز با رنگی متفاوت در اشکال دایره و لوزی کنار نام هر عضو، نشان داده شده است.

Figure 1- Phylogenetic relationship of the protein sequence of MTP family members in *P. euphratica* and members in *A. thaliana* and *O. sativa* (The first two letters of the sequences represent the first letters of the genus and species). The sequence of proteins was divided into three groups **Mn-MTP**, **Zn/Fe-MTP** and **Zn-MTP** and seven subgroups (12, 9, 8, 7, 6, 5, 1), each group with separate color lines and each subgroup with a different color is shown in circles and rhombuses next to each member's name.

درصد و مرتبط با جایگزینی T/U به C است. بررسی میانگین تفاوت بین گروهی در سه گروه Mn-MTPs, Zn-MTPs و Zn/Fe-MT بیشترین تفاوت بین گروهی را بین دو گروه Mn-MTPs و Zn-MTPs مشخص کرد.

تجزیه و تحلیل ساختار ژنی

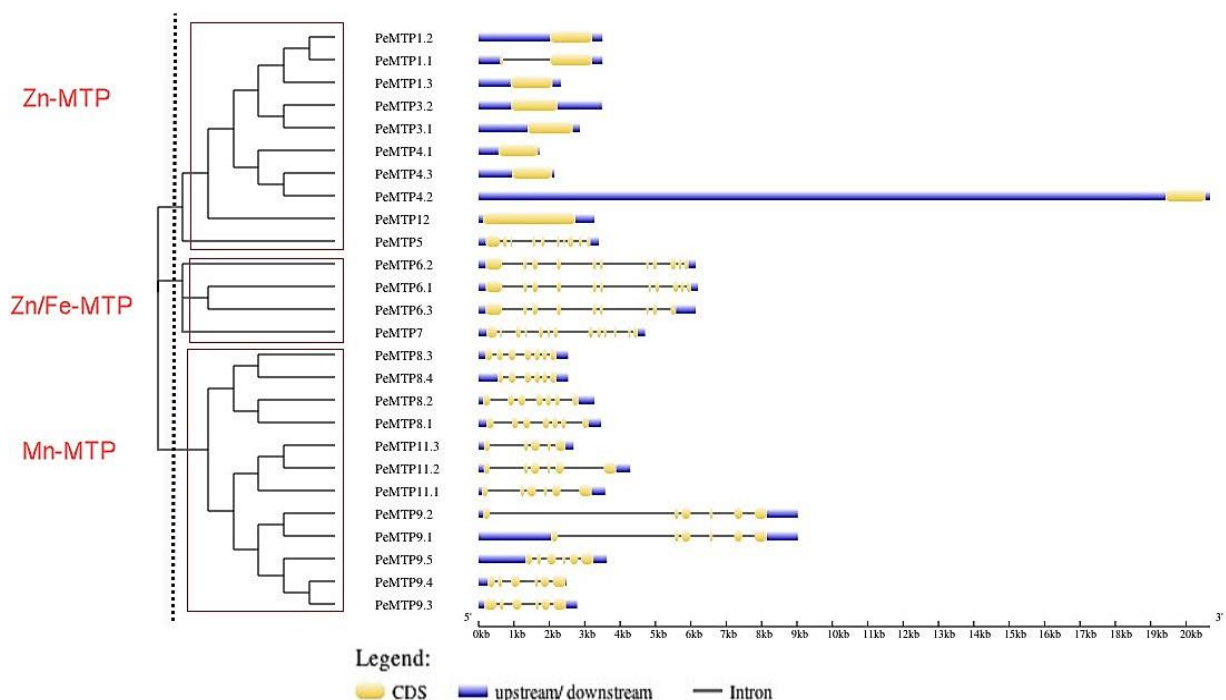
بررسی ساختار اگزون-اینترون می‌تواند شواهد بیشتری را در تأیید گروه‌بندی فیلوژنتیکی و روابط تکاملی ارائه نماید. زیرا این نوع تنوع ساختاری اغلب نقش مهمی در تکامل خانواده‌های ژنی دارد (Zhang et al., 2012). گروه‌بندی ساختار ژنی در صنوبر پده نیز به روش اتصال همسایه انجام شد. توالی‌های پروتئینی PeMTP پیرایش دگرسان نداشت. در کل تعداد اگزون‌ها در سه گروه اصلی بین ۱۳-۱۱ شناسایی شد. بیشترین یکپارچگی از نظر تعداد در داخل گروه Mn-MTP با ۷-۵ اگزون و کمترین یکپارچگی در گروه Zn-MTP با ۱۰-۱۱ اگزون مشاهده شد (شکل ۲).

ویژگی فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌های MTP

تجزیه و تحلیل فیزیکی و شیمیایی نشان داد که طول اسیدآمینه، وزن مولکولی برحسب کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک (pI) پروتئین‌های MTP متفاوت است. وزن مولکولی در دامنه ۹۷/۸۰ - ۳۲/۹۶ کیلودالتون در صنوبر پیش‌بینی شد. همچنین نتایج نشان داد که نقطه ایزوالکتریک از ۴ تا ۷/۲۴ متغیر است. بیشترین وزن مولکولی در MTP₁₂ مشاهده شد. موقعیت درون سلولی تمامی اعضای خانواده MTP در واکوئل پیش‌بینی شد و بیشترین تعداد دمین فراغشایی با تعداد ۱۲ دمین در MTP₁₂ بود.

نوع فشار گزینش

برای تمامی ژن‌های مورد بررسی فشار انتخاب منفی بود. نتایج نشان‌دهنده این است که واگرایی عملکردی قبل از پدیده مضاعف‌شدن ژن‌های PeMTP در ژنوم *P. euphratica* به وقوع پیوسته است (Zang et al., 2015). حداکثر جایگزینی مترادف در ۲۶ توالی نوکلئوتیدی ژنی PeMTP ۱۶/۴۴



شکل ۲- ساختار اگزون-اینترون ژنهای *MTP* مطابق با روابط فیلوژنتیکی

Figure 2- Exon-intron structure of *MTP* genes according to their phylogenetic relationships

شناسایی اعضای خانواده *MTP*

نتایج هستی‌شناسی ژن *PeMTP* عملکرد معنی‌دار اعضا در فرایندهای زیستی، مولکولی و سطح سلولی است. اکثریت فعالیت ژنها در فرایند مولکولی، انتقال یونهای کاتیونی غشا بوده و در سطح زیستی دارای عملکرد انتقال یون روی در غشاء هستند و مرتبط با جزء واکوئل و غشای واکوئلی بودند.

شناسایی نشانگرهای *SSR*

SSR موجود در توالی ژنی اعضای خانواده *MTP* در *P. euphratica* در جدول ۱ نشان داده شده است. ۵۲ نشانگر اختصاصی *SSR* در ۱۵ توالی ژنی *PeMTP* شناسایی شد. بیشترین نوع نشانگر مربوط به ۴ نشانگر نوکلئوتیدی و کمترین آن مربوط به ۳ نشانگر نوکلئوتیدی بود.

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده

برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی پروتئینی خانواده *MTP* در صنوبر پده، توالی پروتئین‌های این خانواده بوسیله نرم‌افزار MEME ارزیابی شد. براساس این بررسی ۱۰ موتیف حفاظت‌شده در توالی پروتئینی این ژنها شناسایی گردید. ارزیابی موتیف‌ها با برنامه Pfam بررسی شد. در بررسی ژنوم صنوبر، سه موتیف دارای عملکرد شناخته‌شده بودند که دو موتیف، دمین CDF را رمز می‌کنند و یک موتیف دربردارنده دمین ZT dimer است. یکی از موتیف‌های دربردارنده دمین CDF در همه توالی‌های پروتئینی شناسایی شد. در حالی که تمامی اعضای گروه Mn-MTP دارای موتیف ZT dimer هم بودند و بیشترین تعداد موتیف شناسایی شده در توالی به تعداد ۷ موتیف بودند و در توالی *PeMTP7* تنها یک موتیف مشاهده شد.

جدول ۱- شناسایی توالی نشانگرهای SSR در توالی ژن‌های خانواده *MTP* در *P. euphratica*

Table 1- Identification of SSR markers in the gene sequence of the *MTP* family in *P. euphratica*

Gene Name	SSR Motives
PeMTP4.1	(TC)8
PeMTP4.2	(TG)7-(CAA)5-(AGAA)3-(TATG)6-(TTCTT)3
PeMTP1.2	(GTTT)3-(AGTC)4
PeMTP1.1	(GTTT)3-(AGTC)4
PeMTP12	(TCC)4-(ACC)7-(CAT)4-(CGACCC)3-(CATGAC)4
PeMTP5	(TTTC)3
PeMTP6.2	(CT)7-(AGA)6-(ACC)4-(TTTC)3-
PeMTP6.1	(CT)7-(TTTC)3-(TTCC)3-(ACC)4-(AGA)6
PeMTP6.3	(CT)7-(AGA)6-(TTTC)3-(TTCC)3-(ACC)4
PeMTP9.2	(AT)6-(ATT)4-(TG)8-(TTTC)3--(TATT)3-(TTTA)3-(TTTA)3
PeMTP9.1	(AT)6-(TG)8-(ATT)4-(TTTC)3-(TTTA)3-(TATT)3 (TTTA)3
PeMTP9.5	(TG)6
PeMTP8.1	(GTGTG)3
PeMTP8.2	(TCTA)3
PeMTP7	(GATT)3

miRNA مورد هدف قرار می‌دهد. برخی miRNA مانند -aly

miR2111b-5p، ۹ عضو ژنی را هدف قرار می‌دهد و برخی

ژن‌ها مانند *PeMTP11.1*، *PeMTP11.2* و *PeMTP11.3*

دارای تعداد بالایی miRNA مشترک هستند.

شناسایی miRNA

نتایج شناسایی miRNA که اعضای خانواده *MTP* در *P.*

euphratica را مورد هدف قرار می‌دهند در شکل ۳ نشان

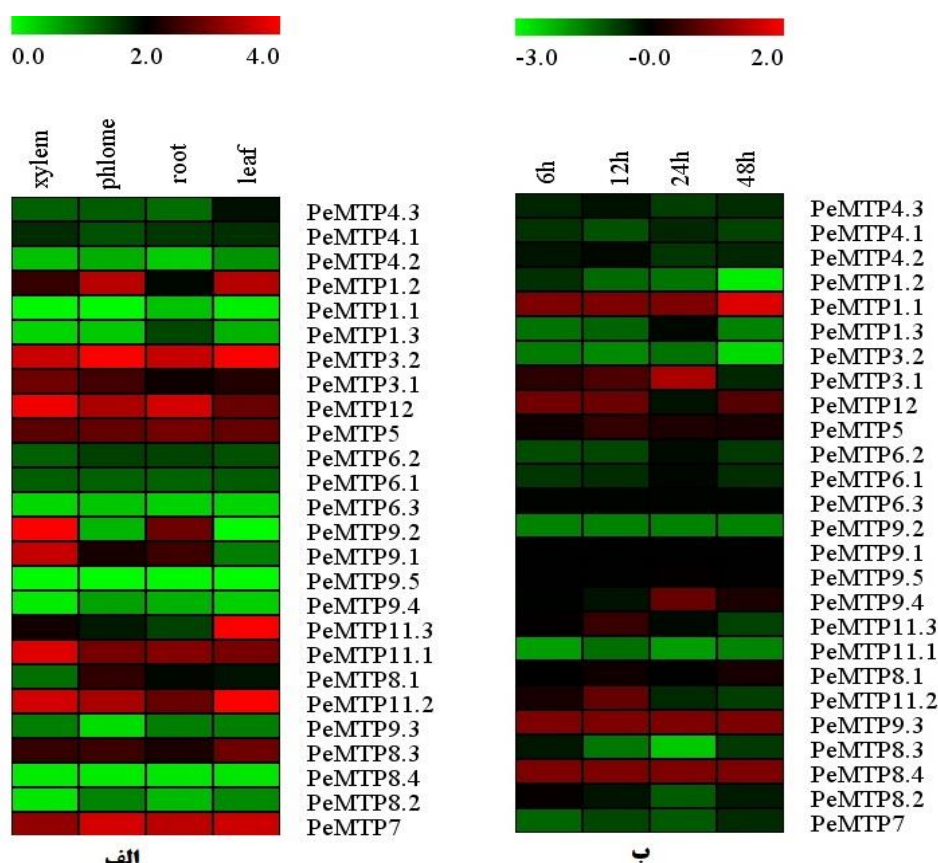
داده شده است. ۷۳ miRNA با ۲۵ ژن خانواده *MTP* در

P. euphratica در ارتباط بودند. تمامی ژن‌ها را بیش از یک



لگاریتم دوم تغییرات بیان ژن انجام شده و نمودار حرارتی با استفاده از نرم افزار $Mev4.0$ ترسیم گردید. در بررسی بیان ژن در بافت های مختلف، ژن های $MTP11.2$, $MTP3.2$, $MTP12$ و $MTP7$ بیشترین بیان را در هر چهار بافت مورد بررسی نشان دادند. ژن $MTP9.1$ در بافت ریشه بیان نداشت و بیان ژن $MTP9.3$ در بافت آبکش مشاهده شد. در بررسی میزان تغییرات بیان ژنها در چهار زمان مختلف بعد از اعمال شوری، ژن $MTP1.1$ بعد از ۴۸ ساعت بیشترین افزایش بیان ژن را نمایش داد.

نتایج نمودار حرارتی بررسی بیان ژنهای *MTP* گیاهچه دو ساله پده در بافت‌های ریشه، برگ، آوند چوبی و آبکش و تغییرات بیان ژنها در گیاهچه‌های تحت تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار بعد از زمان‌های ۴۸-۱۴-۱۲ و ۶ ساعت در شکل ۴ ارائه گردید. فراوانی داده‌ها براساس تعداد قطعات کیلو باز رونوشت در هر میلیون خوانش مکان‌یابی شده (FPKM) نرمال شد. گروه‌بندی بیان ژنها در بافت‌های مختلف براساس معیار لگاریتم دوم داده‌های بیانی و در شرایط تنش براساس معیار



شکل ۴- الف) بررسی بیان ژن‌های *PeMTP* در بافت‌های مختلف صنوبر پده دوساله، ب) تغییرات میزان بیان ژن‌های *PeMTP*

بعد از اعمال تنش شوری ۲۰۰ میلی‌مولار در چهار زمان مختلف

Figure 4-a) Investigating the expression of *PeMTP* genes in four different tissues of two-year-old Euphrates b) Changes in the expression level of *PeMTP* genes after applying 200 mM salt stress at four different times.

بحث

بررسی فیلوژنتیکی، تکاملی، ساختار ژنی، ویژگی پروتئینی

و هستی‌شناسی خانواده *MTP*

در این پژوهش ۲۶ ژن رمزکننده توالی پروتئینی *MTP* در *P. euphratica* شناسایی شد که همگی دارای دمین حفاظت‌شده خانواده (CDF) بودند. براساس رابطه فیلوژنتیکی توالی‌های شناسایی‌شده به سه گروه اصلی و هفت زیرگروه تقسیم شدند که مشابه با طبقه‌بندی و شناسایی این خانواده آرابیدوپسیس، انگور، برنج، گندم و پرتقال است (Fu et al., 2017; Gao et al., 2020; Montanini et al., 2007; Shirazi et al., 2019; Vatansever et al., 2017).

• گروه Zn-MTP شامل زیرگروه‌های *MTP1*-*MTP4* و *MTP5* و *MTP12* است.

• گروه Mn-MTP شامل زیرگروه‌های *MTP81.1*-*MT9* است.

• گروه Zn/Fe-MTP شامل زیرگروه‌های *MTP6* و *MTP7* است.

اعضای گروه Mn-MTP شامل *MTP8*، *MTP9* و *MTP11* بوده که دارای بیش از یک نسخه همولوگ هستند که چنین نتایج مشابه در بررسی خانواده *MTP* در سایر گیاهان مانند انگور و پرتقال نیز گزارش شده است (Fu and Menzies, 2017; Shirazi et al., 2019). البته تعداد زیاد نسخه‌های ارتولوگ *MTP8* در خیار، جو و برنج هم گزارش

شده است (Fu et al., 2017; Migocka et al., 2015; Ricachenevsky et al., 2013). وجود نسخه‌های متعدد از یک ژن با عملکرد یکسان در ژنوم به دلیل نیاز بالای گیاه به عملکرد و محصول اختصاصی آن ژن و یا بیان متفاوت اعضای خانواده در مراحل مختلف رشد و نمو و تنش‌های مختلف است (Dandekar et al., 1998; He and Zhang, 2005).

نتایج به دست آمده از فشار گزینش بیانگر این است که رویداد مضاعف‌شدگی ژن در طول تکامل خانواده ژنی و ایجاد اعضای متفاوت ژنی در گونه‌های مختلف به وقوع پیوسته است. همچنین با توجه به تعداد اعضای خانواده ژنی در گونه‌های مختلف گیاهی و در مقایسه با اندازه ژنومی، رابطه معنی‌داری بین اندازه ژنوم و تعداد اعضای خانواده ژنی مشاهده نشد. مضاعف‌شدگی ژن، از سازوکارهای اولیه در جهت گسترش اعضای خانواده ژنی است که شانس دستیابی به عملکرد جدید، توسعه خانواده ژنی و در نهایت سازگاری بیشتر گیاه را موجب می‌شود (Kong et al., 2007). صنوبر نسبت به سایر گیاهان ذکر شده دارای تعداد بیشتری از اعضای خانواده MTP است که همین موضوع می‌تواند منجر به نقش این دو گونه در پالایش خاک از فلزات باشد که با رشد بیشتر و تولید مقدار بیشتری چوب و جذب و پالایش فلزات همراه است (Rad et al., 2010). مضاعف‌شدگی پشت سرهم و پراکنده منجر به ایجاد اعضای خانواده ژنی شده و تعداد تکرارهای اعضای خانواده ژنی MTP وابسته به پدیده مضاعف‌شدگی و وابسته به تکامل گیاه است (Hittinger and Carroll, 2007). بنابراین رابطه بین تکامل خانواده ژنی MTP در گونه‌های مختلف گیاهی نیاز به مطالعه بیشتری دارد (Gao et al., 2009; Gao et al., 2020). در بررسی فشار گزینش تمامی ژن‌ها، شامل نوع انتخاب منفی بودند که بیانگر این موضوع است که اعضای این خانواده ژنی بر اثر جانشینی یا واگرایی در ساختار ژنی (اگزون-اینترون) ایجاد شده‌اند (Xu et al., 2012).

بررسی ساختار ژنی برای مطالعه تاریخچه تکاملی پدیده مضاعف‌شدگی ژنها و رابطه فیلوژنتیکی استفاده می‌شود (Yu

در بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی توالی پروتئینی اعضای خانواده MTP، دارای ۴-۶ دمین فراغشایی بودند و بیشترین تعداد دمین فراغشایی نیز در MTP12 مشاهده شد. وجود دمین فراغشایی تأییدکننده نقش این خانواده در انتقال فلزات از طریق سیستم غشایی است. در سایر گیاهان نیز بیشترین تعداد دمین فراغشایی در MTP12 مشاهده شده و بیشتر اعضاء دارای ۴-۶ دمین گزارش شده است (Lu and Fu, 2007). موقعیت درون سلولی پروتئین‌های MTP در اندامک واکوئل شناسایی شد که مشابه با سایر گیاهان و در ارتباط با نقش این خانواده در انتقال فلزات به درون واکوئل است و سم‌زدایی گیاه از تأثیر منفی فلزات سنگین می‌باشد (Singh et al., 2011). در بررسی موتیف‌های حفاظت شده اعضای خانواده ژنی، توزیع موتیف‌ها در اعضای گروه Mn-MTP همگن‌تر بود که تأییدکننده نتایج ساختار ژنی و درخت فیلوژنتیکی است. وجود دمین‌های حفاظت شده مختلف در توالی پروتئین با عملکردهای متنوع در پروتئین ارتباط دارد. تمامی اعضای خانواده Mn-MTP دارای دمین Zn transporter بودند که نقش این موتیف در انتقال فلزات به واکوئل تأیید شده است (Migocka et al., 2015). از سویی نتایج حکایت از این است که اعضای گروه Mn-MTP در انتقال بیش از یک نوع سوبسترا نقش دارد. همانگونه که در

متابولیسم و فرایندهای مرتبط با رشد و نمو گیاه، انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی توسط miRNA قابل تنظیم هستند (Gielen et al., 2012; Lv et al., 2012).

بررسی بیان ژنهای خانواده MTP به‌روش *in silico* به‌طورکلی، نقش ژنهای *MTP3*، *MTP7*، *MTP11*، *MTP1* و *MTP9* در گیاهان تحت تنش‌های شوری، فشار اسمزی و خشکی بررسی و افزایش بیان آنها مشاهده شده است. خشکی و شوری دو تنش مهم در سراسر جهان هستند که از مهمترین عوامل محدودکننده تولید محصول هستند. واکنش گیاهان مختلف به خشکی و شوری اغلب مشابه است (Ahmad, 2016). از سویی، سمیت با فلزات سنگین می‌تواند پاسخ‌های مشابه به شوری ایجاد کند، زیرا شوری باعث تنش و تولید بیش از حد یون‌ها در گیاهان می‌شود و عملکرد را کاهش می‌دهد (Chinnusamy et al., 2005; Li et al., 2010). بیان ژنهای *MTP* در برگ، ساقه و ریشه در یونجه یکساله تنش پنج فلز سنگین دو ظرفیتی کادمیوم، کبالت، روی و آهن مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که ژنهای *MtMTP1.1*، *MtMTP1.2* و *MtMTP4* بالاترین میزان بیان را در بیشتر غلظت‌های مورد بررسی نشان دادند (El-Sappah et al., 2021). در مطالعه بررسی بیان ارتولوگ *MTP* در گوجه‌فرنگی، بعد از تیماردهی با فلزات کادمیوم، کبالت، روی و آهن، ژنهای *SIMTP* پاسخ‌های متفاوتی در برگ و ریشه گیاه نشان دادند. در مجموع بالاترین پاسخ‌های بیانی را در بیشتر غلظت‌ها و تیمار فلزات در ژنهای *SIMTP1*، *SIMTP3*، *SIMTP4*، *SIMTP8*، *SIMTP10* و *SIMTP11* مشاهده شد (El-Sappah et al., 2021). نقش مهم خانواده ژنی *MTP* در افزایش تحمل گیاهان مختلف تحت تیمار فلزات روی، نیکل، کبالت، کادمیوم، آهن و منگنز تأیید شده است (Gao et al., 2020; Montanini et al., 2007). محصولات این خانواده ژنی انتقال جریان فلزات از سیتوپلاسم را تسهیل کرده و عمدتاً فلزات کاتیون دوظرفیتی را به داخل اندامک‌ها منتقل می‌کنند (Ricachenevsky et al., 2013). نتایج بدست آمده از این پروژه نیز نقش مهم و

بررسی هستی‌شناسی ژنهای *MTP* مشخص شد، این ژن‌ها در فرایند انتقال فلزاتی مانند کادمیوم، روی و غیره نقش دارند و از اجزای مهم غشای واکوئلی هستند. نتایج هستی‌شناسی با نتایج بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ژن‌ها که مکان درون سلولی را در واکوئل پیش‌بینی کرده، همخوانی دارد. دلیل وجود پروتئین رمزکننده این ژن‌ها در غشا واکوئلی، بدلیل وجود دمین فراغشایی است که از این طریق فلزات جذب‌شده در سیتوپلاسم سلولی را از فضای سلولی به داخل واکوئل منتقل کرده و منجر به سم‌زدایی از تأثیر فلزات سنگین در گیاه می‌شود.

شناسایی SSR و MicroRNA در ژنهای MTP

نشانگرهای SSR توالی‌های تکراری ساده از موتیف‌های نوکلئوتیدی است که نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند (Haas and Payseur, 2012). در بیشتر گیاهان تک‌لپه، SSR غالب شامل موتیف‌های CCG / CGG / CGC / GCG / GCC / GG شامل موتیف‌های AAT / ATT / ATA / TAT / TAA / TTA می‌باشند. نوع غالب SSR وابسته به تاکسون گیاه است (Qin et al., 2015). نتایج بدست‌آمده از نشانگر SSR موجود در توالی ژن‌ها می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی ارقام دارای چندشکلی ژنتیکی در صنوبر و ارتباط آنها در تحمل به تنش و شناسایی ارقام مقاوم‌تر به‌روش انتخاب به کمک نشانگر استفاده شود.

در بررسی شناسایی miRNA که اعضای خانواده ژنی *MTP* را در صنوبر هدف قرار می‌دهند، بیشتر ژن‌ها را بیش از یک miRNA تنظیم می‌کند. miRNA توالی ۱۹-۲۴ جفت‌باز نوع RNA کوچک غیر کدشونده هستند و نقش اساسی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های محیطی از طریق ایجاد تغییرات پس از رونویسی، روی ژن‌ها دارند (Wang et al., 2017). MiRNA عملکرد تنظیمی خود را با هدف قرار دادن mRNA خاص در جهت تخریب mRNA و سرکوب بیان ژن مورد نظر انجام می‌دهد (Bartel, 2004; Carrington and Ambros, 2003). بسیاری از مسیرهای

عملکردی و موقعیت درون سلولی تجزیه و تحلیل شدند. خواص این ژن‌ها، از جمله روابط تکاملی، الگوهای بیان ژن، ساختار ژن، نشانگر SSR و هستی‌شناسی با استفاده از ابزار مختلف بیوانفورماتیک بررسی شد. نتایج بیانگر این است که شناخت دقیق در مورد نقش ژن‌های *MTP* می‌تواند در تعیین خصوصیات عملکردی آنها مفید باشد. همچنین، انتخاب مبتنی بر نشانگر SSR یا داده‌های بیان ژن می‌تواند در انتخاب جمعیت‌های با مقاومت بالا در برابر فلزات سنگین کمک‌کننده باشد.

کلیدی خانواده ژنی *MTP* را در پاسخ به تنش فلزات سنگین مشخص کرد و ژن‌های *MTP* بیان شده در بالاترین سطح بیان را می‌توان به عنوان نشانگرهای زیست محیطی برای پیش‌بینی آلودگی فلزات سنگین براساس سطوح بیان استفاده کرد (El-Sappah *et al.*, 2021).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ۲۶ ژن *PeMTP* از جنبه‌های بیولوژیکی،

پیوست

جدول پیوست - شماره دسترسی توالی‌های *MTP* شناسایی شده در پده

Attached Table - Accession numbers of *MTP* sequences identified in *Euphrates poplar*

Row	Gene	Accession number	Row	Gene	Accession number
1	<i>PeMTP4.3</i>	XP_011032230.1	14	<i>PeMTP9.2</i>	XP_011014000.1
2	<i>PeMTP4.1</i>	XP_011035249.1	15	<i>PeMTP9.1</i>	XP_011014010.1
3	<i>PeMTP4.2</i>	XP_011032233.1	16	<i>PeMTP9.5</i>	XP_011014022.1
4	<i>PeMTP1.2</i>	XP_011039401.1	17	<i>PeMTP9.4</i>	XP_011014035.1
5	<i>PeMTP1.1</i>	XP_011039394.1	18	<i>PeMTP11.3</i>	XP_011016554.1
6	<i>PeMTP1.3</i>	XP_011025363.1	19	<i>PeMTP11.1</i>	XP_011021606.1
7	<i>PeMTP3.2</i>	XP_011038014.1	20	<i>PeMTP8.1</i>	XP_011025190.1
8	<i>PeMTP3.1</i>	XP_011040614.1	21	<i>PeMTP11.2</i>	XP_011027107.1
9	<i>PeMTP12</i>	XP_011043155.1	22	<i>PeMTP9.3</i>	XP_011027837.1
10	<i>PeMTP5</i>	XP_011033203.1	23	<i>PeMTP8.3</i>	XP_011037970.1
11	<i>PeMTP6.2</i>	XP_011009533.1	24	<i>PeMTP8.4</i>	XP_011037971.1
12	<i>PeMTP6.1</i>	XP_011013736.1	25	<i>PeMTP8.2</i>	XP_011037972.1
13	<i>PeMTP6.3</i>	XP_011009534.1	26	<i>PeMTP7</i>	XP_011046526.1

References

- Ahmad, P., 2016. Water stress and crop plants: a sustainable approach. John Wiley & Sons.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. and Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl_2): W202-W208.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2): 281-297.
- Carrington, J.C. and Ambros, V., 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301(5631): 336-338.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2): 437-448.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. and Krämer, U., 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, 7(7): 309-315.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M. and Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674-3676.
- Dandekar, T., Snel, B., Huynen, M. and Bork, P., 1998. Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends in biochemical sciences*, 23(9): 324-328.
- Draghici, S., Khatri, P., Tarca, A.L., Amin, K., Done, A., Voichita, C., Georgescu, C. and Romero, R., 2007. A systems biology approach for pathway level analysis. *Genome Research*, 17(10): 1537-1545.
- El-Sappah, A.H., Elrys, A.S., Desoky, E.S.M., Zhao, X., Bingwen, W., El-Sappah, H.H., Zhu, Y., Zhou, W., Zhao, X. and Li, J., 2021. Comprehensive

- genome-wide identification and expression analysis of MTP gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) under multiple heavy metal stress. *Saudi journal of biological sciences*, 28(12): 6946-6956.
- Etemadi, E., Fayyaz, P. and Zolfaghari, R., 2016. Insights into some physiological and biochemical responses of *Populus alba* and *Populus nigra* to lead contamination. *Iranian Journal of Plant Biology*, 8(30): 1-14.
 - Firouzan, A.H., Zargham inanlu, M. and Hashemi, S.A., 2016. Zinc absorption in two-year-old poplar seedlings (*Populus deltoids*) in the environment. *Health in the field*, 4(1):12-25.
 - Fu, W. and Menzies, T., 2017. Easy over hard: A case study on deep learning, *Proceedings of the 2017 11th joint meeting on foundations of software engineering*, pp. 49-60.
 - Fu, X.Z., Tong, Y.H., Zhou, X., Ling, L.L., Chun, C.P., Cao, L., Zeng, M. and Peng, L.Z., 2017. Genome-wide identification of sweet orange (*Citrus sinensis*) metal tolerance proteins and analysis of their expression patterns under zinc, manganese, copper, and cadmium toxicity. *Gene*, 629: 1-8.
 - Gao, J., Agrawal, G.K., Thelen, J.J. and Xu, D., 2009. P3DB: a plant protein phosphorylation database. *Nucleic acids research*, 37 (suppl_1): D960-D962.
 - Gao, Y., Yang, F., Liu, J., Xie, W., Zhang, L., Chen, Z., Peng, Z., Ou, Y. and 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.
 - Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.E., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*: 571-607.
 - Gielen, H., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., 2012. MicroRNAs in metal stress: specific roles or secondary responses? *International journal of molecular sciences*, 13(12): 15826-15847.
 - Gustin, J.L., Zanis, M.J. and Salt, D.E., 2011. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1): 1-13.
 - Haasl, R.J. and Payseur, B.A., 2012. Microsatellites as targets of natural selection. *Molecular biology and evolution*, 30(2): 285-298.
 - Hall, J.A., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366): 1-11.
 - He, X. and Zhang, J., 2005. Rapid subfunctionalization is accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics*, 169(2): 1157-1164.
 - Hittinger, C.T. and Carroll, S.B., 2007. Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature*, 449(7163): 677-681.
 - Hu, B., Jin, J., Guo, A.Y., Zhang, H., Luo, J. and Gao, G., 2015. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8): 1296-1297.
 - Kong, H., Landherr, L.L., Frohlich, M.W., Leebens-Mack, J., Ma, H. and DePamphilis, C.W., 2007. Patterns of gene duplication in the plant SKP1 gene family in angiosperms: evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth. *The Plant Journal*, 50(5): 873-885.
 - Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3): 567-580.
 - Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. and Thompson, J.D., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
 - Letunic, I., Doerks, T. and Bork, P., 2012. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*, 40(D1): D302-D305.
 - Li, Q., Cai, S., Mo, C., Chu, B., Peng, L. and Yang, F., 2010. Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in saline soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(1): 84-88.
 - Lu, M. and Fu, D., 2007. Structure of the zinc transporter YiiP. *Science*, 317(5845): 1746-1748.
 - Lv, S., Nie, X., Wang, L., Du, X., Biradar, S.S., Jia, X. and Weining, S., 2012. Identification and characterization of microRNAs from barley (*Hordeum vulgare* L.) by high-throughput sequencing. *International Journal Molecular Sciences*, 13(3): 2973-2984.
 - Memon, A.R. and Schröder, P., 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(2): 162-175.
 - Migocka, M., Papierniak, A., Kosieradzka, A., Posyniak, E., Maciaszczyk- Dziubinska, E., Biskup, R., Garbiec, A. and 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.
 - Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D. and 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.
- Qin, Z., Wang, Y., Wang, Q., Li, A., Hou, F. and Zhang, L., 2015. Evolution analysis of simple sequence repeats in plant genome. *PLoS One*, 10(12): e0144108.
 - Rad, M., Sardabi, H., Soltani, M. and Ghelmani, S., 2010. Comparison of different eucalypt species and provenances in respect to their vegetative growth, irrigated by wastewater of Yazd City of Iran, Proceedings of Second Seminar on: the Position of Water Reuse and Effluents on Water Resources Management: Applications in Agriculture and Landscape Irrigation, pp. 105-106.
 - Ricachenevsky, F.K., Menguer, P.K., Sperotto, R.A., Williams, L.E. and 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.
 - Shirazi, Z., Abedi, A., Kordrostami, M., Burritt, D.J. and 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.
 - Singh, R.K., Anandhan, S., Singh, S., Patade, V.Y., Ahmed, Z. and Pande, V., 2011. Metallothionein-like gene from *Cicer microphyllum* is regulated by multiple abiotic stresses. *Protoplasma*, 248(4): 839-847.
 - Sukla, C., Pramanik, A. and Maiti, G., 2011. Taxonomic account of the Indian *Populus* L.(Salicaceae Mirb.) with special emphasis on their distribution and identification. *Indian Forester*, 137(7): 872-876.
 - Suyama, M., Torrents, D. and Bork, P., 2006. PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2): W609-W612.
 - Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10): 2731-2739.
 - Vatansever, D., Menon, D.K. and Stamatakis, E.A., 2017a. Default mode contributions to automated information processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(48): 12821-12826.
 - Vatansever, R., Filiz, E. and Eroglu, S., 2017b. Genome-wide exploration of metal tolerance protein (MTP) genes in common wheat (*Triticum aestivum*): insights into metal homeostasis and biofortification. *Biometals*, 30(2): 217-235.
 - Wang, Z., Qiao, Y., Zhang, J., Shi, W. and Zhang, J., 2017. Genome-wide identification of microRNAs involved in fatty acid and lipid metabolism of *Brassica napus* by small RNA and degradome sequencing. *Gene*, 619: 61-70.
 - Xu, G., Guo, C., Shan, H. and Kong, H., 2012. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4): 1187-1192.
 - Yu, L.J., Luo, Y.F., Liao, B., Xie, L.J., Chen, L., Xiao, S., Li, J.T., Hu, S.N. and Shu, W.S., 2012. Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 195(1): 97-112.
 - Yu, Q., Hu, S., Du, J., Yang, Y. and Sun, X., 2020. Genome-wide identification and characterization of the lateral organ boundaries domain gene family in *Brassica rapa* var. *rapa*. *Plant diversity*, 42(1): 52-60.
 - Zang, L., Zheng, T., Chu, Y., Ding, C., Zhang, W., Huang, Q. and Su, X., 2015. Genome-wide analysis of the fasciclin-like arabinogalactan protein gene family reveals differential expression patterns, localization, and salt stress response in *Populus*. *Frontiers in plant science*, 6: 1140.
 - Zhang, Y., Gao, M., Singer, S.D., Fei, Z., Wang, H. and Wang, X., 2012. Genome-wide identification and analysis of the TIFY gene family in grapes. *PLoS ONE*, 7(9): 0044465.