

植物对锌吸收运输及积累的生理与分子机制

汪洪, 金继运

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业部植物营养与养分循环重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 锌是植物必需的营养元素,也是重金属污染元素之一。现代分子生物学的发展,极大地推动了植物体内与锌吸收运输有关转运蛋白的研究。目前发现, 锌铁控制转运相关蛋白(ZIP)、自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 NRAMP、重金属 ATPase 酶、阳离子扩散协助蛋白 CDF、 Mg^{2+}/H^{+} 的反向交换转运蛋白 MHX 等运输蛋白参与细胞内 Zn^{2+} 离子的跨膜运输,调节植物细胞内 Zn^{2+} 平衡与分配。利用数量遗传学手段在水稻上已找到与缺锌植株死亡率和叶片青铜病发生率有关 QTL 位点。而在 *Thlaspi caerulescens* 和 *Arabidopsis halleri* 植物上鉴定出控制锌含量的 QTLs,为寻找控制植物高效积累 Zn 的遗传基础规律打下了基础。

关键词: 锌;吸收;运输;超积累植物;运输蛋白;分子标记

中图分类号: Q945.12

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2009)01-0225-11

The physiological and molecular mechanisms of zinc uptake, transport, and hyperaccumulation in plants: A review

WANG Hong, JIN Ji-yun

(Key Laboratory of Plant Nutrition and Nutrient Cycling Research, Ministry of Agriculture; Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, China)

Abstract: Zinc (Zn) is an essential plant element, but it is toxic to plants in excess. Plants have complicated Zn transport and regulation systems to maintain a proper intracellular concentration of zinc. Some genes have been indentified in plants encoding proteins with putative roles in Zn transport, such as ZIP (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like protein), NRAMP (Natural resistance-associated macrophage proteins), P_{IB}-type heavy metal associated domain containing ATPases, cation diffusion facilitator (CDF), and Mg^{2+}/H^{+} exchanger (MHX). The quantitative trait loci (QTL) analysis is being used to find the loci controlling Zn accumulation in heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* or *Arabidopsis halleri*. Some QTLs associated with plant mortality and leaf bronzing are detected in Zn deficient rice plants.

Key words: uptake; hyperaccumulation; quantitative trait loci; transporter; zinc

锌 (Zn) 是一种蓝白色金属,密度 7.14 g/cm^3 ,熔点 419.5°C 。锌原子价电子层组态为 $3d^{10}4s^2$,通常失去最外层的两个 s 电子而呈 +2 价。 Zn^{2+} 离子半径为 0.83 \AA ,极化力和变形性较大,有路易斯酸特征,能与 N、O 等配体形成配位数为 6 的配合物^[1]。锌的稳定性同位素有 ^{64}Zn (48.63%)、 ^{66}Zn (27.90%)、 ^{67}Zn (4.90%)、 ^{68}Zn (18.75%) 和 ^{70}Zn (0.62%)。放射性同位素 ^{65}Zn 半衰期为 244.26 天^[1-3]。

Zn 是植物必需的微量元素。土壤锌有效性低是造成植物 Zn 不足的主要原因。全世界大约 30% 的耕地缺 Zn,石灰质土壤、半干旱土壤缺 Zn 更严重^[4]。最早发现植物缺锌症状是在玉米上^[5],随后在大麦和矮秆向日葵上发现黄化和小叶等缺 Zn 症状^[6]。大多数植物体内 Zn 含量为 $20 \sim 100 \mu\text{g/g}$,若低于 $15 \sim 20 \mu\text{g/g}$,作物常表现缺 Zn^[3,7]。保证 Zn 供应,对于植物碳水化合物、蛋白质、生长素等物质

收稿日期: 2008-01-02 接受日期: 2008-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771284)和教育部回国人员资助经费项目资助。

作者简介: 汪洪(1970—)男,安徽桐城人,博士,副研究员,主要从事植物中、微量元素营养与根系生物学、重金属胁迫及叶面肥料开发等研究。

Tel: 010-82108662, E-mail: wanghong@caas.ac.cn

代谢及繁殖发育过程具有重要作用^[3]。

锌矿开采、冶炼、镀锌加工等含锌工业“三废”的不合理排放,使土壤中 Zn 超常积累,污染土壤中锌易被植物吸收而造成毒害,并可通过食物链污染农产品,威胁人畜健康。一般植物体内 Zn 浓度达到约 100 $\mu\text{g/g}$ 时就表现过量,浓度为 400 $\mu\text{g/g}$ 时就造成严重毒害。有些植物是 Zn 超积累植物,这些植物大都是十字花科,如 *Thlaspi* 属(11 个种)和 *Arabidopsis* 属(1 个种),它能在 Zn 浓度为 100 $\mu\text{g/g}$ 的条件下生长而不表现任何中毒症状,体内积累 Zn 的浓度高达 25000~30000 $\mu\text{g/g}$ 干重^[8-10]。*Arabidopsis halleri* 地上部 Zn 浓度可达 32000 $\mu\text{g/g}$ 干重,但不表现中毒症状或生长的降低^[11-12]。据报道,东南景天(*Sedum alfredii* H)是一种新的 Zn 超积累植物^[13],地上部 Zn 含量可高达 4134~5000 $\mu\text{g/g}$,平均为 4515 $\mu\text{g/g}$ 。

本文就对近些年来植物细胞和亚细胞水平上 Zn 存在形态与分布特征、Zn 离子跨膜运输蛋白、Zn 积累的分子标记及数量遗传学等方面研究进展作一综述。

1 植物细胞内锌的区室化分布

锌在植物细胞的不同部位和细胞器中含量分布不一,胞内区室化分隔有利于保证缺锌和高锌胁迫下植物维持正常的生理代谢^[3]。细胞壁在控制自由态锌浓度上具有重要作用。*T. caerulescens* 植株在 50 $\mu\text{mol/L}$ Zn 溶液中培养,根部细胞中 Zn 有 30% 存在细胞壁中^[14]。东南景天茎叶细胞壁对 Zn 的贮存可能是该植物耐锌机制之一^[15]。液泡是植物主要的分离贮藏重金属的部位,液泡的区室化作用起到解毒效果,与超富集重金属特性密切相关^[16]。麦瓶草(*Silene vulgaris*)的锌耐性品种与敏感品种相比,锌通过液泡膜进入小囊的数量高出 2.5 倍^[17]。*A. halleri* 植株体内锌主要积累在叶肉细胞和毛状体的液泡中^[11,18-19]。*T. caerulescens* 根系中的锌主要分布在液泡中,细胞壁中相对较少;而叶片中锌主要积累在表皮细胞。*T. caerulescens* 表皮细胞中锌相对含量与细胞长度呈线性正相关,表皮细胞的液泡化促进了 Zn 的积累^[20]。

2 植物体内锌存在的形态

锌在植物中存在的形式常为自由态离子、低分子量有机物配合态复合物、贮存金属蛋白以及与细胞壁结合的非溶形式;自由态锌离子的浓度一般较低。番茄^[21]、苜蓿^[22]叶片组织中自由态锌含量分

别占总锌量的 5.8% 和 6.5%。植物体内可溶性锌占到 58%~91%^[23-24],具有较强的生理活性^[25]。在可溶性锌形态中,与低分子量化合物形成复合物的锌所占比例最高。

植物螯合肽(Phytochelatin, PC)是一类分子量较小的金属结合多肽,具有共同的结构($\gamma\text{-Glu-Cys}$)_n-Gly,其中 n=2~11,对植物适应重金属 Cd、Zn 毒害具有重要意义^[16,26-27]。PC 是由还原型谷胱甘肽在植物螯合肽合成酶作用下经转肽反应合成^[28]。植物细胞在重金属处理几秒钟后,就会诱导 PC 的产生,细胞质中低分子量的 PC-金属复合物可以被运输到液泡中^[28-30]。ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)利用水解 ATP 主动运输多种不同基质通过生物膜,可能介导转运 Zn-PC 复合物^[31]。PC-Cd 或 Ni 复合物可通过 ABC 转运蛋白转运进入液泡中^[32]。

金属硫蛋白(Metallothioneins, MT)是由基因编码的一类富含 Cys 的低分子量蛋白,能结合金属离子。植物中第一个被分离出来的 MTs 是小麦 EC (Early Cys labeled)蛋白,从成熟胚胎里面分离出来,可以结合 Zn^{2+} ^[33]。大约有 50 余种编码 MT 类似基因在不同的植物中被发现^[16,26,34]。

在锌超积累植物 *T. caerulescens* 和 *A. halleri* 体内多种有机酸如柠檬酸、苹果酸、草酸可与重金属结合,阻止胞内过多的游离重金属离子毒害^[16,19,26-27,35]。*A. halleri* 叶肉细胞和毛状体的液泡中, Zn 主要和苹果酸结合在一起^[11,18-19]。X 射线吸收光谱研究发现:*T. caerulescens* 根系中 70% 的锌与组氨酸配合,其次吸附在细胞壁上成为不溶形态;在木质部运输汁液中,水合 Zn 离子占 79%,其余是柠檬酸结合态 Zn;地上部中柠檬酸结合态 Zn 占 38%,草酸结合态占 9%,组氨酸络合态占 16%,水合离子形态占 26%,另有 12% 的锌在细胞壁中^[14]。*T. caerulescens* 地上部中的可溶性锌与苹果酸、草酸之间存在显著正相关关系,在根系中未发现这种关系。锌可能与苹果酸形成复合物转移到液泡,部分以草酸化合物的形式存储^[36]。在拟南芥中鉴定出的 AtTDI (Tonoplast dicarboxylate transporter)和动物上 Na^+ /dicarboxylate 同向转运体有同源性,但 AtDT 转运蛋白位于液泡膜上。T-DNA 突变体与野生型比较,叶片组织中苹果酸含量低,苹果酸跨液泡膜运输量少,分离出的液泡中苹果酸含量少,但柠檬酸的跨液泡膜运输没有受到影响,AtDT 参与了苹果酸-Zn 跨液泡膜运输^[37-38]。

木质部中锌以何种形式和形态长距离运输还缺少深入研究。根据木质部汁液⁶⁵Zn 的电泳结果,Tiffin^[39]认为,锌主要以离子形式在木质部中运输;但 McGrath^[40]认为,电泳过程中,由于氧化还原电势和 pH 的改变,稳定性较低的复合物会离解,因此不能排除锌在植物木质部中以复合物形式运输。White 等^[41]推断,大豆木质部中锌主要以 Zn-柠檬酸复合物运输;番茄木质部中锌主要以 Zn-柠檬酸或苹果酸复合物运输。利用模型 CHELATE,他们推测番茄木质液中非复合物态锌占到 21%,而大豆则为 4%。Mullins 等^[42]用模型 CHELATE 和 GEOCHEM 计算大豆木质液中 Zn-柠檬酸复合物所占比例,分别为 80%~90% 和 33%~50%,结果大不相同。

韧皮部汁液中锌的浓度在 3~170 $\mu\text{mol/L}$ ^[43]。GEOCHEM 模型计算推测 *Yucca* 韧皮部汁液中约 53% 的锌与天冬酰胺复合,15% 的锌与谷氨酰胺和酪氨酸复合^[42]。锌在韧皮部中再转移能力较弱^[7,44]。

3 植物根系对锌的吸收动力学研究

植物根系对锌吸收的时间动力学过程呈现二相特征。开始是快速过程,锌与根细胞壁结合,可以被其它二价阳离子交换,对生理代谢活动不敏感;后期过程慢速,呈饱和和线性特征变化^[7]。在亚细胞水平上用⁶⁵Zn 示踪技术分区分析小麦幼苗根系对锌的吸收动力学发现, Zn^{2+} 从细胞质膜外流(efflux)量占到 Zn^{2+} 内流量(influx)的 65% 到 80%。质外体中锌离子交换的 half-time $t_{1/2}$ 为 0.08 h,占根系体积的 8%~14%。据此估测,质外体中锌浓度为 0.5 mmol/L,很大一部分锌是在 Donnan 自由空间里。另一个快速交换过程发生在原生质中, $t_{1/2}$ 为 0.55 h,占到根容量的 8%。最慢的交换过程 $t_{1/2}$ 是 134 h,占到根中锌的 76%,该过程中锌离子可能与液泡或原生质中有机物结合^[45]。

植物根系对锌吸收的浓度动力学过程研究表明,在低浓度范围($< 7.6 \mu\text{mol/L}$),大麦根吸收锌动力学过程遵从 Michaelis-Menten 方程饱和曲线,亲和力 K_m 约为 3 $\mu\text{mol/L}$ ^[46]。用耗竭技术研究玉米根系对锌的吸收动力学过程,锌离子浓度为 0~10 $\mu\text{mol/L}$,而且营养液中不加入配合物态物质, Zn^{2+} 的活度用 GEOCHEM 程序精确计算,最后得出 K_m 值约为 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 。该研究表明,在接近土壤可溶性锌的低浓度范围内,植物根系对锌的吸收受对锌亲和力较高的运输蛋白的调节^[47]。小麦锌高效品种

Dagdas 和锌低效品种 BDME-10 根系对锌的吸收动力学参数 K_m 和 V_{\max} 没有明显区别^[48]。而 Bower^[49-51]的研究表明,甘蔗、水稻和番茄根系对锌吸收动力学参数在不同品种之间具有显著差异。

4 根系分泌物与锌吸收积累

根系分泌物与植物适应土壤缺锌胁迫关系密切。锌缺乏诱导植物根系分泌低分子量有机酸增多,低分子量有机酸可以提高土壤中锌的有效性^[52]。水稻试验表明,缺锌条件下,根系分泌草酸较多,而柠檬酸分泌速率与水稻对低锌的耐性之间具有良好的相关关系^[53-54]。

禾本科植物在缺铁胁迫下,根系分泌出麦根酸类植物高铁载体(MAs),这是一类低分子量的非蛋白氨基酸,对 Fe^{3+} 有极强的螯合作用,活化土壤中难溶的三价铁化合物,然后在专一的转运蛋白的作用下将 Fe^{3+} -MAs 运进胞质中。研究表明,MAs 不仅可以活化根际土壤中铁,也可以活化土壤中锌,显著提高锌在根际土壤中的移动性和在根系质外体中的累积量,从而提高植物对锌的吸收量^[55-56]。锌高效小麦品种比低效品种根系分泌更多的麦根酸类植物高铁载体^[57]。

MAs 生物合成的前体 L-蛋氨酸(L-Met)与 ATP 一起形成 S-腺苷甲硫氨酸(SAM);在烟碱酰胺合成酶(NAS)的催化下,形成烟碱酰胺(NA),然后在烟碱酰胺氨基转移酶(NAAT)等催化下经过一系列步骤形成脱氧麦根酸(DMA),再转化为麦根酸(MA)和差向异构-3-羟基麦根酸(epi-HDMA)等麦根酸类植物高铁载体^[58-59]。近年来,已克隆并鉴定了许多 MAs 合成途径的关键酶基因,如 *Nas*、*Naat*、*Ids1*~*7*、*Aprt*、*Fdh*、*Adh* 等。拟南芥烟碱酰胺合成酶基因 *Nas* 在转基因烟草中异源表达能够增加烟草植株叶片中铁含量,提高铁缺乏状况下铁的利用率,增加植物体内锌和锰的累积^[60]。缺锌大麦体内合成和分泌麦根酸量增加。根系中编码合成麦根酸关键酶的基因 *HvNas1*、*HvNaat-A*、*HvNaat-B*、*HvIds2* 和 *HvIds3* 转录水平提高;利用正电子释放示踪图像系统(Positron-emitting tracer imaging system)证明,缺锌大麦吸收⁶²Zn(II)-MAs 比⁶²Zn²⁺ 更多^[59]。与 *A. thaliana* 比较,*A. haller* 根系中烟碱酰胺合成酶活性高,尼克烟酰胺数量多,NA 浓度与 *Saccharomyces pombe* 细胞的锌抗性关系密切^[61]。

在玉米上发现,*ZmYS1* 基因编码 Fe(III)-植物铁载体螯合物的转运蛋白,是多肽转运蛋白家族的

一个成员^[62-63]。该基因是 Curie 等^[94] 2001 年利用转座子 AC 随机插入法, 获得 1 个玉米突变体 *ysl1*, 并筛选构建出缺铁胁迫的 cDNA 文库, 得到 3 个全长或近乎全长的 *ysl1* cDNA。根据 cDNA 序列推测 YS1 是一具有 682 个氨基酸残基的蛋白质, 估计分子量为 75 kD, 具有 12 个跨膜结构域。*ysl1* 突变体由于不能转运 Fe^{3+} -MAs 复合物而表现出典型的缺铁症状: 叶脉间失绿、叶片呈黄色条纹状, 因此该基因被命名为 *yellow stripe* (YS)^[64]。当植物受到缺铁胁迫时, YS1 基因表达大幅度上调^[63]。在低铁条件下, YS1 蛋白在根和叶中大量诱导表达。在水稻中分离的 18 个 YS1 类似基因 *OsYSL1-12*, *OsYSL2* 主要参与了 Fe/Mn -NA 在韧皮部中的转运^[65]。在拟南芥中也发现了 8 个与 YS1 全长有很强相似性的 YSL 蛋白 (Yellow stripe like proteins) 成员^[66-68]。拟南芥 *ysl1ysl3* 双突变体表现出缺 Fe 症状, 叶片中 Fe 浓度下降, 而 Mn 、 Zn 尤其是 Cu 含量增加。在双突变体的种子中 Fe 、 Zn 和 Cu 浓度低, 叶片衰老过程中金属离子的活化受到抑制, 因此推测 AtYSL1 和 AtYSL3 在维管束组织细胞中可能起到运输 Zn 、 Fe 、 Cu 等金属离子与 NA 复合物的作用^[66-68]。

在锌超积累植物 *T. caerulea* 鉴定出 3 个 YSL 转运体。与拟南芥中类似基因相比, 这 3 个 YSL 基因表达程度高。*TcYSL7* 在花中高度表达, *TcYSL5* 在地上部高度表达, *TcYSL3* 在所有器官中表达程度类似。原位杂交实验发现 *TcYSL7* 和 *TcYSL5* 在木质部的薄壁细胞和韧皮部表达。外界供应 Zn 、 Cd 、 Ni 未发现影响这 3 个基因的组成性表达特征^[69]。

5 植物体内锌离子跨膜运输蛋白

目前研究表明, 参与植物体内锌离子的跨膜运输蛋白至少有 5 大类: 锌铁控制运转相关蛋白 (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated transporter-like protein, ZIP)、自然抵抗相关巨噬细胞蛋白 (Natural resistance associated macrophage proteins, NRAMP)、重金属 ATPase 酶 (Heavy metal ATPases, HMA)、阳离子扩散协助蛋白 (Cation diffusion facilitator proteins, CDF)、镁离子/ H^+ 反向转运蛋白 (Mg^{2+}/H^+ exchanger, MHX)^[3, 16, 70-73]。这些运输蛋白对于植物锌吸收、体内分配以及细胞内锌离子的稳态平衡 (Homeostasis) 具有重要作用。

5.1 锌铁控制运转相关蛋白 (ZIP)

ZIP 分为锌调控转运体 (Zinc-regulated trans-

porter, ZRT) 和铁调控转运体 (Iron-regulated transporter, IRT)。大多数 ZIP 家族成员有 8 个潜在的跨膜结构域, N-端和 C-端均位于质膜外层。该家族蛋白的氨基酸序列在长度上有较大的变化, 从 309 个到 406 个不等, 这种变化主要是由于第 3 和第 4 个跨膜结构域之间的可变区决定的。在大多数情况下, 可变区包括一个富含 His 残基的金属离子结合序列, 其共有序列为 HXHXHXHX, 即 $(HX)_n$ ($n = 3 \sim 6$)。多数 ZIP 家族蛋白的保守序列位于第 5 跨膜结构域内, 它能够与完全保守的 His 残基相互结合形成一个 α -螺旋结构^[71-74]。

目前已从细菌、古细菌和真核生物中发现了约 85 个 ZIP 家族成员。在拟南芥^[72-75]、大豆^[76]、蒺藜苜蓿^[77]和水稻^[78-81]等植物也鉴定出 ZIP 基因。第一个被克隆的植物 ZIP 是拟南芥 AtIRT1 (Iron-regulated transporter 1)^[82]。AtIRT1 被认为主要是在根部的 Fe^{2+} 的高亲和性吸收运转蛋白, 缺铁能诱导拟南芥根中 IRT1 的转录。进一步的酵母试验表明, AtIRT1 具有广泛的底物特异性, 也能转运 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 。拟南芥中还发现了 AtIRT2, 在缺铁条件下, AtIRT2 在根表皮细胞表达; 在酵母中 AtIRT2 的表达能使酵母 Fe 和 Zn 吸收突变体功能恢复正常^[83]。拟南芥中还克隆出 ZIP1、ZIP2、ZIP3、ZIP4 等基因。其中 ZIP1、ZIP2、ZIP3 能运输 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} , 还能以较低的亲合度运输 Mn^{2+} 。在 Zn^{2+} 缺乏的植物根系中 ZIP1 和 ZIP3 能得到很好的表达, 在 Zn^{2+} 充足或者过量时其表达受到抑制。当 Zn^{2+} 供应不足, 根和茎中 ZIP4 转录水平提高^[84]。在豆科模式植物蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 上鉴定出 7 个 ZIP 基因 MtZIP1-7。MtZIP1, MtZIP5 和 MtZIP6 在酵母中表达, 恢复其在低锌介质中生长, 可能具有转运 Zn^{2+} 功能。MtZIP1 在缺锌蒺藜苜蓿的根系和叶片中可以检测到表达, MtZIP3 和 MtZIP4 根系和叶片中表达受到缺锌的上调^[77]。Ramesh 等^[79] 从水稻基因数据库中鉴定出 3 个锌转运蛋白的全长 cDNA 片断 *OsZIP1*、*OsZIP2* 和 *OsZIP3*, 研究发现, *OsZIP3* 基因在所有条件下都能广泛的表达, 而 *OsZIP1* 基因主要在根系缺锌及其他金属元素的情况下被诱导表达。Ishimaru 等^[80] 鉴定出 *OsZIP4* 基因, 缺锌条件下 *OsZIP4* 在水稻生长点和韧皮部等部位中表达。预示该蛋白参与体内 Zn^{2+} 平衡分配^[81]。

Pence 等^[85] 和 Assunção 等^[86] 分别从遏蓝菜属 *T. caerulea* 克隆到转运蛋白 ZNT1, ZNT2 和 ZTP1 的 cDNA, 编码的蛋白属于 ZIP 家族的成员, 在植物

体内锌运输和积累过程中扮演重要角色。*T. caerulescens* 中发现的 *ZNT1* 基因在根部和地上部的表达量大大高于非富集植物败酱草 *T. arvense*^[85-86]。*ZNT1* 的表达受锌浓度提高的反向调节,在 *T. caerulescens* 中这种反向调节所需的锌浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,高于 *T. arvense* 的 1 $\mu\text{mol/L}$ 。这说明土壤 Zn 浓度能调节 Zn 向根系的运输,富集植物在反向调节上的改变对提高 Zn 的吸收和积累具有一定的作用。Pence 等^[85]进一步推测,*ZNT1* 在 *T. caerulescens* 中高表达,其产物与离子态的 Zn 形成弱生理活性的复合物,随后贮存在叶肉细胞中。van der Zaal 等^[87]在拟南芥中克隆到一种与 *ZNT1* 类似基因 *ZAT1* (Zn transporter of *Arabidopsis thaliana*) 基因,该基因的表达不受 Zn^{2+} 控制,它在拟南芥中的超量表达被证实和 Zn^{2+} 抗性有关,*ZAT* 可能是一种和根系主动外排 Zn^{2+} 有关的运输蛋白。在 *A. halimifolius* 中发现 ZIP 成员 AhZIP6^[88]和 AhZIP9^[89]参与 Zn^{2+} 的积累。

5.2 重金属 ATP 酶 (Heavy metal ATPases, HMA)

P-type ATPase 酶是一种通过水解 ATP 进行跨膜运输的运转蛋白。P-ATPase 是一个超级家族,存在于动物、植物及微生物中,在细胞膜系统上起离子泵的作用。所有 P-ATPase 的合成都包括一个磷酸化介导的酶促反应,在转运离子过程中涉及磷酸化和去磷酸化中间反应,因此,称之为 P-ATPase^[90]。根据其底物特异性可以分为五个主要的家族(<http://biobase.dk/~axe/Patbase.html>): 重金属 ATPases ($\text{P}_{1\text{B}}$) Ca^{2+} -ATPases ($\text{P}_{2\text{A}/2\text{B}}$) $\text{P}_{2\text{C}}$ ATPases (Na^+/K^+ ; H^+/K^+) $\text{P}_{2\text{D}}$ ATPases (Na^+ ?; Ca^{2+} ?) H^+ -ATPases ($\text{P}_{3\text{A}}$) Mg^{2+} -ATPase ($\text{P}_{3\text{B}}$) Putative aminophospholipid (氨基磷脂) ATPases (ALA , P_4) 特异性未知分支 (a branch with unknown specificity, P_5) $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPase 是与多种重金属离子如 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cu^+ 和 Zn^{2+} 等跨膜运输有关的运转器,被称作重金属 ATPase 酶。重金属 ATPase 有 8 个跨膜结构域,在 TM-6 和 TM-7 之间有一个大的胞质环,上有磷酸化结构域。膜内有 Cys-pro-Cys/His/Ser 基序,在金属元素转运过程中发挥作用^[72, 91-93]。

在拟南芥上已发现 8 个成员基因编码 $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases 这些 $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases 被命名为 HMA_{1-8} 。根据基因序列比较的结果,又将 $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPase 分为两个类群,一类参与一价离子 Ag/Cu 的运输,另一类参与二价离子 $\text{Cd}/\text{Pb}/\text{Zn}/\text{Co}$ 的运输^[90, 94]。*AtHMA7* 属于 Cu^+/Ag^+ 簇,能转运 Cu^+ 穿越高尔基体膜,产生功能

性乙烯受体^[95]。*AtHMA6* 也属于 Cu^+/Ag^+ 类,此转运蛋白负责 Cu 穿越叶绿体膜^[72]。*HMA5* 和 *HMA8* 属于 Cu^+/Ag^+ 类,而 *HMA1-4* 是 $\text{Cd}/\text{Pb}/\text{Zn}/\text{Co}$ 亚类^[94-95]。拟南芥中克隆的 *HMA2*^[96]和 *HMA4*^[97-98]是 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 的高亲和性质膜转运蛋白,与 Zn^{2+} 的体内平衡以及 Cd^{2+} 耐性有关,向胞外主动排出过量的重金属离子,提高 Zn 和 Cd 的耐性^[99]。拟南芥 *hma2* 和 *hma4* 双突变体由于缺失 *Hma2* 和 *Hma4* 基因,体内 Zn^{2+} 吸收明显下降。*HMA4* 过量表达时植株地上部 Zn 浓度提高,在 Zn、Cd 和 Co 毒性浓度下根系的生长较野生型有所改善^[97]。*HMA2* 是依赖于 Zn^{2+} 的 ATPase,虽然也能被 Cd 等其他的二价金属离子激活,但程度较 Zn^{2+} 低^[96]。Hussain 等^[100]报道, *A. thaliana* 的 *HMA2* 和 *HMA4* 主要在根、茎和叶片的维管组织中表达。*HMA4* mRNA 在拟南芥根维管束导管周围的组织中表达,受到 Zn 和 Mn 的促进,参与 Zn 离子向木质部的装载^[97-98]。*T. caerulescens* 的同源基因 *TcHMA4* 与 *AtHMA4* 有相同的组织表达特异性,缺锌和高锌条件均能诱导 *TcHMA4* 表达增强,*TcHMA4* 参与了 *T. caerulescens* 的 Zn 超富集和维持 Zn 平衡的过程^[99]。

5.3 阳离子扩散协助蛋白 (Cation Diffusion Facilitator proteins, CDF)

离子扩散协助蛋白 CDF 家族存在于酵母、动物和植物中,与重金属 Zn、Cd、Co 转运有关。这一转运蛋白家族通常将细胞质中金属离子运转流出到胞外,也参与将离子运输进入液泡中^[71, 101]。拟南芥中 CDF 家族目前发现了至少 12 个成员,被命名为金属耐受蛋白 *AtMTP1-12* (Metal tolerance protein, MTP)^[75]。这些 CDF 蛋白表现出一定的共同特征:含有 6 个跨膜结构域,有一个 N 末端信号序列和一个 C 末端阳离子结合域。真核成员在跨膜结构域 TM4 和 TM5 之间有一个组氨酸丰富的结构域,可能是锌结合域。各成员之间的长度差异变异较大,约 280~740 个残基不等。这些蛋白在细胞中的定位也是多种多样的,大部分定位于细胞的质膜上,但也有的存在于液泡膜、高尔基体膜上^[71-72]。

第一个被鉴定的植物 CDF 转运蛋白基因是拟南芥 *ZAT*,包含 398 个氨基酸残基。*ZAT* 在整个植物中组成型表达,锌浓度提高时表达水平增强。当其在转基因植株中过量表达时提高了植株对高锌胁迫的耐性和根部锌积累量。*ZAT* 与液泡/液泡中锌螯合,因此与锌的稳态和耐性有关^[87, 101]。拟南芥中 *ZAT1* 转运蛋白在 *E. coli* 中表达,经纯化和重建

的蛋白脂质体能支持对 Zn 的吸收^[102]。ZAT 后来被命名为 MTP1^[103]。AtMTP1 定位在叶片和根系的液泡膜上^[104]。在拟南芥中还发现 AtMTP3,其在 *zrc1* 和 *cot1* 双缺失的芽殖酵母突变体中表达可以提高酵母耐受锌和钴。实验证明,在野生型拟南芥中,AtMTP3 蛋白在细胞对高量 Zn²⁺ 离子的耐性和分室隔离方面扮演重要角色。拟南芥植株中 AtMTP3 异常的过表达会造成锌在根和叶中的大量积累,对锌的耐性显著增强。当拟南芥野生型植株在外界高锌或钴浓度下但无毒害作用时,会强烈诱导 AtMTP3 在特定的根毛区表皮细胞上表达。用 RNA 干涉沉默 AtMTP3 导致细胞对高锌胁迫敏感^[105]。

在 Zn 富集植物 *T. caerulea* 上发现 ZAT 同源基因 ZTP1。*T. caerulea* 叶片中的转录产物大大高于非富集植物 *T. arvense*,该基因编码的蛋白可能在细胞内 Zn²⁺ 的分室化中发挥重要作用^[118]。从 *A. halleri* 克隆了三个 ZAT 的同源基因 MTP 基因 AhMTP1-3,定位于液泡膜上^[106]。*A. halleri* 对高锌胁迫的耐性与 CDF 家族的 AhMTP1 的多拷贝数和组成型高表达相关,并且锌浓度提高时 AhMTP1 的表达上调。在高锌耐性的 *A. halleri* 和敏感的 *A. lyrata* 为亲本的 BC1 群体中,MTP1 位点与高锌的耐性性状共分离。从耐 Zn/Ni 毒性的 *T. goesingense* 中克隆的 MTP1 在酵母中过量表达可以功能互补 *zrt* 缺失突变体对 Zn 的敏感,也证实了 CDF 家族的基因在高锌耐性中的作用^[107]。

5.4 Mg²⁺/H⁺ 的反向交换转运蛋白

从拟南芥中克隆鉴定出 AtMHX,被认为是一种 Mg²⁺/H⁺ 的反向交换转运蛋白,位于液泡膜上,该蛋白不仅转运 Mg²⁺,也对 Zn²⁺ 具有转运功能^[108]。在 *A. halleri* 鉴定出一个与 AtMHX 同源基因 AhMHX,蛋白 AhMHX 与 AtMHX 有近 98% 的同源性,AhMHX 蛋白也定位在液泡膜上。*A. halleri* 叶片内 AhMHX 蛋白含量比非积累的 *A. thaliana* 高。重金属离子如 Zn²⁺ 被运输贮存于液泡里从而避免积聚在细胞质中。AhMHX 和 AtMHX 基因在两种植物叶片细胞中转录水平类似,两个基因的表达受转录后调控^[109]。

5.5 自然抵抗相关巨噬细胞蛋白(Natural resistance associated macrophage proteins, NRAMP)

小鼠对细胞内病原微生物侵染产生抗性或敏感性是受显性基因 *Bcg*、*Ity* 或 *Lsh* 控制,将该类基因命名为 *Nramp*^[110-111]。在动物中 *Nramp* 作为金属离子转运蛋白基因,表现出对 Fe²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、

Cd²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Pb²⁺ 等离子的吸收转运功能^[112-113]。植物中也发现了其同源序列基因并得到克隆,如在拟南芥中相继克隆了 5 个 *Nramp* 基因 *At-Nramp1-5* 以及水稻中的 3 个 *Nramp* 基因 *OsNramp1-3*。*Nramp* 基因家族编码多肽分子具有典型的膜整合蛋白特征,有 10~12 个跨膜区域,1~2 个糖基化的胞质外环状结构和一个胞质内的转运蛋白特征结构域,具有高度的氨基酸序列同源性和相似的二级结构^[114-115]。拟南芥 *AtNramp1* 能修复酵母 *fet3/fet4* 双缺陷型突变体的缺 Fe 症状,并且在 Fe 缺乏时能够超量表达,可能与 Fe 的吸收和体内平衡有关^[116]。*AtNramp3* 蛋白还可能与 Cd²⁺ 的吸收有关。*At-Nramp1*、*AtNramp2* 和 *AtNramp3* 在酵母菌中的单独表达,发现它们还与 Mn²⁺ 吸收有关。在金属离子浓度增加时这些基因表达受到抑制^[117]。在 Ni 的超积累植物 *Thlaspi japonicum* 克隆到 *TjNramp4* 和 *AtNramp4* 具有同源性,在酵母中表达导致其对 Ni²⁺ 选择性吸收增加,但没有发现对 Zn、Cd 和 Mn 具有运转特性^[118]。目前尚未见到植物 *Nramp* 蛋白转运 Zn²⁺ 的报道。

5.6 其他基因

Haydon 和 Cobbett^[119]从拟南芥中克隆到一个新基因 *ZIF1* (ZINC-INDUCED FACILITATOR 1),属于主要协助因子超家族(Major facilitator superfamily protein)成员。*zif1* 突变体表现出地上部锌积累的特性。*ZIF1* 基因表达受到锌的诱导,该基因编码的蛋白定位在液泡膜上,可能运输锌或锌与配位体复合物进入液泡。

6 植物锌积累的分子标记及数量遗传位点分析

植物许多性状如株高、生育期、产量、品质、养分效率等都属于数量性状,受多个数量基因位点(Quantitative trait loci, QTL)和环境因子的共同作用控制。随着基于 DNA 分子水平上遗传多态性分子标记技术的迅速发展,各种统计软件和分子标记作图软件的日趋完善,植物数量性状遗传位点(QTL)的研究不断深入。近些年来,开始利用数量遗传学手段鉴定控制植物体内锌含量的 QTLs,以期寻找出控制植物高效积累锌的遗传基础规律,最终为克隆相关基因以及辅助培育超积累植物新品种服务。利用来自工业重度污染区生长的 *A. halleri* 和与其亲缘 *A. lyrata* ssp. *petraea* 进行回交,得到后代群体,进行 QTL 分析,共采用 85 个标记来覆盖 *A. halleri*

基因组,其中有 65 个与其它拟南芥基因组共线性。发现有 3 个不同的连锁群,在所有 QTL 位点上,锌耐受性都被 *A. halleri* 等位基因所增强。重要的是,这 3 个区域每个都与 *HMA4*、*MTP1-A* 和 *MTP1-B* 等基因共定位^[120];利用同一回交系群体,还筛选到 3 个 QTL 位点与 Cd 抗性有关,可以解释 16%~43% 的性状变异。其中 *A. halleri* 上编码重金属 ATPase (*HMA4*) 的等位基因与 QTL *Cdtol-1* 位点共定位^[121]。Deniau 等^[122]用来自邻近比利时 La Calamine 污染地区 *T. caerulescens* 的品种和法国 Ganges 非污染地区的品种作为亲本,进行杂交,得到由 129 个后代组成的 F₂ 群体。筛选到两个 QTL 位点与根系中 Zn 和 Cd 浓度有关,3 个 QTL 位点与地上部 Zn 浓度性状有关。选择来自植物 *T. caerulescens* 的高锌积累品系 Lellingen 和低锌积累品系 La Calamine 为亲本,得到杂交 F₃ 代群体,地上部和根部锌浓度等性状出现明显分离特征,在第 3 条和第 5 条染色体上鉴定到两个 QTL 位点与根部锌积累量有关,对性状的贡献率分别为 21.7% 和 16.6%^[123]。将 *A. halleri* 和 *A. petraea* 两亲本杂交,得到一个 F₂ 群体,分别在低锌 10 μmol/L 和高锌 100 μmol/L 浓度下培养,分析 92 个 F₂ 品系叶片中 Zn 含量。低锌条件下,在染色体 3、4 和 7 上鉴定出 QTL 位点与叶片中锌含量连锁,高锌条件下,在染色体 6 和 7 上鉴定出 QTL 位点与叶片中锌含量这一性状有关^[124]。利用 183 个双二倍体(DH)株系构建了大白菜的 AFLP 连锁图谱,该连锁图由 10 个连锁群组成,包括 222 个 AFLP 标记,覆盖基因组长度为 1064 cM,标记间平均间距为 4.8 cM。利用这一图谱,对大白菜叶片 Zn 等矿质元素含量进行了 QTL 分析,找到控 4 个 QTLs 与叶片中 Zn 含量这一性状有关,位于染色体 3、5、8 上。对这一群体的 130 个 DH 株系进行高 Zn 胁迫下耐性的 QTL 分析,发现了一个 100 μmol/L Zn²⁺ 浓度条件下大白菜生物量相关的 QTL 和两个 300 μmol/L Zn²⁺ 浓度条件下植株生物量相关的 QTL^[125]。

培育锌高效作物新品种是解决植物缺的一条重要途径。水稻严重缺锌症状是植株坏死,叶片青铜病发生率通常可以作为水稻对锌缺乏敏感性指标。利用水稻非耐缺锌品种 IR74 耐缺锌品种 Jalmagna 为亲本进行杂交,得到重组近交系群体(RIL),发现 4 个 QTL 位点与缺锌植株死亡率有关,只有一个 QTL 位点与控制叶片青铜病发生率的 QTL 位点共定位。与缺锌植株死亡率有关的两个 QTLs 具有较强的效应,分别位于染色体 2 和 12 上,对性状的贡

献率分别为 16.6% 和 24.2%。随带有来自亲本 Jalmagna 的等位基因的 RIL 品系,其植株死亡率下降了 16.6% 和 14.8%。与植株死亡率有关的 QTL 位点呈现加性特征,而与叶片青铜病有关的 QTL 位点呈现上位性互作(基因位点之间的非加性遗传效应)特征^[54]。

7 展望

全世界缺锌耕地面积近 30%,土壤有效锌不足影响作物生长。解决植物缺锌问题,不仅要依靠施肥,更要加强在细胞与分子水平上研究植物体内锌素营养生理作用机制,鉴定出与锌吸收、运输、分配有关的基因,筛选锌高效作物基因型,培育优良的作物品种。尽管目前已发现参与植物体内锌离子的跨膜运输蛋白:ZIP、NRAMP、重金属 ATPase 酶、CDF、镁离子/H⁺ 反向转运蛋白。但是对这些运转蛋白的生理生化作用机制及其调控机理,仍需加强研究。

重金属锌污染问题受到广泛关注。植物重金属 Zn 耐性机理特别是分子生理机理方面的研究发展迅速。加强分子生物学和生态学原理的结合,为污染生态学的研究开辟了广阔的研究领域,但目前这些研究只是集中在少数植物(如拟南芥和遏蓝菜等)上,相关基因在植物基因工程中的应用有待进一步拓宽,深入研究植物超积累锌不同过程中分子机理的协同作用,改进技术手段,培育出一批生物量大、实用性强的锌超积累植物,对锌污染土壤的进行有效生物修复,具有重要意义。

参 考 文 献:

- [1] Barak P, Helmke P A. The chemistry of zinc [A]. Robson A D (ed). Zinc in soil and plants [M]. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. 1-13.
- [2] Auld D S. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites [J]. Biometals, 2001. 14: 271-313.
- [3] Broadley M R, White P J, Hammond J P et al. Zinc in plants [J]. New Phytol., 2007, 173: 677-702.
- [4] Sillanpää M. Micronutrients and the nutrient status of soils: A global study [M]. Rome, Italy: FAO, 1982.
- [5] Mazé P. Influences respectives des éléments de la solution minérale sur le développement du maïs [J]. Inst. Pasteur. Ann., 1914, 28: 21-68.
- [6] Sommer A L, Lipman C B. Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants [J]. Plant Physiol., 1926, 1: 231-249.
- [7] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants (2nd ed) [M]. London: Academic Press, 1995.
- [8] Reeves R D, Baker A J M. Metal-accumulating plants [A]. Raskin I, Ensley B D (eds). Phytoremediation of toxic metals: Using plants to

- clean up the environmen[M]. New York , USA : John Wiley & Sons , 2000 . 193-229 .
- [9] Assunção A G L , Schat H , Aarts M G M . *Thlaspi caerulescens* , an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants [J]. New Phytol . , 2003 , 159 : 351-360 .
- [10] Macnair M R . The hyperaccumulation of metals by plants [J]. Adv . Bot . Res . , 2003 , 40 : 63-106 .
- [11] Zhao F J , Lombi E , Breedon T , MacGrath S P . Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri* [J]. Plant , Cell Environ . , 2000 , 23 : 507-514 .
- [12] Bert V , Bonnin I , Saumitou-Laprade P *et al.* Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations ? [J]. New Phytol . , 2002 , 155 : 47-57 .
- [13] 杨肖娥 , 龙新宪 , 倪吾钟 , 傅承新 . 东南景天(*Sedum alfredii* H)—一种新的锌超积累植物 [J]. 科学通报 , 2002 , 47 (13) : 1003-1006 .
Yang X E , Long X X , Ni W Z , Fu C X . *Sedum alfredii* H : A new Zn hyperaccumulating plant first found in China [J]. Chin . Sci . Bull . , 2002 , 47 (13) : 1003-1006 .
- [14] Salt D E , Prince R C , Baker A J M *et al.* Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X - ray absorption spectroscopy [J]. Environ . Sci . Tech . , 1999 , 33 : 713-717 .
- [15] 熊愈辉 杨肖娥 , 叶正钱 , 龙新宪 . 两种生态型东南景天锌吸收与分布特性的研究 [J]. 浙江农业大学学报 , 2003 , 29 (6) : 614-620 .
Xiong Y H , Yang X E , Ye Z Q , Long X X . Study on zinc uptake and distribution in zinc hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ecotypes of *Sedum alfredii* Hancé [J]. J . Zhejiang Univ . (Agric . & Life Sci .) , 2003 , 29 (6) : 614-620 .
- [16] Clemens S . Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis [J]. Planta , 2001 , 212 : 475-486 .
- [17] Verkleij J A C , Koevoets P L M , Blake-Kalff M M A , Chardonens A N . Evidence for an important role of the tonoplast in the mechanism of naturally selected Zn tolerance in *Silene vulgaris* [J]. J . Plant Physiol . , 1998 , 153 : 188-191 .
- [18] Küpper H , Lombi E , Zhao F J , McGrath S P . Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. Planta , 2000 , 212 : 75-84 .
- [19] Sarret G , Saumitou-Laprade P , Bert V , Proux O *et al.* Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. Plant Physiol . , 2002 , 130 : 1815-1826 .
- [20] Küpper H , Zhao F J , McGrath S P . Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. Plant Physiol . , 1999 , 119 : 305-311 .
- [21] Bowen H J M , Cause P A , Thick J . The distribution of some inorganic elements in plant tissue extracts [J]. J . Exp . Bot . , 1962 , 13 : 257-267 .
- [22] Johnson W J , Schrenk W G . Zinc in plant nutrition , nature of zinc containing substances in the alfalfa plant cell [J]. J . Agric . Food Chem . , 1964 , 12 : 210-213 .
- [23] Peterson P I . The distribution of Zinc-65 in *Agrostis tenuis* sibth . and *A . stolonifera* L . Tissues [J]. J . Exp . Bot . , 1969 , 20 : 863-875 .
- [24] Welch R M , House W A , Van Campen D . Effects of oxalic acid on availability of zinc from spinach leaves and zinc sulfate to rats [J]. J . Nutr . , 1976 , 107 : 923-933 .
- [25] Cakmak I , Marschner H . Mechanism of phosphorous-induced zinc deficiency in cotton . III : Changes in physiological availability of zinc in plants [J]. Physiol . Plant , 1987 , 70 : 13-20 .
- [26] Callahan D L , Baker A J M , Kolev S P , Wedd A G . Metal ion ligands in hyperaccumulating plants [J]. J . Biol . Inorg . Chem . , 2006 , 11 : 2-12 .
- [27] Wójcik M , Skórzyńska-Polit E , Tukiendorf A . Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress [J]. Plant Growth Regul . , 2006 , 48 : 145-155 .
- [28] Rauser W E . Phytochelatin and related peptides : structure , biosynthesis and function [J]. Plant Physiol . , 1995 , 109 : 1141-1149 .
- [29] Sun Q , Wang X R , Ding S M , Yuan X F . Effects of interactions between cadmium and zinc on phytochelatin and glutathione production in wheat (*Triticum aestivum* L .) [J]. Environ . Toxicol . , 2005 , 20 : 195-201 .
- [30] Hangavel P . Changes in phytochelatin and their biosynthetic intermediates in red spruce (*Picea rubens* Sarg .) cell suspension cultures under cadmium and zinc stress [J]. Plant Cell Tiss . Org . Cult . , 2007 , 88 : 201-216 .
- [31] Rea P A . Plant ATP-binding cassette transporters [J]. Ann . Rev . Plant Biol . , 2007 , 58 : 347-375 .
- [32] Moons A . Ospsd9 , which encodes a PDR-type ABC transporter , is induced by heavy metals , hypoxic stress and redox perturbations in rice roots [J]. FEBS Lett . , 2003 , 553 : 370-376 .
- [33] Lane B G , Kajioka R , Kennedy T D . The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein [J]. Biochem . Cell Biol . , 1987 , 65 : 1001-1005 .
- [34] Rauser W E . Structure and function of metal chelators produced by plants—the case for organic acids , amino acids , phytin , and metallothioneins [J]. Cell Biochem . Biopy . , 1999 , 31 : 19-48 .
- [35] Haydon M J , Cobbett C S . Transporters of ligands for essential metal ions in plants [J]. New Phytol . , 2007 , 174 : 499-506 .
- [36] Tolrà R P , Poschenrieder C , Barceló J . Zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* . II . Influence on organic acids [J]. J . Plant Nutr . , 1996 , 19 : 1541-1550 .
- [37] Emmerlich V , Linka N , Reinhold T *et al.* The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier [J]. Proc . Natl . Acad . Sci . USA , 2003 , 100 : 11122-11126 .
- [38] Hurth M A , Suh S J , Kretzschmar T *et al.* Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast [J]. Plant Physiol . , 2005 , 137 : 901-910 .
- [39] Tiffin L O . Translocation of manganese , iron , cobalt , and zinc in tomat [J]. Plant Physiol . , 1967 , 42 : 1427-1432 .
- [40] McGrath J F . Some aspects of the zinc nutrition of *Pinus radiata* D . Dor [D]. Nedlands , Australia : PhD thesis , The University of West-

- ern Australia, 1982.
- [41] White M, Decker A, Chaney R. Metal complexation in xylem fluid. I: Chemical composition of tomato and soybean stem exudates[J]. *Plant Physiol.*, 1981, 67: 292–300.
- [42] Mullins G L, Sommers L E, Housley T L. Metal speciation in xylem and phloem exudates[J]. *Plant Soil*, 1986, 96: 377–391.
- [43] Robson A D, Pitman M G. Interactions between nutrients in higher plants[A]. Lauchli A, Bielecki R L (eds). *Encyclopedia of plant physiology* (New Series, Vol. 15 [M]. Berlin/Heidelberg: Springer – Verlag. 1983. 147–180.
- [44] Hacisalihoglu G, Kochian LV. How do some plants tolerate low levels of soil zinc? Mechanisms of zinc efficiency in crop plants[J]. *New Phytol.*, 2003, 159: 341–350.
- [45] Santa Maria G E, Cogliatti D H. Bidirectional Zn-fluxes and compartmentation in wheat seedling roots[J]. *J. Plant Physiol.*, 1988, 132: 312–315.
- [46] Veltrup W. Characteristics of zinc uptake by barley roots[J]. *Physiol. Plant*, 1978, 42: 190–194.
- [47] Mullins G L, Sommers L E. Cadmium and zinc influx characteristics by intact corn (*Zea mays* L.) seedlings[J]. *Plant Soil*, 1986, 96: 153–164.
- [48] Hacisalihoglu G., Hart J J, Kochian L V. High- and low-affinity zinc transport systems and their possible role in zinc efficiency in bread wheat[J]. *Plant Physiol.*, 2001, 125: 456–463.
- [49] Bowen J E. Kinetics of zinc absorption by excised roots of two sugarcane clones[J]. *Plant Soil*, 1973, 39: 125–129.
- [50] Bowen J E. Kinetics of zinc uptake by two rice cultivars[J]. *Plant Soil*, 1986, 94: 99–107.
- [51] Bowen J E. Physiology of genotypic differences in zinc and copper uptake in rice and tomato[J]. *Plant Soil*, 1987, 99: 115–125.
- [52] Degryse F. Mobilization of Cu and Zn by root exudates of dicotyledonous plants in resin-buffered solutions and in soil[J]. *Plant Soil*, 2007, 306: 69–84.
- [53] Hoffland E, Wei C, Wissuwa M. Organic anion exudation by lowland rice (*Oryza sativa* L.) at zinc and phosphorus deficiency[J]. *Plant Soil*, 2006, 283: 155–162.
- [54] Wissuwa M, Ismail A M, Yanagihara S. Effects of zinc deficiency on rice growth and genetic factors contributing to tolerance[J]. *Plant Physiol.*, 2006, 142: 731–741.
- [55] Zhang F S, Romheld V, Marschner H. Release of zinc mobilizing root exudates in different plant-species as affected by zinc nutritional status[J]. *J. Plant Nutr.*, 1991, 14: 657–686.
- [56] Walter A, Romheld V, Marschner H, Mori S. Is the release of phytosiderophores in zinc-deficient wheat plants a response to impaired iron utilization? [J] *Physiol. Plant*, 1994, 92: 493–500.
- [57] Cakmak I, Sari N, Marschner H *et al.* Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency[J]. *Plant Soil*, 1996, 180: 183–189.
- [58] Mori S, Nishizawa N. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in *Graminaceae* plants[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1987, 28: 1081–1092.
- [59] Suzuki M, Takahashi M, Tsukamoto T *et al.* Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley [J]. *Plant J.*, 2006, 48: 85–97.
- [60] Douchkov D, Gryczka C, Stephan U W *et al.* Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Environ.*, 2005, 28: 365–374.
- [61] Weber M, Harada E, Vess C V *et al.* Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors[J]. *Plant J.* 2004, 37: 269–281.
- [62] 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: 346–349.
- [63] Roberts L A, Pierson A J, Panaviene Z, Walker E L. Yellow stripe1 expanded roles for the maize iron-phytosiderophore transporter[J]. *Plant Physiol.*, 2004, 135: 112–120.
- [64] von Wiren N, Klair S, Bansal S *et al.* Nicotianamine chelates both Fe [III] and Fe [II]. Implications for metal transport in plants[J]. *Plant Physiol.*, 1999, 119: 1107–1114.
- [65] 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 J.*, 2004, 39: 415–424.
- [66] DiDonato R J, Roberts L A, Sanderson T *et al.* *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2* (*YSL2*): A metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes[J]. *Plant J.*, 2004, 39: 403–414.
- [67] Le Jean M, Schikora A, Mari S *et al.* A loss-of-function mutation in *AtYSL1* reveals its role in iron and nicotianamine seed loading[J]. *Plant J.*, 2005, 44: 769–782.
- [68] 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 Physiol.*, 2006, 141: 1446–1458.
- [69] Gendre D, Czernic P, Conejero G *et al.* *TcYSL3*, a member of the YSL gene family from the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotianamine-Ni/Fe transporter[J]. *Plant J.*, 2007, 49: 1–15.
- [70] Grotz N, Guerinet M L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants[J]. *Bioch. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, 2006, 1763: 595–608.
- [71] 王祥, 李鹏, 印莉萍. 酵母和植物的锌转运系统及其调控[J]. *植物学通报*, 2007, 24(6): 799–806.
Wang X, Li P, Yin L P. Transport system and regulation of zinc in yeast and plants[J]. *Chin. Bull. Bot.*, 2007, 24(6): 799–806.
- [72] Hall L, Williams L E. Transition metal transporters in plants[J]. *J. Exp. Bot.*, 2003, 54: 2601–2613.
- [73] Gaither L A, Eide D J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation[J]. *Biomaterials*, 2001, 14: 251–270.
- [74] Guerinet M L. The ZIP family of metal transporters[J]. *Bioch. Biophys. Acta*, 2000, 1465: 190–198.
- [75] Maser P, Thomine S, Schroeder J I *et al.* Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*,

- 2001, 126 : 1646–1667.
- [76] Moreau S , Thomson R M , Kaiser B N *et al.* GmZIP1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean[J]. *J. Biol. Chem.* , 2002 , 15 : 4738–4746.
- [77] Lopez-Millan A F , Ellis D R , Grusak M A. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*[J]. *Plant Mol. Biol.* , 2004 , 54 : 583–596.
- [78] Bughio N , Yamaguchi H , Nishizawa N K *et al.* Cloning an iron-regulated metal transporter from rice[J]. *J. Exp. Bot.* , 2002 , 53 : 1677–1682.
- [79] Ramesh S A , Shin R , Eide D J , Schachtman D P. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice[J]. *Plant Physiol.* , 2003 , 133 : 126–134.
- [80] Ishimaru Y , Suzuki M , Kobayashi T *et al.* OsZIP4 , a novel zinc-regulated zinc transporter in rice[J]. *J. Exp. Bot.* , 2005 , 56 : 3207–3214.
- [81] Ishimaru Y , Masuda H , Suzuki M *et al.* Overexpression of the OsZIP4 zinc transporter confers disarrangement of zinc distribution in rice plants[J]. *J. Exp. Bot.* , 2007 , 58 : 2909–2915.
- [82] Eide D , Broderius M , Fett J , Guerinot M L. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1996 , 93 : 5624–5628.
- [83] Vert G , Grotz N , Dedaldechamp F *et al.* IRT1 , an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth [J]. *Plant Cell* , 2002 , 14 : 1223–1233.
- [84] Grotz N , Fox T , Connolly E *et al.* Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1998 , 95 : 7220–7224.
- [85] Pence N S , Larsen P B , Ebbs S D *et al.* The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 2000 , 97 : 4956–4960.
- [86] Assunção A , Da Costa G L , Martins P *et al.* Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. *Plant Cell Environ.* 2001 , 24 : 217–226.
- [87] van der Zaal B J , Neuteboom L W , Pinas J E *et al.* Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation [J]. *Plant Physiol.* , 1999 , 119 : 1047–1055.
- [88] Becher M , Talke I N , Krall L , Krämer U. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. *Plant J.* , 2004 , 37 : 251–268.
- [89] Weber M , Harada E , Vess C V *et al.* Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase , a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors[J]. *Plant J.* , 2004 , 37 : 269–281.
- [90] Baxter I , Tchiew J , Sussman M R *et al.* Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiol.* , 2003 , 132 : 618–628.
- [91] Williams L E , Pittman J K , Hall J L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants[J]. *Bioch. Biophys. Acta* , 2000 , 1465 : 104–126.
- [92] Williams L E , Mills R F. P_(1B)-ATPases—An ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants[J]. *Trends Plant Sci.* , 2005 , 10 : 491–502.
- [93] Axelsen K B , Palmgren MG. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.* , 2001 , 126 : 696–706.
- [94] Woeste K E , Kieber J J. A strong loss-of-function mutation in *RAN1* results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype[J]. *Plant Cell* , 2000 , 12 : 443–455.
- [95] Mills R F , Krijger G C , Baccarini P J *et al.* Functional expression of AtHMA4 , a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass[J]. *Plant J.* , 2003 , 35 : 164–176.
- [96] Eren E , Argüello J M. *Arabidopsis* HMA2 , a divalent heavy metal-transporting P (I_B)-type ATPase , is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis[J]. *Plant Physiol.* , 2004 , 136 : 3712–3723.
- [97] Verret F , Grivot A , Auroy P *et al.* Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance[J]. *FES Lett.* , 2004 , 576 : 306–312.
- [98] Verret F , Grivot A , Auroy P *et al.* Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch[J]. *FEBS Lett.* , 2005 , 579 : 1515–1522.
- [99] Papoyan A , Kochian L V. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase[J]. *Plant Physiol.* , 2004 , 136 : 3814–3823.
- [100] Hussain D , Haydon M J , Wang Y *et al.* P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell* , 2004 , 16 : 1327–1339.
- [101] Krämera U , Talke I N , Hanikenne M. Transition metal transport [J]. *FEBS Lett.* , 2007 , 581 : 2263–2272.
- [102] Bloß T , Clemens S , Nies H. Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes[J]. *Planta* , 2002 , 214 : 783–791.
- [103] Desbrosses-Fonrouge AG. , Voigt K , Schroder 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 Lett.* , 2005 , 579 : 4165–4174.
- [104] 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 Physiol.* , 2004 , 45 : 1749–1758.
- [105] Arrivault S , Senger T , Krämer U. The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply[J]. *Plant J.* , 2006 , 46 : 861–879.
- [106] Dräger D B , Desbrosses-Fonrouge A G. , Krach C *et al.* Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co-segre-

- gate with zinc tolerance and account for high *MTP1* transcript levels [J]. *Plant J.* , 2004 , 39 : 425–439.
- [107] Kim D , Gustin J L , Lahner B *et al.* The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Plant J.* , 2004 , 39 : 237–251.
- [108] Shaul O , Hilgemann D W , Almeida-Engler J *et al.* Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger[J]. *EMBO J.* , 1999 , 18 : 3973–3980.
- [109] Elbaz B , Shoshani-Knaani N , David-Assael O *et al.* High expression in leaves of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* of AhMHX , a homolog of an *Arabidopsis thaliana* vacuolar metal/proton exchanger[J]. *Plant Cell Environ.* , 2006 , 29 : 1179–1190.
- [110] Skamene E , Pietrangeli C E. Genetics of the immune response to infectious pathogens[J]. *Curr. Opin. Immunol.* , 1991 , 3 : 511–517.
- [111] Belouchi A , Cellier M , Kwan T *et al.* The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural to infections in mice has homologous expressed in the root system of plants[J]. *Plant Mol. Biol.* , 1995 , 29 : 1181–1196.
- [112] Cellier M , Gros P. The NRAMP family[M]. New York : Eureka.com and Kluwer Academic/Plenum. 2004.
- [113] Nevo Y , Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters [J]. *Bioch. Biophys. Acta* , 2006 , 1763 : 609–620.
- [114] Cellier M , Prive G , Belouchi A *et al.* Nramp defines a family of membrane proteins[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 1995 , 92 : 10089–10093.
- [115] Colangelo E P , Guerinot M L. Put the metal to the petal : metal uptake and transport throughout plants[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.* , 2006 , 9 : 322–330.
- [116] Curie C , Alonso J M , Le Jean M *et al.* Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport[J]. *Bioch. J.* , 2000 , 347 : 749–755.
- [117] Thomine S , Wang R , Ward J M *et al.* Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 2000 , 97 : 4991–4996.
- [118] Mizuno T , Usui K , Horie K *et al.* Cloning of three *ZIP/Nramp* transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni^{2+} -transport abilities [J]. *Plant Physiol. Biochem.* , 2005 , 43 : 793–801.
- [119] Haydon M J , Cobbett C S. A Novel major facilitator superfamily protein at the tonoplast influences zinc tolerance and accumulation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.* , 2007 , 143 : 1705–1719.
- [120] Willems G B , Drager D , Courbot M *et al.* The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *Halleri* (*Brassicaceae*) : an analysis of quantitative trait loc[J]. *Genetics* , 2007 , 176 : 659–674.
- [121] Courbot M , Willems G , Motte P *et al.* A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4* , a gene encoding a heavy metal ATPase[J]. *Plant Physiol.* , 2007 , 144 : 1052–1065.
- [122] Deniau A X , Pieper B , Ten Bookum W M *et al.* QTL analysis of cadmium and zinc accumulation in the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. *Theor. Appl. Genet.* , 2006 , 113 : 907–920.
- [123] Assunção A G. , Pieper B , Vromans J *et al.* Construction of a genetic linkage map of *Thlaspi caerulescens* and quantitative trait loci analysis of zinc accumulation[J]. *New Phytol.* , 2006 , 170 : 21–32.
- [124] Filatov V , Dowlle J , Smirnov N *et al.* A quantitative trait loci analysis of Zinc hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*[J]. *New Phytol.* , 2007 , 174 : 580–590.
- [125] 武剑. 白菜类蔬菜锌积累和锌胁迫反应的遗传分析[D]. 北京 : 中国农业科学院研究生院博士论文 , 2005.
- Wu J. Genetic dissection of Zn accumulation and response to Zn stress in *Brassica rapa* L. vegetable varieties[D]. Beijing : PhD thesis , Chinese Academy of Agriculture Sciences , 2005.