

重金属、磺酰脲类除草剂的植物基因应答及其交互作用

路超^{1,2}, 姜慧敏^{1,2}, 张建峰^{1,2}, 葛才林³, 王泽港³, 杨俊诚^{1,2}

(1.中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081; 2.农业部作物营养与施肥重点开放实验室, 北京 100081; 3.扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要:土壤污染日益成为威胁人类生存的重要问题,而且正呈现出多元化和复杂化的特点。土壤的重金属污染已被重点研究,大量与金属阳离子吸收、分布和解毒相关的通道蛋白、螯合剂以及伴侣蛋白的编码基因被发现和克隆;而土壤的农药污染,特别是磺酰脲类除草剂类污染研究却还主要集中在生理生化水平上。同时,两者复合污染研究更是鲜有报道,总体还处于探索阶段。本文重点将对现阶段重金属与磺酰脲类除草剂单因素的植物基因应答及其复合污染交互作用的研究进展,在基因类型和作用等方面分别进行综合性分析与阐述,并结合环境污染现状和国际研究前沿提出了今后研究的主要方向。

关键词:重金属;磺酰脲类除草剂;复合污染;基因应答;交互作用

中图分类号:X503.23 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)12-2253-07

Gene Response and Interaction of Heavy Metal and Sulfonylurea Herbicides in Plant

LU Chao^{1,2}, JIANG Hui-min^{1,2}, ZHANG Jian-feng^{1,2}, GE Cai-lin³, WANG Ze-gang³, YANG Jun-cheng^{1,2}

(1.Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081, China; 2.Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; 3.College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Soil pollution is increasingly becoming more threatening to humanity, and being in diversification and complication. The heavy metal pollution in soil has been studied very well. A mass of sequences of transporters, chelators and chaperones have been identified, which are involved in the uptake, distribution and detoxification of metal ions; while the research of agricultural chemical pollution is still focusing on the physiology and biochemistry, especially the sulfonylurea herbicides. The research of combined pollution of heavy metals and sulfonylurea herbicides is less reported, and just in exploring phase. In this review, the advances in gene responses and interaction of heavy metals and sulfonylurea herbicides in plant was analyzed and expounded, and the research trends in the future was proposed according to the present environmental pollution situation and international research fronts.

Keywords: heavy metals; sulfonylurea herbicides; combined pollution; gene response; interaction

随着现代工农业快速发展,污水排放、灌溉、采矿冶炼、农药和化肥的大量施用等原因^[1],加上土壤对于污染物的累积富集作用,土壤污染日趋复杂化。我国受到有毒金属污染的耕地面积已经接近 2 000 万 hm^2 ^[2],而且其进入食物链后对人类的健康将产生严重的危害^[3-5]。

随着我国农业栽培耕作方式趋向于规模化和集约化发展,除草剂的使用量日渐增大,2008 年全国施用量达 7.71 万 t,全国农田化学除草剂使用面积已达

0.53 亿 hm^2 ^[6-7]。除草剂在土壤、水源和食品中残留对人类健康构成的危害,已经引起各国环保和食品安全专家的高度重视^[8-9]。磺酰脲类除草剂由于其具有高效性、广谱性、低毒性等优点,已成为水稻、玉米、大豆、油菜、麦类作物杂草防治的主要种类^[10-11],而且对其残留的毒理研究也已经开展^[12-14]。因此,重金属与磺酰脲类除草剂在土壤中共存所产生的复合污染成为客观现实,而对其应答机理的研究最早由杨俊诚等^[15]提出,但与重金属单因素污染的植物基因应答机制研究相比,对重金属与磺酰脲类除草剂复合污染的基因应答机制的研究还处于开始阶段。本文重点将对现阶段重金属与磺酰脲类除草剂单因素的植物基因应答及其复合污染交互作用研究进展,在基因类型和作用等方面分别进行综合性分析与阐述,结合环境污染现状和国际研究前沿提出了今后研究的主要方向。

收稿日期:2010-11-19

基金项目:国家自然科学基金项目:水稻在镉与苯噻磺隆胁迫下的基因应答研究(20877101);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2010-3)

作者简介:路超(1982—),男,河北廊坊人,博士,主要研究方向为环境生物技术。E-mail:bleach2008@sohu.com

通讯作者:杨俊诚 E-mail:yangjch@263.net

1 重金属的基因应答机制

植物对金属离子的耐性是普遍存在的,而且越来越多的研究表明植物中存在着几种普遍的金属耐受性调控机制,其中包括了金属离子的吸收转运、解毒和隔离。

1.1 金属离子吸收和转运机制

植物拥有一套完整的对金属离子和其他无机物质的吸收系统,膜转运系统在其中起着十分重要的作用。随着遗传和分子技术的发展,一系列涉及重金属离子吸收和转运的基因家族被鉴定,如 ZIP(ZRT, IRT-like proteins)家族、Nramps(Natural resistance-associated macrophage proteins)家族、HMAs(Heavy Metal ATPases)家族等等。

1.1.1 ZIP(ZRT, IRT-like proteins)家族

ZIP 家族是一类十分重要的通道蛋白,其在 Zn 或 Fe 离子缺乏的情况下诱导活化。它涉及到 Fe、Zn、Mn 和 Cd 等金属离子的转运^[16-17],迄今在 NCBI 上注册的 ZIP 家族成员已经达到 593 个^[18],这些蛋白广泛存在于真核生物中,其中绝大多数又存在于植物中(如拟南芥),大多数的 ZIP 家族成员推测都含有 8 个潜在的跨膜结构域,N-端和 C-端均位于质膜外层。AtIRT1 是第一个被克隆的 ZIP 家族基因^[9],它被认为是植物根部吸收 Fe 元素的主要转运蛋白^[20-21],后来也发现其同样对 Zn 和 Cd 等金属离子具有转运能力^[22]。ZRT1 和 ZRT2 是从酵母中克隆出的两个 ZIP 家族基因,但他们分别表现出来对 Zn²⁺的不同亲和力^[16,24],而 ZRT3 除表现出对 Zn²⁺的高亲和性外,还表现出了对 Cd²⁺的一定亲和力^[25],Pence et al^[26]也发现 ZNT1 编码的蛋白除转运 Zn²⁺外,其对低亲和性的 Cd²⁺也有一定的转运能力,这在一定程度上说明,植物对 Zn 和 Cd 的吸收调控机制存在协同效应。同时研究发现 ZIP 通道蛋白虽然是植物根部吸收金属离子的必要条件,但还需要其他蛋白的协助^[27]。

1.1.2 Nramps(Natural resistance-associated macrophage protein)家族

Nramps 家族是另一类重要的跨膜转运蛋白,而且由于它对 Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺ 和 Co²⁺等都有转运能力^[28],所以被称为通用型通道蛋白。Nramps 家族在细菌、酵母、植物和动物中广泛存在,在植物中水稻的 OsNramp1、2、3^[29-30]是首先被鉴定的。同时, Nramps 家族蛋白序列具有很高的保守性^[31],植物中基因序列的同源性达到了 40%。在 Fe 缺乏的情况下,拟

南芥中的 AtNramps1、3、4 表达量上调^[32-33],其中 At-Nramp3 还表现出了对 Cd 的吸收和敏感性,进一步的研究发现 AtNramp3 在拟南芥的根、茎和叶的维管束中表达,其很可能参与了金属离子的长距离转运^[34]。Chiang et al^[35]通过 cDNA 基因芯片分析发现,金属超积累植物中的 Nramps 基因表达水平显著提高,它负责使金属离子跨过质膜或液泡膜进入细胞质。

1.1.3 HMA(Heavy Metal ATPase; CPx-type ATPase)家族

P-type ATPase 是一类转运蛋白超家族,它的特点是在反应循环的过程中产生磷酸化的中间产物。它一般有 8 到 12 个跨膜区和一个大的细胞质环组成,其中包含 ATP 结合位点和磷酸化位点。根据其底物特异性和系统发生学,P-type ATPase 被分为 5 个亚家族,它们主要负责一系列阳离子在膜系统间的转运,其中 P_{1B} ATPase 亚家族涉及金属离子的转运。拟南芥中的 HMA1-8 等 8 个 P_{1B} ATPase (或 HMAs)蛋白表现出对 Cu²⁺的转运活性^[36-41]。其中,HMA2 和 HMA4 对 Zn²⁺的平衡具有调节作用^[42],它们在 Zn²⁺的运输和从根部到茎部的转运过程中起着重要的作用,同时对 Cd²⁺也具有转运活性。Verret et al^[43]的研究也发现,HMA 族蛋白主要在植物的根部和茎部的韧皮部维管细胞中表达,这在一定程度上表明其在金属离子由根部向茎部的转运中发挥作用。

1.2 金属离子解毒机制

由于大多数金属离子毒性和低溶解性,植物在长期的进化过程中形成了独特的重金属富集机制—金属螯合作用,Rea et al^[44]发现在酵母细胞中不存在游离态的铜离子。生物合成一系列具有络合重金属离子能力的小分子,即螯合剂,其能与游离的重金属离子螯合形成毒性较低的螯合物,从而减小重金属离子的毒性。植物中重要的螯合剂包括植物螯合肽(PCs)、金属硫蛋白(MTs)、有机酸类和氨基酸类。

1.2.1 植物螯合肽(PCs)相关基因

植物螯合肽一类富含巯基的寡聚多肽,最早是在粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中发现的,它们在生物体内具有相同的前体—谷胱甘肽并具有结构通式:(γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly($n=2\sim 11$)^[45]。PCs 不是基因直接编码翻译的产物,而是在重金属诱导下,由谷胱甘肽(GSH)为底物由植物螯合肽合成酶催化而成。

重金属离子进入植物后,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 H⁺/Cd²⁺逆向转运蛋白的作用下,进入液泡内;S²⁻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。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。

目前,PCs的克隆基因包括AtPCs1、SePCs1和TaPCs1编码的蛋白质有40%~50%的相似序列^[46],它们的分子量为50~55 kD。重金属诱导试验能够明显提高植物体内PCs和GSH含量^[47],在Cd和Cu的喷雾诱导试验中,gsh1^[48]、gsh2^[49]和gr1^[50]基因的表达量被稳定提高,而且不会由于PCs的积累而改变,这种mRNA表达量与最后产物积累间的割裂关系很可能是由于PCs的转录后调节有关。在十字花科植物中,经过水杨酸诱导后丝氨酸乙酰转移酶(SAT)的浓度明显上调,从而导致高浓度GSH的出现。NgSAT过量表达的植株中GSH的浓度明显提高,并表现出对Ni、Co、Zn和Cd的忍耐性。但在产生重金属忍耐性的机理上,Freeman et al^[51]认为主要是由于GSH介导的氧化还原反应,而不是通常认为的GSH和PCs的植物螯合肽所起的作用。而且由于PCs不是基因直接编码的产物,尽管可采用PCs分离、克隆等手段获得PCs生物合成中的相关基因,在将其导入植物体后其表达仍然受到外界Cd胁迫的影响,所以,其功能还需要进一步的证明。

1.2.2 金属硫蛋白(MT)相关基因

金属硫蛋白为一组富含Cys的低分子量金属结合蛋白,它通过硫醇基与金属离子形成螯合物。与PCs不同,MT是直接由mRNA转录生成的,通过重金属诱导产生^[45]。豌豆中的MT(PsMTa)在埃希氏菌中的表达试验表明^[52],其对Cd、Zn和Cu都有很好的螯合作用,芸苔的MT2基因在转入拟南芥中后^[53],明显提高了其对Cd和Cu的忍耐性。

金属硫蛋白基因在许多植物的所有部位都有较高的表达,如拟南芥的MT1a和MT2a在其香毛簇处积累,而重金属离子就是被隔离到这一结构中的^[54];而其在韧皮部中被检测到则说明MT很可能参与了金属离子转运过程^[55]。

金属硫蛋白并不是重金属单一诱导产生的,它在植物生长的各个阶段都进行表达,而且对多种环境胁迫都有响应,比如小麦和水稻的MT基因在高温和营养物质缺乏的情况下都被诱导表达^[45]。

1.2.3 有机酸类和氨基酸类

由于金属离子与S、N、O的反应活性,使氨基酸和羧基类化合物成为金属离子的重要配体;柠檬酸、

苹果酸和草酸等都参与金属的耐受性反应和金属离子在木质部的运输^[56]。研究证明,柠檬酸可以与 Cd^{2+} 、 Ni^{2+} 和 Zn^{2+} 形成复合物,使其能够在植物体内积累^[57-59]。Krämer et al^[60]通过香雪球对比试验发现,组氨酸是Ni的螯合剂,并在木质部中与Ni含量成线性相关。烟草胺是一种非蛋白质氨基酸,是 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的螯合剂^[61],它的缺失使植物体内的Fe长距离转运无法正常运行,从而导致了植物严重的生长损伤和叶脉失绿症。烟草胺合成酶及其基因已经在不同植物中纯化、克隆出来^[62-63]。

1.3 金属离子隔离机制

当植物吸收过量的金属离子时,必须将其移出细胞溶质,这一过程可以通过将金属离子排出或区划隔离等过程实现。植物细胞中贮存毒性化合物的主要部位是液泡,金属离子也被隔离到液泡中,参与这一过程的转运蛋白已被大量鉴定,如ABC(ATP-binding cassette)家族、CDF(Cation Diffusion Facilitator)家族等等。

1.3.1 ABC(ATP-binding cassette)家族

ABC超家族是一个庞大和多样化的膜蛋白家族,它广泛存在于原核和真核生物中,涉及很多的生理过程。完整的ABC转运蛋白包含2个高度疏水的跨膜区和2个保守的核苷酸结合区,它是利用ATP的水解能量对溶质中各种生物分子进行跨膜转运,其转运底物众多^[64-66]。根据其结构的相似性,ABC转运蛋白被分为了7个亚家族^[67-68],其中只有MRP和ATM/HMT两个亚家族涉及了金属离子转运。MRPs是谷胱甘肽S-共轭泵^[64],酵母中的ScYCF1蛋白可以将Cd复合物由细胞质转运入液泡中,而且ScYCF1的过度表达可以增强拟南芥对Pb和Cd的耐受性^[69]。拟南芥中的MRPs中,AtMRP3涉及Cd的解毒和转运,其过度表达明显提高植物对Cd的耐受性,并且使Cd在植物体内积累^[70]。ATM/HMTs为线粒体或液泡膜上的转运蛋白,莱茵衣藻中的线粒体转运蛋白CrCds1通过将Cd排出线粒体,从而使线粒体免受Cd的毒害作用^[71-72]。Kim et al^[73]也发现,拟南芥线粒体转运蛋白AtATM3在植物经过Cd和Pb的处理后,其表达水平明显上调,而其过量表达显著提高了植株对Cd的耐受性。粟酒裂殖酵母的SpHMT1^[74]液泡转运蛋白参与了Cd-PC复合物由细胞质进入液泡的转运过程。

1.3.2 CDF(Cation Diffusion Facilitator)家族

CDFs转运蛋白家族广泛地参与金属的体内平衡

和耐性调节,这些蛋白催化过渡族金属阳离子的外溢,如 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 等离子由细胞质排出细胞,或转入亚细胞器官^[75-77]。拟南芥植物中的第一个CDF转运蛋白基因是拟南芥中的AtMTP1(ZAT)^[78],其参与液泡对 Zn^{2+} 的隔离和 Zn^{2+} 体内平衡和耐性的调节,其过量表达明显提高了植物对 Zn^{2+} 的耐受性和体内的 Zn^{2+} 含量。拟南芥金属超积累品种*A. halleri*的AhMTP1基因表达量明显高于普通拟南芥品种,AhMTP1转运蛋白主要在液泡膜中表达,主要介导 Zn^{2+} 在液泡中积累^[79-80]。

2 磺酰脲类除草剂的基因应答机制

磺酰脲类除草剂易被植物的根、叶吸收,在木质部和韧皮部传导,其对杂草和作物的高效选择性主要是由于其本身作用机理和P-450介导的氧化还原反应。磺酰脲类除草剂的作用靶标是乙酰乳酸合成酶(ALS)/乙酸羟酸合成酶(AHAS)抑制剂^[81-83],能通过抑制植物的ALS/AHAS,阻止支链氨基酸(如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)的合成,破坏蛋白质、细胞分裂期间DNA合成被抑制,有丝分裂停止,细胞周期停留在G1和G2阶段,植物生长受抑、失绿枯萎而亡^[84]。生物学和遗传学的研究也表明,ALS是磺酰脲类除草剂的唯一作用靶标^[85]。但是,由于作用位点单一,杂草极易对其产生抗药性,人们对ALS抑制剂本身及杂草对ALS抑制剂抗性机理的研究也不断深入,研究领域从抗药性杂草的分布、危害、形态学深入到分子抗性机理、抗性基因的利用等诸多方面^[86-88]。目前抗ALS抑制剂的杂草数量已经上升到99种^[89],其抗药性杂草的数量远远超过其他任何一种除草剂。在P-450方面,超过400条基因序列已经被克隆,但只有一小部分的功能得到验证^[90]。

3 重金属与磺酰脲类除草剂复合污染研究

土壤污染正呈现出多元化和复杂化的特点,最终形成多种污染物对同一介质的同时污染,即复合污染^[91]。但由于受研究条件和认识上的影响,以前很多研究工作都限于对单个污染物在自然界中迁移及其生态效应,而且各国制定的环境标准和污染物的排放标准及相关法规也都基本上限于单项污染物的控制。

近些年的复合污染研究也主要集中于重金属间的复合污染研究^[92-93],春小麦、苜蓿菜、玉米等对Cd的吸收明显受Zn的影响,土壤中Zn的添加减少了植物对Cd的吸收。

而随着杨俊诚等^[15]将重金属与磺酰脲类除草剂复合污染生物效应研究的提出,涉及磺酰脲类除草剂与重金属的复合污染及其交互作用机理研究已经有一定的积累。在对磺酰脲类除草剂苄嘧磺隆(BSM)分别与Cd和Pb的复合污染对土壤环境的影响试验中^[94-95],发现BSM与重金属间存在明显的交互作用,两者共同存在一方面加大了对土壤环境的破坏,另一方面延长了BSM的降解时间。而在对BSM与Cd复合污染对水稻生长的影响试验中发现^[96-97], $0.1\sim 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BSM能够降低水稻对Cd离子的吸收; $0.4\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BSM能够刺激根部对Cd离子的吸收,但却抑制了Cd离子从根部向地上部分的迁移;而当BSM与Cd均处于较高浓度时,对水稻产生明显的毒害作用。这一结果表明,当BSM处于一定浓度范围时,可以降低水稻体内Cd离子的浓度,或限制其迁移将Cd离子隔离、贮存在根部;而当超过这一浓度时,又会与Cd离子产生叠加效应,增加对水稻的损伤。可见,BSM与Cd复合污染对植物的作用过程及其机理是一个十分复杂的过程,明显不同于单因素污染。

4 研究展望

在重金属胁迫的调控机理方面,随着重金属超积累植物概念的提出,越来越多的重金属超积累型植物被发现,至今已经报道的超过500多个品种^[98]。这种可以过量吸收积累重金属而不产生或较少产生不良反应的植物,为研究植物对重金属的吸收,及其在植物体内的运输、分配和解毒等机制提供了良好的研究材料^[99-100]。在拟南芥重金属超积累型*A. lyrata*的染色体上,已经有3个与Zn、Cd高耐性相关的数量性状基因座被标记^[101-103],其中可能包含800~3000个相关基因。但这些研究也主要集中在重金属单因素和重金属间的调节机理上,而在植物对重金属与磺酰脲类除草剂复合污染的调控机制和基因响应方面的研究还处于起步阶段,研究进展的公开报道很少。

我们先前的研究已经证明,重金属与磺酰脲类除草剂间存在着复杂的互作效应,BSM在一定浓度下,与Cd离子产生了拮抗效应,而在超过这个浓度后又与Cd离子产生叠加效应。这些结果表明BSM可以增强水稻植株对Cd的耐受性,并可能诱导水稻植株启动对Cd的隔离调控机制。重金属与磺酰脲类除草剂的植物复合污染的植物基因应答研究已成为近期研究的重点方向。

随着功能基因组时代到来,基因芯片、RNA 干扰等技术的发展和运用,以及一些现代分析仪器设备的运用和联用,如毛细管电泳电感耦合离子体质谱等,为上述研究提供有力的支持。我们实验室近年来在“国家自然科学基金”的资助下,进行了利用基因芯片技术对重金属 Cd 与磺酰脲类除草剂 BSM 复合污染的植物基因应答的研究,并已经成功分离出复合污染诱导的特异表达基因。我们将在接下来的试验中进一步对分离出的基因功能进行验证,以期揭示重金属与磺酰脲类除草剂复合污染的植物基因应答机制,为丰富和完善复合污染的理论、制定环境污染标准、评价环境污染风险、修复污染环境及保证农业环境安全等提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] 郭丹,朱维琴,林娟. 杭州市主要地区农田土壤重金属污染评价及关联特征研究[J]. 杭州师范大学学报:自然科学版,2009,8(3): 138-143.
GUO Dan, ZHU Wei-qin, LIN Juan. Researches on assessment and correlation of heavy metal contamination in agricultural soils of Hangzhou [J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2009,8(3):138-143
- [2] Wong S C, Li Xiang-dong, Zhang Gan, et al. Heavy metals in agricultural soil of the Pearl River Delta, South China[J]. *Environmental Pollution*, 2002,119:33-44.
- [3] Buchet J P, Lauwerys R, Roels H, et al. Renal effects of cadmium body burden of the general population[J]. *Lancet*,1990,336:699-702.
- [4] 文香兰,沈桂月,文永植. 钒毒性的研究进展[J]. 广东微量元素科学, 1997,4(10):9-11.
WEN Xiang-lan, SHEN Gui-yue, WEN Yong-zhi. The advance study on the toxicity of Vanadium[J]. *Trace Elements Science*,1997,4(10):9-11.
- [5] Imamul Huq S M, Joardar J C, Parvin S, et al. Arsenic contamination in food-chain: transfer of arsenicin to food materials through ground water irrigation[J]. *J Health Poul Nutr*, 2006,23:305-516.
- [6] <http://www.chinapesticide.gov.cn/doc08/08102109.html>
- [7] 张敏恒. 磺酰脲类除草剂的发展现状、市场与未来趋势[J]. 农药, 2010,49(4):236-241.
ZHANG Min-heng. The development situation, market and trend of sulfonylurea herbicides[J]. *Agrochemicals*, 2010,49(4):236-241.
- [8] Joanna D, Honegger J L, Francesca G T, et al. Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron—a case study[J]. *Pest Management Science*, 2003,59(2):231-237.
- [9] Jennifer L F, Rayburn A L. Aquatic herbicides and herbicide contaminants: In vitro cytotoxicity and cell-cycle analysis[J]. *Environmental Toxicology*, 2006,21(3):256-263.
- [10] Mohammad A B, Eskandar Z, Saeid S, et al. Efficacy evaluation of some dual purpose herbicides to control weeds in maize[J]. *Crop Protection*, 2007, 26:936-942.
- [11] Peter H S, Chris K, Joshua D V. Control of Muhlenbergia frondosa (Wirestem muhly) with post-emergence sulfonylurea herbicides in maize[J]. *Crop Protection*, 2007,26:1585-1588.
- [12] 叶发兵,吴中华,董元彦,等. 除草剂苄嘧磺隆对后茬作物的危害[J]. 湖北农业科学,2005,5:72-73.
XIE Fa-bing, WU Zhong-hua, DONG Yuan-yan, et al. Phytotoxicity of the herbicide bensulfuron methyl to next-season crop [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2005,5:72-73.
- [13] 娄国强,吕文彦,职明星. 苯磺隆、苄嘧磺隆对不同小麦品种安全性及叶绿素含量的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(10):317-320.
LOU Guo-qiang, LV Wen-yan, ZHI Ming-xing. Studies on safety of tribenuron-methyl and bensulfuron-methyl and their impact to the content of chlorophyll[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(10):317-320.
- [14] 姜罡丞. 苄嘧磺隆对斑马鱼的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32):15879-15881.
JIANG Gang-cheng. Study on the acute toxicity and genetics toxicity of bensulfuron-methyl on danio rerio[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(32):15879-15881.
- [15] 杨俊诚,张建峰,韦东普,等. 苄嘧磺隆对镉的生物有效性影响[C]. 首届全国农业环境科学学术研讨会论文集, 2005:68-71.
YANG Jun-cheng, ZHANG Jian-feng, WEI Dong-pu, et al. Effect of bensulfuron-methyl on the bioavailability of cadmium[C]. The Memoir of the First National Agricultural Environmental Science Conference, 2005:68-71.
- [16] Gueriot M L. The ZIP family of metal transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000,1465:190-198.
- [17] Mäser P I, Thomine S, Julian I Schroeder, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2001,126:1646-1667.
- [18] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
- [19] Eide D, Broderius M, Fett J, et al. A novel ironregulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,1996,93:5624-5628.
- [20] Connolly E L, Fett J P, Gueriot M L. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation[J]. *The Plant Cell*, 2002,14:1347-1357.
- [21] Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, et al. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth[J]. *The Plant Cell*, 2002,14:1223-1233.
- [22] Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis[J]. *Planta*, 2001,212:475-486.
- [23] Eide D J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1998,18, 441-469
- [24] MacDiarmid C W, Gaither L A, Eide D. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *EMBO J*,2000,19: 2845-2855.
- [25] 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.
- [26] Krämer U, Talke I N, Hanikenne M. Transition metal transport [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581:2263-2272.
- [27] Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006,1763:609-620.
- [28] Belouchi A, Cellier M, Kwan T, et al. The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants[J]. *Plant Molecular Biology*,1995,29:1181-1196.
- [29] Belouchi A, Kwan T, Gros P. Cloning and characterization of the Os-Nramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions[J]. *Plant Molecular Biology*,1997,33:1085-1092.
- [30] Cellier M, Prive G, Belouchi A, et al. Nramp defines a family of membrane proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1995,92(22):10089-10093.
- [31] Curie C, Alonso J M, Le Jean M, et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport[J]. *Biochemical Journal*, 2000, 347: 749-755.

- [32] Thomine S, Lelievre F, Debarbieux E, et al. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency[J]. *The Plant Journal*, 2003, 34: 685–695.
- [33] 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.
- [34] Chiang H C, Lo J C, Yeh Q C. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator Arabidopsis halleri: a genomic survey with cDNA microarray[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 6792–6798.
- [35] Hirayama T, Kieber J J, Hirayama N, et al. RESPONSIVE-TOANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis[J]. *Cell*, 1999, 97: 383–393.
- [36] 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.
- [37] Abdel-Ghany S E, Muller-Moule P, Niyogi K K, et al. Two P-type ATPases are required for copper delivery in Arabidopsis thaliana chloroplasts[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1233–1251.
- [38] Andres-Colas N, Sancenon V, Rodriguez-Navarro S, et al. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metal-chaperones and functions in copper detoxification of roots[J]. *Plant Journal*, 2006, 45: 225–236.
- [39] Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, et al. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 2882–2892.
- [40] Moreno I, Norambuena L, Maturana D, et al. AtHMA1 is a thapsigargin sensitive Ca^{2+} /heavy metal pump[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 9633–9641.
- [41] 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.
- [42] Verret F, Gravot A, Auroy P, et al. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance[J]. *FEBS Lett*, 2004, 576: 306–312.
- [43] Rea T D, Schmidt P J, Pufahl R A, et al. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase[J]. *Science*, 1999, 284: 805–808.
- [44] Cobbett C S, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2002, 53: 159–182.
- [45] 徐正浩, 沈国军, 诸常青, 等. 植物镉忍耐的分子机理[J]. 应用生态学报, 2006, 17(6): 1112–1116.
- XU Zheng-hao, SHEN Guo-jun, ZHU Chang-qing, et al. Molecular mechanisms of plant resistance to cadmium toxicity[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(6): 1112–1116.
- [46] Chengbin Xiang, David J Oliver. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 1539–1550.
- [47] May M J, Leaver C J. Arabidopsis thaliana g-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and Escherichia coli homologues[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 91: 10059–10063.
- [48] Wang C, Oliver D J. Cloning of the cDNA and genomic clones for glutathione synthetase from Arabidopsis thaliana and complementation of a gsh2 mutant in fission yeast[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 1093–1104.
- [49] Kubo A, Sano T, Saji H, et al. Primary structure and properties of glutathione reductase from Arabidopsis thaliana[J]. *Plant Cell Physiol*, 1993, 34: 1259–1266.
- [50] Freeman J L, Salt D E. The metal tolerance profile of Thlaspi goesin-gense is mimicked in Arabidopsis thaliana heterologously expressing serine acetyl-transferase[J]. *BMC Plant Biol*, 2007, 7: 63.
- [51] Tommey A M, Shi J, Lindsay W P, et al. Expression of the pea gene PsMTa in E. coli—metal binding properties of the expressed protein[J]. *FEBS Lett*, 1991, 292: 48–52.
- [52] Zhigang A, Cuijie L, Yuangang Z, et al. Expression of BjMT2, a metallothionein2 from Brassica juncea, increases copper and cadmium tolerance in Escherichia coli and Arabidopsis thaliana, but inhibits root elongation in Arabidopsis thaliana seedlings[J]. *J Exp Bot*, 2006, 57: 3575–3582.
- [53] Salt D E, Prince R C, Pickering I J, et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard[J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1427–1433.
- [54] Garcia-Hernandez M, Murphy A, Taiz L. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 387–397.
- [55] Rauser W E. Structure and function of metal chelators produced by plants[J]. *Cell Biochem Biophys*, 1999, 31: 119–148.
- [56] Wanger G J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health[J]. *Adv Agron*, 1993, 51: 173–212.
- [57] Sagner S, Kneer R, Wanner G, et al. Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in Sebertia acuminata[J]. *Phytochemistry*, 1998, 47: 339–347.
- [58] Godbold D L, Horst W J, Collins J C, et al. Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of Deschampsia caespitosa[J]. *J Plant Physiol*, 1984, 116: 59–69.
- [59] Krämer U, Cotter-Howells J D, Charnock J M, et al. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel[J]. *Nature*, 1996, 379: 635–638.
- [60] Von Wirén N, Klair S, Briat J F, et al. Nicotianamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants[J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 1107–1114.
- [61] Ling H Q, Koch G, Baumlein H, et al. Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7098–7103.
- [62] Herbig A, Koch G, Mock H P, et al. Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley. A key enzyme for iron homeostasis in plants[J]. *Eur J Biochem*, 1999, 265: 231–239.
- [63] Rea P A, Li Z S, Lu Y P, et al. From vacuolar GS-X pumps to multi-specific ABC transporters[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1998, 49: 727–760.
- [64] Davies T G E, Coleman J O D. The Arabidopsis thaliana ATP-binding cassette proteins: an emerging superfamily[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2000, 23: 431–443.
- [65] Martinoia E, Klein M, Geisler M, et al. Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers[J]. *Planta*, 2002, 214: 345–355.
- [66] Decottignies A, Goffeau A. A complete inventory of the yeast ABC proteins[J]. *Nat Genet*, 1997, 15: 137–145.
- [67] Sanchez-Fernandez R, Davies T G, Coleman J O, et al. The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 30231–30244.
- [68] Song W Y, Ju Sohn E, Martinoia E, et al. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 914–919.
- [69] Bovet L, Eggmann T, Meylan-Bettex M, et al. Transcript level of AtMRPs after cadmium treatment: induction of AtMRP3[J]. *Plant Cell Environment*, 2003, 26: 371–381.
- [70] Hanikenne M, Matagne RF, Loppes R. Pleiotropic mutants hypersensitive to heavy metals and to oxidative stress in Chlamydomonas reinhardtii[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 196: 107–111.
- [71] Hanikenne M, Motte P, Wu MCS, et al. A mitochondrial half-size ABC transporter is involved in cadmium tolerance in Chlamydomonas rein-

- hardtii[J]. *Plant Cell Environ*, 2005, 28: 863–873.
- [72] Kim D Y, Bovet L, Kushnir S, et al. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 922–932.
- [73] Hanikenne M, Krämer U, Demoulin V, et al. A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschyzon merolae*[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137: 428–446.
- [74] Hall J L, Williams L E. Transition metal transporters in plants[J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(393): 2601–2613.
- [75] 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.
- [76] Grass G, Otto M, Fricke B, et al. FieF(YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress [J]. *Arch Microbiol*, 2005, 183(1): 9–18.
- [77] van der Zaai 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.
- [78] Becher M, Talke I N, Krall L, et al. 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.
- [79] Dräger D B, Desbrosses-Fonrouge A G, Krach C, et al. Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels [J]. *Plant J*, 2004, 39: 425–439.
- [80] LaRossa R A, Seholoss J V. The sulfonylurea herbicide sulfometuron methyl is an extremely potent and selective inhibitor of Acetolactate synthase in *Salmopella typhimrium*[J]. *J Bio Chem*, 1984, 259: 8753–8757.
- [81] Ray T B. Site of action of chlorsulfuron[J]. *Plant Physiology*, 1984, 75: 827–831.
- [82] Chaleff R S, Ray T B. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures[J]. *Science*, 1984, 222: 1145–1151.
- [83] Schloss J V. Acetolactate synthase, mechanism of action and its herbicide binding site[J]. *Pestic Sci*, 1990, 29: 283–292.
- [84] 陈锡岭, 王桂莲. 磺酰脲类除草剂的化学作用方式选择及降解特性[J]. 河南职业技术学院学报, 1998, 26(1): 22–26.
- CHEN Xi-ling, WANG Gui-lian. The Chemistry Mode of Action, Crop Selectivity Characteristics of Degradation of Sulfonylurea Herbicides [J]. *Journal of Henan Vocation-Technical Teachers College*, 1998, 26(1): 22–26.
- [85] 吴明根, 郑承志, 李听珈. 抗苄嘧磺隆慈姑 ALS 基因突变位点[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 222–224.
- WU Ming-gen, ZHENG Cheng-zhi, LI Xin-jia. Mutation locus of ALS gene with resistance to sulfonylurea in *Sagittaria sagittifolia* L. var. *longiloba* T. [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 26(1): 222–224.
- [86] Cui H L, Zhang C X, Zhang H J, et al. Confirmation of Flixweed (*Descurainia sophia*) Resistance to Tribenuron in China[J]. *Weed Science*, 2008, 56: 775–79.
- [87] Cui H L, Zhang C X, Zhang H J, et al. Tribenuron-methyl resistant flixweed (*Descurainia sophia*) [J]. *Agricult Ural Sciences in China*, 2009, 8(4): 488–490.
- [88] Heap I. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. <http://www.weedscience.org>, 2009.
- [89] O'Keefe D P. A functional genomics approach to the enzymes of plant xenobiotics[J]. *J Pestic Sci*, 2000, 25: 182–183.
- [90] 北京市环境保护科学研究院. 三废处理工程技术手册. 废水卷[M]. 北京: 化工工业出版社, 2000: 578–588.
- Beijing Environmental Protection Science Research Institute. Three wastes treatment engineering technical manuals. Wastewater roll [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 578–588.
- [91] 黄益宗, 朱永官, 黄凤堂, 等. 镉和铁及其交互作用对植物生长的影响[J]. 生态环境, 2004, 13(3): 406–409.
- HUANG Yi-zong, ZHU Yong-guan, HUANG Feng-tang, et al. Effects of cadmium and iron and their interactions on plants growth: a review [J]. *Ecology and Environment*, 2004, 13(3): 406–409.
- [92] 胡莹, 朱永官, 黄益宗, 等. 钒镉复合污染对水稻吸收积累镉、钒和磷的影响[J]. 环境科学学报, 2005, 25(2): 198–202.
- HU Ying, ZHU Yong-guan, HUANG Yi-zong, et al. Effects of combined contaminations of vanadium and cadmium on cadmium, vanadium and phosphorus uptake by rice in solution culture [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2): 198–202.
- [93] 胡著邦, 王海珍, 吴建军, 等. 镉与苄嘧磺隆除草剂单一污染和复合污染土壤的微生物生态效应[J]. 浙江大学学报, 2006, 31(2): 151–156.
- HU Zhu-bang, WANG Hai-zhen, WU Jian-jun, et al. Ecological effects of both single and combined pollution of Cd and bensulfuron-methyl on soil microorganisms [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2006, 31(2): 151–156.
- [94] 贾继元. 铅与苄嘧磺隆复合污染对苄嘧磺隆的降解及土壤微生物物量的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- JIA Ji-yuan. Effects of lead and bensulfuron-methyl combined pollution on degradation of bensulfuron-methyl and the size of microbial biomass in soil [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [95] 吴庆钰, 杨俊诚, 张建峰, 等. 镉与苄嘧磺隆复合污染对水稻某些生物学特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(5): 1789–1796.
- WU Qing-yu, YANG Jun-cheng, ZHANG Jian-feng, et al. Effects of cadmium and bensulfuron methyl co-contamination on some biological characteristics of rice [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1789–1796.
- [96] 吴庆钰, 杨俊诚, 张建峰, 等. 镉与苄嘧磺隆复合污染对水稻细胞、DNA 的毒害作用. 农业环境科学学报, 2007, 26(6): 2216–2220.
- WU Qing-yu, YANG Jun-cheng, ZHANG Jian-feng, et al. Toxicity of co-contamination with bensulfuron methyl and cadmium to cell and DNA of rice [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(6): 2216–2220.
- [97] Ute Krämer. Metal Hyperaccumulation in Plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 517–534.
- [98] Bert V, Meerts P, Saumitou-Laprade P, et al. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in Arabidopsis halleri [J]. *Plant and Soil*, 2003, 249: 9–18.
- [99] Hendrik Küpper, Fang Jie Zhao, Steve P McGrath. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119: 305–311.
- [100] Dräger D B, Desbrosses-Fonrouge A G, Krach C, et al. Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels [J]. *Plant J*, 2004, 39: 425–39.
- [101] 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.
- [102] Willems G, Dräger D B, Courbot M, et al. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci [J]. *Genetics*, 2007, 176: 659–674.