

水稻镉积累相关基因家族研究进展

袁雪, 马海燕, 马亚飞*, 陆龙千 (广西大学农学院, 广西南宁 530005)

摘要 重金属镉会给人体健康带来很大的危害,降低水稻籽粒中的重金属镉含量成为了很多学者研究的内容。通过对水稻镉积累相关基因家族的概述及近些年的研究进展进行分析,希望能从中得到新的研究思路与方向。

关键词 水稻; 家族基因; 镉

中图分类号 S-3 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)16-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.16.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress of Cadmium Accumulation Related Gene Families in Rice

YUAN Xue, MA Hai-yan, MA Ya-fei et al (Agricultural College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract Cadmium, a heavy metal, can take great harm to human health. Reducing the content of cadmium in rice grains has become the research content of many scholars. By summarizing the gene families related to cadmium accumulation in rice and analyzing the research progress in recent years, this paper hopes to obtain new research ideas and directions.

Key words Rice; Family gene; Cadmium

水稻作为主要的世界粮食作物,在我国种植面积非常广泛。近年来,由于工业污染物的排放,土壤镉污染日益严重,随之带来的粮食安全问题也成为了大家聚焦的重点。目前,我国耕地重金属超标率在35%左右,面积将近2 000万hm²^[1]。大米镉超标会严重威胁人类健康,带来诸多健康问题,引起多种疾病,比如癌症、骨质疏松、肾结石等,甚至会影响智力发育。探讨如何降低水稻对镉的吸收转运,以期降低水稻籽粒中的镉含量,对食品健康等问题都有着十分积极的作用。

近年来,科学家们通过两大途径降低水稻籽粒中的镉含量,一种是治理降低农田土壤中的镉含量,以期降低植株的吸收量;另一种是选育低镉吸收的水稻镉安全材料,从植物本身来降低其镉含量。在不断探索植物体对镉吸收的生理生化过程中,科学家不断发现了水稻中众多调控或参与调控的相关蛋白,它们所代表的基因家族也陆陆续续被挖掘研究。笔者就目前发现的调控水稻镉的吸收、转运等过程主要的相关基因家族进行概括分析,为今后低镉积累水稻品种的选育提供相应的分子生物学信息。

1 NRAMP 家族

天然抗性相关巨噬细胞蛋白(NRAMP)是由一个大家族组成的完整的膜蛋白。NRAMP 蛋白家族作为一种二价金属转运体,在从细菌到人类的各种生物中发挥着广泛的作用,用于运输一系列二价金属阳离子,包括铁、锰、镉和锌^[2-3]。NRAMP 基因已在多种植物中得到鉴定(图1)^[4]。在水稻中,NRAMP 蛋白家族中有7个成员。它们分别被鉴定为 OsNRAMP1、OsNRAMP2、OsNRAMP3、OsNRAMP4、OsNRAMP5、OsNRAMP6 和 OsNRAMP7。其中,OsNRAMP3 参与锰的转运^[5],OsNRAMP4 参与三价铝离子的转运^[6]。

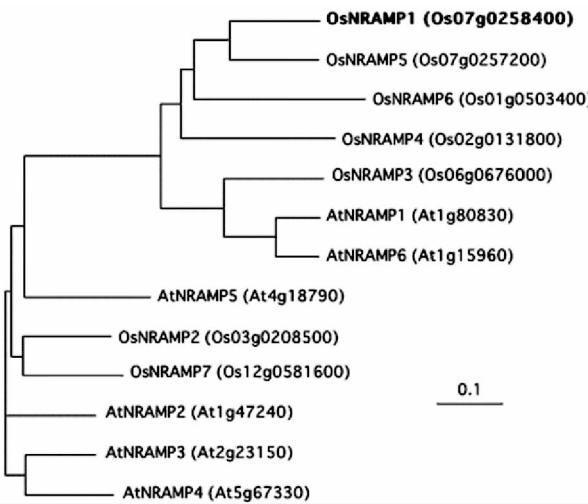


图1 水稻和拟南芥 NRAMP 蛋白的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the NRAMP proteins of rice and Arabidopsis

1.1 OsNRAMP1 OsNRAMP1 最早发现其与水稻体内铁离子的转运有关,是铁转运蛋白,在不同遗传背景的水稻中其表达量存在显著差异。OsNRAMP1 定位在质膜上,主要在根系中表达。Takahashi 等^[7]发现 OsNRAMP1 基因也参与了水稻对镉的吸收,在镉高积累的水稻中是一个非常重要的蛋白。根系中 OsNRAMP1 表达水平的差异可以引起不同品种间镉积累的差异^[7]。Tiwari M 等^[8]通过在酵母突变体(fet3fet4)中表达 OsNRAMP1,发现 OsNRAMP1 可能参与镉在木质部的装载,使镉从根转运到芽中,但具体是如何影响的还不得而知。

1.2 OsNRAMP2 Zhao 等^[9]用312份水稻种质资源通过全基因组关联分析发现了14个跟镉积累有关的QTLs。新研究发现的QTL(qCd3.2)候选基因 OsNRAMP2 的表达分析表明,OsNRAMP2 主要是在镉处理后高镉积累的幼苗中诱导的。在 OsNRAMP2 的开放阅读框中,发现了高、低镉积累材料之间的4个氨基酸差异。低镉积累的等位基因显著提高

基金项目 国家重点研发计划项目(2017YFD0100104)。
作者简介 袁雪(1994—),女,河南信阳人,硕士研究生,研究方向:水稻种质资源的创新与利用。*通信作者,博士研究生,研究方向:水稻育种。
收稿日期 2019-03-17

了酵母对镉的敏感性和积累。亚细胞定位分析表明, *OsNRAMP2* 在水稻原生质体中表达。

1.3 *OsNRAMP5* *OsNRAMP5* 是水稻根部细胞参与吸收二价金属阳离子的主要转运蛋白, 主要吸收 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Fe^{2+} , 同时负责这些离子从根部向地上部的运输, 其表达受根表皮、外皮层、皮层外层及木质部周围组织的限制^[10]。研究表明, 突变体 *osnramp5* 所编码的缺陷转运蛋白显著降低了根系对镉的吸收, 导致秸秆和籽粒中镉的含量降低^[11]。Tang L 等^[12]报道了利用 CRISPR/Cas9 系统敲除金属转运体基因 *OsNRAMP5*, 开发出低镉积累、无转基因的籼稻新品系, 此方法显著降低了水稻籽粒中的镉含量。

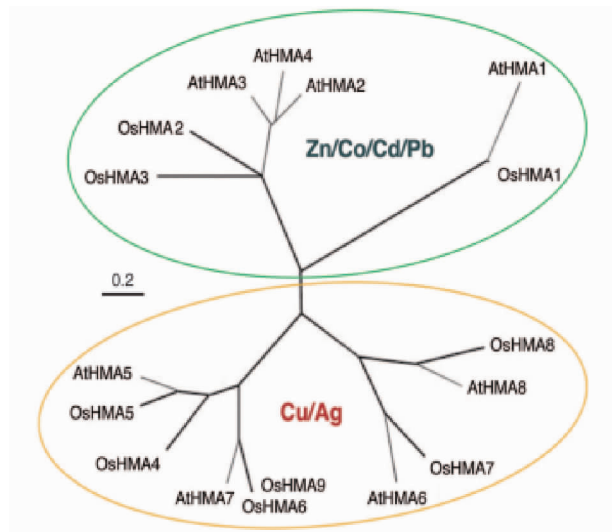
1.4 *OsNRAMP6* *AtNRAMP6* 定位于细胞器膜^[13] (具体细胞器还不清楚), 具有 Cd^{2+} 转运活性。先前发现的大部分镉转运蛋白基因大多是在根部表达, 而杨猛^[14]发现 *OsNRAMP6* 具有 Cd^{2+} 转运活性, 且在幼叶中表达极显著高于其他组织。由此推断出 *OsNRAMP6* 可能参与幼叶中镉的解毒, 但具体的表达特点及其功能还并不清楚。

2 HMA 家族

P_{1b} 型重金属 ATP 酶 (HMAs) 最早是在微生物中发现的^[15]。通过系统发育分析, 主要分为 2 个不同的簇, 一个是 Cu 团簇, 在 Cu、Ag 转运中起作用, 另一个是 Zn 团簇, 在 Zn、Co、Cd、Pb 转运中起作用 (图 2)^[16]。研究者们根据同源比对及酵母双杂试验, 发现了拟南芥中第一个具有镉转运活性的 HMA 成员 *AtHMA4*, 属于 Zn 团簇^[17-18]。 P_{1b} 型重金属 ATP 酶家族成员在重金属运输及稳态平衡方面都起着重要作用^[19]。目前与镉积累有关的家族基因有 *OsHMA2* 和 *OsHMA3*, 可能有关的 *OsHMA1*、*OsHMA9* 目前没有详细的研究进展, 可能调控着 Zn、Cu 或 Cd 的稳定, 拟南芥中的 *AtHMA1* 定位在叶绿体膜上, 主要在绿色组织中表达^[20]。高浓度的铜、锌和镉诱导时, *OsHMA9* 表达。研究发现, *OsHMA9* 主要表达在维管束和花药, 经过绿色荧光蛋白融合将其定位于质膜^[21]。

2.1 *OsHMA3* 基因 关于 HMA 基因家族在拟南芥中的功能已有很多报道, 其中 *AtHMA3* 的功能是将游离的镉转移进液泡中, 阻止镉向上转移^[22-23]。在此之前关于水稻该基因还未有报道。直到 Miyadate 等^[24]通过正向遗传学手段克隆出 *OsHMA3* 基因, 其主要定位在水稻根部, 与 *AtHMA3* 都是定位在液泡膜上, 反向调控镉在植物体内的转运。*OsHMA3* 过表达能够降低水稻籽粒镉的积累, 使水稻籽粒几乎不含镉, 对籽粒产量或必需微量营养素浓度几乎没有影响, 并且也提高了水稻对镉的耐受性^[25]。当 *OsHMA2* 的启动子控制 *OsHMA3* 的表达时, 可以通过将更多的镉隔绝到各个组织的液泡中, 有效地减少镉在水稻籽粒中的积累^[26]。籼稻通常比粳稻积累更多的镉在芽和籽粒中。但是, 籼稻和粳稻镉吸收积累差异的遗传基础仍不清楚。Liu CL 等^[27]发现 *OsHMA3* 启动子序列变异的 QTL GCC7 是控制籼稻和粳稻籽粒 Cd 差异积累的重要决定因素。

2.2 *OsHMA2* 基因 *OsHMA2* 是一个重要的 Zn 和 Cd 的转运蛋白, 与重金属 ATP 酶 *OsHMA3* 同源但功能完全不同, 其



注: 0.2 刻度显示代换距离

Note: The 0.2 scale shows substitution distance

图 2 水稻和拟南芥 HMAs 系统发育树^[16]

Fig.2 Phylogenetic tree of HMAs in rice and Arabidopsis^[16]

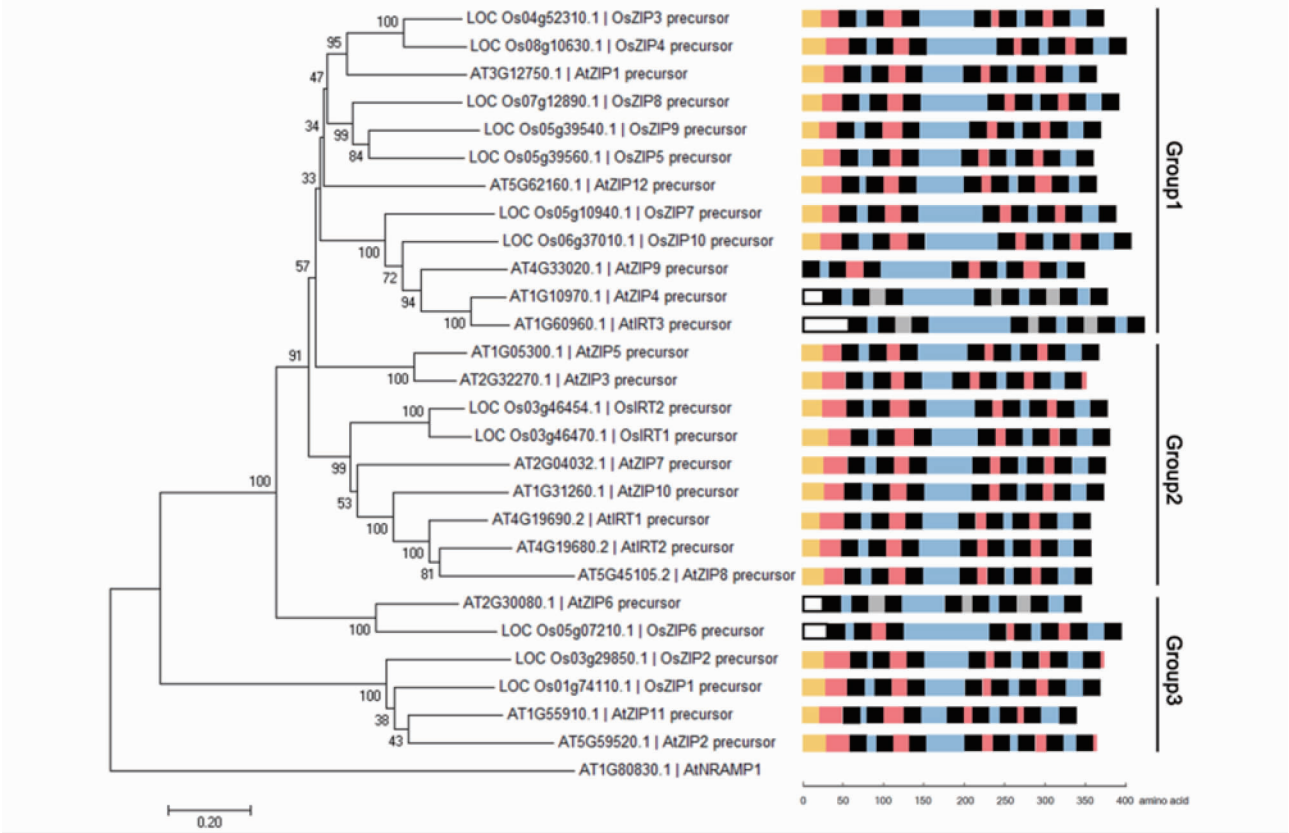
C 端区域是转运活性区域, 不能缺失^[28]。Yamaji 等^[29]通过构建的 *Tos17* 插入突变体, 发现在根冠尖端 Zn 浓度降低, 地上部的茎节和生殖器官中 Zn 和 Cd 的浓度降低。这说明 *OsHMA2* 在茎节中的表达对于 Zn 和 Cd 通过韧皮部优先运输到发育组织中发挥着重要作用。完全丧失 *OsHMA2* 的功能对于减少镉从根到芽的转运至关重要。Takahashi 等^[30]发现当 *OsHMA2* 过量表达且由 *OsSUT1* 启动子驱动 *OsHMA2* 时, 转基因水稻种子中的镉含量降低一半, 且其他金属含量基本不变。降低大米中镉的含量对于降低摄入镉的风险是迫切需要的, 但是保持谷物中其他金属的平衡是很重要的, 如果只降低水稻籽粒中镉积累的含量而不影响其他农艺性状, 这将是很有意义的。

3 ZIP 家族

锌铁转运蛋白家族基因 (ZIPs) 是一种膜定位的阳离子转运蛋白^[31-32]。它们普遍存在于原核细胞、真菌、植物和哺乳动物中。在拟南芥和水稻中, 目前发现了大量的 ZIPs 基因 (图 3)^[33], 但是只有少量的 ZIPs 在植物中进行了生物学功能的检测。其中水稻中铁转运蛋白 2 个, *OsIRT1* 和 *OsIRT2*; 锌转运蛋白 14 个, *OsZIP1*、*OsZIP2*、*OsZIP3*、*OsZIP4*、*OsZIP5*、*OsZIP6*、*OsZIP7*、*OsZIP8*、*OsZIP9*、*OsZIP10*、*OsZIP11*、*OsZIP13*、*OsZIP14*、*OsZIP16*。最近, 对来自拟南芥的 18 个和来自水稻的 16 个 ZIPs 进行了注释^[34]。

3.1 *OsZIP1* *OsZIP1* 在根部和花穗表达, 负责吸收转运 Zn 和 Cd。在缺 Zn 诱导下, 其表达上调^[35-36]。

Zheng 等^[33]曾系统性地研究了拟南芥和水稻本中的 ZIPs 在镉胁迫下的表达调控。拟南芥主要是根系 ZIPs 基因表达上调, 水稻主要是茎 ZIPs 基因表达上调。有趣的是, 一些基因, 如 *AtIRT3*、*AtZIP5*、*AtZIP12*、*OsIRT1* 和 *OsZIP1*, 在镉胁迫下表现出相反的表达调控。*AtIRT1*、*OsZIP1* 和 *OsZIP3* 能够增强对 Cd 胁迫的敏感性, 在酵母细胞中表达时会增加



注:黑盒子表示 TM 区域,粉红色的框表示细胞外区域,蓝框代表细胞质区域,灰色框表示腔区域,黄色框表示 SP 区域,不典型的 SPs 由白框表示

Note:Black box represents TM area,pink box represents extracellular area,blue box represents cytoplasmic area,gray box represents lumen area,yellow box represents SP area,and atypical SPs are represented by white boxes

图3 拟南芥和水稻 ZIPs 系统发育树^[33]
Fig.3 Phylogenetic tree of HMAs of rice and Arabidopsis

镉的积累,这意味着它在植物直接吸收镉方面发挥了作用。

3.2 OsZIP6 OsZIP6 预测具有 8 个跨膜螺旋,与 AtZIP6 同源性较高。OsZIP6 在最大分蘖和灌浆中期的茎和根中均有表达,在茎中的表达高于根中的。Fe²⁺、Zn²⁺和 Mn²⁺ 缺陷时,茎和根中 OsZIP6 表达增加。OsZIP6 的离子转运能力与 pH 有关,在酸性 pH 下转运活性增强。Co²⁺、Fe²⁺和 Cd²⁺ 可能是 OsZIP6 底物,底物亲和性 Co²⁺>Cd²⁺>Fe²⁺,而 Zn²⁺、Ni²⁺和 Mn²⁺ 可能不是。此外,当 Co²⁺ 存在时,OsZIP6 对 Fe²⁺ 的吸收存在竞争性抑制^[37]。

3.3 OsIRT1 和 OsIRT2 水稻中的 IRT1 基因是通过拟南芥中的 IRT1 基因同源克隆得到的,说明此基因序列具有高度的保守性,而 OsIRT2 基因也是因与 OsIRT1 高度同源而得以分离出,两者均在根中表达,定位在细胞质膜上。OsIRT1 主要是吸收 Fe²⁺,而 OsIRT2 主要吸收 Fe³⁺^[38-39]。后来,研究者们发现了 OsIRT1、OsIRT2 基因其对 Zn、Cd 的吸收也具有一定的作用,但是具体的功能及转运形式仍不清楚^[40-41]。

4 CAX 家族

钙氢离子交换蛋白基因(CAXs)在植物营养和信号转到中发挥着重要作用。CAXs 是调节 Ca²⁺ 浓度的转运体之一,有些也参与 Cd²⁺和 Mn²⁺ 的转运。最早是在拟南芥中克隆得到了 CAX1 和 CAX2。根据氨基酸序列,OsCAXs 可分为 2 个

簇,OsCAX1a、OsCAX1b、OsCAX1c 属于 IA 型,OsCAX2 和 OsCAX3 属 IB 型(图 4)^[42-45]。

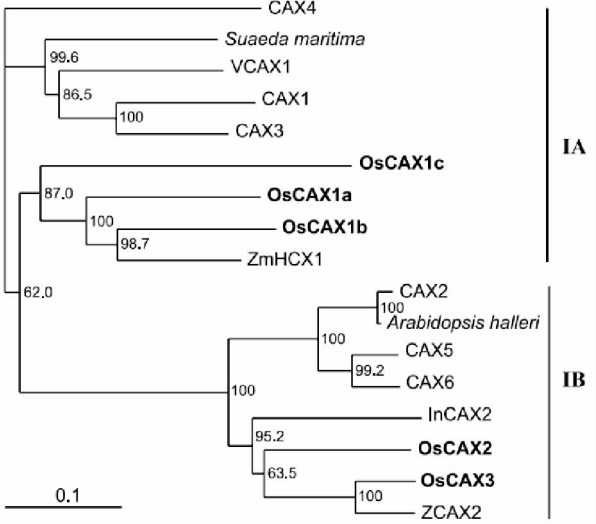


图4 5 个 OsCAXs 的系统发育关系^[45]

Fig.4 Phylogenetic relationship of five OsCAXs

OsCAX1 是高亲和性的 Ca²⁺ 转运体,其定位在液泡膜上,参与维持高浓度 Ca²⁺ 环境下细胞内 Ca²⁺ 的动态平衡。相反,OsCAX2 对 Ca²⁺ 显示低亲和力而过表达 CAX2 的烟草植株积

累的 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Mn^{2+} 要多于野生型。*OsCAX2* 位于第 3 号染色体,主要在根和芽中大量表达。而 *OsCAX3* 是一种钙氢离子反向转运体,在植物体各部位都有所表达,也参与 Mn^{2+} 的转运^[42-43,45]。

5 LCT 家族

水稻籽粒中的镉主要是通过韧皮部运输积累的。*OsLCT1* 基因属于水稻体内的低亲和力阳离子运输蛋白,参与调控镉在韧皮部向籽粒的运输,定位于细胞质膜。*OsLCT1* 基因敲出时,籽粒镉积累量是对照的一半,但其他金属含量及植株生长无明显影响^[46]。在籼稻 Kasalath 中研究 *OsLCT1* 功能时发现,*OsLCT1* 在 Kasalath 中的表达高于在 Nipponbare 中的表达高且对 Cd、K、Mg、Ca 和 Mn 具有外排活性,而对 Fe、Zn、Cu 和 Na 没有外排活性^[47]。Liu 等^[48] 通过基因编辑 *OsLCT1* 获得突变体,在镉含量 0.9 mg/kg 的稻田中种植,其籽粒中的镉含量未超出国家食品安全标准(0.2 mg/kg)。

目前对于水稻低亲和力阳离子运输蛋白家族基因(*OsLCTs*)的报道并不多,对 *OsLCT1* 的功能研究也不够深入。由于水稻中只存在该基因的一个拷贝,且对参与多种金属离子的转运,因此 *OsLCT1* 也可用于开发新的耐盐品种。

6 讨论

从上述的研究成果来看,关于镉吸收转运的功能基因很多都还没有进行系统的功能研究,因此对于水稻体内镉的吸收转运通路并不十分清楚,不同基因家族的联合功能分析也并不常见,多见于研究改变外部环境来影响相关基因表达的研究。此外,当研究上述家族基因的功能时,研究者大多利用突变体来研究,极少使用遗传群体来进行研究,比如近等基因系。并且,关于特异性吸收运输镉的相关基因报道并不常见,比如 *OsHMA3*。镉特异性转运基因或 QTLs 的发现给后续培育低镉积累水稻品种工作提供了更好的思路。

参考文献

- [1] 陈丙义,赵安芳.重金属污染土壤对农业生产的影响及其可持续利用的措施[J].平顶山工学院学报,2003,12(6):31-33.
- [2] NELSON N. Metal ion transporters and homeostasis[J]. EMBO J, 1999, 18(16):4361-4371.
- [3] MIGEON A, BLAUDEZ D, WILKINS O, et al. Genome-wide analysis of plant metal transporters, with an emphasis on poplar[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(22):3763-3784.
- [4] TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SENOURA T, et al. The *OsNRAMP1* iron transporter is involved in Cd accumulation in rice[J]. Journal of experimental botany, 2011, 62(14):4843-4850.
- [5] YAMAJI N, SASAKI A, XIA J X, et al. A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice[J]. Nat Commun, 2013, 4:1-11.
- [6] XIA J X, YAMAJI N, KASAI T, et al. Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(43):18381-18385.
- [7] TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, NAKANISHI H, et al. Role of the iron transporter *OsNRAMP1* in cadmium uptake and accumulation in rice[J]. Plant signaling & behavior, 2011, 6(11):1813-1816.
- [8] TIWARI M, SHARMA D, DWIVEDI S, et al. Expression in Arabidopsis and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, *OsNRAMP1*, in arsenic transport and tolerance[J]. Plant Cell Environ, 2014, 37(1):140-152.
- [9] ZHAO J L, YANG W, ZHANG S H, et al. Genome-wide association study and candidate gene analysis of rice cadmium accumulation in grain in a diverse rice collection[J]. Rice, 2018, 11(1):1-15.
- [10] ISHIMARU Y, TAKAHASHI R, BASHIR K, et al. Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport[J]. Scientific reports, 2012, 2:1-8.
- [11] ISHIKAWA S, ISHIMARU Y, IGURA M, et al. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(47):19166-19171.
- [12] TANG L, MAO B G, LI Y K, et al. Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):1-12.
- [13] CAILLIATTE R, LAPEYRE B, BRIAT J F, et al. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity[J]. Biochem J, 2009, 422(2):217-228.
- [14] 杨猛.水稻 NRAMP 家族基因在 Mn 和 Cd 转运中的功能研究[D].武汉:华中农业大学,2014.
- [15] AXELSEN K B, PALMGREN M G. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2001, 126(2):696-706.
- [16] TAKAHASHI R, BASHIR K, ISHIMARU Y, et al. The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice[J]. Plant signaling & behavior, 2012, 7(12):1605-1607.
- [17] MILLS R F, KRUGER G C, BACCARINI P J, et al. Functional expression of *AtHMA4*, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Pb subclass[J]. The plant journal, 2003, 35(2):164-176.
- [18] 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 Letters, 2004, 576(3):306-312.
- [19] 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.
- [20] 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]. J Biol Chem, 2006, 281(5):2882-2892.
- [21] LEE S, KIM Y Y, LEE Y, et al. Rice P1B-type heavy-metal ATPase, *OsHMA9*, is a metal efflux protein[J]. Plant Physiol, 2007, 145(3):831-842.
- [22] HUSSAIN D, HAYDON M J, WANG Y W, et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2004, 16(5):1327-1339.
- [23] MOREL M, CROUZET J, GRAVOT A, et al. *AtHMA3*, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*[J]. Plant physiology, 2009, 149(2):894-904.
- [24] MIYADATE H, ADACHI S, HIRAIZUMI A, et al. *OsHMA3*, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles[J]. New phytologist, 2011, 189(1):190-199.
- [25] LU C N, ZHANG L X, TANG Z, et al. Producing cadmium-free Indica rice by overexpressing *OsHMA3*[J]. Environ Int, 2019, 126:619-626.
- [26] SHAO J F, XIA J X, YAMAJI N, et al. Effective reduction of cadmium accumulation in rice grain by expressing *OsHMA3* under the control of the *OsHMA2* promoter[J]. J Exp Bot, 2018, 69(10):2743-2752.
- [27] LIU C L, GAO Z Y, SHANG L G, et al. Natural variation in the promoter of *OsHMA3* contributes to differential grain cadmium accumulation between Indica and Japonica rice[J/OL]. J Integr Plant Biol, 2019-05-06[2019-01-11]. <https://www.x-mol.com/paper/5536709>. DOI: 10.1111/jipb.12794.
- [28] SATOH-NAGASAWA N, MORI M, NAKAZAWA N, et al. Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of zinc and cadmium[J]. Plant Cell Physiol, 2012, 53(1):213-224.
- [29] YAMAJI N, XIA J X, MITANI-UENO N, et al. Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by P-type heavy metal ATPase *OsHMA2*[J]. Plant physiology, 2013, 162:927-939.
- [30] TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SHIMO H, et al. The *OsHMA2* transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice[J]. Plant Cell Environ, 2012, 35(11):1948-1957.
- [31] ENG B H, GUERINOT M L, EIDE D, et al. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins[J]. J Membr Biol, 1998, 166(1):1-7.
- [32] GUERINOT M L. The ZIP family of metal transporters[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1465(1/2):190-198.
- [33] ZHENG X, CHEN L, LI X F. *Arabidopsis* and rice showed a distinct pattern in ZIPs genes expression profile in response to Cd stress[J]. Bot Stud, 2018, 59(1):1-10.
- [34] IVANOV R, BAUER P. Sequence and coexpression analysis of iron-regulated ZIP transporter genes reveals crossing points between iron acquisition strategies in green algae and land plants[J]. Plant soil, 2017(1/2):61-73.

东大学,2012.

[12] WILLIAMS C A, GREENHAM J, HARBORNE J B, et al. Acylated anthocyanins and flavonols from purple flowers of *Dendrobium* cv. ‘Pompadour’ [J]. *Biochemical systematics and ecology*, 2002, 30: 667–675.

[13] ZHANG C, WANG W N, WANG Y J, et al. Anthocyanin biosynthesis and accumulation in developing flowers of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) ‘Luoyang Hong’ [J]. *Postharvest biology & technology*, 2014, 97: 11–22.

[14] ANDERSEN O M, MARKHAM K R. *Flavonoids: Chemistry, biochemistry, and applications* [M]. London: CRC Taylor & Francis Group, 2006.

[15] 卢邦俊. 高效液相色谱法测定茶叶中的黄酮醇 [D]. 成都: 成都理工大学, 2006.

[16] GROTEWOLD E. The genetics and biochemistry of floral pigments [J]. *Annual Review Plant Biol*, 2006, 57: 761–780.

[17] MORI M, KONDO T, YOSHIDA K. Anthocyanin components and mechanism for color development in blue veronica flowers [J]. *Bioscience biotechnology & biochemistry*, 2009, 73(10): 2329–2331.

[18] 安田齐. 花色的生理生物化学 [M]. 傅玉兰, 译. 北京: 中国林业出版社, 1989.

[19] TREUTTER D. Significance of flavonoids in plant resistance: A review [J]. *Environment chemistry letters*, 2006, 4: 147–157.

[20] KOVALEVA L V, ZAKHAROVA E V, MINKINA Y V. Auxin and flavonoids in the progame phase of fertilization in petunia [J]. *Russian journal of plant physiology*, 2007, 54(3): 396–401.

[21] HEIM K E, TAGLIAFERRO A R, BOLIYA D J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships [J]. *Journal of nutritional biochemistry*, 2002, 13(10): 572–584.

[22] 唐传核, 彭志英. 类黄酮的最新研究进展——抗氧化研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2001(5): 12–16, 25.

[23] 金晶. 四类玫瑰花瓣的抗氧化活性和类黄酮成分比较分析 [D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2018.

[24] XIAO Z P, WU H K, WU T, et al. Kaempferol and quercetin flavonoids from *Rosa rugosa* [J]. *Chemistry of natural compounds*, 2006, 42(6): 736–737.

[25] OCHIR S, PARK B J, NISHIZAWA M, et al. Simultaneous determination of hydrolysable tannins in the petals of *Rosa rugosa* Thunb. and allied plants [J]. *Nat Med*, 2010, 64(3): 383–387.

[26] 张玲. 玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.) 花瓣显色机理研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.

[27] VAN SUMERE C, FACHÉ P, CASTEELE K V, et al. Improved extraction and reversed phase-high performance liquid chromatograph separation of flavonoids and the identification of *Rosa* cultivars [J]. *Phytochemical analysis*, 1993, 4(6): 279–292.

[28] MIKANAGI Y, YOKOI M, UEDA Y, et al. Flower flavonol and distribution in subgenus *Rosa* [J]. *Biochemical systematics and ecology*, 1995, 23(2): 183–200.

[29] MIKANAGI Y, SAITO N, YOKOI M, et al. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (= *Rosa*), *Chinese*, *Gallieanae* and some modern garden roses [J]. *Biochemical systematics and ecology*, 2000, 28(9): 887–902.

[30] 李洪权. 月季新谱 [M]. 北京: 科学普及出版社, 1986.

[31] 牛家淑, 褚洪图. 食用天然玫瑰色素性质、提取及应用研究 [J]. *食品工业科技*, 1996(2): 24–26.

[32] 冯作山, 杜鹏, 李勇, 等. 玫瑰色素的纯化及成分初步鉴定 [J]. *食品科技*, 2006, 10: 152–155.

[33] 王丽君, 高同雨, 刘卫强, 等. 妙峰山玫瑰色素提取工艺及稳定性研究 [J]. *北方园艺*, 2009(11): 12–15.

[34] MARSHALL H H, CAMPBELL C G, COLLICUTT L M. Breeding for anthocyanin colors in *Rosa* [J]. *Euphytica*, 1983, 32(1): 205–216.

[35] 石秀花, 王忠民, 程明冬. 野玫瑰色素提取工艺的研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2006(1): 111–113, 70.

[36] 葛芹. 食用玫瑰色素的提取、纯化及性质研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2013.

[37] KATSUMOTO Y, FUKUCHI-MIZUTANI M, FUKUI Y, et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin [J]. *Plant and cell physiology*, 2007, 48(11): 1589–1600.

[38] FUKUI Y, NOMOTO K, IWASHITA T, et al. Two novel blue pigments with ellagitannin moiety, rosacyanins A1 and A2, isolated from the petals of *Rosa hybrida* [J]. *Tetrahedron*, 2006(62): 9661–9670.

[39] 黄鸿曼, 袁利兵, 彭志红, 等. 花青素的生物合成与环境调控研究进展 [J]. *湖南农业科学*, 2011(13): 118–120.

[40] TANAKA Y, FUKUI Y, FUKUCHI-MIZUTANI M, et al. Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4-reductase gene [J]. *Plant & cell physiology*, 1995, 36(6): 1023–1031.

[41] 赵启明, 李范, 李萍. 花青素生物合成关键酶的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2012(12): 25–32.

[42] 罗平. 玫瑰类黄酮合成相关基因的克隆和功能解析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.

(上接第4页)

[35] CHEN WR, FENG Y, CHAO YE. Genomic analysis and expression pattern of OsZIP1, OsZIP3, and OsZIP4 in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different zinc efficiency [J]. *Russ J Plant Physiol*, 2008, 55(3): 400–409.

[36] RAMESH S A, SHIN R, EIDE D J, et al. Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(1): 126–134.

[37] KAVITHA P G, KURUVILLA S, MATHEW M K. Functional characterization of a transition metal ion transporter, OsZIP6 from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2015, 97: 165–174.

[38] BUGHIO N, YAMAGUCHI H, NISHIZAWA N K, et al. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(374): 1677–1682.

[39] ISHIMARU Y, SUZUKI M, TSUKAMOTO T, et al. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺ [J]. *Plant J*, 2006, 45(3): 335–346.

[40] NAKANISHI H, OGAWA I, ISHIMARU Y, et al. Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice [J]. *Soil science and plant nutrition*, 2006, 52: 464–469.

[41] LEE S, AN G. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice [J]. *Plant Cell Environ*, 2009, 32(4): 408–416.

[42] HIRSCHI K D, ZHEN R G, CUNNINGHAM K W, et al. CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8782–8786.

[43] HIRSCHI K D, KORENKOV V D, WILGANOWSKI N L, et al. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco: Altered metal accumulation and increased manganese tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 125–133.

[44] PITTMAN J K, SHIGAKI T, MARSHAL J L, et al. Functional and regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56: 959–971.

[45] KAMIYA T, AKAHORI T, MAESHIMA M. Expression profile of the genes for rice cation/H⁺ exchanger family and functional analysis in yeast [J]. *Plant and cell physiology*, 2005, 46(10): 1735–1740.

[46] URAGUCHI S, KAMIYA T, SAKAMOTO T, et al. Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains [J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2011, 108(52): 20959–20964.

[47] URAGUCHI S, KAMIYA T, CLEMENS S. Characterization of OsLCT1, a cadmium transporter from indica rice (*Oryza sativa*) [J]. *Physiologia plantarum*, 2014, 151(3): 339–347.

[48] LIU S M, JIANG J, LIU Y, et al. Characterization and evaluation of OsLCT1 and OsNramp5 mutants generated through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis for breeding low Cd rice [J]. *Rice science*, 2019, 26(2): 88–97.