

超富集植物吸收富集重金属的生理和分子生物学机制*

李文学 陈同斌**

(中国科学院地理科学与资源研究所环境修复室,北京 100101)

【摘要】 与普通植物相比,超富集植物在地上部富集大量重金属离子的情况下可以正常生长,其富集重金属的机理已经成为当前植物逆境生理研究的热点领域。尤其是近两年,随着分子生物学等现代技术手段的引入,关于重金属离子富集机理的研究取得了一定进展。通过与酵母突变株功能互补克隆到了多条编码微量元素转运蛋白的全长 cDNA;也从分子水平上研究了谷胱甘肽、植物螯合素、金属硫蛋白、有机酸或氨基酸等含硫物质与重金属富集之间的可能关系。本文从植物生理和分子生物学角度简要评述超富集植物对重金属元素的吸收、富集、螯合及区室化的机制。

关键词 超富集植物 重金属 生理学机制 分子生物学机制

文章编号 1001-9332(2003)04-0627-05 **中图分类号** X171.5 **文献标识码** A

Physiological and molecular biological mechanisms of heavy metal absorption and accumulation in hyperaccumulators. LI Wenxue, CHEN Tongbin (Laboratory of Environmental Remediation, Institute of Geographical Sciences and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2003, 14(4): 627~631.

In comparison with normal plants, hyperaccumulators have the ability to accumulate heavy metals in their shoots far exceeding those observed in soil, without suffering from detrimental effects. With the help of molecular technologies, the research on the mechanisms of heavy metal accumulation in hyperaccumulators has been made a great progress. A number of trace element transporters have been cloned by functional complementation with yeast mutants defective in metal absorption. The relations between glutathione, phytochelatins metallothioneins, organic acids and heavy metals have been studied by molecular technologies. This review concentrated on the physiological and molecular mechanisms of heavy metal absorption and sequestration in hyperaccumulators.

Key words Hyperaccumulator, Heavy metal, Physiological mechanisms, Molecular biological mechanisms.

1 引言

土壤重金属污染是一个重要的环境问题,传统的治理主要采用物理或化学方法,费用高,对大面积的污染效果差;与传统措施相比,植物修复技术以成本低、操作简单等优点而倍受青睐。广义上的植物修复是指利用植物去除土壤、水体或空气中重金属、有机污染物等污染物的技术,包含植物萃取(Phytoextraction)、根际过滤(Rhizofiltration)、植物挥发(Phytovolatilization)、植物固定(Phytostabilization)等技术,现在通常提到的植物修复主要是指植物萃取^[32]。

超富集植物(Hyperaccumulator)是植物修复的基础,国际上已发现400多种超富集植物,国内对于超富集植物的研究相对较晚,研究较为系统的当属As、Zn等重金属的超富集植物^[2, 3, 33]。与普通植物相比,重金属离子进入超富集植物体内同样经过吸收/转运、富集/转化/矿化等生理生化过程,而且许多重金属离子进入植物体内的离子通道与必需营养元素相同,这就决定了超富集植物必然具有独特的生理代谢过程。关于这些过程的研究已经成为新的研究热点。本文对有关超富集植物吸收和富集重金属离子的生理及分子机制

研究进行评述。

2 重金属离子吸收的分子生物学机制

遏蓝菜属(*Thlaspi* L.)植物具有非常强的富集Zn的能力,能够在地上部富集高达3%(干重)的Zn,同时植物正常生长,没有表现出任何中毒症状,它已经成为研究重金属富集机理的模式植物之一。但无论是超富集植物或是普通植物,金属离子进入植物体内的第一步是根系吸收,也就是说吸收过程很可能是超富集植物富集重金属离子的第一个限速步骤。*T. caerulescens*与*T. arvense*同属于遏蓝菜属,*T. caerulescens*能够富集Zn而*T. arvense*则不具此能力,通过比较它们对 Zn^{2+} 的吸收动力学发现:两者 K_m 值差异不大,但*T. caerulescens*的 V_{max} 要比*T. arvense*高3.5倍^[21],表明*T. caerulescens*富集 Zn^{2+} 的能力并非是与 Zn^{2+} 有更高的亲和力,而很可能是因为锌离子的流入量加大所致,也就是说在*T. caerulescens*根系细胞膜上分布有更多的锌离子转

*国家自然科学基金项目(40071075)、中国科学院知识创新工程重点方向项目(KZCX2-401-02)和王宽诚博士后工作奖励基金资助。

**通讯联系人。E-mail:chentb@igsrr.ac.cn

2002-07-05收稿,2002-11-28接受。

运蛋白。

近年来随着分子生物学等现代技术手段的引入,人们对金属离子如何进入细胞有了新的认识。通过对酵母突变株进行功能互补克隆到了多条编码微量元素转运蛋白的全长 cDNA,其中研究最多的是 ZIP 基因家族(ZRT, IRT-like Protein)。ZIP 基因家族分布非常广泛,在真菌、动物、植物等真核细胞中均发现了 ZIP 基因家族成员。ZIP 基因编码的蛋白一般具有 8 个跨膜区,C-端和 N-端的氨基酸均位于细胞膜外。此家族包含至少 25 个成员,*zrt1*、*zrt2* (zinc-regulated transporter) 和 *irt1* (iron-regulated transporter) 是最早克隆到的 ZIP 基因。*zrt1*、*zrt2* 均由酵母中获得,与 Zn 的吸收密切相关^[36, 37]; *irt1* 编码的蛋白主要位于拟南芥的根系,体内缺 Fe 时可诱导 *irt1* 表达^[8]。

另一类与金属离子吸收有关的蛋白是 Nramp 基因家族(Natural resistance associated macrophage proteins)。Nramp 基因家族编码的蛋白一般具有 12 个跨膜区,这与 ZIP 基因家族明显不同。Nramp 最初在哺乳动物中发现,植物中的研究主要集中于水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis*)。*Oryza sativa* 和 *Arabidopsis* 的 Nramp 基因家族分为 2 类,OsNramp1、OsNramp3 和 AtNramp5 属于一类,OsNramp2、AtNramp1、AtNramp2、AtNramp3 与 AtNramp4 属于另一类。Nramp 基因家族在植物中的功能现在仍不清楚,AtNramp3 和 AtNramp4 能够维持 *Arabidopsis* 体内铁离子的平衡^[29]。此外,AtNramp3 很可能与 Ca^{2+} 的吸收有关,破坏 AtNramp3 基因可增加植物对 Cd 的耐性,过量表达则导致植物对 Ca^{2+} 的超敏感性。

对于超富集植物而言,Zn 的吸收过程研究相对较清楚。通过与酵母突变株进行功能互补,Pence 等^[24]在具有富 Zn 能力的 *T. caerulescen* 中克隆到 *znt1*。*znt1* 编码 Zn^{2+} 转运蛋白,属 ZIP 基因家族,缺 Zn 和 Zn 供应充足条件下均可以在根系和叶片中高量表达,表明其可能是组成型表达;对于不具有富 Zn 能力的 *T. arvense* 而言,*znt1* 主要在缺 Zn 条件下表达,供 Zn 时,表达明显受到抑制。这种表达方式的不同很可能是造成 *Thlaspi* 富 Zn 能力差异的主要原因之一。Assuncao 等^[11]的研究结果也表明 Zn 转运蛋白基因 *T. caerulescen* 的表达量要远高于 *T. arvense*。从 Pence 等^[24]、Assuncao 等^[11]与 Lasat 等^[21]的实验结果可以发现根系 Zn 转运蛋白基因的表达量与 *Thlaspi* 富集 Zn 的能力正相关,初步验证了吸收过程是超富集植物富集重金属离子的首个限速步骤的假设。

但是目前还不能肯定转运蛋白是否在超富集植物吸收重金属方面起到决定性作用。譬如说,尽管 *znt1*、*znt2* 在 *T. caerulescen* 的表达量要远高于 *T. arvense*,但是它们在具有不同富集能力 *T. caerulescen* 中的表达量几乎相同^[11],即 *T. caerulescen* 富集能力的差异与吸收并无太大的相关性。造成此现象的原因很可能在于:(1)一般来说,转运蛋白由一个基因家族控制,而现在得到的克隆还不足以代表整个家族,许多未知的基因可能起到更为重要的作用,如在 *T. caerulescen* 就又克隆到 *zat* 基因,它与 Zn^{2+} 的区室化(Se-

questration)密切相关,但是此基因与 ZIP 基因家族明显不同,仅含有 6 个跨膜区^[34];(2)对已知转运蛋白的性质研究还不清楚,金属离子转运蛋白对底物专一性不强,造成多种吸收途径同时对一种金属离子发挥作用,所以在进行具体的分子生物学研究时,必须清楚那些转运蛋白对该金属离子起作用;(3)现在转运蛋白的研究主要集中于根系,叶片中转运蛋白的研究相对较少,但是对超富集植物而言,重金属离子在地上部的含量要远远高于根系,即叶片中的转运蛋白很可能起到更为主要的作用。

3 木质部运输

在木质部存在大量的有机酸和氨基酸,它们能够与金属离子结合,这种复合物是重金属离子在木质部中运输的主要形式。譬如在木质部,Fe 主要是以柠檬酸铁的形式存在,Zn 主要是与柠檬酸或苹果酸结合,而 Cu 随着植物不同可与天冬酰胺酸、谷氨酸、组氨酸或烟碱结合,当然也有许多是以离子形态存在的,如 Ca、Mg、Mn。在超富集植物中研究较多的为组氨酸。Kramer 等^[19]发现,组氨酸与 *Alyssum montanum* 富集 Ni 的能力密切相关,当植物地上部 Ni 含量高时,木质部中组氨酸含量也较高,外源组氨酸的加入也能显著促进 Ni 装载入木质部,从而提高 Ni 向地上部的运输。然而,最近的研究表明,组氨酸反应很可能并不是 Ni 超富集植物的普遍机理。Persans 等^[25]在研究 Ni 的超累积植物 *Thlaspi geosingense* 时并没有发现 His 反应,同时他们克隆了控制 His 合成的关键酶基因 *thg1*、*thb1*、*thd1*,其表达量并没有随着 Ni 用量的增加而升高。

重金属由根系进入木质部至少需要 3 个过程:进入根细胞,由根细胞运输到中柱,装载到木质部。在内皮层由于凯氏带的存在,使得共质体运输在重金属进入木质部的过程中起到主导作用。在共质体运输中起关键作用的是膜转运蛋白,然而直到现在还没有在木质部中克隆到与重金属离子运输相关的基因,这方面的研究,尤其是在研究超富集植物时应该引起充分的重视。与普通植物相比,超富集植物能够高效、迅速地把重金属离子由根系运输到地上部,而通过凯氏带是重金属离子进入木质部主要屏障之一,探明此过程,将有利于提高植物修复的效果。

4 对金属离子的解毒机制

4.1 谷胱甘肽(GSH)

许多金属离子是植物必需的微量养分,它们参与植物体内众多的生理代谢过程。但如果含量过高,尤其是具有氧化还原活性的金属,会对植物产生毒害作用,这种毒害作用很可能是由于自由基的形成造成的。GSH 含巯基,具有很强的氧化还原特性,可有效地清除活性氧等自由基,因此 GSH 在植物抗逆境胁迫中起重要作用。GSH 为三肽,结构通式为 $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$,合成主要通过两步依赖于 ATP 的反应完成, $\gamma\text{-EC}$ 合成酶和 GSH 合成酶是其中的关键酶。 $\gamma\text{-EC}$ 合成酶由 *gsh1* 编码,GSH 合成酶由 *gsh2* 编码,*gsh1* 与 *gsh2* 在拟南芥

基因组中均以单拷贝的形式存在。

正常条件下, GSH 的合成依赖于半胱氨酸的活性, 同时存在明显的反馈抑制现象, 表明由 γ -EC 合成酶催化的反应是整个合成的限速步骤。重金属胁迫条件下, 重金属离子激活植物螯合素的合成, 消除了 GSH 的反馈抑制作用, 由 GSH 合成酶催化的反应也成为限速步骤, 此时如果加强 *gsh2* 的表达, 则既可增加植物螯合素的合成又能避免 GSH 的耗竭, 从而缓解重金属胁迫。Zhu 等^[38,39]的实验结果验证了此假设。他把大肠杆菌的 *gsh1* 与 *gsh2* 分别转入到印度芥菜 (*Brassica juncea*), 发现印度芥菜对 Cd^{2+} 的耐性与富集能力均有明显增加, 且耐性和富集能力还与 *gsh2* 的表达正相关。然而, Foyer 等^[10]把 *gsh2* 转入白杨树 (*Populus*) 后, 白杨树抗氧化胁迫的能力 (光抑制) 并没有增加; Goldsbrough 等^[13]的结果也表明 *gsh2* 转入野生型的拟南芥后并不能增加其对 Cd 的抗性。由此可见, 如何通过基因工程改造 GSH, 以增加植物对重金属的耐性和富集能力还有待于进一步研究。

4.2 植物螯合素 (PCs)

植物螯合素 (PCs, = cadystins in *S. pombe*) 由植物体内一系列低分子量、能够结合金属离子的多肽组成, 其结构通式为 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (图 1), 一般来讲, n 为 2~5, 最高可达 11^[5]。现已发现多种 PC 的同功异构体, 主要是 C 端的 Gly 被 β -Ala, Ser 取代形成。原来认为植物螯合素仅存在于植物中, 但是随着研究的深入, 陆续在线虫、蚯蚓等克隆到 PC 合成酶的类似基因。

PCs 不能由基因直接编码, 必须在 PCs 合成酶的催化下完成^[14]。PC 合成酶为四聚体, 分子量 95000 道尔顿, 等电点在 pH4.8 附近, 最适反应温度和 pH 分别为 35 $^{\circ}\text{C}$ 、7.9^[14]。然而, 由克隆到的编码 PCs 的全长 cDNA 推测的结果与此不符, 推测结果表明 PCs 不是多聚体, 分子量为 42000~70000 道尔顿, 这种偏差很可能由于在 Grill 等提纯的酶中 PCs 并不是主要成分造成的。不同重金属离子诱导 PCs 合成的能力有很大差别^[15], 一般为 $\text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sb}^{3+} > \text{Ag}^{+} > \text{Hg}^{2+} > \text{As}^{5+} > \text{Cu}^{+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Au}^{3+} > \text{Bi}^{3+}$; 不同重金属离子诱导 PC 合成酶活性的能力与诱导 PCs 合成的能力稍有不同^[35]: $\text{Cd}^{2+} > \text{Ag}^{+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Sn}^{2+} > \text{Au}^{3+} > \text{As}^{5+} > \text{In}^{3+} > \text{Ti}^{3+} > \text{Ge}^{4+} > \text{Bi}^{3+} > \text{Ga}^{3+}$ 。关于 PCs 功能研究得相对清楚的是 PCs 与 Cd 之间的关系 (图 2)。现

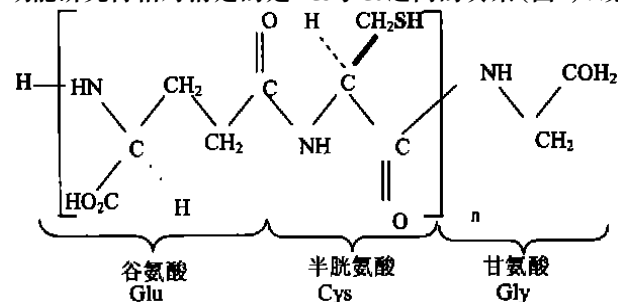


图 1 植物螯合素的化学结构示意图

Fig. 1 Chemical structure of phytochelatin.

已明确 PCs 在植物解 Cd 毒中起到重要作用, PCs-Cd 复合物是 Cd 由细胞质进入液泡的主要形式。正是由于 PCs 在重金属离子区室化中所起的重要作用, 近年来 PCs 已成为植物抗重金属胁迫的研究热点之一。

目前 PCs 的分子生物学研究基本集中于普通植物或耐性植物, 而有关超富集植物的研究相对较少。Schmoger 等^[28]在用 As 处理过的蛇根木 (*Rauvolfia serpentina*) 悬浮细胞及拟南芥幼苗中发现了 PCs, Hartley-Whitaker 等^[17]在绒毛草 (*Holcus lanatus*) 上也证实了上述现象。但这些植物多属于耐性植物。Ebbs 等^[7]的实验表明, 无论是否具有富集能力, *Thlaspi* 用 Cd 处理后都会有大量 PCs 的合成, 但是 *T. arvense* 中 PCs 的总量要高于 *T. caerulescens*, 说明 PCs 与植物富 Cd 能力之间并无太大的关系。由于 PCs 在超富集植物中的研究还很少, 所以 PCs 在超富集植物是否起到重要作用还有待于深入研究。

Cobbett、Rea 和 Schroeder 等 3 个研究小组于 1999 年分别在拟南芥、小麦、酵母中克隆到了编码 PC 合成酶的全长 cDNA。其中, 通过对拟南芥 *cad1* 突变株 (含有与野生型相似的 GSH 含量, 但不含 PC) 定位克隆获得 AtPCS1^[16], 小麦耐 Cd 基因 AtPCS1 与 TaPCS1 主要是通过与酵母突变株功能互补得到^[4,30]。对 PC 合成酶相应的全长 cDNA 对齐比较发现其保守区位于 N 端, 同一性高达 40%。长时间 Cd^{2+} 处理 *cad1* 突变株也没有发现 PCs 的合成, 表明 PCs 的合成可能是由单基因控制^[18]。但随着拟南芥基因组测序的完成, 发现了与 AtPCS1 高度同源的 AtPCS2 基因^[16], 其功能尚不清楚, 但与 AtPCS1 相比, 其表达量非常低。但植物在长期的进化历程中把 AtPCS2 作为功能基因保留下来, 尽管其在正常条件下表达量很低, 可以想象在某些器官或环境下, AtPCS2 基因的表达肯定会起到重要作用。

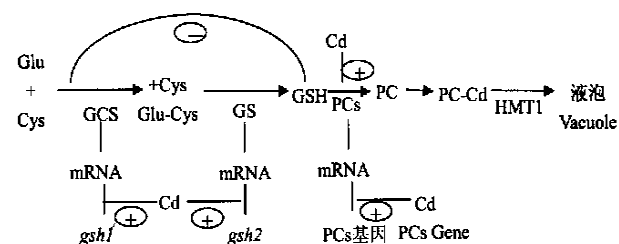


图 2 以 Cd 为例说明谷胱甘肽、植物螯合素在抗重金属胁迫中的作用 (+ 表示增加基因表达或酶活性, - 表示减少基因表达或酶活性, HMT1 表示位于液泡膜上的 PC-Cd 转运蛋白, 参见 Cobbett^[5]并作修改

Fig. 2 Function of GSH and PC in the metal tolerance of plants under metal stress (+ and - indicate positive and negative regulation of enzyme activities or gene expression, respectively; HMT1 is a vacuolar membrane transporter of PC-Cd complex; revised from the figure of Cobbett^[5]).

4.3 金属硫蛋白 (MT)

金属硫蛋白 (Metallothioneins) 是自然界中普遍存在的一种低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质。它与 PCs 的本质区别在于 MT 由基因直接编码, 而 PCs 在 PCs 合成酶的催化下完成。与 PCs 一样, 金属硫蛋白能够通过巯基与金属离子结合, 从而降低重金属离子的毒性, 它对于 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 的解毒效

果尤为明显^[23]。

植物中首先鉴定的 MT 是 Ec 蛋白,它由小麦成熟胚芽中分离得到。在植物中已发现大约 50 种 MT,根据半胱氨酸残基的排列方式,可以将其分为 I 型、II 型和 V 型,大多属于 I 型和 II 型。I 型中的半胱氨酸残基仅有 Cys Xaa-Cys 一种排列方式;II 型中的半胱氨酸残基有两种排列方式,分别为 Cys-Cys、Cys Xaa Xaa-Cys。编码 I 型 MT 的 cDNA 在根系的表达水平较高,编码 II 型 MT 的 cDNA 主要在叶片表达。

金属硫蛋白极易水解,尤其植物中的金属硫蛋白氨基酸链比较长,极易在半胱氨酸区水解,同时金属硫蛋白在有氧的条件下非常不稳定,所以难以获得相应蛋白质的资料,目前仅对小麦 Ec 蛋白及拟南芥 MT1、MT2 编码的蛋白进行了纯化,这就限制了对 MT 类似基因功能的研究。Murphy 等^[22]证实 Cu^{2+} 诱导拟南芥 MT2 表达,而且表达强度与不同基因型抗 Cu 胁迫的能力密切相关;Nathalie 等^[13]的研究结果也证实 Cu 的耐性植物 *Silene vulgaris* 耐 Cu 胁迫的特性与 MT2b 的表达紧密联系。王剑虹等^[31]在重金属耐性植物紫羊茅草 (*Festuca rebra*) 中克隆到 mc MT1 的全长 cDNA,此基因编码 70 个氨基酸,含有 12 个 Cys 残基,在 N 端和 C 端分别含有 3 个 Cys Xaa-Cys 结构,将此基因转入到酵母 MT 基因缺失突变株中发现,mc MT1 的表达增加了酵母细胞对 Cu、Cd 和 Pb 的抗性。在拟南芥和蚕豆中,MT 主要在毛状体中表达^[9,12],而 Cd 等许多有毒重金属离子也在毛状体中累积^[27],暗示 MT 和重金属累积有某种联系。

4.4 细胞壁的固持与区室化作用

植物细胞壁残基对阳离子有高亲和力,可以影响重金属离子向细胞内扩散速率,从而影响金属离子的吸收。比较黄花茅 (*Anthoxanthum odoratum*) 悬浮细胞和原生质体固 Pb 能力发现,Pb 浓度对从耐 Pb 细胞克隆分离的悬浮细胞无太大影响,而原生质体的死亡率上升,相应地,从 Pb 敏感细胞克隆分离的悬浮细胞和原生质体对 Pb 极其敏感,表明细胞壁在 *Anthoxanthum odoratum* 抗 Pb 胁迫中起到重要作用^[26]。需要明确的是,细胞壁对金属的固定作用不是一个普遍的抗金属毒害的机制,例如抗 Zn 毒和 Zn 敏感型菜豆的细胞壁物质表现出相似的亲和力,同时细胞壁有一定的金属容量,而超富集植物能够在地上部富集大量的重金属离子,暗示细胞壁不可能在超富集植物中起到重要作用。最近的研究表明,区室化作用与超富集植物富集重金属离子的能力密切相关。就 *Thlaspi* 而言,具有富集能力的 *T. geosingense* 液泡中 Ni 的含量要比不具有富集能力的 *T. arvense* 高 1 倍^[20];Frey 等^[11]也证实 Zn 在 *T. caerulescens* 中主要分布于表皮细胞液泡中。但区室化作用是否为超富集植物富集重金属离子的一个普遍机理还需对新发现的超富集植物进一步研究才能确定。

5 研究展望

关于超富集植物富集重金属离子的研究虽然取得了一

定进展,但至今对其分子和生理机制仍不是很清楚,研究人员看法也存在明显的分歧。在把超富集植物用于实践的过程中,首先要研究清楚对超富集植物富集的生理基础,譬如重金属离子如何进入根细胞,在木质部如何被运输,在叶片中如何分布;其次要注意不同生理过程的联系,就吸收而言,它其实是根系吸收与体内再分配的有机结合,所以在利用基因工程方法增加重金属离子吸收量时,不仅要考虑到增加根系的吸收位点,提高转运蛋白底物的专一性,同时要注意细胞器,尤其是液泡膜上与重金属离子区室化相关膜蛋白的表达,只有这样,才会达到比较好的效果;最后要强调的是学科交叉与渗透,Dhankher 等^[6]将细菌中的磷酸盐还原酶 ArsC 基因和 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -ECS) 在拟南芥的叶子中表达,这样运输到地上部的磷酸盐在磷酸盐还原酶的作用下转化成亚磷酸盐, γ -ECS 表达可增加一些连接重金属(如亚磷酸盐)并解除其毒性的化合物,将这些复合物限制在叶子中,从而使植物能够积累并忍耐不断增加的 As 含量。

参考文献

- 1 Assuncao AGL, Martins PDC, Polter SD, et al. 2001. Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell Environ*, **24**: 217~226
- 2 Chen T-B, Wei C-Y, Huang Z-C, et al. 2002a. Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chin Sci Bull*, **47**: 902~905
- 3 Chen T-B, Fan Z-L, Lei M, et al. 2002b. Arsenic uptake of hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L.: Effect of phosphorus and its significance. *Chin Sci Bull*, **47**: 1876~1879
- 4 Clemens S, Kim EJ, Neumann D, et al. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthase genes from plants and yeast. *EMBO J*, **18**: 3325~3333
- 5 Cobbett CS. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification. *Curr Opin Plant Biol*, **3**: 211~216
- 6 Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, et al. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotech*, **20**: 1140~1145
- 7 Ebbs S, Lau I, Ahner B, et al. 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, **214**(4): 635~640
- 8 Eide D, Broderius M, Fett J, et al. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci*, **93**: 5624~5628
- 9 Foley RC, Singh KB. 1994. Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. *Plant Mol Biol*, **26**: 435~444
- 10 Foyer CH, Souriau N, Perret S, et al. 1995. Overexpression of glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in Polar trees. *Plant Physiol*, **109**: 1047~1057
- 11 Frey B, Keller K, Zierold K, et al. 2000. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol*, **23**: 675~687
- 12 Garcia-Hernandez M, Murphy A, Taiz L. 1998. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **118**: 387~397
- 13 Goldsbrough PB. 1998. Metal tolerance in plants: the role of phytochelatin and metallothioneins. In: Terry N, Banuelos GS eds. *Phytoremediation of trace elements*. Michigan: Ann Arbor Press.
- 14 Grill E, Löffler S, Winnacker EL, et al. 1989. Phytochelatin, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci*, **86**: 6838~6842
- 15 Grill E, Winnacker EL, Zenk MH. 1987. Phytochelatin, a class of heavy metal binding peptides from plants, are functionally analo-

- gous to metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci*, **84**:439~443
- 16 Ha SB, Smith AP, Howden R, et al. 1999. Photochelatase synthase genes from *Arabidopsis thaliana* and the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, **11**:1153~1164
- 17 Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Vooijs R, et al. 2001. Photochelatases are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiol*, **126**:299~306
- 18 Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, et al. 1995. Cadmium sensitive, *cad1*, mutants of *Arabidopsis thaliana* are photochelatase deficient. *Plant Physiol*, **107**:1059~1066
- 19 Kramer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, et al. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, **379**:635~636
- 20 Kramer U, Pickering IJ, Prince RC, et al. 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol*, **122**:1343~1353
- 21 Lasat MM, Pence SN, Garvin DF, et al. 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot*, **51**(342):71~79
- 22 Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, et al. 1997. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, **113**:1293~1301
- 23 Nathalie ALM, Hassinen VH, Hakvoort HWJ, et al. 2001. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol*, **126**:1519~1526
- 24 Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, et al. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator. *Proc Natl Acad Sci*, **97**:4956~4960
- 25 Persans MW, Yan XG, Patnoe JMML, et al. 1999. Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi geosingense*. *Plant Physiol*, **121**:1117~1126
- 26 Poulter A, Collin HA, Thurman DA, et al. 1985. The role of the cell wall in the mechanism of lead and zinc tolerance in *Anthoxanthum odoratum* L. *Plant Sci*, **42**:61~66
- 27 Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, et al. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol*, **109**:1427~1433
- 28 Schmoger MEV, Oven M, Grill E. 2000. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants. *Plant Physiol*, **122**:793~801
- 29 Thomine S, Wang R, Ward JM, et al. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc Natl Acad Sci*, **97**:4991~4996
- 30 Vatamaniuk OK, Mari S, Lu YP, et al. 1999. AtpCS1, a photochelatase synthase genes from *Arabidopsis thaliana*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc Natl Acad Sci*, **96**:7110~7115
- 31 Wang J-H (王剑虹), Ma M (麻密). 2000. Biological mechanisms of phytoremediation. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, **17**(6):504~510 (in Chinese)
- 32 Wei C-Y (韦朝阳), Chen T-B (陈同斌). 2001. Hyperaccumulators and phytoremediation of heavy metal contaminated soil: a review of studies in China and abroad. *Acta Ecol Sin (生态学报)*, **21**(7):1196~1203 (in Chinese)
- 33 Wei C-Y (韦朝阳), Chen T-B (陈同斌). 2002. The ecological and chemical character of plants in arsenic abnormal areas. *Acta Phytocool Sin (植物生态学报)*, **26**:695~700 (in Chinese)
- 34 Zaai BJVD, Neuteboom LW, Pinas JE, et al. 1999. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol*, **119**:1047~1055
- 35 Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene*, **179**:21~30
- 36 Zhao H, Eide D. 1996a. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci*, **93**:2454~2458
- 37 Zhao H, Eide D. 1996b. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **271**:23203~23210
- 38 Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L. 1999. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol*, **119**:73~79
- 39 Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, et al. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol*, **121**:1169~1177

作者简介 李文学,男,1973年生,博士后.主要从事植物营养遗传与重金属污染生态学研究,在国内外发表论文8篇.
E-mail: liwx @igsnr.ac.cn