

植物螯合肽及其在抗重金属胁迫中的作用

蔡保松^{1,2,3}, 雷 梅², 陈同斌^{2*}, 张国平¹, 陈 阳²

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029; 2. 中国科学院地理科学与资源研究所环境修复室, 北京 100101; 3. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

摘要:植物螯合肽(PCs)广泛存在于植物体中,与植物抗重金属胁迫关系密切。植物螯合肽及其复合物是一类富含半胱氨酸的低分子量化合物。现有研究证明,PCs 由谷胱甘肽(GSH)为底物的酶促反应合成,其合成受相关基因的调控,从模式植物拟南芥的突变体中已分离到与 PCs 合成有关的几个基因。植物螯合肽首先与重金属离子结合形成低分子量(LMW)复合物,以此形态经由细胞质进入液泡后,再与一个分子的植物螯合肽结合,形成对植物组织毒性较小的高分子量(HMW)复合物,从而达到缓解重金属对植物的危害作用。就植物螯合肽及其复合物的结构、生物合成、基因调控及重金属解毒机理等进行了综述,并对今后的研究方向提出了一些看法。

关键词:植物螯合肽;重金属;植物毒性;抗性

Phytochelatins and their roles in phyto-tolerance to heavy metals: A review

CAI Bao-Song^{1,2,3}, LEI Mei², CHEN Tong-Bin², ZHANG Guo-Ping¹, CHEN Yang²

(1. Department of Agronomy, Huajiachi Campus, Zhejiang University, Huangzhou 310029, China; 2. Laboratory of Environmental Remediation, Institute of Geographic Sciences and Natural Resources Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. College of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(10): 2125~2132.

Abstract: Phytochelatins (PCs) commonly found in plants are verified to be closely related to the phyto-tolerance of metal heavy. Phytochelatins and their complexes are low molecular weight (LMW) complexes which are rich in cysteine analogues. It has been proven that PCs is synthesized through enzyme catalysis reaction using glutathione (GSH) as the substrate and regulated by relevant genes. Genes involved in PC synthesis have been isolated and identified in the mutants of *Arabidopsis*, a model plant widely used in genetic study. The PCs in plants can combine with heavy metal ions to form LMW compounds and then be transported into vacuole via symplast. The LMW complex may combine with another molecular of PC to form high molecular weight complex (HMW) with lower phytotoxicity which leads to alleviate the phytotoxicity of heavy metal. In this paper, chemical structure, bio-synthesis and genetic regulation of phytochelatins and their compounds, as well as the processes and possible mechanisms related to the

基金项目:北京市自然科学基金重大资助项目(6990002);国家自然科学基金重点资助项目(40232022);中国科学院知识创新工程重点方向资助项目(KZCX2-401)

收稿日期:2003-01-10; **修订日期:**2003-05-22

作者简介:蔡保松(1971~),男,上海人,博士生,讲师,主要从事污染环境修复研究。

* 通信作者 Author for correspondence, E-mail: chentb@igsnrr.ac.cn

Foundation Item: Natural Science Foundation of Beijing (No. 6990002); National Natural Science Foundation of China (No. 40232022) and Chinese Academy of Sciences Innovation Program (No. KZCX-401-01)

Received date: 2003-01-10; **Accepted date:** 2003-05-22

Biography: CAI Bao-Song, Ph. D. candidate, main research field: phytoremediation.

alleviation of phytotoxicity of heavy metal are reviewed.

Key words: phytochelatins (PCs); heavy metal; phytotoxicity; tolerance

文章编号: 1000-0933(2003)10-2125-08 中图分类号: Q142, Q948.1, X171 文献标识码: A

重金属污染已经成为一个重要的环境问题^[1,2]。重金属毒害达到一定程度,植物就会表现出种种中毒症状,如生长迟缓、植株矮小和退绿等,最终停止生长。但是,植物在长期的进化过程中形成了一种适应性机制,一些植物表现出较强的重金属抗性。明确植物抗重金属的生理和分子机理,寻找化学调控途径和开展抗性育种以增强植物对重金属的抗性,从而提高植物在污染环境下的适应范围和生产能力,对于高效利用自然资源和进行污染环境的生物修复均具有重要意义。

到目前为止,植物抵御重金属毒害一般有 3 种机理:①通过限制对重金属离子的吸收,从而避免细胞受到伤害^[3];②通过谷胱甘肽(GSH)、草酸、组氨酸和柠檬酸盐等小分子化合物,以及金属硫蛋白(MT)和植物螯合肽(PCs)等配位体螯合重金属的方式解毒^[3,4];③区室化(compartmentalization)作用,即将吸收的重金属积累在植物的特定部位,从而与细胞中其他组分隔离,达到解毒效果^[5]。PCs 是植物体内在重金属诱导下产生的一类多肽,对重金属离子的螯合能力很强,在重金属的累积和解毒过程中发挥重要作用。PC 对重金属解毒的机理是重金属离子进入植物体后,与细胞内的 PC 结合形成复合物,然后转运到特定的细胞器(主要为液泡),进行区室化固定,从而使细胞质中有毒金属离子浓度降低到植物能够忍耐的程度。本文主要侧重于评述 PCs、LMW 和 HMW 与植物抗重金属胁迫的关系以及 PCs 的生物合成与基因调控。

1 PCs 解毒机理

目前在植物中已发现有两类重金属结合肽,即 MT 和 PCs^[5]。根据重金属与 PCs 形成的复合物在交联葡聚糖(sephadex G50)分子筛凝胶过滤层析中洗脱峰曲线迁移率的差异,可将它们大致分为植物螯合肽(PCs)高分子量植物螯合肽复合物(HMW)和低分子量植物螯合肽复合物(LMW)3 种类型。MT 是一类由基因编码的、富含半胱氨酸的低分子量多肽,可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络合物,从而降低重金属毒害。然而在高等植物中分离到最多的一类重金属结合肽是 PCs^[6]。

重金属 Cd^{2+} 进入植物后,首先与 PCs 结合形成 LMW 复合物,在 *hmt1* 膜转运蛋白作用下,转入液泡内;同时,镉离子在 $\text{H}^+/\text{Cd}^{2+}$ 逆向转运蛋白(antiporter)的作用下,进入液泡内; S^{2-} 在 *hmt2* 膜转运蛋白作用下进入液泡内。然后,LMW 复合物、PC、 S^{2-} 和 Cd^{2+} 在液泡内合成 HMW 复合物,并固定在液泡内^[7]。HMW 复合物对植物的毒性较低,植物正是通过形成 HMW 复合物使植物免受重金属毒害,产生对重金属离子的抵抗能力。

2 PCs 的种类和结构

PCs 是一种由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的含巯基多肽,分子量一般为 1.5~4KD。研究发现,PCs 都包含有共同的结构特征 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-X}$ ($n=2\sim 11$, X 是三肽的 C-端氨基酸)^[7]。现已发现 5 类 C-端氨基酸不同的 PCs,分别是: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ 、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ 、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ 、 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ 和 $\gamma\text{-(Glu-Cys)}_n$ ^[8]。

Grill 等^[9]用凝胶过滤层析法,从经 200 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理的蛇根木(*Rauvolfia serpentina*)中首次分离到 Cd-螯合物,通过 HPLC 反向柱层析,纯化出 5 种金属螯合物,分子量约 1.04KD,并在 220nm 处具吸收峰。水解后发现,这些螯合剂是由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的含巯基螯合物,其主体结构为: $(\text{NH}_3^+)-\gamma\text{-Glu-Cys-}\gamma\text{-Glu-Cys-}\gamma\text{-Glu-Cys-Gly-COO}^-$ 。一些研究在 Cd 胁迫的真菌中也检测到这类螯合物,并称之为镉胍(Cadystin),意为 Cd 与半胱氨酸的复合物^[10,11]。Gekeler 等^[12]最初从重金属胁迫的水藻中分离到这类螯合物,不久用 Cd 及其它几种重金属处理苔藓类、蕨类和种子类植物的 200 多个物种中也检测到解毒型重金属螯合物,并首次提出了植物螯合肽(phytochelatins)的概念,其分子式为: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2\sim 11$),简称为 PC_n , n 指 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 的重复数^[13]。Mehra 等^[14]发现, Cu 过多诱导假丝酵母(*Candida glabrata*)生成 PC 和 MT, Kneer 等^[15]在啤酒酵母和脉孢菌属中也有类似报道。迄今已从蛇根木、烟草、毛曼陀罗、菜豆、玉米、番茄、甘蓝和小麦等植物中证实了 PC 的存在(表 1)。

采用同步辐射扩展 X 射线衍射吸收精细结构分析技术(EXAFS)的研究结果表明,PC 复合物中 Cd-S 内部直径为 $2.52 \pm 0.02 \text{ \AA}$ [22]。Mancanza 等[23]采用计算机辅助半经验方法研究 PC 复合物发现, $\text{Cd}(\text{PC}_1)_2$ 是一种线性配位体的复合物, $\text{Cd}(\text{PC}_1)_2$ 复合物中 S—Cd—S 的键角为 175.7° , 键长为 $2.42 \text{ \AA}$ 。 $\text{Cd}(\text{PC}_2)_2$ 是一种非四面体立体结构的复合物, 镉原子位于硫原子形成的非正四面体的中央, Cd—S 平均键长为 $2.6 \text{ \AA}$ 。 HMW 与 LMW 结构特征上的差别主要是在是否含有硫原子, HMW 的主要结构物质是 $\text{Cd}(\text{PC}_2)_2$, 结构中含有 S^{2-} 化合物, LMW 的主要结构物质是 $\text{Cd}(\text{PC}_1)_2$, 其分子中不含 S^{2-} 化合物[24]。

表 1 已从植物中分离出来 PCs 及其种类

Table 1 Types of PCs isolated from different plant species

类别 Types	结构式 Structure	首次发现的植物 First identified species	主要存在的植物 The relevant plants
PCs	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n=2\sim 11$)	蛇根木 (<i>Rauvolfia serpentina</i>)	蛇根木 (<i>Rauvolfia serpentina</i>)、烟草 (<i>Nicotiana</i>)、毛曼陀罗 (<i>D. metal</i>)、菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)、玉米 (<i>Zea mays</i>)、番茄 (<i>Lycopersicon mill</i>)、甘蓝 (<i>Brassica oleracea</i>) 和小麦 (<i>Triticum linn</i>) 等植物[9,13]
丙氨酸类 PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ ($n=2\sim 7$)	菜豆 (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	豆科植物 (<i>Leguminosae</i>) [16,17]
谷氨酸类 PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ ($n=2\sim 3$)	玉米 (<i>Zea mays</i>)	玉米 (<i>Zea mays</i>) [18,19]
丝氨酸类 PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ ($n=2\sim 4$)	水稻 (<i>Oryza linn.</i>)	水稻 (<i>Oryza linn.</i>) [17]
缺甘氨酸 PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ ($n=3\sim 4$)	玉米 (<i>Zea mays</i>)、辣根 (<i>Armoracia rusticana</i>)	玉米 (<i>Zea mays</i>)、辣根属 (<i>Armoracia gaertn.</i>) [20,21]
谷氨酰胺类 PC	$(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gln}$ ($n=3\sim 4$)	辣根 (<i>Armoracia rusticana</i>)	辣根属 (<i>Armoracia gaertn.</i>) [21]

3 PCs 的生物合成及调控

PCs 是一类酶促合成的、富含半胱氨酸的低分子量多肽, 最早在粟酒裂殖菌属酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 中发现, 随后又在某些细菌、藻类和几乎所有植物中发现, 其生物合成途径是通过在一些模式植物中的研究所发现的。

3.1 PCs 的生物合成

现有研究证明, PC 由谷胱甘肽 (GSH) 为底物的酶促反应合成。图 1 是 PC 生物合成的一般途径[25]。

首先 γ -GCS 依靠 ATP 将 Glu 和 Cys 连接成 γ -Glu-Cys, 然后由 ATP 供给能量, 谷胱甘肽合成酶 (GS) 在 γ -Glu-Cys 的 C-末端连接一个 Gly 残基, 从而合成一个分子的 γ -Glu-Cys-Gly, 即 GSH。关于 GSH 如何生成 PCs, 研究者普遍赞同由 γ -谷氨酰半胱氨酸二肽基转肽酶 (γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase, EC 2.3.2.15), 即植物螯合肽合成酶 (Phytochelatase, PCS) 催化合成的观点[23,26,27]。其催化合成过程为: PC 合成酶中 N 端具有激活域, 在 C 端具有信号检测域, 在无 Cd^{2+} 存在时, C 端信号检测域没有触发信号, 所以 N 端激活域没有酶活性; 当溶液中存在 Cd^{2+} 时, 信号检测域感受到镉离子存在的信号, 并与 Cd^{2+} 、Cys 结合形成特殊的空间伸展结构, 使 N 端激活域具有催化活性。在 N 端激活域, 一分子的 GSH 在 PC 合成酶催化下与另一分子的 GSH 合成 PC_2 , PC_2 被继续催化与 GSH 合成 PC_3 , 重复这一过程直至反应合成 PC_{n+1} [8]。Grill 等通过蝇子草属 (*Silene cucubalis*) 细胞培养, 以 GSH 为底物首次合成了 PC [28]。

3.2 PCs 生物合成的调控

目前主要通过两个方面对 PCs 的生物合成途径进行调控: 对 GSH 生物合成的调控和对 PCS 活性的调控。人们通过转基因方法增加了印度芥 (*Brassica juncea*) GSH 生物合成酶的表达来增加印度芥的 PC 合成水平, 进而提高了印度芥的耐镉能力[29,30]。这证明可以通过调节 GSH 的生物合成途径来调节 PC 在植物

Cd^[36]。Verkleij 等^[37]也报道,根系所吸收的 Cd 至少有 60% 是以 PC 结合物形式存在。研究还发现,在很低重金属浓度的处理下就能在植物组织和细胞培养中检测到 PCs;通过细胞培养试验也观察到 PC 合成水平的变化与介质中金属离子的增减呈正相关。在重金属污染下,许多植物都会产生植物螯合肽,如大多数植物和真菌产生 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ 类螯合肽,豆科植物产生 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ 类螯合肽,水稻产生 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ 类螯合肽^[38]。Kneer^[39]等研究抗铜锌植物发现,其体内能够产生大量不同类型的寡肽,此种寡肽主要为不同分子量的 PCs。

PC 与金属离子结合,减少金属离子对植物的毒害从而增强植物抵抗重金属胁迫的作用^[39~42]。试验表明,在 $0.6\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 浓度处理下,不能合成 PC 的拟南芥突变体表现出中毒症状^[43],但是,通过向溶液中加入外源 PC,突变体却能够在这—浓度下正常生长。PCs 与植物抗性有密切的关系,其原因在于:PCs 与重金属结合,可以保护对重金属敏感的酶的活性。例如,Zn 以 PCs-Zn 络合形态存在时,对锌较敏感的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)的活性很少受到影响。体外培养表明,1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶、硝酸还原酶、乙醇脱氢酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、脲酶均受硝酸镉的抑制。在相同 Cd 浓度下硝酸镉对上述几种酶的抑制能力要比 PCs-Cd 大 10-1000 倍^[39]。另外,PCs 与 Cu、Zn 络合的金属离子还有激活酶活性的功能。室内试验已经证明,PC-Cu 和 PC-Zn 复合物能够激活铜诱导性二氨氧化酶(diamino oxidase, DAO)和锌诱导性碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)^[44]。在所有的 PC-Zn 复合物中,Zn- $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}]$ 有较强的激活碳酸酐酶/加氧酶的能力。由醋酸镉引起失活的硝酸还原酶活性还能够为 PCs 所复活。

4.2 PCs 类复合物与植物重金属抗性的关系

在大多数植物中,PCs 的含量与植物的抗性有密切关系。但是,最近的试验也显示,植物合成 PCs 的能力并不一定与植物的抗重金属毒害能力呈正相关。蝇子草属植物的细胞培养发现,抗性细胞系合成 PCs 的能力反而小于敏感型细胞系。这使人们怀疑 PCs 与植物抗性的关系^[25]。

许多试验显示,HMW 复合物的形成与植物的抗性关系更为紧密^[8]。Subhash 等^[45]用 4 个番茄细胞系发现,随着镉处理浓度增加,细胞体内产生的镉螯合多肽增加,高分子量螯合肽也呈增加的趋势。Mutoh 等^[47]研究也发现,虽然 PC 和 LMW 复合物的含量差异不显著,但不能产生 HMW 复合物的粟酒裂殖菌属酵母突变体比野生的粟酒裂殖菌属酵母对镉更敏感。另一试验显示,对镉超敏感的拟南芥突变体 cad1 不能合成 HMW 复合物。进一步的研究发现,镉抗性与非抗性体合成 PC 的速率相同。但在抗性植物体中,PC、LMW 复合物向 HMW 复合物转化的速率大于非抗性体,并且能够形成较多的 HMW 复合物^[46]。粟酒裂殖菌属酵母的基因组学研究也证明,HMW 复合物与植物抗镉毒害的能力有密切的关系。

然而,目前对 HMW 复合物与 PCs 及 LMW 复合物的相互作用关系及其功能至今仍不清楚。推测其植物的抗性可能与 LMW 复合物、PC 转化成 HMW 复合物的速度密切相关。因为决定植物体抗性的最主要因素是降低植物体内毒性金属离子的浓度。当环境(介质)、植物确定后,进入植物体的重金属离子应该是一个较为固定的常量,这部分重金属离子最终将在植物体内建立一个由源到库的 LMW 复合物、PC 和 HMW 复合物之间传递的传递链,最终将重金属离子通过低毒性的复合物的形式贮存在植物特定组织(库)中,这一传递链的传递效率将决定植物体内重金属毒害离子的最终浓度。PC 的浓度意味着植物体内可以用作结合重金属离子的物质的多少,因此,PC 含量高的植物抵抗重金属的能力也越高。LMW 复合物是 PC 与金属离子结合后的形态,具有较低的毒性和较强的移动性,并通过位于液泡膜上的转运蛋白主动运输进入液泡后再与金属离子、 S^{2-} 等形成 HMW 复合物,并在液泡内区室化固定,这样就不断消耗植物体内游离的重金属离子,使植物体内有毒重金属离子保持一个动态平衡。HMW 复合物对植物的毒性很低,是植物体内金属离子的贮存形式之一。

综上所述,决定植物抗性的植物体内因素是:(1)PC 的合成速度,(2)由 PC 形成 LMW 复合物的速度,(3)LMW 复合物转化成 HMW 复合物的速度,(4)贮存 HMW 的潜在容量。其中 PC 的合成速度、LMW 向 HMW 的转化速度以及贮存 HMW 复合物的容量,是最终影响植物抗重金属能力的主导因素。

5 展望

PCs 及其复合物与植物的耐性有密切的关系,但是,这方面的研究目前尚处于起步阶段,今后应在以

下几方面加强研究:

(1) 继续利用不同的突变体系统对 PC 的生物合成和功能进行研究,从分子生物学方面揭示其生化合成途径及其人工调控的可能。一方面这些研究可以为 PC 的生化、分子和生理研究提供基础材料,另一方面可以通过 PC 的调控或者利用外源人工合成 PC 类复合物增加植物抗性。

(2) PC 及其复合物的生物合成是酶促反应,如果能够有效地控制酶的活性,增加 PC 及其复合物在植物体内的合成和转化,则可提高植物的抗性。这方面的研究对植物修复(phytoremediation)和农业生产都非常重要。

(3) 重金属在植物体内的积累有地上积累型、地下积累型和整株积累型,而出现这一现象的原因可能与重金属在植物不同组织和器官的区室化固定水平不同有关。因此研究 PCs 和 PCs 类复合物与植物体内重金属富集的关系,将有助于从分子水平解释这 3 种积累型植物的重金属富集机理。或许,通过对植物体 PC 及其复合物的检测,能够发现快速检测耐性植物、非耐性植物的方法。这些问题的解决可以为今后抗性育种的苗期鉴定提供快速简便的方法。

(4) 蜈蚣草、大叶井口边草等超富集植物对砷具有很强的耐性和富集能力^[48~50],但是,植物耐受砷等阴离子态形式存在的元素及其解毒机理是否也与 PCs 有关?目前仍缺乏相应的研究,在今后的研究中应予以关注。

References:

- [1] Ryan J A, Pahren H R, Lucas J B. Controlling cadmium in human chain; review and rationale based on health effect. *Environ. Res.*, 1982, **28**: 251~302.
- [2] Nicholson F A, Jones K C. Effect of phosphate fertilizers and atmospheric deposition on long-time changes in the cadmium content of soil and crop. *Environ. Sci. Tech.*, 1994, **28**: 2170~2175.
- [3] Meberg A A. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum*, 1993, **88**: 191~198.
- [4] Ma J F, Hiradate S, Matsumoto H. High aluminum resistance in buckwheat I. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.*, 1998, **117**: 753~759.
- [5] Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 1999, **41**: 105~130.
- [6] Salt D E, Prince R C, Picking I J, et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol.*, 1995, **109**: 1427~1433.
- [7] Zenk M H. Heavy metal detoxification in higher plant; a review. *Gene*, 1996, **179**: 21~30.
- [8] Cobbett C S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 2000, **123**: 825~832.
- [9] Grill E, Winnacker E L, Zenk M H. Phytochelatins; the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 1985, **230**: 674~676.
- [10] Kondo N, Isobe M, Imai K, et al. Synthesis of metallothionein-like peptides Cadystin A and B occurring in a fission yeast, and their isomers. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, **49**: 71~83.
- [11] Zeng W, Hemmasi B. Solution synthesis of phytochelatins isopeptides from the plant kingdom. *Liebigs Ann. Chem.*, 1992, 311~315.
- [12] Gekeler W, Grill E, Winnacker E L, et al. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins. *Z. Naturforsch.*, 1989, **44**: 361~369.
- [13] Rauser W E. Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, **59**: 61~86.
- [14] Mehra R K, Tabet E B, Gray W R, et al. Metal-specific synthesis of two metallothioneins and γ -glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, **85**: 8815~8819.
- [15] Kneer R, Zenk M H. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochem.*, 1992, **31**: 2663~2667.
- [16] Grill E, Winnacker E L, Zeek M H. Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal-exposed

- schizosaccharomyces pombe* cells. *FEBS Lett.*, 1986, **197**: 115~120.
- [17] Klapheck S, Schlunz S, Bergmann L. Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.*, 1995, **107**: 515~521.
- [18] Meuwly P, Thibault P, Rauser W E. γ -Glutamylcysteinylglutamic acid—a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.*, 1993, **336**: 472~476.
- [19] Meuwly P, Thibault P, Schwan A L, et al. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. *Plant J.*, 1995, **7**: 391~400.
- [20] Bernhard W R, Kägi H R. Purification and characterization of a typical cadmium-binding polypeptides from *zea mays*. *Experientia*, 1987, **52**: 309~315.
- [21] Kubota H, Sato K, Yamada T. Phytochelatins homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochem.*, 2000, **53**(2): 239~245.
- [22] Pickering I J, Prince R C, George M J, et al. Reduction and coordination of arsenic in *Indian Mustard*. *Plant Physiol.*, 2000, **122**: 1171~1177.
- [23] Maaczna B, Delana S, Pintore M. The complexes of cadmium with phytochelatins: a quantum mechanics study. In: Wenzel W W. *Adriano on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Austria. International Society for Trace Element Research, 1999. 884~885.
- [24] Zhu Y L, Pilon-smit S E A H, Tarun A S. Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.*, 1999, **121**: 1169~1177.
- [25] Cobbett C S. A family of phytochelatin synthase genes from plant fungal and animal species. *Trends in Plant Sci.*, 1999, **4**(9): 335~336.
- [26] Vatamaniuk O K, Mari S, Lu Y P, et al. *AtPCS1*, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**: 7110~7115.
- [27] Ha S B, Smith A P, Howden R. Phytochelatin synthase gene from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, 1999, **11**: 1153~1163.
- [28] Grill E, Löffler S, Winnacker E L, et al. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, **86**: 6838~6842.
- [29] Yong L Z, Pilon-Smits E A H, Tarun A S, et al. Cadmium tolerance and accumulation in *indian mustard* is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.*, 1999, **121**: 1169~1177.
- [30] Schafer H J, Haag K A, Rausch T. cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L.; evidence of Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant Mol. Biol.*, 1998, **37**: 87~97.
- [31] Chen J, Goldsbrough P B. Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant Physiol.*, 1994, **106**: 233~239.
- [32] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, **49**: 249~279.
- [33] May M J, Vernoux T, Leaver C, et al. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.*, 1998, **49**: 649~667.
- [34] Clemens S, Kim E J, Neumann D, et al. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.*, 1999, **18**: 3325~3333.
- [35] Clemens S, Kim E J, Neumann D. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.*, 1999, **18**: 3325~3333.
- [36] Grill E, Winnacker E L, Zenk M H. Phytochelatins: a class of heavy-metal-binding peptides from plant are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1987, **84**: 439~443.
- [37] Verkleij J A C, Koevoets P. Poly(γ -gluylcysteinyl) glucines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *silene vulgaris*. *Plant Cell and Environ.*, 1990, **13**: 913~921.

- [38] Sigrid K, Wolfgang F, Ina Z. Hydroxymethyl-Phytochelate [(γ -Glutamylcysteine) $_n$ -Serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. *Plant Physiol.*, 1994, **104**(4): 1325~1332.
- [39] Toppi S, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 1999, **41**: 105~130.
- [40] Rauser W E. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.*, 1995, **109**: 1141~1149.
- [41] Zenk M H. Heavy metal detoxification in higher plants; a review. *Gene.*, 1996, **179**: 21~30.
- [42] Wagner G J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.*, 1993, **51**: 173~212.
- [43] Howden R, Goldsbrough P B, Andersen C R, *et al.* Cadmium-sensitive, *cad1*, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.*, 1995, **107**: 1059~1066.
- [44] Thumann J, Grill E, Winnacker E L, *et al.* Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett.*, 1991, **284**: 66~69.
- [45] Subhash C G, Peter B G. Phytochelatin accumulation and cadmium in selected tomato cell lines. *Plant Physiol.*, 1991, **97**(1): 306~312.
- [46] Mutoh N, Hayashi Y. Isolation of mutants of *Scizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small Cd-binding peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **151**: 32~39.
- [47] Zhu Y L, Pilon-Smits E A H, Jouanin L, *et al.* Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.*, 1999, **119**: 73~79.
- [48] Chen T B, Wei C Y, Huang Z C, *et al.* Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chinese Science Bulletin*(in Chinese), 2002, **47**(3): 207~210.
- [49] Wei C Y, Chen T B, Huang Z C, *et al.* Cretan brake (*Pteris cretica* L.): An arsenic-accumulating plant. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, **22**(5): 777~778.
- [50] Chen T B, Huang Z C, Huang Y Y, *et al.* Cellular distribution of arsenic and other elements in hyperaccumulator *Pteris nervosa* L. and their relations to arsenic accumulation. *Chinese Science Bulletin*, 2003.

参考文献:

- [48] 陈同斌, 韦朝阳, 黄泽春, 等. 超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征. 科学通报, 2002, **47**(3): 207~210.
- [49] 韦朝阳, 陈同斌, 黄泽春, 等. 大叶井口边草——一种新发现的富集砷的植物. 生态学报, 2002, **22**(5): 777~778.
- [50] 陈同斌, 黄泽春, 黄宇营, 等. 超富集植物中元素的微区分布及其与砷富集的关系. 科学通报, 2003.