

· 热点评 ·

植物防御素调控水稻镉积累的新机制

黄新元*, 赵方杰

南京农业大学资源与环境科学学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

摘要 镉是我国农产品的主要重金属污染物之一。随着我国土壤重金属污染问题日益突出, 包括稻米在内的农产品重金属超标时常发生。如何防控重金属在作物可食部位的积累, 在保证农产品安全的同时将农田重金属进行移除修复, 已成为我国农业生产急需解决的问题。最近, 中科院上海生命科学院植物生理生态所龚继明研究组和中国水稻所钱前研究组克隆到1个特异调控镉在水稻(*Oryza sativa*)叶片中积累的主效QTL基因CAL1。CAL1编码1个植物防御素类似蛋白, 通过与镉进行螯合, 将镉从维管束木质部薄壁细胞中分泌出来, 进入木质部参与长距离转运, 从而定向调控镉在水稻叶片等营养器官的积累而不影响籽粒镉的积累。该研究加深了人们对重金属镉在植物体内的转运和再分配机理的认识, 同时也为培育秸秆镉高积累而籽粒镉含量达标的“修复型”水稻品种提供有价值的新基因。研究成果具有重要的理论意义和应用价值。

关键词 水稻, 镉, 植物修复, 植物防御素

黄新元, 赵方杰 (2018). 植物防御素调控水稻镉积累的新机制. 植物学报 53, 451–455.

重金属镉是我国农田和农产品的重要污染物之一。随着我国工业化和城市化的快速发展, 土壤重金属污染问题日益突出。环保部和国土资源部2014年发布的全国土壤污染调查报告显示, 我国耕地土壤19.4%点位污染物含量超标, 其中重金属镉的超标率为7%, 污染程度以中、低污染为主(环境保护部和国土资源部, 2014)。农田重金属污染造成农产品重金属含量超标时常发生, 我国南方稻米重金属含量超标现象尤为严重(Zhao et al., 2015)。调查结果显示, 我国湖南益阳和长株潭地区分别有60%和76%的稻米镉含量超过我国食品卫生标准稻米镉限量值—— $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 样品中最高镉含量分别达 2.77 和 $4.80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 超过限量值13和24倍(Du et al., 2013; Zhu et al., 2016)。土壤重金属污染已经导致我国居民的镉摄入量逐年增加。据国家卫生和计划生育委员会长达25年的调查统计结果显示, 我国居民人均镉的摄入量已从1990年的 $13.8 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$ 上升到2015年的 $30.6 \mu\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$, 25年间升高了122%, 达到世界卫生组织和世界粮农组织规定的日均镉允许摄入量(FAO/WHO Cd Tolerable Daily Intake)的61%。其中, 稻米是膳食中镉的主要来源, 占我国人均每天镉摄入量的55%, 南方人群则占到了65%(Song et al., 2017)。因此, 农田重金

属污染造成的农产品重金属含量超标已经严重影响农产品的质量安全, 对我国居民的身体健康构成威胁, 已成为限制我国农产品质量和农业生产可持续发展的重要因素。因此, 重金属污染治理迫在眉睫。

为保障农产品产地可持续利用及农产品质量安全, 国务院发布了《土壤污染防治行动计划》(简称“土十条”), 提出到2020和2030年, 受污染耕地安全利用率分别达到90%和95%以上的目标。但由于我国耕地重金属污染量大、范围广、形态类型复杂, 污染耕地的治理将是一个长期的过程。同时, 由于我国人多地少, 粮食供给压力巨大, 为了保持住18亿亩耕地的底线, 很多重金属中低度污染农田仍需继续用于高强度的农业生产, 导致类似“镉大米”的事件频繁发生。因此, 如何对重金属中低度污染农田进行安全利用, 保证稻米重金属含量不超标的同时对重金属进行移除修复, 实现“边生产边修复”, 已成为我国污染农田修复的当务之急。

目前, 开展重金属中低污染农田“边生产边修复”主要采用重金属低积累作物品种与重金属超富集植物进行间套作的方式。然而, 由于水稻(*Oryza sativa*)主要种植在水田, 而镉超富集植物, 如伴矿景天(*Sedum plumbizincicola*)或者东南景天(*S. alfredii*)

收稿日期: 2018-03-08; 接受日期: 2018-03-30

* 通讯作者。E-mail: xinyuan.huang@njau.edu.cn

等均是旱生植物,水稻难以与镉超富集植物进行间作或套作。因此,利用水稻镉高积累品种对中低度污染农田进行镉移除修复将是较好的选择。通过将水稻镉高积累品种种植于镉中低度污染农田,将收获的地上部进行焚烧或者资源化利用等方式进行减量处理,达到对污染农田镉移除修复的目的。然而,秸秆镉高积累的水稻品种,其籽粒镉含量通常超标,无法实现修复污染农田的同时进行农业生产。因此,培育镉在秸秆等部位高积累而籽粒镉含量不超标的“修复型”水稻品种,将是对重金属中低度污染农田进行安全利用,在保证稻米安全的同时对重金属进行移除修复,实现“边生产边修复”的理想策略。

中科院分子植物科学卓越创新中心/上海植物生理生态所龚继明研究组与中国水稻所钱前研究组合作,最近在“修复型”水稻的遗传基础解析方面取得了重大进展。他们克隆到1个特异调控镉在水稻叶片中积累的主效QTL基因*CAL1* (Luo et al., 2018)。*CAL1*编码1个植物防御素类似蛋白(defensin-like protein),定向调控镉在叶片等营养器官的积累。利用表达量有差异的*CAL1*等位基因构建近等基因系,可以提高叶片中镉的含量而不影响籽粒镉的积累,表明该基因可用于培育秸秆镉高积累而籽粒镉含量不超标的“修复型”水稻品种。

镉是植物非必需的重金属元素之一,主要通过锰、铁和锌等二价阳离子的吸收途径经根系进入植物体内。在水稻中,镉主要通过定位于细胞质膜上的*OsNRAMP5*进行吸收(图1)。*osnramp5*突变体丧失大部分镉的吸收能力,其秸秆和籽粒中镉的含量都比野生型显著降低(Ishikawa et al., 2012; Sasaki et al., 2012; Yang et al., 2014)。通过CRISPR/Cas9基因编辑技术将两系杂交稻双亲中的*OsNRAMP5*基因同时敲除,获得的杂交种籽粒镉含量比双亲降低了98%,在双亲籽粒镉超标10倍的情况下,杂交种籽粒镉含量仍然低于国家标准,显示*OsNRAMP5*基因在培育镉低吸收水稻品种中具有良好的应用前景(Tang et al., 2017)。然而,*OsNRAMP5*同时也是植物必需矿质营养元素锰的转运蛋白(Ishimaru et al., 2012; Sasaki et al., 2012),参与植物体内锰从根部向地上部的转运以及再分配(Yang et al., 2014)。在水培条件下,*osnramp5*突变体比野生型对缺锰更为敏感(Sasaki et al., 2012; Yang et al., 2014),这可能限制

了*osnramp5*突变体在控制镉吸收中的实际应用,尤其是在低锰农田中的应用。镉离子通过根部吸收进入植物体以后,通常被区隔化到液泡中(图1),在水稻中,这一过程由P-1B型重金属ATP酶*OsHMA3*负责(Ueno et al., 2010)。在*OsHMA3*的T-DNA插入突变体或者*OsHMA3*功能丧失的水稻品种中,镉未能被转运到液泡中,从而导致由根系向地上部和籽粒运输大幅度上升,引起籽粒中镉含量升高(Ueno et al., 2010; Miyadate et al., 2011; Yan et al., 2016)。相反,过量表达*OsHMA3*基因可以将镉截留在根部,从而显著降低籽粒中镉的积累(Ueno et al., 2010)。虽然通过敲除*OsNRAMP5*和过量表达*OsHMA3*可以有效降低籽粒镉的积累,但是镉依旧滞留于污染农田中。如何将镉定向分配到水稻地上部秸秆和叶片等非可食部分,同时保证籽粒镉含量不超标,在实现水稻安全的同时对镉进行移除修复,一直停留在概念的阶段。

Luo等(2018)对212份中国核心水稻种质资源以及一些代表品种进行筛选,鉴定出叶片和籽粒镉高积累的水稻品种TN1。他们利用TN1和CJ06构建的双单倍体群体进行QTL定位分析,克隆到1个特异调控镉在水稻叶片中积累的主效QTL基因*CAL1*。利用来源于高镉品种TN1的*CAL1*等位基因构建的近等基因系NIL (TN1),其木质部伤流液、叶片以及秸秆的镉含量均高于低镉品种近等基因系NIL (CJ06),而籽粒中镉的含量并无显著差异,表明*CAL1*特异地调控镉从根部向地上部秸秆的转运而不参与调控镉向籽粒的运输。*CAL1*表达量升高的转基因互补株系,其叶片镉的含量升高;相反,通过CRISPR/Cas9基因编辑技术将*CAL1*基因敲除,其叶片的镉含量降低,表明*CAL1*可以促进镉在叶片中的积累。*CAL1*基因编码1个植物防御素类似蛋白,此蛋白含有1个富含半胱氨酸结构域和胞外分泌信号肽。*CAL1*基因主要在根、叶鞘和节中表达,在叶片中基本不表达。在根中,*CAL1*主要在外皮层和中柱木质部薄壁细胞内表达;在剑叶的叶鞘中,*CAL1*也主要在木质部薄壁细胞中表达。亚细胞定位结果表明,*CAL1*蛋白定位在细胞壁上,这符合其带有胞外信号肽的特点。*CAL1*蛋白可以通过其蛋白上的3个巯基特异地与镉进行螯合而不与钙、锰和锌等二价离子结合。带有分泌信号肽的全长蛋白和加工掉信号肽的成熟蛋白均可以与镉螯合,但成熟蛋白与镉的结合强度更高。*CAL1*与镉结合之后可以从木

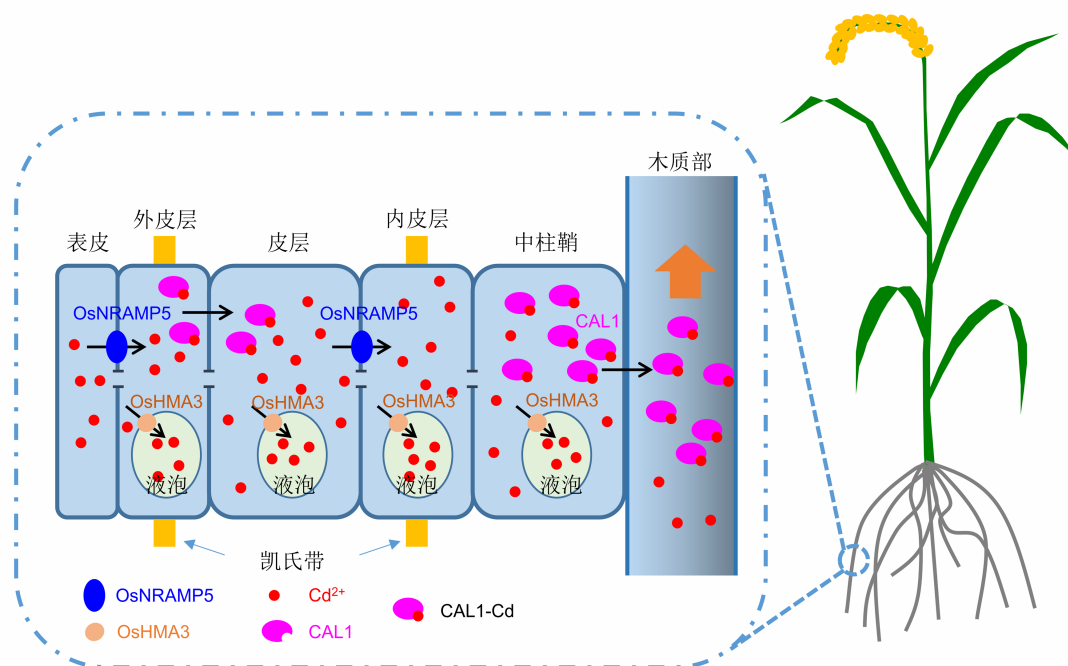


图1 水稻根部吸收和转运镉的示意图

镉离子在水稻根部通过OsNRAMP5吸收进入外皮层, 随后部分镉被OsHMA3转运到液泡中进行区隔化。OsNRAMP5同时负责将镉离子从皮层细胞转运到内皮层细胞。位于木质部薄壁细胞的CAL1蛋白与镉进行螯合后被分泌到胞外, 进入木质部导管向上部进行长距离运输。CAL1蛋白也在外皮层细胞中表达, 可能与镉进行螯合之后分泌到皮层细胞中。然而, 介导CAL1-Cd螯合物跨膜转运是通过转运蛋白还是囊泡运输尚不清楚。

Figure 1 Schematic diagram of the uptake and transport of Cd in rice roots

The uptake of Cd into rice roots is mediated by OsNRAMP5, which is also responsible for the transport of Cd from cortex cells into endodermis. Part of Cd is then sequestered into vacuoles by OsHMA3. In xylem parenchyma cells, Cd is chelated with CAL1 in the cytosol and then is secreted into the xylem vessels for long-distance transport to shoots. CAL1 is also expressed in exodermis, where CAL1 is also able to chelate Cd and potentially facilitates the Cd secretion from exodermis into cortex cells. However, it is still not clear whether transporters or vesicular trafficking pathways are responsible for translocating the CAL1-Cd complex across the plasma membrane.

质部薄壁细胞的细胞质中分泌出来, 进入木质部中参与长距离转运, 从而促进镉在叶片中的积累(图1)。CAL1基因原本不在叶片中表达, 但在叶片中可以检测到其成熟蛋白的存在, 同时在木质部伤流液以及叶尖排水器溢出液中也可以检测到CAL1蛋白, 进一步证实了CAL1蛋白的移动性。由于镉与CAL1的紧密结合, 可能影响这些螯合态的镉再次跨膜通过韧皮部向水稻籽粒的再分配过程, 因此CAL1在促进镉在叶片和秸秆中积累的同时, 并未促进镉向籽粒的转运。

镉离子通过植物根系吸收进入体内以后通常与植物螯合素(phytochelatins, PCs)、谷胱甘肽(GSH)、金属硫蛋白(metallothioneins, MT)以及其它一些寡肽或者小分子化合物等螯合物进行螯合。这些螯合物

的含量变化直接影响镉在植物体内的运输和分配。例如, 通过RNAi降低水稻的植物螯合素合成酶基因OsPCS1和OsPCS2的表达, 可以显著降低籽粒镉的含量, 然而其中的机制并不清楚(Das et al., 2017)。Luo等(2018)的研究结果表明, 镉可以与植物防御素CAL1蛋白进行螯合, 与镉和植物螯合素的螯合类似, 均通过巯基与镉进行螯合。CAL1蛋白螯合镉后跨细胞膜分泌到胞外, 从而从细胞质中卸载出来, 进入木质部中进行长距离转运。镉与CAL1蛋白螯合之后, 限制了其通过韧皮部向水稻籽粒的再分配, 从而定向调控其在叶片等营养器官的积累而不影响籽粒中镉的积累。这一创新性研究加深了人们对重金属镉在植物体内的转运和再分配机理的认识, 同时也为培育秸秆

镉高积累而籽粒镉含量达标的“修复型”水稻品种提供了有用的新基因,研究成果具有重要的理论意义和应用价值。后续将通过挖掘**CAL1**强功能型自然变异优异等位基因以及原位过量表达**CAL1**基因等手段,进一步提高水稻秸秆中镉的积累量;同时,在中低镉污染农田中实际考察镉的移除效率以及籽粒镉的含量,以进一步提高**CAL1**在培育“修复型”水稻品种中的应用价值。

参考文献

- 环境保护部和国土资源部 (2014). 全国土壤污染状况调查公报. http://www.mep.gov.cn/qkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.htm.
- Das N, Bhattacharya S, Bhattacharyya S, Maiti MK (2017). Identification of alternatively spliced transcripts of rice phytochelatin synthase 2 gene *OsPCS2* involved in mitigation of cadmium and arsenic stresses. *Plant Mol Biol* **94**, 167–183.
- Du Y, Hu XF, Wu XH, Shu Y, Jiang Y, Yan XJ (2013). Effects of mining activities on Cd pollution to the paddy soils and rice grain in Hunan province, Central South China. *Environ Monit Assess* **185**, 9843–9856.
- Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arai T, Nishizawa NK, Nakanishi H (2012). Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 19166–19171.
- Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arai T, Nakanishi H, Nishizawa NK (2012). Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Sci Rep* **2**, 286.
- Luo JS, Huang J, Zeng DL, Peng JS, Zhang GB, Ma HL, Guan Y, Yi HY, Fu YL, Han B, Lin HX, Qian Q, Gong JM (2018). A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice. *Nat Commun* **9**, 645.
- Miyadate H, Adachi S, Hiraizumi A, Tezuka K, Nakazawa N, Kawamoto T, Katou K, Kodama I, Sakurai K, Takahashi H, Satoh-Nagasawa N, Watanabe A, Fujimura T, Akagi H (2011). *OsHMA3*, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytol* **189**, 190–199.
- Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell* **24**, 2155–2167.
- Song Y, Wang Y, Mao WF, Sui HX, Yong L, Yang DJ, Jiang DG, Zhang L, Gong YY (2017). Dietary cadmium exposure assessment among the Chinese population. *PLoS One* **12**, e0177978.
- Tang L, Mao BG, Li YK, Lv QM, Zhang LP, Chen CY, He HJ, Wang WP, Zeng XF, Shao Y, Pan YL, Hu YY, Peng Y, Fu XQ, Li HQ, Xia ST, Zhao BR (2017). Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Sci Rep* **7**, 14438.
- Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang CF, Ando T, Yano M, Ma JF (2010). Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 16500–16505.
- Yan JL, Wang PT, Wang P, Yang M, Lian XM, Tang Z, Huang CF, Salt DE, Zhao FJ (2016). A loss-of-function allele of *OsHMA3* associated with high cadmium accumulation in shoots and grain of Japonica rice cultivars. *Plant Cell Environ* **39**, 1941–1954.
- Yang M, Zhang YY, Zhang LJ, Hu JT, Zhang X, Lu K, Dong HX, Wang DJ, Zhao FJ, Huang CF, Lian XM (2014). *OsNRAMP5* contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots. *J Exp Bot* **65**, 4849–4861.
- Zhao FJ, Ma YB, Zhu YG, Tang Z, McGrath SP (2015). Soil contamination in China: current status and mitigation strategies. *Environ Sci Technol* **49**, 750–759.
- Zhu HH, Chen C, Xu C, Zhu QH, Huang DY (2016). Effects of soil acidification and liming on the phytoavailability of cadmium in paddy soils of central subtropical China. *Environ Pollut* **219**, 99–106.

A Defensin-like Protein Regulates Cadmium Accumulation in Rice

Xinyuan Huang^{*}, Fangjie Zhao

State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Resources and Environmental Sciences,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Cadmium (Cd) is a highly toxic heavy metal that threatens human health. Rice is one of food crops that can accumulate Cd in the grain to levels that are unsafe for human consumption. With increasing contamination of heavy metals in paddy soils in China, considerable proportions of rice grain produced in some areas of southern China exceed the 0.2 mg·kg⁻¹ Cd limit of the Chinese food standard, which causes widespread public concern. Molecular breeding of rice varieties that accumulate Cd in straw for removing Cd from paddy soil while producing safe grain is one of the strategies for phytoremediation of contaminated soils. Recently, Luo et al. identified a quantitative trait locus *CAL1* in rice that specifically regulates the accumulation of Cd in leaves. *CAL1* encodes a defensin-like protein that can chelate Cd in the cytosol and facilitates Cd secretion from xylem parenchyma cells into xylem vessels for long-distance transport. The chelation of Cd to *CAL1* appears to prevent Cd from being loaded into the phloem for transport to rice grain. Thus, *CAL1* does not affect the accumulation of Cd in rice grain. These findings shed light on understanding the molecular mechanism of Cd translocation and allocation in rice and provide a molecular tool to breed rice varieties that may be used to remove Cd from the soil without affecting grain Cd concentration.

Key words rice, cadmium, phytoremediation, defensin protein

Huang XY, Zhao FJ (2018). A defensin-like protein regulates cadmium accumulation in rice. *Chin Bull Bot* **53**, 451–455.

* Author for correspondence. E-mail: xinyuan.huang@njau.edu.cn

(责任编辑: 朱亚娜)