

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150720002

李娟, 全占军, 张春晖, 等. 植物铜耐性机理的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3): 53-60

Li J, Quan Z J, Zhang C H, et al. Research Progress of the Tolerance Mechanism of Plants to Copper [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(3): 53-60 (in Chinese)

植物铜耐性机理的研究进展

李娟^{1,2}, 全占军^{2,*}, 张春晖¹, 史娜娜², 韩煜², 王琦², 张淇翔²

1. 中国矿业大学(北京) 化学与环境工程学院, 北京 100083

2. 中国环境科学研究院, 北京 100012

收稿日期: 2015-07-20 录用日期: 2015-11-11

摘要: 主要从植物根细胞壁积累固定、细胞膜对铜的吸收控制、金属配体的螯合作用、铜在系统液泡的分隔机制及胁迫蛋白的合成5个方面, 分别阐述植物对铜分子的耐性机理的研究进展, 全面了解了铜在植物中的亚细胞分布、铜在植物根系到地上部分运输过程的转运机制以及植物在铜胁迫下的抗性反应等。并在此基础上提出了存在的问题以及今后研究的重点。

关键词: 铜; 植物; 细胞膜; 螯合作用; 胁迫蛋白

文章编号: 1673-5897(2016)3-053-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Research Progress of the Tolerance Mechanism of Plants to Copper

Li Juan^{1,2}, Quan Zhanjun^{2,*}, Zhang Chunhui¹, Shi Nana², Han Yu², Wang Qi², Zhang Qixiang²

1. School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining & Technology (Beijing), Beijing 100083, China

2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Received 20 July 2015 accepted 11 November 2015

Abstract: Research progress of the tolerance mechanism of plants to copper was reviewed in five aspects: i) the copper accumulation of plant cell wall; ii) the absorption and control of plant membrane; iii) the chelation of metal ligands; iv) the separation of vacuole; and v) the synthesis of Cu-responsive proteins. The review provided us a better understanding of the subcellular distribution of copper in plant, the transport mechanism of copper from root to shoot of plants and the resistance of plants under copper stress. Based on the progress, the prospects of future studies were suggested.

Keywords: copper; plant; plasma membrane; chelation; tolerance stress proteins

铜是植物生长所必需的微量营养元素之一, 其参与植物体内多种生理生化反应, 是细胞色素氧化酶、Cu/Zn 超氧化物歧化酶、多酚氧化酶等胞内酶所必需的组分或辅酶, 在植物光合、呼吸、抗氧化、细胞

壁代谢以及激素反应中起着重要作用^[1]。然而, 过量的铜可能会抑制植物的光合作用及色素合成, 且能够与细胞膜蛋白巯基结合, 从而导致膜破坏, 产生脂质过氧化反应, 使细胞膜透性增加, 造成膜内电解

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务专项 (2013-YSKY-14); 云南省环境保护厅生物多样性保护专项“滇池土著水生植物保育区构建示范研究”

作者简介: 李娟(1990-), 女, 硕士生, 研究方向为重金属污染土壤生态修复, E-mail: jilife307@126.com

* **通讯作者** (Corresponding author), E-mail: quanzej@craes.org.cn

质和非电解质的外渗,破坏胞内环境的稳定性^[2]。大量研究表明,低浓度 Cu 处理能够促进植物的生长,而高浓度 Cu 则抑制其生长^[3-4]。不仅如此,在长期的进化过程中,生长于铜污染胁迫下的植物,逐渐在细胞内形成了严格的调控机制调节铜在植物体内的含量^[5]。本文针对植物对铜的吸收控制机理及防御机理,主要从植物根细胞壁的稳定机制、细胞膜对铜的吸收控制机理、金属配体的螯合作用、铜在细胞液泡的分割机理以及胁迫蛋白的合成 5 个方面总结植物对铜毒害的解毒作用机制。

1 植物对铜的吸收控制机理 (Mechanism of plant absorbing and controlling copper)

1.1 根细胞壁固定机制

根细胞壁是重金属进入细胞的第一道屏障。长期生存在铜污染环境中的植物,大部分铜积累在植物根系,只有少量的铜会转移到地上部^[4,6-7],而根系中的铜又大多被吸附在根细胞壁上^[8-11],大大减少了铜离子向原生质体的跨膜运输,降低了铜的生物毒性,这是铜耐性植物抵抗铜毒害的重要机制。

细胞壁对重金属的吸附作用通过细胞壁中的多糖、蛋白质及木质素等组分提供的各种带负电的配位基团完成,这些配位基团主要包括羧基、羟基、醛基、氨基及磷酸基等^[12],其数量决定了细胞壁对重金属的吸附能力^[13-14]。武贝等^[15]经研究发现,海州香薷细胞壁纤维素和木质素中的羧基、氨基和羟基是铜的主要结合位点,且细胞壁结合 Cu 的分子形态类似于 Cu-草酸、Cu-组氨酸以及水合态铜离子。随后,刘婷婷等^[12]进一步研究发现,海州香薷根系中的果胶为铜离子提供了羟基官能团,纤维素和半纤维素为铜离子提供了羧基官能团,而细胞壁蛋白提供了氨基官能团等结合位点。Merdy 等^[16]发现,铜离子在小麦细胞壁上的结合位点主要是羧基和酚基。随后,又有研究发现,剑叶舌叶藓将过量的 Cu 累积在其原丝体的细胞壁上,且 43% 的 Cu 结合在果胶的同型半乳糖醛酸上^[8]。这说明,不同植物的细胞壁结构及组成不同,其铜离子的结合位点及各组分在对铜离子吸附固定过程中所起到的作用不同,且细胞壁中的纤维素、半纤维素以及果胶在植物抗 Cu 毒过程中起到了关键作用。

另外,在植物对铜的耐性机制中,细胞壁不仅仅是铜的被动积累场所,在胁迫环境持续作用下,细胞壁也会发生一系列变化,而这种变化又增强了其对重金属的吸附能力,同时降低了微量元素向原

生质体的渗透率^[9]。例如,Liu 等^[17]发现随着土壤介质中铜含量的增加,各种细胞壁多糖的含量也相应增加,且其中包含较多羧基的细胞壁多糖为铜离子提供了更多的结合位点。此外,过量的铜也会影响胞内多糖在根细胞壁上的分布,改变细胞壁的结构,这种改变不仅增加了细胞壁富集微量元素的能力,还降低了微量元素向原生质体的渗透性^[9,17]。

1.2 细胞膜对铜的吸收控制机理

铜离子的吸收和其在细胞内的平衡由具体转运载体和金属泵控制,它们属于不同的植物金属转运蛋白家族,能够在组织水平或器官水平起作用^[18]。Küpper 等^[19]研究发现,跨膜的金属转运蛋白在重金属的吸收、木质部的装载、卸载以及液泡区室化作用中可能起着决定性作用。近年来,对植物体吸收及运输铜的机制的研究取得了长足进步。目前已经发现了几种铜转运家族,包括 COPT 转运体、Cu 运输 P 型 ATP 酶、铜伴侣蛋白等^[20]。

COPT 转运体在调控植物细胞对重金属 Cu 的吸收及分配中起到关键作用,主要负责细胞质膜对高亲和性 Cu⁺ 的吸收^[21-22]。通过质膜铜吸收系统突变体的功能互补筛选实验,在拟南芥中基因组中鉴定出 6 个编码 COPT 的基因,即 COPT1-6,其中 COPT1、COPT2、COPT3、COPT5、COPT6 对 Cu 均具有很高的运输能力,最新发现的 COPT6 是位于细胞质膜上的铜吸收转运体,在铜缺失或过量时,对拟南芥体内铜含量的调控具有重要作用^[22-25]。拟南芥中 COPT1 存在于拟南芥细胞质膜上^[26],能弥补酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 铜吸收缺失突变体,被认为是一个铜转运体,在植物吸收铜的过程中发挥重要作用^[27-28],COPT1 基因主要在根尖、表皮毛、气孔、花粉和种胚等部位表达^[28],其表达受 Cu 负调控^[22],增加了植物对 Cu 毒性的敏感性^[29]。目前,已有研究表明 Cu 以还原形式的 Cu⁺ 进入细胞质^[30],且相对于家族内其他蛋白,COPT1 对 Cu⁺ 具有较高亲和力和^[22]。

Cu 运输 P 型 ATP 酶能将无机阳离子运入或排出细胞,HMA 重金属转运蛋白随其分布的组织、亚细胞定位以及金属特异性的不同而具备不同的功能。Baxter 等^[31]在拟南芥体内发现了 P_{1B} 型 ATPases 的 8 个成员,并将其分别命名为 AtHMA1-8,其中包括之前已经命名的 PAA1 (AtHMA6),RAN1 (AtHMA7),PAA2 (AtHMA8)。AtHMA1-AtHMA4 属于 P_{1B-2} 型 ATPases,为二价阳离子载体,如 Cu²⁺、Cd²⁺

等;而 AtHMA5-AtHMA8 属于 P_{1B-1} 型 ATPases,为一价阳离子载体,如 Cu^+ 、 Ag^+ 等^[32]。Nuria 等^[33]通过对两个功能缺失突变体进行研究,发现 AtHMA5 能够将 Cu^+ 从细胞质运出胞外或运入相应器官,其在植物根部和花中大量表达,此外,酵母双杂交实验发现,铜分子伴侣 ATX1 或 CCH 相互作用能与 AtHMA5 的氨基端相互作用^[34-35]。AtHMA1、AtHMA6 都存在于叶绿体内膜上,分别通过不同的方式将 Cu 转运到叶绿体基质中^[36-37]。经过对叶绿体被膜上的 ATPase 分析发现,AtHMA1 的活性仅仅受到 Cu 的刺激,表明 AtHMA1 对铜具有特异性^[37]。AtHMA8 编码位于叶绿体类囊体上的 Cu 运输 P 型 ATPases,可将叶绿体基质中的 Cu^+ 转运到类囊体腔中,Cu 向质体蓝素的传递需要 AtHMA6 和 AtHMA8 共同作用^[38]。Rodriguez 等^[39]发现 RAN1(AtHMA7)是定位于内质网膜上的铜结合蛋白,在运输 Cu 到乙烯受体中起作用。然而,又由于 RAN1 与酵母中位于高尔基膜泡上的 Cu^+ -ATPase Ccc2p 的功能具有相似性,都负责将 Cu^+ 运输到 ETR1^[40],故推测 RAN1 可能位于高尔基膜泡上。关于 RAN1 的定位及在植物中的功能还需要进一步确定。单子叶植物水稻 (*Oryza sativa*) 基因组中发现了 9 个基因,即 OsHMA1-9^[41]。水稻体内的 OsHMA5 负责将根系中的铜向木质部加载,参与铜在体内由根系向地上部的运输,且通过对 OsHMA5 抗体进行免疫染色,发现其定位于细胞质膜^[42]。目前,对于 HMAs 的研究多集中于双子叶植物拟南芥,而对于单子叶植物中的 HMAs 的相关功能及研究较少,对其基因定位及功能尚需要更进一步的研究。

自从酵母中的铜伴侣蛋白 ATX1 被确认为 Cu^+ 的受体后,铜伴侣蛋白的概念逐渐为人们所知^[43],它能在细胞溶质中与低溶解性、高活性的 Cu^+ 结合,再把 Cu 传递给所需的亚细胞体^[35,44],保护细胞免受重金属毒害^[22,45]。在植物体内的铜伴侣蛋白主要包括:CCH^[44,46]、AtCOX17^[47]、AtCCS^[48] 和 AtATX1^[49]。CCH 是拟南芥中第一个被发现的铜伴侣蛋白^[44],含有植物特异的羧基端区域 CTD 和独特的结构特征,CCH 能够在植物的韧皮部、叶柄和衰老的叶片等表达^[46]。CCH 与酵母中的 ATX1 为同源蛋白,能够将铜离子传递给与 CCC2 同源的 RAN1,然后由 RAN1 将 Cu 传递给分泌道促使乙烯产生信号^[49-51]。Puig 等^[35]发现高等植物体内含有两种类型 ATX1 铜伴侣蛋白,即之前已经发现的 CCH 和 AtATX1。AtATX1

存在于细胞质中,能互补酵母 atx1 和 sod1 突变体的表型,通过酵母双杂交实验发现 AtATX1 能够将 Cu^+ 转运给 RAN1,但其转运效率低于 CCH。Balandin 和 Castresana^[47]发现了与酵母中 COX17 同源的 AtCOX17,它能够将 Cu 传递给线粒体的细胞色素氧化酶复合体上。与酵母 Ccs1p/Lys7p 同源的 AtCCS 能够将 Cu^+ 转运到 SOD1,其在叶绿体中行使功能,可能向机制中 Cu/Zn SOD 供应 Cu^+ ,保持 Cu^+ 在质体蓝素和 SOD 中的稳态含量,同时,AtCCS 的 ATX-like 域对其铜伴侣蛋白的功能至关重要^[52]。

2 植物对铜的防御机理 (Mechanism of plant defending copper)

2.1 金属配体的螯合作用

重金属进入根细胞后,特异性蛋白质会通过螯合作用调控铜在植物体内的生态平衡,一方面,保证足量的 Cu 来维持植物的正常代谢功能,另一方面,避免铜在体内过多积累而对植物产生毒害作用^[53]。铜离子对多肽、巯基、羧基以及酚羟基均具有很强的亲和力,其经细胞膜进入细胞质后,以结合态存在于细胞中^[29],随后,经金属载体转运至相应的细胞器或液泡中储存。植物体内的金属配体主要包括有机酸、氨基酸、金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)、植物螯合肽(phytochelatins, PCs)及其他低分子量化合物。

植物体内螯合铜的有机酸主要是柠檬酸、苹果酸和草酸,但不同种类植物螯合重金属的有机酸种类不同,且有机酸是否能够对植物体内铜起到解毒作用仍存在很大争议^[54]。Murphy 等^[55]发现短期的 K^+ 外排可增加拟南芥对 Cu 的耐性,而此过程又伴随着柠檬酸的释放,且 Cu 促进了柠檬酸盐的释放。此后,Bernal 等^[56]也发现在大豆细胞悬浮液暴露于铜环境时,柠檬酸首先合成。目前,有机配体提高植物抗 Cu 毒的研究相对较少,有机酸是否能够提高植物耐 Cu 毒的能力及其作用机制需进一步研究。氨基酸(如组氨酸等)也可作为重金属的配位基,在重金属的解毒和耐受机制中发挥作用,能够通过巯基、氨基、羧基和铜离子结合,形成稳定的螯合物从而起到一定的解毒作用。White 等^[57]发现在大豆渗出物中铜主要与天冬酰胺和组氨酸结合,在番茄中主要与组氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺结合。经 Cu 处理后的耐铜品种 B1139 和敏感品种 B1195 两品种水稻木质部汁液中的各种氨基酸的含量均有所上升,其中丝氨酸含量最高、上升最快,然而,其在水稻木质部中与 Cu 在水稻木质部中的运输和解毒是否

相关尚需要进一步研究^[58]。

金属螯合蛋白对铜的螯合能力远大于其他配体^[59]。MTs 是一类富含半胱氨酸(Cys)残基,可以结合重金属的低分子量蛋白质。Guo 等^[60]已经通过研究证明了 MTs 在调节植物体内金属平衡的作用。过量的 Cu 经常诱导 MTs 的产生^[61], MTs 可通过 Cys 残基上的巯基与铜离子结合形成无毒或低毒络合物,消除其毒害作用。Thomas 等^[62]将酵母中的金属硫蛋白(CUP1)引入烟草体内,发现在铜胁迫下植物体内的 CUP1 转录水平下降,但转基因植物叶片积累的铜含量较对照植物依然增加了 2~3 倍。另有研究发现过量表达 OsMT2c 的转基因拟南芥比野生植物对铜的耐性更强,且对 ROS 的清理能力也更强^[63]。PCs 是以谷胱甘肽为底物由 PC 合成酶催化而成的金属螯合肽^[64],和游离的重金属离子螯合形成无毒或低毒的化合物。虽然,PCs 能够通过 Cu 离子诱导产生,但由于 PC-Cu 复合物并未在液泡中隔离,且 PCs 突变体对铜的敏感性较小,故推测 PC 的诱导合成不是植物解铜毒的主要机制^[65]。随后, Lee 和 Kang^[66]通过研究发现,过量表达拟南芥 AtPCS1 的 Cd 耐性转基因植物对铜不具有耐性,拟南芥突变体 cad2-1 对铜的耐性高于野生型植物,这些都说明 PCs 对铜并没有显著的解毒作用。

2.2 铜在细胞液泡的分隔机理

铜能够通过位于液泡膜上的金属载体从胞质转运至液泡中储存^[15]。重金属转运蛋白及金属螯合蛋白通过与金属离子结合形成一种临时储存形式封存于液泡中,其中,液泡膜转运蛋白 ABCCs 在其向液泡的运输起到了关键作用。液泡含有多种蛋白质、有机酸、有机碱以及其他能够结合重金属的物质,这些物质都能与重金属离子结合从而降低其生物毒性^[11]。研究发现,生长于铜污染环境中的骆驼刺(*Alhagi camelorum* Fisch)并未产生明显的铜毒害症状,这是因为过量的铜大多被储存于植物叶片中的液泡(48%)和叶绿体(7%)中^[67]。经过铜处理后的大蒜,铜主要聚集在根尖细胞的液泡中^[68]。另外,通过投射电镜观察发现,某些被子植物液泡中积累了大量的铜离子^[69],泡泡草根细胞中的液泡膜上可见黑色沉积物^[70]。以上研究结果均表明,液泡是除细胞壁以外的另一主要的重金属隔离位点,通过将 Cu 隔离在液泡中,减少铜离子在植物细胞质中的含量,从而抑制其对植物的毒害作用。Wu 等^[71]通过研究发现,在匍匐剪股颖(*Agrostis stolonifera*)体内,铜以

可溶或不可溶的复合物形态存在于细胞质或液泡中,蓄积在液泡中的铜离子是没有毒性的,这一耐性机制对一些地上部分含铜量高的植物,特别是低等植物和超积累植物具有尤为重要的作用。另外,除液泡以外,隔离作用也可以发生在质外体或特殊细胞中,如表皮细胞及毛状体中^[4]。由于分离高纯度的液泡难度较大,对于铜是如何进入植物液泡以及铜是以何种形态存在于液泡中尚需要进一步深入研究。

2.3 胁迫蛋白的合成/抗氧化酶保护系统

铜逆境影响能够诱导胁迫响应蛋白的表达,从而使植物细胞适应胁迫环境^[17]。通过蛋白质组分析,已经在多种植物中发现了多种重金属敏感蛋白,主要包括:抗氧化保护蛋白、与蛋白折叠相关的蛋白(如热激蛋白、伴侣蛋白和蛋白质二硫键异构酶)、病程相关蛋白及参与脂质代谢的蛋白、蛋白和离子转运蛋白,这些蛋白的表达量均在金属胁迫下上调^[72]。张黛静等^[73]通过 KEGG 富集分析发现,检测出的 2 283 个差异表达基因(DEGs)被注释到 31 个代谢途径中,涉及植物生长发育的各个方面。

许多研究表明,在 Cu 胁迫下植物体内的多种蛋白出现上调或下调现象^[61,63,74-75]。Smith 等^[76]研究发现,铜胁迫下拟南芥种子中 AtGSTF2, AtGSTF6, AtGSTF7 和 AtGSTU19 的 RNA 表达提高,这与张黛静等^[73]研究发现的铜胁迫下小麦谷胱甘肽硫转移酶(GSTs)等抗性蛋白质表达升高一致,这说明 GSTs 在植物低于重金属铜毒害中发挥了重要的作用。Li 等^[77]利用蛋白质组学方法研究小麦中铜胁迫响应蛋白的种类,在其根系和叶片中分别发现了 49 种和 44 种差异表达蛋白。其中,信号传导、胁迫防御、能量代谢等方面的功能蛋白丰度显著上调,而在糖代谢、蛋白质代谢以及光合作用方面的功能蛋白丰度显著降低。Chen 等^[75]通过对比研究抗铜水稻品种 B1139 和铜敏感水稻品种 B1195 根系对铜结合蛋白的差异性表达,两种水稻根系中的 Cu-IMAC 结合蛋白含量在铜胁迫环境下高于对照,而 B1139 根系中的 Cu-IMAC 结合蛋白含量高于 B1195。这说明 Cu-IMAC 结合蛋白对植物对铜的耐性和解毒能力的增强发挥了积极的作用。同时,通过 MALDI-TOF/TOF MS 发现了 34 种差异性表达的蛋白点,经数据库搜索后确定了 27 种铜结合蛋白。这些铜响应蛋白分别参与到植物的抗氧化防御和解毒,发病机理,基因转录调控,氨基酸合成,蛋白质合成、修饰、运输以及降解,细胞壁合成和分子信号转换等过程。

3 总结与展望 (Summary and prospect)

铜污染是一个严重的环境问题,过量的铜会严重损害植物的细胞结构和细胞膜,抑制植物基本的运输和代谢功能,同时能够经过食物链的积累作用危害人类健康。目前,植物耐铜胁迫的机理大多集中于生理生化水平,且已经取得了很大的进展。研究植物耐铜胁迫的生理机制,可以全面了解铜在植物中的亚细胞分布、铜在植物根系到地上部分运输过程的转运机制以及植物在铜胁迫下的抗性反应等,促进富集重金属转基因植物的开发。但在分子水平上,植物对铜耐性和积累性的机理仍不明确,如植物细胞如何感应铜信号的刺激,植物耐铜的相关基因如何进行表达和调控,植物耐受铜的基因的鉴定、分离、克隆及其功能研究等还未进行较为深入的研究。随着分子生物学、蛋白组学以及分子遗传学等新兴技术的应用,在今后的研究中应集中从分子和蛋白水平上研究耐性植物和超积累植物细胞参与对重金属铜的解毒和耐性机理,进而利用分子遗传学手段创造培育出低积累、高耐性的农作物新品种以及生长快、高生物量、高积累的超富集植物新品种。

致谢:感谢中国环境科学研究院张凤春老师在文章修改中给予的帮助。

通讯作者简介:全占军(1979—),男,博士,副研究员,主要研究方向为恢复生态学。

参考文献 (References):

- [1] Pilon M, Abdel-Ghany S E, Cohu C M, et al. Copper co-factor delivery in plant cells [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(3): 256-263
- [2] Gill T, Dogra V, Kumar S, et al. Protein dynamics during seed germination under copper stress in *Arabidopsis* over-expressing potentilla superoxide dismutase [J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(1): 165-172
- [3] 王小玲, 高柱, 黄益宗, 等. 铜胁迫对3种草本植物生长和重金属积累的影响[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(4): 699-706
Wang X L, Gao Z, Huang Y Z, et al. Effects of copper stress on three kinds of herbaceous plants growth and heavy metal accumulation [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(4): 699-706 (in Chinese)
- [4] Sahi S V, Israr M, Srivastava A K, et al. Accumulation, speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii* [J]. *Chemosphere*, 2007, 67(11): 2257-2266
- [5] Garcia L, Welchen E, Gonzalez D H. Mitochondria and copper homeostasis in plants [J]. *Mitochondrion*, 2014, 19: 269-274
- [6] 申鸿, 刘于, 李晓林, 等. 丛枝菌根真菌(*Glomus caledonium*)对铜污染土壤生物修复机理初探[J]. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11(2): 199-204
Shen H, Liu Y, Li X L, et al. Influence of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus caledonium*) on maize seedlings grown in copper contaminated soil [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, 11(2): 199-204 (in Chinese)
- [7] 刘小红. 九华铜矿重金属污染调查及耐铜植物的筛选、耐性机理研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2005: 35-36
Liu X H. Heavy metal contamination and copper tolerant plants in the vicinity of Jiuhua copper mine [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2005: 35-36 (in Chinese)
- [8] Konno H, Nakashima S, Katoh K. Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(5): 358-364
- [9] Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33: 35-51
- [10] Konno H, Nakato T, Nakashima S, et al. *Lygodium japonicum* fern accumulates copper in the cell wall pectin [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(417): 1923-1931
- [11] Liu T, Li F, Zhang X, et al. Tracing intracellular localization and chemical forms of copper in *Elsholtzia splendens* with cluster analysis [J]. *Biological Trace Element Research*, 2014, 160(3): 418-426
- [12] 刘婷婷, 彭程, 王梦, 等. 海州香薷根细胞壁对铜的吸附固定机制研究[J]. *环境科学学报*, 2014, 34(2): 514-523
Liu T T, Peng C, Wang M, et al. Mechanism of fixation and adsorption of copper on root cell wall of *Elsholtzia splendens* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(2): 514-523 (in Chinese)
- [13] Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz E J. New insights into pectin methylesterase structure and function [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(6): 267-277
- [14] Davis T A, Volesky B, Mucci A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae [J]. *Water Research*, 2003, 37(18): 4311-4330
- [15] 武贝. 海州香薷 Cu 耐性与积累机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009: 45-49
Wu B. Study of mechanisms for Cu tolerance and accu-

- mulation in *Elsholtzia splendens* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009: 45-49 (in Chinese)
- [16] Merdy P, Guillon E, Dumonceau J, et al. Spectroscopic study of copper(II)--wheat straw cell wall residue surface complexes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(8): 1728-1733
- [17] Liu T, Shen C, Wang Y, et al. New insights into regulation of proteome and polysaccharide in cell wall of *Elsholtzia splendens* in response to copper stress [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109573
- [18] Pilon M, Cohu C M, Ravet K, et al. Essential transition metal homeostasis in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(3): 347-357
- [19] Küpper H, Zhao F J, Mcgrath S P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119: 305-311
- [20] Sahi S V, Israr M, Srivastava A K, et al. Accumulation, speciation and cellular localization of copper in *Sesbania drummondii* [J]. *Chemosphere*, 2007, 67(11): 2257-2266
- [21] Puig S, Lee J, Lau M, et al. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(29): 26021-26030
- [22] Sancenon V, Puig S, Mira H, et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(4): 577-587
- [23] Jung H I, Gayomba S R, Rutzke M A, et al. COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(40): 33252-33267
- [24] Antoni G, Nuria A, Ana P, et al. The *Arabidopsis* COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54(8): 1378-1390
- [25] Penarrubia L, Nuria A, Moreno J, et al. Regulation of copper transport in *Arabidopsis thaliana*: A biochemical oscillator? [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2010, 15(1): 29-36
- [26] Nuria A, Ana P, Puig S, et al. Deregulated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 170-184
- [27] Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, et al. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(47): 28479-28486
- [28] Sancenon V, Puig S, Isabel M, et al. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(15): 15348-15355
- [29] 张红晓, 张芬琴. 铜在植物细胞中的运输和分布[J]. *洛阳理工学院学报:自然科学版*, 2011, 27(3): 1-5
Zhang H X, Zhang F Q. Copper delivery and distribution in plant cells [J]. *Journal of Luoyang Institute of Science and Technology: Natural Science Edition*, 2011, 27(3): 1-5 (in Chinese)
- [30] Eisses J F, Kaplan J H. The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1: A mutational analysis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(44): 37159-37168
- [31] Baxter I, Tchieu J, Sussman M R, et al. Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice [J]. *American Society of Plant Biologists*, 2003, 132(2): 618-628
- [32] 金枫, 王翠, 林海建, 等. 植物重金属转运蛋白研究进展[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(7): 1875-1882
Jin F, Wang C, Lin H J, et al. Heavy metal-transport proteins in plants: A review [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(7): 1875-1882 (in Chinese)
- [33] Nuria A, Vicente S, Susana R, 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(2): 225-236
- [34] Williams L E, Mills R F. P(1B)-ATPases--An ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(10): 491-502
- [35] Puig S, Mira H, Dorcey E, et al. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2007, 354(2): 385-390
- [36] Boutigny S, Sautron E, Finazzi G, et al. HMA1 and PAA1, two chloroplast-envelope PIB-ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(6): 1529-1540
- [37] Daphne S, Gravot A, Auroy P, et al. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(5): 2882-2892
- [38] Salah E A, Patricia M, Niyogi K K, et al. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(4): 1233-1251
- [39] Rodriguez F I, Esch J J, Hall A E, et al. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis* [J].

- Science, 1999, 283(5404): 996-998
- [40] Chen Y F, Randlett M D, Findell J L, et al. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(22): 19861-19866
- [41] 张玉秀, 张媛雅, 孙涛, 等. 植物重金属转运蛋白 P_{1B}-ATPase 结构和功能研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 25(6): 715-725
- Zhang Y X, Zhang Y Y, Sun T, et al. Structure and function of heavy metal transporter P_{1B}-ATPase in plant: A review [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 25(6): 715-725 (in Chinese)
- [42] Deng F, Yamaji N, Xia J, et al. A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice [J]. Plant Physiology, 2013, 163: 1353-1362
- [43] Pufahl R A, Singer C P, Peariso K L, et al. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1 [J]. Science, 1997, 278(5339): 853-856
- [44] Himelblau E, Mira H, Lin S J, et al. Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 1998, 117(4): 1227-1234
- [45] 伍盈盈. 金属伴侣蛋白研究进展[J]. 科技信息, 2009, 33: 428-429
- Wu Y Y. The recent advances in study of metallochaperones [J]. Science & Technology Information, 2009, 33: 428-429 (in Chinese)
- [46] Mira H, Fernando M, Penarrubia L. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH [J]. Plant Journal, 2001, 25(5): 521-528
- [47] Balandin T, Castresana C. AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17 [J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1852-1857
- [48] Chu C C, Lee W C, Guo W Y, et al. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 139(1): 425-436
- [49] Lin S J, Pufahl R A, Dancis A, et al. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(14): 9215-9220
- [50] Harrison M D, Jones C E, Solioz M, et al. Intracellular copper routing: The role of copper chaperones [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2000, 25(1): 29-32
- [51] 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(3): 443-455
- [52] Salah E A, Burkhead J L, Gogolin K A, et al. AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7 [J]. FEBS Letters, 2005, 579(11): 2307-2312
- [53] Yruela I. Copper in plants: Acquisition, transport and interactions [J]. Functional Plant Biology, 2009, 36(5): 1-64
- [54] 傅晓萍, 豆长明, 胡少平, 等. 有机酸在植物对重金属耐性和解毒机制中的作用[J]. 植物生态学报, 2010, 34(11): 1354-1358
- Fu X P, Dou C M, Hu S P, et al. A review of progress in roles of organic acids on heavy metal resistance and detoxification in plants [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(11): 1354-1358 (in Chinese)
- [55] Murphy A S, Eisinger W R, Shaff J E, et al. Early copper-induced leakage of K(+) from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux [J]. Plant Physiology, 1999, 121(4): 1375-1382
- [56] Bernal M, Sánchez-Testillano P, Risueño M, et al. Excess copper induces structural changes in cultured photosynthetic soybean cells [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33(11): 1001-1012
- [57] White M C, Baker F D, Chaney R L, et al. Metal complexation in xylem fluid: II. Theoretical equilibrium model and computational computer program [J]. Plant Physiology, 1981, 67(2): 301-310
- [58] 刘红云. 水稻(*Oryza sativa* L.)耐铜品种的筛选及其耐性机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 86-89
- Liu H Y. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to copper and characterization of the mechanisms of tolerance [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007: 86-89 (in Chinese)
- [59] 张玉秀, 柴团耀, Burkard G. 植物耐重金属机理研究进展[J]. 植物学报, 1999, 41(5): 453-457
- Zhang Y X, Chai T Y, Burkard G. Research advances on the mechanisms of heavy metal tolerance in plants [J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(5): 453-457 (in Chinese)
- [60] Guo W J, Meenam M, Goldsbrough P B. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance [J]. Plant Physiology, 2008, 146(4): 1697-1706
- [61] Zhang H, Lian C, Shen Z. Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa* [J]. Annals of Botany, 2009, 103(6): 923-930
- [62] Thomas J C, Davies E C, Malick F K, et al. Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soils [J]. Biotechnology Progress,

- 2003, 19(2): 273-280
- [63] Liu J, Shi X, Qian M, et al. Copper-induced hydrogen peroxide upregulation of a metallothionein gene, OsMT2c, from *Oryza sativa* L. confers copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 294: 99-108
- [64] Rauser W E. Structure and function of metal chelators produced by plants: The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins [J]. Cell Biochemistry and Biophysics, 1999, 31(1): 19-48
- [65] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 159-182
- [66] Lee S, Kang B S. Phytochelatin is not a primary factor in determining copper tolerance [J]. Journal of Plant Biology, 2005, 48(1): 32-38
- [67] Boojar M M A, Tavakoli Z. Role of antioxidant enzyme response and phytochelatins in tolerance strategies of *Alhagi camelorum Fisch* growing on copper mine [J]. Acta Botanica Croatica, 2010, 69(1): 107-121
- [68] Liu D, Kottke I. Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS) [J]. Bioresource Technology, 2004, 94(2): 153-158
- [69] Elbaz B, Noa S, Ora D, et al. High expression in leaves of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* of AhM-HX, a homolog of an *Arabidopsis thaliana* vacuolar metal/proton exchanger [J]. Plant Cell and Environment, 2006, 29(6): 1179-1190
- [70] Burleigh S H, Kristensen B K, Bechmann I E. A plasma membrane zinc transporter from *Medicago truncatula* is up-regulated in roots by Zn fertilization, yet down-regulated by arbuscular mycorrhizal colonization [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52(5): 1077-1088
- [71] Wu L, Thurman D A, Bradshaw A D. The uptake of copper and its effect upon respiratory processes of roots of copper-tolerant and non-tolerant clones of *Agrostis stolonifera* [J]. New Phytologist, 1975, 75: 225-229
- [72] 谭九洲, 黄迎波. 植物重金属耐受分子机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35): 12782-12785
- Tan J Z, Huang Y B. Research progress of the molecular mechanism of heavy metal tolerance of plants [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(35): 12782-12785 (in Chinese)
- [73] 张黛静, 王多多, 董文, 等. 铜胁迫下小麦幼根转录组学及蛋白质组学研究[J]. 河南农业科学, 2015, 44(4): 31-35
- Zhang D J, Wang D D, Dong W, et al. Transcriptomics and proteomics analysis in root of wheat under copper stress [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2015, 44(4): 31-35 (in Chinese)
- [74] Kung C C, Huang W N, Huang Y C, et al. Proteomic survey of copper-binding proteins in *Arabidopsis* roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry [J]. Proteomics, 2006, 6(9): 2746-2758
- [75] Chen C, Song Y, Zhuang K, et al. Proteomic analysis of copper-binding proteins in excess copper-stressed roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties with different Cu tolerances [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125367
- [76] Smith A P, Deridder B P, Guo W J, et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(25): 26098-26104
- [77] Li G, Peng X, Xuan H, et al. Proteomic analysis of leaves and roots of common wheat (*Triticum aestivum* L.) under copper-stress conditions [J]. Journal of Proteome Research, 2013, 12(11): 4846-4861 ◆