

植物基因工程修复土壤重金属污染研究进展

杨茹月^{1,2}, 李彤彤², 杨天华¹, 李艳平², 刘慧², 王雷^{1*}, 吕宁馨^{2*}

1.沈阳航空航天大学能源与环境学院, 辽宁省清洁能源重点实验室, 辽宁 沈阳 110136

2.中国环境科学研究院, 北京 100012

摘要: 土壤重金属污染植物修复技术应用广泛,但超富集植物的寻找耗时费力,现存超富集植物通常生长缓慢、生物量低、地域限制较大,导致植物修复效果不能达到预期. 基因工程在植物修复中的应用,为提高植物修复土壤重金属污染的效率提供了新的思路. 通过综述基因工程强化植物修复土壤重金属污染的研究进展,着重关注植物修复关于重金属转运、储存、解毒过程的调控过程,主要包括: ①控制植物体内重金属由胞外运移至胞内的关键基因,主要有锌铁调控蛋白、黄色条纹样蛋白、天然抗性相关巨噬细胞蛋白,作为载体参与重金属在植物体内的不同组织的转运. ②改变重金属在细胞内储存位置、提高植物耐受能力的关键基因,主要调控 ATP 结合盒转运器、阳离子扩散促进器和 P_{1B}型 ATPases,通过增强植物对重金属的区隔化能力来实现储存功能. ③降低重金属对植物毒害作用的关键基因,主要调控植物体内植物络合素、金属硫蛋白的大量合成,并络合重金属形成螯合物. 根据植物基因对重金属超耐性和超富集的作用机制,建议后续研究可利用基因工程向目标植物导入相关功能基因,使其在目标植物中高效表达,并在实际环境中进行植物生长测试应答机制,最终更好地调控植物体内重金属含量平衡关系,以克服超富集植物与环境适配性差的缺陷.

关键词: 土壤; 重金属; 植物修复; 超富集植物; 基因工程

中图分类号: X53 文章编号: 1001-6929(2019)08-1294-10

文献标志码: A DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2019.03.19

Advances in Enhanced Phytoremediation by Genetic Engineering Technology for Heavy Metal Pollution in Soil

YANG Ruyue^{1,2}, LI Tongtong², YANG Tianhua¹, LI Yanping², LIU Hui², WANG Lei^{1*}, LÜ Ningqing^{2*}

1.Key Laboratory of Clean Energy of Liaoning, College of Energy and Environment, Shenyang Aerospace University, Shenyang 110136, China

2.Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Abstract: Phytoremediation technology is widely used for heavy metal pollution control in soil. However, slow growth rate, relatively low biomass and regional type of plants often limit the extensive application of these existing hyperaccumulators, searching better hyperaccumulators to complete the remediation is time-consuming and laborious. The application of genetic engineering in phytoremediation provides new idea for improving the phytoremediation efficiency. In this paper, the enhancement of phytoremediation for heavy metal contamination in soil by genetic engineering are reviewed. Moreover, the regulation genes for phytoremediation process are emphatically introduced, which includes: (1) The key genes, controlling the migration of heavy metals from the extracellular to the intracellular, are often related to zinc-iron regulatory proteins, yellow stripe-like proteins, and natural-resistance-associated macrophage protein. They participate as carriers during the translocation and the uptake process of heavy metals in different tissues of plants. (2) The key genes, changing the location of heavy metals in cells, often regulate ATP-binding cassette transporter, cation diffusion facilitator family and P_{1B} type ATPase. They could improve the segregation ability of plants to heavy metals by controlling the intracellular transport of heavy metals. (3) The key genes related to phytochelatins and metallothionein, which reduce the toxicity to plants by forming stable chelates with heavy metals. All the regulation gene mentioned above reveal the entire process of heavy metal hypertolerance and hyperaccumulation characteristics. Hence it is suggested that reverse transcription used to improve expression of functional genes in the target plants might be

收稿日期: 2018-12-06 修订日期: 2019-03-08

作者简介: 杨茹月(1994-),女,河北秦皇岛人,15731362847m@sina.cn.

* 责任作者: ①王雷(1986-),男,黑龙江大庆人,工程师,博士,主要从事环境污染控制研究, wanglei01@craes.org.cn; ②吕宁馨(1986-),男,山西忻州人,助理研究员,硕士,主要从事环境污染控制研究, lvnq@craes.org.cn

基金项目: 国家科技重大专项项目(No.2016ZX05040001-003); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项(No.201409030)

Supported by National Science and Technology Major Project of China (No.2016ZX05040001-003); Fundamental Research Funds for Central Public Welfare Scientific Research Institutes of China (No.201409030)

better in the future, which is enable plants to grow in the natural environment. This method would regulate the balance of heavy metal content in plants, so as to overcome the shortcomings of poor environmental adaptability of hyperaccumulators.

Keywords: soil; heavy metals; phytoremediation; hyperaccumulator; genetic engineering

随着我国工业化、城市化进程的不断推进,在矿产开发、电镀冶炼、污水灌溉、农业施肥等过程中存在管理制度不完善的问题,导致土壤重金属污染严重^[1]. 据统计,目前我国耕地面积约 1×10^8 hm², 重金属污染的耕地面积约 2×10^7 hm², 受重金属污染的粮食达 1.2×10^7 t, 经济损失高达 2×10^{10} 元^[2]. 儿童“血铅”超标,“镉米”事件无时无刻不在向人类敲响警钟,重金属污染对人类的生产生活产生了巨大影响,关于土壤重金属污染修复的研究成为当今重点.“十三五”规划以来,我国加大了对土壤修复的力度,原环境保护部组织编制了《重金属及有毒有害化学物质污染防治“十三五”规划纲要(征求意见稿)》,为保障人类的身体健康,急需研发经济、高效、实用的土壤重金属修复技术^[3].

目前常见的土壤重金属污染修复技术主要包括物理修复、化学修复、生物修复,生物修复中的植物修复因技术成本低、操作简便、应用范围广、无二次污染以及可以回收植物体中重金属等优点^[4],被学术界以及各国和地区的环境保护部门广泛接受. 近年来,美国、法国等均在植物修复方面的研究投入了大量资金,随着经济的快速发展,植物修复的应用前景将会越来越广泛^[5]. 植物修复技术的关键是超富集植物的筛选,但因其过程耗时费力、获得的植株矮小、环境适配性差等缺点,严重阻碍了植物修复在土壤重金属污染修复中的应用^[6]. 有研究^[7-8]指出,在烟草中加入 MTs 基因 *CUPI*,可以有效促进烟草对 Cu 的吸收和富集,提高植物对土壤重金属污染的修复效率;引入对 Hg 富集有益的基因,不仅可以有效提高植物对 Hg 的富集量和富集速度,而且还可以提高植物对 Hg 的耐性,进而提高植物对重金属土壤的修复能力.

转录组测序可以克服传统分析检测方法中的缺点,提高分析检测的速度和结果的准确度、完整性,目前已广泛应用于生物基因结构的分析工作中,利用转录组测序寻找控制植物超富集和超耐性的关键基因. Grichko 等^[9]将细菌中的 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶基因导入番茄中,发现转基因番茄对 Cd、Co、Cu、Ni、Pb、Zn 的耐性都有不同程度的提高,同时在各组织中的富集量也得到了提高. Pilon 等^[10]将老鼠的 *se-cys* 裂解酶基因导入拟南芥中,转基因拟南芥地上

部的硒含量是野生型的 1.5 倍. 以上试验说明,在植物修复过程中利用基因工程技术突破了物种之间的界限,将某些异源(来源于植物、细菌或动物等)目的基因转移到目标植物体内并充分表达^[11],可有效提高植物对重金属的耐性和富集能力,针对土壤重金属污染获得更高效的修复植物. 因此,利用基因工程强化植物修复土壤重金属污染成为广大学者当今研究的重点和热点,具有广阔的发展潜力. 该文针对土壤重金属污染问题,主要介绍植物修复技术关于重金属转运、储存、解毒过程主要调控基因的研究进展,同时对未来的研究方向进行展望,以期基因工程培育高效修复植物以及提高植物修复土壤重金属污染效率提供参考.

1 调控重金属向细胞内转运能力的主要基因

植物体内重金属的转运行为主要与重金属吸收蛋白相关,该蛋白主要位于细胞质膜上,主要作用是将细胞质以外的重金属运输到细胞质. 近年来,随着转录组测序技术的发展,许多金属转运蛋白基因被鉴定,主要有锌铁调控蛋白(zinc-iron regulatory proteins, ZIP 家族蛋白)、黄色条纹样蛋白(yellowstripe-like, YSL 家族蛋白)、天然抗性相关巨噬细胞蛋白(natural-resistance-associated macrophage protein, Nramp 家族蛋白)等.

1.1 锌铁调控蛋白(ZIP 家族)

ZIP 家族是 Zn 转运蛋白家族(ZRT)和 Fe 转运蛋白家族(IRT)的合称(见表 1),主要用于重金属从胞外到胞内的运输^[27]. 其中,HvZIP5 蛋白(ZRT 家族一员)是 Zn 的转运体,在大麦缺乏 Zn 元素时参与大麦根部 Zn 的平衡;而 IRT 是 Fe²⁺的转运蛋白,作用原理是诱导根际释放 H⁺酸化土壤从而增强 Fe³⁺的可溶性,而后通过铁氧化还原酶(FRO)将 Fe³⁺还原成 Fe²⁺,在植物缺 Fe 情况下 IRT1 将 Fe²⁺转运至细胞内,IRT 的转运功能仅针对双子叶植物和非禾本科单子叶植物. 目前在拟南芥、水稻、苜蓿、番茄和大豆等植物中发现了 100 多个 ZIP 家族基因,现已克隆了 6 个植物 ZIP 家族基因铁载体基因,其中有 2 个来源于拟南芥基因 *IRT1*、*IRT2*,2 个来源于番茄铁载体基因 *LeIRT1* 和 *LeIRT2*^[28],1 个来源于水稻铁载体基因 *OsIRT1*^[29],1 个来源于豌豆铁载体基因 *PsRITI*^[30],有关玉米、大豆、大麦等农作物中 Zn 转运蛋白基因的鉴定与克隆还处于起步阶段.

表 1 ZIP 家族基因在不同植物中的表达情况

Table 1 Expression of ZIP family genes in different plants

植物种类	ZIP 家族基因	胁迫条件	部位	功能	数据来源
水稻	<i>OsZIP1</i>	缺 Zn	根	转运 Zn	文献[12-13]
	<i>OsZIP4</i>	缺 Zn	根/地上部	转运 Zn	文献[14-16]
	<i>OsZIP6</i>	缺 Zn、Fe、Mn	根/地上部	Zn 向地上部转运	文献[16]
	<i>OsIRT1</i>	缺 Fe	根/茎	吸收和转运 Fe、Zn、Cd	文献[17-18]
	<i>OsIRT2</i>	缺 Fe	根	吸收 Fe、Cd 转运 Cd	文献[19]
拟南芥	<i>AtZIP1</i>	缺 Zn	根/茎	Zn 地上部运输	文献[20]
	<i>AtZIP2</i>	缺 Zn	根	Zn 地上部运输	文献[20]
		缺 Cu	根	转运 Cu	文献[21]
	<i>AtZIP3</i>	缺 Zn	根/茎	转运 Zn	文献[22-23]
	<i>AtZIP4</i>	缺 Zn	根/地上部	转运 Zn	文献[24]
	<i>AtZIP5</i>	缺 Cu	根	转运 Cu	文献[25]
		缺 Zn	根/地上部	转运 Zn	文献[20]
	<i>AtZIP9</i>	缺 Zn	根/地上部	转运 Zn	文献[22]
	<i>AtIRT1</i>	缺 Fe	根	转运 Fe	文献[25]
	<i>AtIRT2</i>	缺 Fe	根	转运 Fe	文献[26]

通常地, ZIP 家族蛋白转运对象具有专一性, 主要针对 Zn、Fe 两种元素. 但近期研究表明, ZIP 家族蛋白对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 也具备较好的转运效果, 如位于大麦根部细胞膜上的 HvIRT1 蛋白有利于 Mn^{2+} 的吸收和转运^[31]; OsIRT1、OsIRT2 蛋白不仅能转运 Zn^{2+} 还能转运 Cd^{2+} , 且 OsIRT1 转运能力远高于 OsIRT2^[32]. 研究发现, 当植物缺失不同元素时, 表达基因的种类和部位都有所不同, 处于缺 Cu^{2+} 情况下, *AtZIP2* 和 *AtZIP5* 基因在根部过量表达; 缺 Zn^{2+} 时, *OsZIP5* 基因在根部和地上部表达量升高, 缺 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 时该基因只在根中过量表达^[33], 说明 ZIP 蛋白家族参与了多种重金属在植物不同组织的转运. 此外, 该家族基因参与重金属在植物体内的再分配^[34], 因此重金属含量过高或过低时, 基因的表达情况又有所不同. 通过对拟南芥的研究发现, 当 Zn^{2+} 含量较少或者缺乏时, *AtZIP1* ~ *AtZIP4* 和 *AtIRT1* ~ *AtIRT3* 基因会过量表达^[35], Zn^{2+} 充足或者过量时, *AtZIP1* ~ *AtZIP5*、*AtZIP9* ~ *AtZIP12* 和 *AtIRT3* 基因表达量会增加^[36].

ZIP 家族蛋白的独特性质影响着 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 等重金属离子在植物体内的运移与分布, 尤其对于水稻这种重要的农作物, 是否会增加有毒重金属在籽粒中累积的研究还需要进一步明确. 为了更好地研究 ZIP 家族基因, 还需要进一步了解各成员的特异性以及它们之间的关联性, 寻找 ZIP 家族基因在不同重金属浓

度处理下各组织中的表达和分配规律, 筛选出有利于提高作物中 Zn 含量、降低有毒重金属含量平衡关系的控制基因, 以提升植物修复重金属累积能力、降低农作物重金属毒性.

1.2 黄色条纹蛋白(YSL 家族)

YSL 家族蛋白属于重金属的吸收蛋白, 主要位于质膜上, 少数位于细胞器膜上. 该基因最早在玉米根部发现, 作为载体参与 Fe-PC 螯合物的运输, 为作物提供生长必需的 Fe 元素. YSL 家族蛋白的作用原理是, 在缺 Fe 环境中, 植物体内合成大量麦根酸(MAs) 类物质并分泌至根部, 麦根酸类物质与 Fe^{3+} 螯合形成络合物, 最终 YSL 家族蛋白将络合物转运至细胞内, 该功能只能在禾本科植物中实现. 研究发现, 在缺 Fe 条件下, 水稻 *OsYSL2*、*OsYSL6*、*OsYSL8*、*OsYSL9*、*OsYSL13*、*OsYSL15*、*OsYSL16*、*OsYSL18* 等基因表达水平上调, 增强了植物对 Fe^{2+} 或 Fe^{3+} 的吸收和转运能力^[37-39]. 目前, 已经发现了许多 YSL 家族蛋白成员在不同植物体内、不同组织间转运重金属的情况(见表 2).

如今随着 YSL 家族基因成员相继被发现, 研究者逐渐意识到 YSL 家族基因不仅参与 Fe-PC 的转运, 还可以转移其他重金属螯合物(Cu、Ni、Zn 等). 有研究者对 *ysl1*、*ysl3* 突变体以及 *ysl1* 和 *ysl3* 双突变体突变植物研究发现, *ysl1* 或 *ysl3* 突变体植株表型没有显著改变, 但是 *ysl1* 和 *ysl3* 双突变体的叶片中 Fe

表2 YSL 家族基因在不同植物中的表达情况
Table 2 Expression of YSL family genes in different plants

植物种类	YSL 家族基因	胁迫条件	部位	功能	数据来源
拟南芥	<i>AtYSL2</i>	缺 Fe	地上部	转运 Fe	文献[40]
		缺 Fe 高 Cu	根/地上部	转运 Fe、Cu	文献[41]
		缺 Fe 缺 Zn	根/地上部	转运 Fe、Zn	文献[42]
	<i>OsYSL6</i>	缺 Fe	叶	转运 Fe、Mn	文献[43]
	<i>OsYSL12</i>	缺 Zn	根/茎	转运 Zn	文献[41-42]
	<i>OsYSL2</i>	缺 Fe	叶	转运 Fe、Mn	文献[43]
水稻	<i>OsYSL6</i>	正常	根/地上部	转运 Mn	文献[44]
	<i>OsYSL15</i>	缺 Fe	根/地上部	转运 Fe	文献[45-46]
	<i>OsYSL16</i>	缺 Fe	根	转运 Fe	文献[47]
		缺 Fe 缺 Zn	根	转运 Cu	文献[48]
	<i>OsYSL18</i>	正常条件	花	转运 Fe	文献[49]
		缺 Fe	根	转运 Fe	文献[50]
玉米	<i>ZmYSL</i>	缺 Fe	根/地上部	转运 Fe、Zn、Cu、Ni、Mn、Cd	文献[51-53]

的含量明显下降,而 Mn、Zn、Cu 的含量显著提高,种子中 Fe、Zn 和 Cu 的含量却降低^[54],表明 *AtYSL1* 和 *AtYSL3* 蛋白的协同作用与植物体内多种重金属在不同组织之间的运输有关. 另有研究^[55-56]发现, YSL 家族基因还参与了植物体内重金属的稳态平衡,如在缺 Fe 条件下,拟南芥 *AtYSL1* ~ *AtYSL3* 基因过量表达,此时植物对 Fe 的吸收和转运能力有一定提高;在高 Fe 条件下, *AtYSL4* 和 *AtYSL6* 基因表达水平上调,植物对重金属的耐性有显著改善. 以上研究说明, YSL 家族基因不仅调控植物体内多种重金属在不同组织的转运,同时还参与了重金属在植物体内不同组织的分配过程,有利于植物对重金属的吸收与转运,可以有效提高植物对重金属的吸收效率.

近年来, YSL 家族基因在调控重金属在植物体内转运以及维持重金属在植物体内平衡的研究已经取得了一定进展,但是研究还仅停留在亚细胞定位、基因表达模式等初步阶段,有关家族成员克隆鉴定的研究还鲜见报道,各成员之间协同以及对重金属的调配机制尚不明确,因此对于该基因的深入研究任重而道远.

1.3 天然抗性相关巨噬细胞蛋白(Nramp 家族)

Nramp 家族蛋白是一个膜整合蛋白家族,同样位于细胞膜上,与重金属的转运密切相关. Super 等^[57]提出了一种作用机理模型,即细胞内吞细菌形成内吞小体,随后细胞产生活性氧和/或氮的中间产物(NO^{2-} 、 NO^{3-} 等)以杀死细菌,此时细菌会以 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 或其他金属离子为辅助因子,合成自身的活性氧清除系统来去除活性氧而得以生存. *Nramp1* 基因则

通过将这些金属离子运出内吞小体使细菌无法合成防御酶系,再利用活性氧杀死细菌,使细胞抗菌. Super 等^[57]的研究开辟了 Nramp 家族基因转运金属离子的研究,后来陆续在酵母、果蝇、人类和植物体内发现该家族基因,为植物修复土壤中重金属的研究提供了新的思路. 目前,已经有学者在西红柿、卷心菜、菜豆、小麦、玉米以及一些杂草中发现了 Nramp 家族基因,发现 *OsNramp1* 基因主要在根中表达, *OsNramp2* 基因主要在叶中表达, *OsNramp3* 基因在两种组织中都会表达^[58], Nramp 家族基因在植物不同组织中的表达正说明它们在调控以及在特定环境中行使功能的能力存在差异.

Nramp2 基因与生物体内 Fe 的代谢有着密切联系,是迄今为止第一个克隆的跨膜铁转运体,缺少 *Nramp2* 基因可能会导致生物缺铁性贫血. 之前一直认为 Nramp 家族基因只能转运 Fe^{2+} ,但后来有研究发现,植物体内该家族基因不仅能够转运 Fe,而且对 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Pb^{2+} 等阳离子^[59-60]的转运也起着重要的调控作用,但其具体机制尚未发掘.

有关 Nramp 家族基因结构与组织表达的研究一直处于对动物的抗病原微生物的侵染上,有关植物体内 Nramp 家族基因的研究还处于起步阶段,家族基因在植物体内的具体定位、应答机制还有待验证,与其他转运铁离子的蛋白不同,该家族基因可能与铁代谢相关疾病的产生有关,从以往的研究可以看出, Nramp 家族基因不仅能实现植物体内金属离子的高

效吸收与转运,还能提高植物的抗病能力.因此,该基因的深入研究很可能为植物修复土壤重金属污染提供新的思路.

2 调控重金属在细胞内储存能力的主要基因

与重金属储存相关的蛋白是重金属排出蛋白,该蛋白主要定位于细胞器膜上,能将重金属运出细胞质或运送至特殊细胞器(如液泡),在植物重金属区室化过程起着重要作用.目前研究较多的主要包括 ATP 结合盒(ABC 转运器)(ATP-binding cassette transporter)、阳离子扩散促进器(cation diffusion facilitator family, CDF)和 P_{1B} 型 ATPases (P_{1B} type ATPase).

2.1 ATP 结合盒(ABC 型转运器)

ABC 型转运器是实现底物跨膜运输的重金属排出蛋白,可以将重金属转移到液泡中储存起来. Bovet 等^[61]发现,阿拉伯芥菜在 Cd^{2+} 胁迫下 *AtMRP3* 基因过量表达,且该基因表达水平受 Cd^{2+} 浓度调控,从而发现了其作用机理,即基因表达产物充当了 Cd 及 Cd 结合物的流出泵,在 Cd^{2+} 浓度升高时,将细胞吸收的 Cd 及 Cd 结合物泵出细胞质,储存到液泡等细胞器中,增强植物对重金属的耐性.目前已经鉴定了超过 130 种该家族基因^[62],在庞大的家族基因中,MRP 和 PDR 是目前研究最为深入的调控 Cd^{2+} 储存的蛋白亚族^[63].如 *AtABCC3*(MRP)蛋白参与植物体内 PC-Cd 运输到液泡储存的生物过程^[64],Kim 等^[65]发现,Cd 胁迫下,根部表皮细胞质膜中 *AtABCG36* 或 *AtPDR8* 基因会过量表达,将 Cd^{2+} 或 Cd 的络合物泵出细胞质膜,在其他细胞器中储存从而降低细胞内重金属含量.

另外,研究发现,PDR 蛋白不仅调控了 Cd^{2+} 的储存,还参与了 Pb^{2+} 在植物体内的储存.如 Lee 等^[66]研究发现,*AtABCG40* 或 *AtPDR12*(PDR)基因在 Pb 胁迫下会过量表达,*AtABCG40* 蛋白能将 Pb 或 Pb 的衍生物运出细胞质,增强拟南芥对 Pb 的耐性.由于 ABC 家族基因广泛存在于植物体内,且 Cd、Pb 污染往往相伴而生,这一发现或可实现修复植物同时去除两种重金属的构想,解决现存超富集植物修复重金属单一的问题.

ABC 转运蛋白影响着植物对重金属的储存过程,虽然相关研究已经有了一定进展,但是由于该家族基因庞大,功能多样,且不同植物的代谢途径不同,转运蛋白的结构功能也千差万别,所以无法将单一生物体的科研成果直接运用到其他植物中.因而,面对庞大的蛋白家族,还远不能系统地观察 ABC 家族基

因的作用机制,今后工作中应多借助生物信息学、遗传学等方法研究 ABC 家族基因的功能,也可以利用基因工程在其他植物种中使该基因异源表达,提高重金属的转移能力,或者通过基因序列比对来挖掘基因功能的相关性.

2.2 阳离子扩散促进器(CDF)

阳离子扩散进器(CDF)能将重金属从细胞质中外排到细胞外或将其运输到细胞器或储存室中,增加植物对重金属的耐性,其作用原理是通过结合组氨酸残基、天冬氨酸残基和谷氨酸残基调节底物和质子的储存. Kobae 等^[67]研究证实了 CDF 家族基因的功能,发现 *AtMTP1* 蛋白位于叶片和根部细胞的液泡膜上,验证了 *AtMTP1* 基因在细胞内的瞬时表达情况,推测出其作用可能是运载 Zn^{2+} 至液泡储存,从而增强了植物对重金属的耐性.目前,现已发现的 CDF 家族蛋白成员为 110 个,其中对 MTP1 蛋白的研究较为广泛, MTP1 蛋白存在于植物所有组织中,能转运 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} ,当 *MTP1* 基因过量表达时,拟南芥对 Zn 的耐性增强^[68].

以往研究认为,CDF 主要影响 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 在液泡中的储存,但是有研究^[69]表明该家族基因对 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 的储存也有一定的调控作用.如来自柱花草的 *ShMTP1* 基因在拟南芥中表达,可以使 Mn 被隔离到植物细胞器中,增强拟南芥对 Mn 的耐性^[69];在遏蓝菜相关研究中发现,CDF 基因过量表达后有利于 Ni^{2+} 转运与储存^[70].随着土壤重金属污染程度加剧,上述发现或可为植物修复土壤中重金属的研究提供一定依据.

CDF 家族蛋白普遍存在,相关研究也在不断深入,但是关于它们的结构和功能机制尚未明确,主要包括:①大多数与 CDF 相关的研究都是在植物体外进行,在植物体内、体外的效应是否相同?②不同植物体 CDF 具体定位还未明确,现有研究对于其处于细胞质还是细胞器存在质疑;③底物运转机制以及此类蛋白未来的开发利用等.这些都是目前研究的热点和难点,也是今后的工作中亟待解决的问题.

2.3 P_{1B} 型 ATPases

P_{1B} 型 ATPase 蛋白利用 ATP 水解产生的能量,作为离子跨膜运输的离子泵,其家族成员由多个重金属 ATPases(HMA)组成.目前已经发现的该家族基因主要包括:拟南芥中 8 个 HMA 基因(*AtHMA1* ~ *AtHMA8*),水稻中 9 个 HMA 基因(*OsHMA1* ~ *OsHMA9*),大麦中 10 个 HMA 基因(*HvHMA1* ~ *HvHMA10*),大豆中 9 个 HMA 基因(*GmHMA1* ~

GmHMA9), 绿藻中 3 个 *HMA* 基因 (*CrHMA1* ~ *CrHMA3*), 红藻中 2 个 *HMA* 基因 (*CmHMA1* ~ *CmHMA2*)^[71-73].

P_{1B} 型 ATPase 家族基因在拟南芥中的研究相对成熟, *AtHMA3* 蛋白的 mRNA 广泛分布在拟南芥的不同组织中, 位于液泡膜上, 可以将 Cd 运进液泡, 起到区隔化 Cd 的功能. 在其他植物中转该基因, 发现转基因植物对 Cd 的富集量比野生型增加了 2~3 倍, 证明了 *AtHMA3* 蛋白有利于植物对 Cd 的储存^[74]. 此外, 研究人员^[75]发现, 过量表达 *AtHMA3* 基因还影响着 Co、Pb 和 Zn 的区隔化过程, 因此 *AtHMA3* 蛋白可能参与多种重金属在液泡中的储存过程.

随着二代测序技术的发展以及转基因技术的成熟, P_{1B} 型 ATPase 家族基因成员不断被发现, 且少部分亚家族已经被克隆出来(如 *HMA1* 基因), 并且验证了其在 Zn、Cd、Pb、Co 等离子体的运输储存过程中起着关键作用. 但是还有许多亚家族的具体组织分布、亚细胞的定位、分子调控机制等还需进一步阐明, 今后还需继续深入解析 P_{1B} 型 ATPases 家族基因对植物重金属储存的调控作用, 为基因工程在植物修复中的应用提供可靠的研究基础.

3 调控重金属在植物体内毒性的主要基因

重金属毒性是植物吸收重金属的主要障碍, 植物通过产生多肽与重金属形成螯合物固定金属离子, 进而降低其生物毒性, 增强植物对重金属的耐性. 目前研究较多的对重金属有螯合作用的物质主要包括植物络合素(phytochelatin, PCs)和金属硫蛋白(Metallothionein, MTs).

3.1 植物络合素(PCs)

PCs 是植物体内螯合重金属的重要物质, 在植物解毒机制中占有重要地位. 在某些重金属离子胁迫下, 植物体内的谷氨酸和半胱氨酸在谷氨酰半胱氨酸合成酶、植物螯合酶的作用下形成 PCs, PCs 通过巯基与金属离子螯合形成无毒络合物, 这些络合物通过转运蛋白被运输到胞外或将其储存在细胞壁、液泡以及叶片表皮毛等部位, 减少细胞内游离的金属离子, 解除重金属的毒害作用从而提高植物对重金属的耐性. 因此, 目前对合成 PCs 相关基因的鉴定和克隆成为分子生物学研究的热点之一^[76].

PCs 不是基因的直接翻译产物, 而是以谷胱甘肽(GSH)为底物, 在植物络合素合成酶(*PCS*)基因的催化下合成的小分子多肽^[77]. 因此, 若想通过增加植物体内 PCs 的含量来降低植物对重金属的毒害作用, 只需使 *PCS* 基因在植物体内过量表达即可实现. 如

在粉蓝烟草中表达小麦中编码植物络合素的基因(*TaPCS1*), 能够显著增加粉蓝烟草对 Pb 和 Cd 的耐受性^[78]. 随着转基因技术的逐渐成熟, 多种生物的 *PCS* 基因在烟草中表达, 试验结果表明, 转线虫^[79]、拟南芥^[80]、狗牙根^[81]的 *PCS* 基因烟草对 Cd 的耐性都有不同程度的提高. 随着 *PCS* 基因被克隆表达, 人们逐渐深入研究如何使 *PCS* 基因活化达到大量合成 PCs 的目的, 研究^[82]表明, 所有能诱导 PCs 合成的金属离子都能增强 *PCS* 蛋白的活性, 只是不同金属离子之间存在较大差异, 如 Pb^{2+} 的激活能力是 Ag^+ 的近 50 倍. 以上试验结果说明, *PCS* 基因可以控制 PCs 的合成, PCs 能有效螯合重金属, 降低重金属毒性, 提高植物对重金属的耐性.

目前多种 *PCS* 基因被克隆, 但是仅局限于少数物种的分析, 相应的结果并不适用于所有类别的植物. 试验中采用的重金属(如 Cd)的浓度、不同理化性质的土壤对 PCs 的产生都有一定影响, 试验中重金属浓度大多超过环境中实际发生的情况, 该条件会引起重金属对植物的急性胁迫, 与植物真正的生长状况有一定区别, 因此这些都是以后在研究中需要考虑的因素. 另外, 研究中各种模拟试验条件获得的结果是否具有普遍性和实用性也是今后试验中需要考虑的问题.

3.2 金属硫蛋白(MTs)

金属硫蛋白(MTs)存在于植物的根、茎、叶、花、果实和种子等组织中, 可以显著提高植物对 Cd、Cu 等重金属的耐受性. MTs 主要通过半胱氨酸残基上的巯基与重金属结合形成无毒或低毒的络合物, 最终通过转运蛋白将复合物转运到细胞器中储存, 提高植物对重金属的耐性. 根据半胱氨酸残基的种类, 可将 MTs 分为 4 类——MT1、MT2、MT3、MT4, 它们均对 Cu 有很强的亲和力, 同时可以固定 Cd、Cu、Zn 等, 甚至可以改变 Cd 和 Cu 的致死剂量^[83]. 有研究^[84]表明, 牧豆中 *PjMT1* 和 *PjMT2* 基因可以被 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 诱导表达, 而 *PjMT3* 基因可以被 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 诱导. 杨柳^[85]、龙葵^[86]、亚麻^[87]等在 Cd^{2+} 胁迫下 MTs 基因得到高效表达, 为了验证 MTs 的功能, 研究者^[88]将不同的 *MT* 基因转入拟南芥中, 发现转基因植物对 Cu 的忍耐能力比对照组提高了 20 倍, 但是植物对重金属的吸收没有明显变化. 将酵母的 *MT* 基因转入花椰菜中, 发现转基因花椰菜对 Cd 的耐性和吸收能力较野生花椰菜均有显著提高^[89]. 上述试验结果说明, *MT* 基因过量表达有利于 MTs 的合成, 而 MTs 可以有效与重金属螯合, 降低重金属毒性, 从而增强植物对重

金属的耐受和富集能力。

目前关于 MTs 的研究较多,许多转 MTs 基因植物对各种不利环境因素的应激能力都得到了提升,其中对金属离子的抗性和耐性能力的提升尤为明显. 相关研究显示,MTs 对 Cd、Cu 的富集和解毒影响较大,但是具体深入的解毒机制还需要进一步研究,建议今后的工作重点放在有关 MTs 的应答机制、解毒机制、组织特异性表达机制等相关研究方面。

4 结论与展望

a) 重金属转运蛋白调控基因的研究主要集中在 ZIP 家族基因、YSL 家族基因和 Nramp 家族基因等;控制重金属在植物体内储存的研究则集中在 ABC、CDF 和 P_{1B} 型 ATPases 家族基因等;PCs 和 MTs 主要有利于提高植物对重金属的解毒能力,并进一步提升植物对重金属的超耐性,有利于植物对重金属的吸收、转运以及储存。

b) 盲目将某些基因逆转录到植物体上,得到的结果有时会与预期效果截然相反,故而大多数转运蛋白在植物组织中的具体定位、基因的拓扑结构、植物体内和体外效应、底物运转机制以及此类蛋白未来的开发利用等都需要进一步明确,因此后续仍需利用基因工程在其他植物种中进行异源表达,使转基因植物在实际环境中生长,以测试植物的应答机制以及重金属平衡机制。

c) 后续的研究中应着手进行转基因植物的安全性评价,是否会对周围的生态环境造成影响,尤其要考虑是否会对人类生产生活过程造成潜在危害,以期能为植物更有效地富集重金属提供参考依据。

参考文献 (References):

- [1] 李柱,周嘉文,吴龙华.2017 年土壤重金属污染与修复研究热点回眸[J].科技导报,2018,36(1):189-198.
LI Zhu,ZHOU Jiawen,WU Longhua.Hot spots of soil heavy metal pollution and remediation research in 2017 [J]. Science & Technology Review,2018,36(1):189-198.
- [2] YAO Zhitong,LI Jinhui,XIE Henghua,et al.Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals [J]. Procedia Environmental Sciences,2012,16(4):722-729.
- [3] PERRINO E V,BRUNETTI G,FARRAG K.Plant communities in multi-metal contaminated soils;a case study in the National Park of Alta Murgia (Apulia Region-Southern Italy) [J]. International Journal of Phytoremediation,2014,16(9):871-888.
- [4] 徐剑锋,王雷,熊瑛,等.土壤重金属污染强化植物修复技术研究进展[J].环境工程技术学报,2017,7(3):366-373.
XU Jianfeng,WANG Lei,XIONG Ying,et al.Research progress on strengthening phytoremediation technologies for heavy metals contaminated soil [J]. Journal of Environmental Engineering Technology,2017,7(3):366-373.
- [5] 姜丹,靳亚忠,慕庆峰,等.转基因技术在植物环境修复中的应用综述[J].安徽农学通报,2013(16):14-16.
JIANG Dan,JIN Yazhong,MU Qingfeng,et al.Applications of transgenic technology on phytoremediation [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin,2013(16):14-16.
- [6] 林海,张海丽,董颖博,等.重金属复合污染下草本植物两两组合水培的富集特性[J].环境科学研究,2016,29(8):1154-1162.
LIN Hai,ZHANG Haili,DONG Yingbo,et al.Enrichment characteristics of various heavy metals by four herbaceous plants in pair combination under hydroponic culture [J]. Research of Environmental Sciences,2016,29(8):1154-1162.
- [7] THAO N P,TRAN L S P.Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean [J]. Critical Reviews in Biotechnology,2012,32(4):349-362.
- [8] LIU Quanji,HU Chengxiao,TAN Qiling,et al.Effects of As on As uptake,speciation,and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions [J]. Acta Scientiae Circumstantiae,2008,20(3):326-331.
- [9] GRICHKO V P,GLICK B R,GRISHKO V I,et al.Evaluation of tomato plants with constitutive,root-specific,and stress-induced acc deaminase gene expression [J]. Russian Journal of Plant Physiology,2005,52(3):359-364.
- [10] PILON M,OWEN J D,GARIFULLINA G F,et al.Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic *Arabidopsis* expressing a mouse selenocysteine lyase [J]. Plant Physiology,2003,131(3):1250-1257.
- [11] 冯斌,谢先芝.基因工程技术[J].化工进展,2002,21(3):231-232.
FENG Bin,XIE Xianzhi.Genetic engineering technology [J]. Chemical Industry and Engineering Progress,2002,21(3):231-232.
- [12] RENSING C,KÜES U,ULF U,et al.Expression of bacterial mercuric ion reductase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Bacteriology,1992,174(4):1288-1292.
- [13] RAMESH S A,SCHACHTMAN D P.Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice [J]. Plant Physiology,2003,133(1):126-134.
- [14] ISHIMARU Y,SUZUKI M,KOBAYASHI T,et al.*OsZIP4*,a novel zinc-regulated zinc transporter in rice [J]. Journal of Experimental Botany,2005,56(422):3207-3214.
- [15] ISHIMARU Y,MASUDA H,SUZUKI M,et al.Overexpression of the *OsZIP4* zinc transporter confers disarrangement of zinc distribution in rice plants [J]. Journal of Experimental Botany,2007,58(11):2909-2915.
- [16] KAVITHA P G,SAM K,MATHEW M K.Functional characterization of a transition metal ion transporter,*OsZIP6* from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Physiology & Biochemistry,2015,97(6):165-174.
- [17] ISHIMARU Y,KIM S,TSUKAMOTO T,et al.From the cover: mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced

- tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(18) : 7373-7378.
- [18] NAKANISHI H, OGAWA I, ISHIMARU Y, *et al.* Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters *OsIRT1* and *OsIRT2* in rice [J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2010, 52(4) : 464-469.
- [19] ISHIMARU Y, SUZUKI M, TSUKAMOTO T, *et al.* Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺ [J]. Plant Journal, 2010, 45(3) : 335-346.
- [20] KRÄMER U, TALKE I N, HANIKENNE M. Transition metal transport [J]. Febs Letters, 2007, 581(12) : 2263-2272.
- [21] WINTZ H, FOX T, WU Y Y, *et al.* Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(48) : 47644-47653.
- [22] GROTZ N, GUERINOT M L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2006, 1763(7) : 595-608.
- [23] 渠慎春, 章镇, 乔玉山. 植物 ZIP 家族基因铁载体蛋白基因研究进展 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(7) : 1348-1354.
QU Shenchun, ZHANG Zhen, QIAO Yushan. Advance of ZIP gene family related to iron transporter in plant [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2004, 24(7) : 1348-1354.
- [24] BRIAT J F. Cellular and whole organism aspects of iron transport and storage in plants. in molecular biology of metal homeostasis and detoxification from microbes to man [J]. Topics in Current Genetics, 2005, 14(6) : 193-213.
- [25] VAROTTO C, MAIWALD D, PESARESI P, *et al.* The metal ion transporter *IRT1* is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2010, 31(5) : 589-599.
- [26] VERT G, BRIAT J F, CURIE C. *Arabidopsis IRT2* gene encodes a root-periphery iron transporter [J]. Plant Journal, 2001, 26(2) : 181-189.
- [27] 蒲琦, 李素贞, 李盼. 植物锌铁转运蛋白 ZIP 家族基因的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2012, 10(10) : 15-19.
PU Qi, LI Suzhen, LI Pan. Research progress of ZIP transporters gene family [J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 10(10) : 15-19.
- [28] ECKHARDT U, MARQUES A M, BUCKHOUT T J. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45(4) : 437-448.
- [29] BUGHIO N. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(374) : 1677-1682.
- [30] COHEN C K, FOX T C, GARVIN D F, *et al.* The role of iron deficiency stress responses in stimulating heavy metal transporter in plants [J]. Plant Physiology, 1998, 116(3) : 1063-1072.
- [31] EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, *et al.* A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(11) : 5624-5628.
- [32] NAKANISHI H, OGAWA I, ISHIMARU Y, *et al.* Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters *OsIRT1* and *OsIRT2* in rice [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2006, 52(4) : 464-469.
- [33] LEE S, JEONG H J, KIM S A, *et al.* *OsZIP5* is a plasma membrane zinc transporter in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2010, 73(4/5) : 507-517.
- [34] 孟璐, 孙亮, 谭龙涛. 水稻锌铁转运蛋白 ZIP 家族基因研究进展 [J]. 遗传, 2018, 40(1) : 33-43.
MENG Lu, SUN Liang, TAN Longtao. Progress in ZIP transporter gene family in rice [J]. Hereditas (Beijing), 2018, 40(1) : 33-43.
- [35] LEE S, AN G. Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 32(4) : 408-416.
- [36] KRÄMER U, TALKE I N, HANIKENNE M. Transition metal transport [J]. FEBS Letters, 2007, 581(12) : 2263-2272.
- [37] LEE S, CHIECKO J C, SUN A K, *et al.* Disruption of *OsYSL15* leads to iron inefficiency in rice plants [J]. Plant Physiology, 2009, 150(2) : 786-800.
- [38] KAKEI Y, ISHIMARU Y, KOBAYASHI T, *et al.* *OsYSL16* plays a role in the allocation of iron [J]. Plant Molecular Biology, 2012, 79(6) : 583-594.
- [39] ZHENG Luqing, YAMAJI N, YOKOSHO K, *et al.* *YSL16* is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice [J]. The Plant Cell, 2012, 24(9) : 3767-3782.
- [40] DIVOL F, COUCH D, CONÉJÉRO G, *et al.* The *Arabidopsis Yellow Stripe Like4* and *6* transporters control iron release from the chloroplast [J]. The Plant Cell, 2013, 25(3) : 1040-1055.
- [41] DIDONATO C J, ROBERTS B L, WALKER R L, *et al.* *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)* : a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes [J]. Plant Journal, 2010, 39(3) : 403-414.
- [42] CHU H H, CHIECKO J, PUNSHON T, *et al.* Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis Yellow Stripe-Like1* and *Yellow Stripe-Like3* metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures [J]. Plant Physiology, 2010, 154(1) : 197-210.
- [43] KOIKE S, INOUE H, MIZUNO D, *et al.* *OsYSL2* is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem [J]. Plant Journal, 2010, 39(3) : 415-424.
- [44] SASAKI A, YAMAJI N, XIA J, *et al.* *OsYSL6* is involved in the detoxification of excess manganese in rice [J]. Plant Physiology, 2011, 157(4) : 1832-1840.
- [45] INOUE H, KOBAYASHI T, NOZOYE T, *et al.* Rice *OsYSL15* is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(6) : 3470-3479.
- [46] BASHIR K, HANADA K, SHIMIZU M, *et al.* Transcriptomic analysis of rice in response to iron deficiency and excess [J]. Rice, 2014, 7(1) : 18-32.

- [47] KAKEI Y, ISHIMARU Y, KOBAYASHI T, *et al.* *OsYSL16* plays a role in the allocation of iron[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79(6):583-594.
- [48] ZHENG L, YAMAJI N, YOKOSHO K, *et al.* *YSL16* is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9):3767-3782.
- [49] AOYAMA T, KOBAYASHI T, TAKAHASHI M, *et al.* *OsYSL18* is a rice iron(III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 70(6):681-692.
- [50] MURATA Y, MA J F, YAMAJI N, *et al.* A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots[J]. *Plant Journal*, 2006, 46(4):563-572.
- [51] CURIE C, PANAVIENE Z, LOULERGUE C, *et al.* Maize *Yellow Stripe1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake[J]. *Nature*, 2001, 409(6818):346-349.
- [52] UENO D, YAMAJI N, MA J F. Further characterization of ferric-phytosiderophore transporters *ZmYS1* and *HvYS1* in maize and barley[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(12):3513-3520.
- [53] SCHAAF G, LUDEWIG U, ERENOGLU B E, *et al.* *ZmYS1* functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore and nicotianamine-chelated metals[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(10):9091-9096.
- [54] WATERS B M, CHU H H, DIDONATO R J, *et al.* Mutations in *Arabidopsis Yellow Stripe-Like1* and *Yellow Stripe-Like3* reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds[J]. *Plant Physiology*, 2006, 1419(4):1446-1458.
- [55] JEAN M L, SCHIKORA A, MARI S, *et al.* A loss of function mutation in *AtYSL1* reveals its role in iron and nicotianamine seed loading[J]. *Plant Journal*, 2010, 44(5):769-782.
- [56] DIDONATO C J, ROBERTS B L, WALKER R L, *et al.* *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2)*: a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes[J]. *Plant Journal*, 2010, 39(3):403-414.
- [57] SUPER F, SUPEKOVA L, NELSON H, *et al.* A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93:5105-5110.
- [58] 王丹.膜蛋白 Nrapm 跨膜区相关肽的结构及功能研究[D].长春:吉林大学,2011.
- [59] NEVO Y, NELSON N. The Nrapm family of metal-ion transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2006, 1763(7):609-620.
- [60] PICARD V, GOVONI G, JABADO N, *et al.* *Nrapm2 (DCT1/DMT1)* expressed at the plasma membrane transports iron and other divalent cations into a calcein accessible cytoplasmic pool[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(46):35738.
- [61] BOVET L, EGGMANN T, MEYLAN-BETTEX M, *et al.* Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatment: induction of *AtMRP3* [J]. *Plant Cell & Environment*, 2010, 26(3):371-381.
- [62] VERRIER P J, BIRD D, BURLA B, *et al.* Plant ABC proteins: a unified nomenclature and updated inventory[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(4):151-159.
- [63] 邵若玄,沈忆珂,周文彬,等.植物 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2013, 30(5):761-768.
- SHAO Ruoxuan, SHEN Yike, ZHOU Wenbin, *et al.* Recent advances for plant ATP-binding cassette transporters[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2013, 30(5):761-768.
- [64] BRUNETTI P, ZANELLA L, De PAOLIS A, *et al.* A, Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter *AtABCC3* increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(13):3815.
- [65] KIM D Y, BOVET L, MAESHIMA M, *et al.* The ABC transporter *AtPDR8* is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance[J]. *Plant Journal*, 2007, 50(2):207-218.
- [66] LEE M, LEE K, LEE J, *et al.* *AtPDR12* contributes to lead resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2):827-836.
- [67] KOBAE Y, UEMURA T, SATO M H, *et al.* Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana AtMTP1* is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2004, 45(12):1749-1758.
- [68] DESBROSSES-FONROUGE A G, VOIGT K, SCHRÖDER A, *et al.* *Arabidopsis thaliana MTP1* is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation[J]. *Febs Letters*, 2005, 579(19):4165-4174.
- [69] DELHAIZE E, KATAOKA T, HEBB D M, *et al.* Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(5):1131-1142.
- [70] MAESER P, THOMINE S, SCHROEDER J I, *et al.* Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 1126(4):1646-1667.
- [71] MILLS R F, VALDES B, DUKE M, *et al.* Functional significance of *AtHMA4* C-terminal domain in planta[J]. *Plos One*, 2010, 5(10):e13388.
- [72] ARGÜELLO J M, EREN E, GONZÁLEZ-GUERRERO M. The structure and function of heavy metal transport P_{1B} ATPases[J]. *Biomaterials*, 2007, 20(3/4):233-248.
- [73] BERNAL M, TESTILLANO PS, ALFONSO M, *et al.* Identification and subcellular localization of the soybean copper P_{1B}-ATPase *GmHMA8* transporter[J]. *Journal of Structural Biology*, 2007, 158(1):46-58.
- [74] MORIN I, GUDIN S, MINTZ E, *et al.* Dissecting the role of the N-terminal metal-binding domains in activating the yeast copper ATPase in vivo[J]. *Febs Journal*, 2008, 149(2):4483-4495.
- [75] MOREL M, CROUZET J. *AtHMA3*, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2008, 149(2):894-904.
- [76] 胡朝华,张蕾,朱端卫.植物螯合肽的生物合成与解毒机制及在重金属修复中的应用前景[J]. *华中农业大学学报*, 2006, 25(5):575-580.

- HU Zhaohua, ZHANG Lei, ZHU Duanrui. Biosynthesis and detoxification mechanism of phytochelatin and its application prospect in remediation of heavy metal [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2006, 25(5): 575-580.
- [77] GRILL E, WINNACKER E L, ZENK M H. Phytochelatins; the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants [J]. Science, 1985, 230(4726): 674-676.
- [78] 孙瑞莲, 周启星. 高等植物重金属耐性与超积累特性及其分子机理研究 [J]. 植物生态学报, 2005, 29(3): 497-504.
SUN Ruilian, ZHOU Qixing. Heavy metal tolerance and hyperaccumulation of higher plants and their molecular mechanisms: review [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2005, 29(3): 497-504.
- [79] WOJAS S, RUSZCZYŃSKA A, BULSKA E, *et al.* The role of subcellular distribution of cadmium and phytochelatins in the generation of distinct phenotypes of *AtPCS1* and *CePCS3*-expressing tobacco [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(12): 981-988.
- [80] POMPONI M, CENSI V, DI G V, *et al.* Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot [J]. Planta, 2006, 223(2): 180-190.
- [81] DAS N, BHATTACHARYA S, MAITI M K. Enhanced cadmium accumulation and tolerance in transgenic tobacco over expressing rice metal tolerance protein gene *OsMTP1* is promising for phytoremediation [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2016, 105: 297-309.
- [82] CLEMENS S. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast [J]. EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal, 1999, 18(12): 3325-3333.
- [83] 赵翠珠. 芦苇抗重金属基因的克隆和功能鉴定 [D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [84] USHA B, VENKATARAMAN G, PARIDA A. Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliflora* (SW) D.C. show differences in binding to heavy metals *in vitro* [J]. Molecular Genetics & Genomics, 2009, 281(1): 99-108.
- [85] KATARZYNA H, GRAZYNA D, CHRISTEL B, *et al.* Interactive and single effects of ectomycorrhiza formation and bacillus cereus on metallothionein *MTI* expression and phytoextraction of Cd and Zn by willows [J]. Water Air & Soil Pollution, 2012, 223(3): 957-968.
- [86] FERRAZ P, FIDALGO F, ALMEIDA A, *et al.* Phytostabilization of nickel by the zinc and cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. are metallothioneins involved [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2012, 57(8): 254-260.
- [87] JANA K, RENE K, VOJTECH A, *et al.* Effect of cadmium chloride on metallothionein levels in carp [J]. Sensors, 2009, 9(6): 4789-4803.
- [88] MURPHY A, ZHOU J, GOLDSBROUGH P B, *et al.* Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 1997, 113(4): 1293-1301.
- [89] HASEGAWA I, TERADA E, SUNAIRI M, *et al.* Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUPI*) [J]. Plant & Soil, 1997, 196(2): 277-281.

(责任编辑:周巧富)