

水稻胚乳过表达 VIT1/VIT2 对 Fe 和 Cd 积累的影响

贺依琦, 刘冬, 史玉皎, 郭宝, 周琳, 罗劲松*, 张振华*

湖南农业大学资源环境学院, 湖南 长沙 410128

贺依琦, 刘冬, 史玉皎, 郭宝, 周琳, 罗劲松, 张振华. 水稻胚乳过表达 VIT1/VIT2 对 Fe 和 Cd 积累的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 713-723.

HE Yiqi, LIU Dong, SHI Yujiao, GUO Bao, ZHOU Lin, LUO Jinsong, ZHANG Zhenhua. Effect of VIT1/VIT2 overexpression on Fe and Cd accumulation in rice endosperm[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 713-723.

摘 要: 水稻籽粒铁(Fe)缺乏和镉(Cd)含量超标是农业生产亟待解决的重要问题。以往研究表明, OsVIT1 和 OsVIT2 是液泡铁转运蛋白, 本研究选取野生型 ZH11 为背景材料, 使用胚乳特异性表达启动子 *Glb-1* 构建了胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 材料。RT-qPCR 分析表明, *OsVIT1* 在转化植株的胚乳和叶片过量表达, *OsVIT2* 在转化植株的胚乳过量表达。通过田间试验, 研究胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 对水稻不同部位 Fe 和 Cd 积累的影响。结果表明, 胚乳过表达 *OsVIT1* 显著降低籽粒中的 Fe 浓度约 50%, 显著增加秸秆的锌(Zn)、铜(Cu)浓度和籽粒中的 Cu 浓度, 胚乳过表达 *OsVIT2* 显著降低籽粒中的 Fe、Cd 浓度约 50%, 显著增加秸秆的 Fe 浓度 45%–120%。胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 不影响水稻的农艺性状。总之, 胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 降低了水稻籽粒的 Fe 积累, 未达到预期效果, 胚乳过表达 *OsVIT2* 还降低籽粒的 Cd 积累, 增加秸秆 Fe 积累, 为水稻铁生物强化和降镉提供了借鉴。

关键词: 水稻; 液泡区隔化; OsVIT1; OsVIT2; 铁和镉积累

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFD1700103); 湖南省自然科学基金(2021JJ20001, 2021RC3086); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-01-02A)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1700103), the Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2021JJ20001, 2021RC3086), and the China Agriculture Research System Project (CARS-01-02A).

*Corresponding authors. E-mail: LUO Jinsong, 0609020317@163.com; ZHANG Zhenhua, zhzh1468@163.com

Received: 2022-06-19; Accepted: 2022-10-27; Published online: 2022-11-02

Effect of VIT1/VIT2 overexpression on Fe and Cd accumulation in rice endosperm

HE Yiqi, LIU Dong, SHI Yujiao, GUO Bao, ZHOU Lin, LUO Jinsong*, ZHANG Zhenhua*

College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: Iron (Fe) deficiency and excess cadmium (Cd) in rice grain are important problems to be solved in agricultural production. Previous studies have shown that OsVIT1 and OsVIT2 are vacuolar iron transporters. In this study, wild-type ZH11 was selected as the background material and *OsVIT1* and *OsVIT2* were overexpressed in endosperm by using endosperm specific promoter *Glb-1*. Field experiments were conducted to study the effect of *OsVIT1* and *OsVIT2* overexpression on Fe and Cd accumulation in different parts of rice. The results showed that *OsVIT1* overexpression in endosperm significantly reduced Fe content in grain by about 50%, while significantly increased zinc (Zn) and copper (Cu) contents in straw and Cu content in grain. *OsVIT2* overexpression in endosperm significantly decreased Fe and Cd contents in grain by about 50%, and significantly increased Fe content in straw by 45%–120%. Overexpression of *OsVIT1* and *OsVIT2* in endosperm did not affect the agronomic traits of rice. In conclusion, *OsVIT1* and *OsVIT2* overexpression in endosperm reduced Fe accumulation in rice grain, which did not achieve the expected effect. *OsVIT2* overexpression in endosperm also decreased Cd accumulation in grain and increased Fe accumulation in straw, which provided reference for iron biofortification and cadmium reduction in rice.

Keywords: rice; vacuolar area isolation; OsVIT1; OsVIT2; accumulation of iron and cadmium

铁是动植物生长发育所必需的微量营养素, 在植物中, 铁参与调节光合作用、线粒体呼吸和蛋白质稳定性, 并且是有氧转移的辅助因子之一^[1]。虽然土壤中铁含量丰富, 但主要以不溶性氧化铁的形式存在, 导致铁的溶解度低, 尤其是在中性或碱性 pH 值的有氧条件下, 其生物有效性往往不高^[2]。缺铁是世界上限制作物生产的最重要因素之一, 生长在低铁土壤中的植物经常表现出萎黄病和光合作用减弱, 从而导致作物产量和品质下降^[3]。植物吸收的铁是动物和人类吸收铁的主要来源, 缺铁不仅会抑制植物的生长并降低产量, 还会通过减少膳食摄入量而导致人类健康障碍^[4]。铁缺乏症

是一种主要的微量营养素缺乏症, 全球大约有 30% 的人口患缺铁性贫血症, 而在我国患缺铁性贫血的男性约有 14.9%, 女性约有 21.2%^[5]。因此, 提高水稻中铁含量对改善中国居民的营养状况具有重要意义。

大米是世界上一半以上人口的主食, 尤其是在发展中国家^[6]。一般来说, 谷物食品的微量营养素含量较低, 特别是在经过大量加工后食用的谷物食品。当以谷物为基础的饮食与其他补充食品不平衡时, 微量营养素可能会严重缺乏, 从而导致隐性饥饿。此外, 谷物中富含微量营养素的组织, 即糊粉层、麸皮层和谷壳层在抛光过程中被去除, 以延长其保质期, 导

致微量营养素进一步流失^[7]。水稻经抛光后颗粒只能提供大约 2 $\mu\text{g/g}$ 的铁^[8], 因此, 水稻是铁生物强化的重要目标作物, 通过生物学手段可以有效地增加水稻中的铁含量。

由于工业化在全球的快速推进, 重金属污染也愈加严重。据报道, 在 2011 年中国就有近 2 000 万 hm^2 耕地被镉(Cd)、砷(As)或铅(Pb)等重金属污染, 造成粮食污染 1 200 万 $\text{t}^{[9]}$ 。Cd 是一种有毒重金属元素, 具有分解周期长、毒性大、易迁移和难降解等特点, 从而对环境安全构成重大威胁, 并通过食物链危害人类健康^[10]。水稻是人类营养的主要作物和主食之一^[11]。大米的 Cd 含量标准在中国为 0.2 mg/kg (GB2762—2017)^[12], 在食品和农业组织、世界卫生组织食品法典委员会定义的安全阈值为 0.4 mg/kg ^[13]。尤其是在经济增长迅速且重金属污染普遍存在的东亚或东南亚地区, 大米镉含量普遍超标, 在部分地区, 大米中的镉浓度高达 1–2 mg/kg ^[14]。因此, 迫切需要降低稻米中镉含量来减少摄入过量镉带来的危害。

胚乳是水稻种子的组织, 是储存营养物质的结构, 积累了高浓度的淀粉, 在碾磨后成为种子的可食用部分^[15]。在水稻中, 铁向胚乳易位的能力较弱, 胚乳的铁含量低于其他组织。提高种子中铁浓度的一种方法就是通过胚乳特异性启动子控制下表达铁蛋白(*ferritin*)基因来增强种子中的铁积累^[16]。Qu 等^[17]从水稻种子贮藏球蛋白基因 *Glb-1* 中分离并鉴定了一个启动子, 该启动子指示的 β -葡萄糖苷酸酶基因(β -glucuronidase, GUS)主要在胚乳中心部位表达, 并且表达量高于 1.3 kb 的 *GluB-1* 启动子 10 倍以上。研究表明, 在 *Glb-1* 启动子和 1.3 kb *GluB1* 启动子的驱动下表达 *SoyferH1* 能有效增加种子铁浓度^[18]。在胚乳特异性启动子的驱动下, *ferritin* 的表达不仅能使转基因水稻糙米铁和锌

的水平显著上升, 在抛光粒中也是如此^[19]。在 *Glb-1* 启动子的驱动下, 在胚乳细胞中表达的 *OsYSL2* 可以增强 Fe(II)-NA 向胚乳细胞的转运, 这对于种子中的 Fe 积累很重要^[19]。但是使用铁蛋白来进行 Fe 生物强化具有一定风险, 可能会导致有毒重金属如镉、锰的积累^[20]。

调节铁稳态的一种重要机制就是液泡螯合, 它是植物安全储存铁的一种策略。液泡铁转运蛋白(vacuolar iron transporter, VIT)是一种独特的液泡铁离子转运体家族, 拟南芥液泡铁转运蛋白 *AtVIT1* 在拟南芥发育中的种子中高度表达, 定位于液泡膜, 并且参与胚胎前维管束的 Fe^{2+} 的液泡固定^[21]。*OsVIT1* 和 *OsVIT2* 是 *AtVIT1* 的水稻同源基因, 定位于液泡膜, 已有研究表明, *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的敲除能增加水稻种子的铁含量并降低旗叶中的铁含量, 推测 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 参与了源、库器官之间的铁转运, 在酵母中, *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 不能转运 Cd^{2+} ^[22]。VIT 同源蛋白都不能转运有毒金属镉, 这暗示着 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 可能应用于作物的 Fe/Zn 生物强化。

基于此, 本研究使用胚乳特异表达 *Glb-1* 启动子, 构建了胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的新的转基因水稻株系, 对胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 水稻中不同部位的 Fe 和 Cd 含量进行研究, 旨从分子和生理方面明确水稻胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 对 Fe 和 Cd 积累的影响。为水稻铁的生物强化和籽粒降镉提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 供试材料和生长条件

供试材料为粳稻品种“中花 11” (*Oryza sativa* L., ZH11)和以其为背景构建的转 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 基因的材料。所用启动子为胚乳特异性表达启动子 *Glb-1*, 载体为 pCAMBIA1300^(Kamr)。

田间试验于湖南省浏阳市实验基地进行, 农田镉浓度背景值为 $0.32 \mu\text{g/g}$ 。设置 5 个重复, 顺序排列, 小区面积为 15 m^2 , 采用田间正常施肥, 施尿素 391.3 kg/hm^2 , 氧化钾(K_2O) 120 kg/hm^2 , 过磷酸钙 $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ 90 kg/hm^2 , 钾肥作底肥一次性基施, 氮肥基肥占比 60%, 分蘖肥占比 25%, 穗肥占比 15%, 磷肥基追比为 7:3。

1.2 目标基因的遗传转化

采用 ZH11 的 cDNA 为模板, 用 OsVIT1-F 和 OsVIT1-R 引物(表 1) PCR, 克隆 OsVIT1 和 OsVIT2 的编码蛋白质产物的序列(coding sequence, CDS)的全长, 采用 ZH11 的基因组 DNA 为模板, 用 PGLB1-F 和 PGLB1-R 引物(表 1)克隆胚乳特异性表达启动子 *Glb-1*, 通过同源重组的方法连入 p1300 分别构建双元表达载体 p1300-GLB1-*OsVIT1* 和 p1300-GLB1-*OsVIT2*, 并交予武汉伯远生物技术有限公司分别转化 ZH11 获得 T_0 代阳性苗。幼苗生长旺盛后, 取叶片提取基因组 DNA, 用潮霉素 B 特异的 HYG-F 和 HYG-R 引物(表 1) PCR, 1%琼脂糖

电泳检测目的条带, 筛选出基因组中有 *OsVIT1*、*OsVIT2* 基因整合的水稻植株, 鉴定过的阳性植株移栽到试验田中继续生长以收获 T_1 代种子, 自交纯化后得到 T_2 代植株用于后续试验。

1.3 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

取水稻叶片或籽粒鲜样, 迅速置于液氮中。用 TRIzol 试剂(Ambion)提取植物的总 RNA^[23]。具体方法如下: 样品在液氮中粉碎后加 1 mL TRIzol 和 200 μL 氯仿, 混匀后室温静置 5 min 后离心。吸取上清液 300 μL , 加入等体积异丙醇, 混匀后静置 5 min 后离心, 用 75%乙醇清洗沉淀后室温干燥 3–5 min, 加入 40 μL ddH₂O 溶解。使用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme)合成 cDNA 模板。使用 SYBR Premix Ex-Tag (TaKaRa)试剂和 ABI Stepone 7 000 进行定量 PCR。相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[24], 用 *OsActin* 基因作为标准化内参。qRT-PCR 所用引物采用 Primer 6.0 软件设计, 引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
OsVIT1-F	CTGTCTTTGAACTCGGATCCATGGCGCGGCGACGGACGG	Transgenic plant
OsVIT1-R	TCGGAGGAGGCCATACTAGTTCTAGTTTGCACGGCCTTGG	
OsVIT2-F	CTGTCTTTGAACTCGGATCCATGGTGAAGGAGTTCGTGCA	Transgenic plant
OsVIT2-R	TCGGAGGAGGCCATACTAGTTCTAGTTTGCACGGCCTTGG	
PGLB1-F	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCCAACATTTTCATGTGTAA	Transgenic plant
PGLB1-R	GACTGACCACCCGGGGATCCGAGTTCAAAGACAGACCAAG	
HYG-F	ACCGCAAGGAATCGGTCAAT	Transgenic plants screening
HYG-R	ATTTGTGTACGCCCCGACAGT	
OsActin-Q-F	TCCATCTTGGCATCTCTCAG	qRT-PCR for <i>OsActin1</i>
OsActin-Q-R	GTACCCGCATCAGGCATCTG	
RT-OsVIT1-Q-F	TCCTCAAGCTTGCTCGACTTCAT	qRT-PCR for <i>OsVIT1</i>
RT-OsVIT1-Q-R	ATGGCGTTCTGTGCTGTGGAGATA	
RT-OsVIT2-Q-F	CCTACATGTTTGTGCCGACG	qRT-PCR for <i>OsVIT2</i>
RT-OsVIT2-Q-R	CCGATAACAGCGGTCTGGAA	

1.4 水稻中金属离子含量的测定

每个株系随机取 5 株水稻, 将水稻包括叶片、叶鞘和除种子外的所有茎秆在 80 °C 烘箱中干燥 24–48 h 后进行研磨粉碎, 此为秸秆样品。种子在 80 °C 烘箱中干燥 24–48 h 后, 取 0.02–0.10 g 干重的秸秆和种子用 1 mL 浓硝酸加热消煮, 用去离子水定容至 10 mL, 稀释 10 倍后, 使用电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)测定材料中的金属离子浓度^[25]。

1.5 农艺性状测定

成熟期每个株系随机取 5 株材料, 收获野生型与过表达材料, 分别测量株高、穗数、生物量和单株产量。在水稻成熟期收获水稻后先脱粒, 再将茎、叶和种子分开装袋并 105 °C 杀青, 65 °C 烘干至恒重后称重。此为生物量的测定。

1.6 数据处理与分析

采用 SPSS 18.0 软件和 DPS 软件进行统计分析、单因素方差分析, LSD 法进行显著性检验。 $P < 0.05$ 为差异显著; $P > 0.05$ 为没有显著差异。用 GraphPad Prism 8 软件制作柱形图。

2 结果与分析

2.1 转基因材料鉴定和表达分析

水稻籽粒由胚和胚乳构成, 为了研究

OsVIT1 和 *OsVIT2* 对籽粒中的金属积累作用, 本研究选用胚乳特异性表达 *Glb-1* 启动子驱动 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 表达构建了载体, 转化 ZH11 得到了表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的转基因株系。在分蘖期, 取水稻幼嫩的叶片, 通过对潮霉素抗性基因的 PCR 鉴定, 筛选出纯合阳性植株。分别测定了植株叶片和胚乳的基因表达量, RT-qPCR 分析表明, 相比于 ZH11, *OsVIT1* 在叶片中的表达量显著增加了 8–15 倍, 在胚乳中的表达量显著增加了 110–157 倍(图 1A); *OsVIT2* 与野生型相比较, 在叶片的表达量较低, 在胚乳的表达量显著高于野生型 1.9–2.5 倍(图 1B)。结果表明, *OsVIT1* 的表达量在转基因植株的胚乳和叶片过量, *OsVIT2* 的表达量在转基因植株的胚乳过量。

2.2 水稻胚乳过表达 *OsVIT1*/*OsVIT2* 显著降低籽粒 Fe 含量

为了研究胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 是否会影响各部位的 Fe 含量, 将水稻种植在含轻微 Cd 污染的农田中直至成熟。使用 ICP-MS 检测了成熟期野生型和纯合转化植株的水稻籽粒和秸秆的 Fe 浓度。结果表明, 与野生型相比, *OsVIT1* 在秸秆中 Fe 浓度无明显差异, 而在籽粒中 Fe 浓度显著降低(图 2); *OsVIT2* 在秸秆中 Fe 浓度显著升高, 而在籽粒中 Fe 浓度显著下降(图 2)。

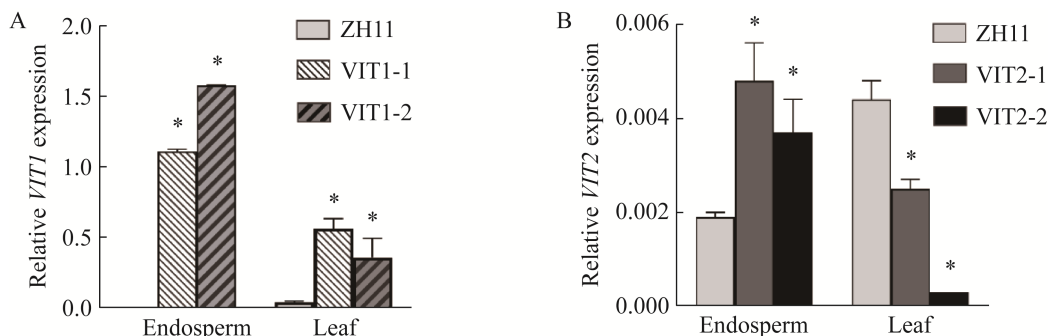


图 1 胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的基因表达量

Figure 1 Overexpression of *OsVIT1* (A) and *OsVIT2* (B) genes in endosperm. The * on the square bar indicates a significant difference between treatments at the 5% level ($P < 0.05$), $n=3$.

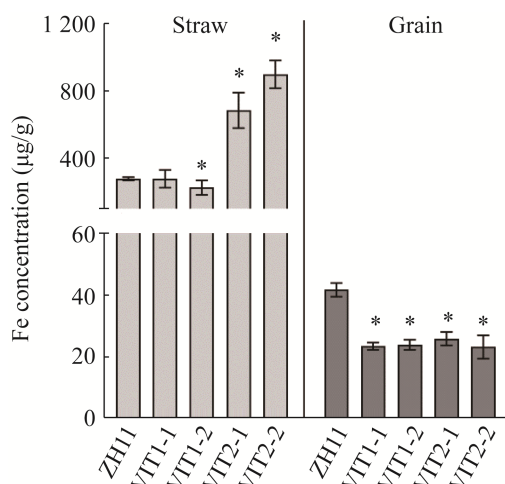


图2 *OsVIT1/OsVIT2* 胚乳过表达材料成熟期秸秆、籽粒的铁浓度

Figure 2 Iron content in rice straw and grain of *OsVIT1/OsVIT2* endosperm specific materials at mature stage. The * on the square bar indicates a significant difference between treatments at the 5% level ($P < 0.05$), $n = 5$.

转 *OsVIT1* 基因株系使得籽粒中 Fe 浓度显著下降约 50%, 转 *OsVIT2* 基因株系显著增加水稻秸秆中 Fe 浓度 45%–120%, 而显著降低籽粒中 Fe 浓度约 50%。

2.3 水稻胚乳过表达 *OsVIT1/OsVIT2* 对 Cd 积累的影响

为了研究增强胚乳 *OsVIT1/OsVIT2* 的表达是否对 Cd 吸收产生影响, 本研究测定了成熟期 ZH11、*OsVIT1* 和 *OsVIT2* 水稻籽粒和秸秆的 Cd 浓度。通过 ICP-MS 检测发现, 与 ZH11 相比, 生长在 Cd 污染的农田中, *OsVIT1* 在秸秆和籽粒中 Cd 浓度无明显差异(图 3); *OsVIT2* 在秸秆中 Cd 浓度无显著差异, 而在籽粒中 Cd 显著降低约 50%(图 3)。表明胚乳过表达 *OsVIT2* 会减少 Cd 向籽粒的转运, 从而降低籽粒 Cd 的累积。

2.4 水稻胚乳过表达 *OsVIT1/OsVIT2* 对其他阳离子的影响

使用 ICP-MS 测定了胚乳过表达 *OsVIT1/*

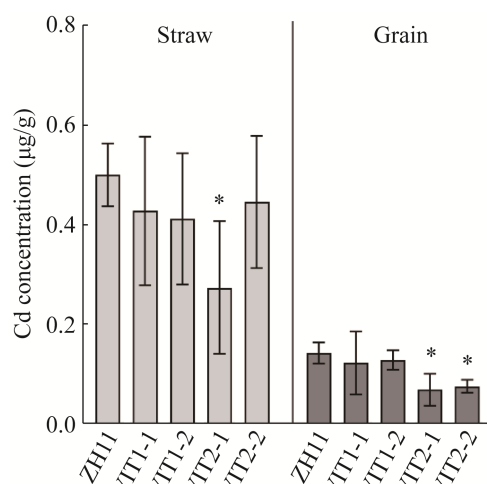


图3 胚乳过表达 *OsVIT1/OsVIT2* 材料成熟期秸秆、籽粒的镉浓度

Figure 3 Cd content in rice straw and grain of *OsVIT1/OsVIT2* overexpressed endosperm at mature stage. The * on the square bar indicates a significant difference between treatments at the 5% level ($P < 0.05$), $n = 5$.

OsVIT2 中的其他阳离子, 发现秸秆中 *OsVIT1* 的 Zn 浓度显著增加 20%–40% (图 4A), Cu 浓度显著增加 100%–150% (图 4B), 而 K、Ca、Mg 浓度则无明显差异(图 4C–4E), 在籽粒中, *OsVIT1* 的 Cu 浓度显著上升 100%–150% (图 4B), Zn、K、Ca、Mg 浓度都无明显差异; *OsVIT2* 在秸秆和籽粒中都未出现 Zn、Cu、K、Ca、Mg 浓度的差异(图 4A–4E)。这些结果表明, 胚乳过表达 *OsVIT1* 提高了秸秆中的 Zn 浓度, 提高了秸秆和籽粒中的 Cu 浓度, 而胚乳过表达 *OsVIT2* 不影响水稻秸秆与籽粒的其他金属离子浓度。

2.5 水稻胚乳过表达 *OsVIT1/OsVIT2* 的农艺性状

在成熟期, 收获了 ZH11 以及胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 材料, 并测定了它们的株高、分蘖数、单株产量和生物量。相比于 ZH11, *OsVIT1*、*OsVIT2* 的株高、分蘖数、单株产量和

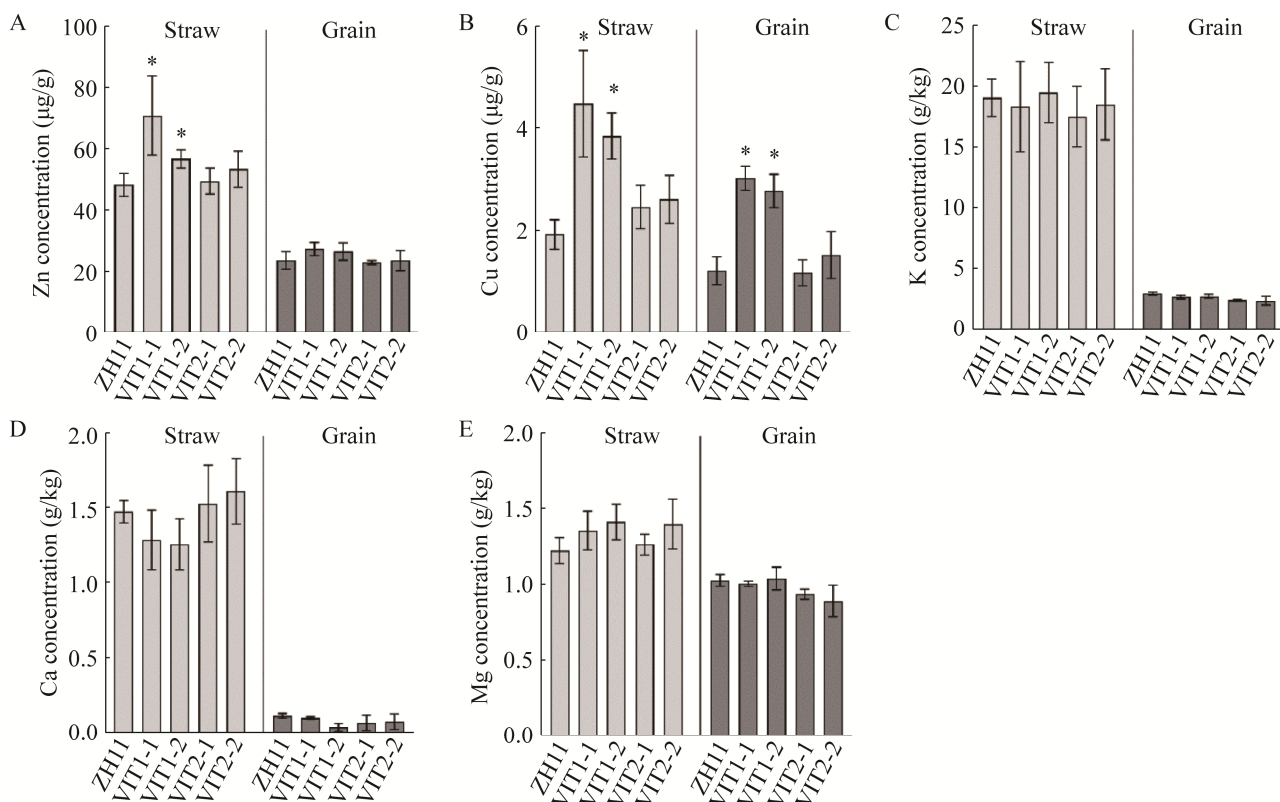


图 4 胚乳过表达 *OsVIT1/OsVIT2* 材料成熟期秸秆、籽粒的金属浓度

Figure 4 The straw and grain metal concentration of endosperm overexpressed *OsVIT1/OsVIT2* material at mature stage. Zn (A), Cu (B), K (C), Ca (D), and Mg (E) concentration of plants in the mature stage. The * on the square bar indicates a significant difference between treatments at the 5% level ($P < 0.05$), $n=5$.

生物量均无显著差异(图 5), 这表明, 胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 材料不会对水稻的农艺性状指标产生影响。

3 讨论

在本研究中, 我们使用胚乳特异性表达启动子 *Glb-1* 构建了胚乳过量表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的材料, 该启动子驱动的 GUS 报告基因主要在胚乳表达^[17]。在胚乳特异性表达启动子 *Glb-1* 的驱动下表达 *ferritin* 基因, 能有效增加精白米中的 Fe 和 Zn 含量^[19]。*OsVIT1* 和 *OsVIT2* 在水稻的各个组织都有表达, *OsVIT1* 在成熟叶片、旗叶以及旗叶鞘中呈现较高的表达水平, *OsVIT2*

在旗叶鞘中有较高表达^[22]。通过对转基因材料的胚乳及叶片进行基因表达量的鉴定, 发现 *OsVIT2* 仅在胚乳的表达量显著高于野生型; *OsVIT1* 在叶片中和胚乳中表达量都显著高于野生型, 但在胚乳的表达量远高于叶片, 这可能是由于启动子泄露导致的。由此得到了胚乳过量表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的材料。

胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 后, 秸秆的铁浓度显著增加而籽粒铁浓度显著下降(图 2、图 3), 这表明胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 使得地上部叶片中液泡的铁储存能力增强, 但是这种累积并不能运输到籽粒中去, 由于水稻中铁向胚乳易位的能力较弱, 导致胚乳中的铁浓

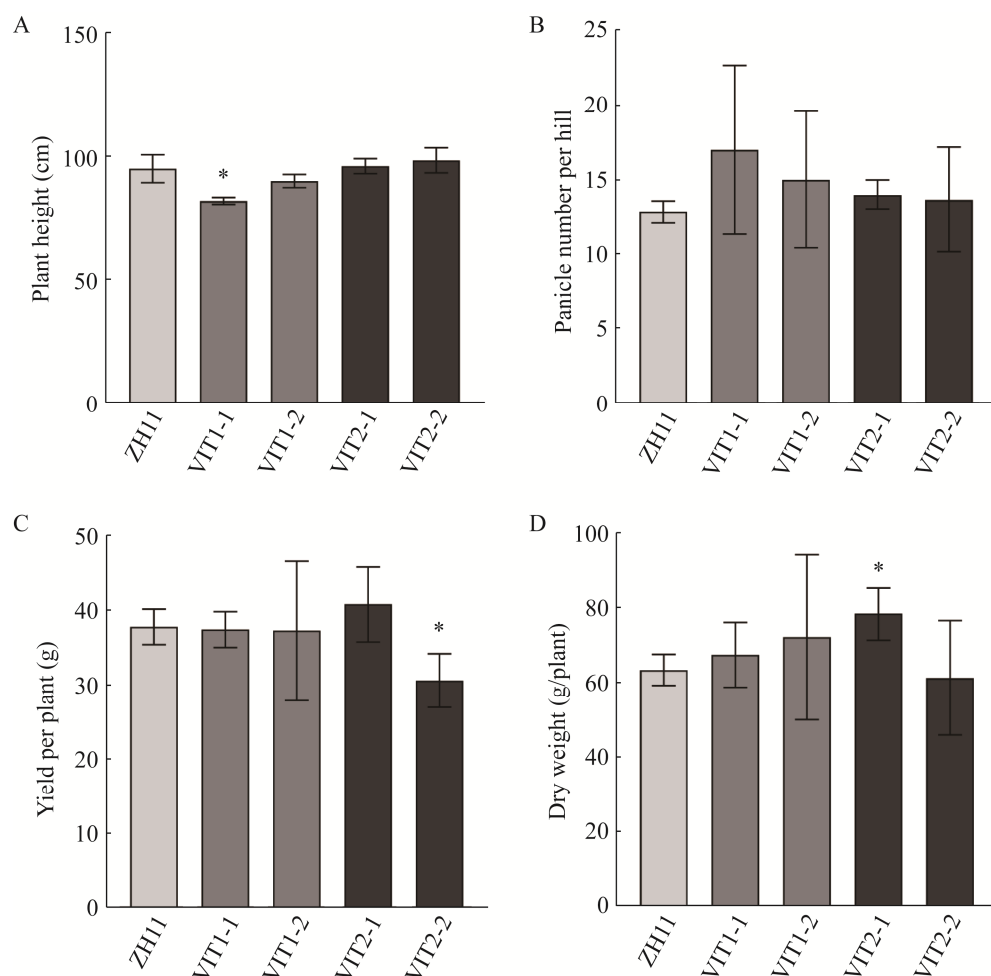


图5 胚乳过表达 *OsVIT1/OsVIT2* 材料的成熟期农艺性状

Figure 5 The endosperm overexpressed the agronomic traits of *OSVIT1* and *OSVIT2* at maturity. Height (A), panicle number (B), yield (C), and dry weight (D) of plants in the mature stage. The * on the square bar indicates a significant difference between treatments at the 5% level ($P < 0.05$), $n = 5$.

度远低于其他组织。水稻植株吸收一定量的铁，但植株可能不会将铁转运到胚乳中去，其中可能存在严格的调控系统来控制铁在水稻中向胚乳的转运。目前已有的研究报道了所有的 VITs 都是液泡 Fe^{2+} 转运蛋白^[21-22,26-28]，但是它们在不同的植物体内发挥不同的作用。*OsVIT1* 和 *OsVIT2* 具有将 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 转化到酵母中液泡的功能，调节水稻“源”——旗叶和“库”种子之间的铁、锌分配。最近的研究表明，*OsVIT2* 在节 I 中高表达，并定位在节 I 的薄壁细胞桥中，敲除

OsVIT2 会增加铁从节到种子以及从糊粉层到胚乳的分配，从而提高了精米中的铁含量^[29]。本研究结果显示，成熟时期，胚乳过表达材料的秸秆铁浓度升高，而籽粒铁浓度下降。种子中的 Fe 积累减少可能是由于 VITs 的表达增加，使 Fe 更多地被运输到叶片中的液泡内。

我们发现胚乳过表达 *OsVIT2* 也影响 Cd 的吸收。近些年来铁转运蛋白一直备受关注，它具有存储和释放生物可利用的 Fe^{2+} 能力^[30-34]。在植物和哺乳动物中，许多二价过渡金属转运

蛋白具有 Cd^{2+} 吸收活性^[35-37], 对 Cd 进行转运。虽然 OsVIT1 和 OsVIT2 检测不到 Cd^{2+} 转运活性, 但当 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 的突变体材料生长在受 Cd 污染的稻田中, 水稻的种子中 Cd^{2+} 出现了过度积累^[22]。VIT 家族在转运底物特异性上存在一定的差异, 如 AtVIT1 转运 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} , 但是敲除 *AtVIT1* 后不会对 Mn 产生影响, 只影响 Fe 的分布^[21]; *TaVIT2* 在酵母中表现出 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 转运活性, 在胚乳特异启动子的驱动下, 小麦胚乳中过表达 *TaVIT2* 能提高种子中的 Fe 积累, 但在大麦中转基因植株的 Fe、Mn 含量均显著增加^[28]; 在本研究中, 胚乳过表达 *OsVIT2* 降低了籽粒 Cd^{2+} 浓度, 这表明不同的 VITs 之间、酵母与植物之间转运底物的机制存在差异, 其原因还需进一步的研究来阐明。

胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 后对叶片和籽粒中其他金属元素的转运影响很小。Zhang 等^[22]报道了 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 调节源和库的组织之间的铁和锌分配, Bashir 等^[38]报道了突变体 *osvit2* 植株的枝条中 Zn、Cu 和 Mn 的浓度也发生了显著变化。而在本研究中, 胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 后只有 *OsVIT1* 的秸秆部分 Zn 浓度出现变化, 种子中无明显变化。而 *OsVIT1* 的秸秆和籽粒中 Cu 浓度也升高了, 这表明胚乳过表达 *OsVIT1* 可能会影响 Cu^{2+} 的转运。胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 后对大量金属元素无明显影响。本研究发现胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 不会影响植株的正常生长发育, 这也为植物富铁和籽粒降镉提供了一种新的研究思路 and 参考。

4 结论

胚乳过表达 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 后不影响水稻的农艺性状。与野生型相比, 胚乳过表达 *OsVIT1* 增加秸秆的 Zn、Cu 浓度和籽粒中的 Cu

浓度 0.2–1.5 倍。同时种子中的 Fe 浓度降低 50%。与野生型相比, 胚乳过表达 *OsVIT2* 显著增加秸秆的 Fe 浓度 0.45–1.20 倍, 而种子中的 Fe、Cd 浓度下降 50%, 对其他金属元素的吸收不产生影响。

REFERENCES

- [1] HÄNSCH R, MENDEL RR. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl)[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(3): 259-266.
- [2] CLEMENS S. Metal ligands in micronutrient acquisition and homeostasis[J]. Plant, Cell & Environment, 2019, 42(10): 2902-2912.
- [3] ZHANG XX, ZHANG D, SUN W, WANG TZ. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2424.
- [4] YUAN DS, STEARMAN R, DANCIS A, DUNN T, BEELER T, KLAUSNER RD. The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(7): 2632-2636.
- [5] ZHANG J, WU LH, WANG MY. Iron and zinc biofortification in polished rice and accumulation in rice plant (*Oryza sativa* L.) as affected by nitrogen fertilization[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science, 2008, 58(3): 267-272.
- [6] BASHIR K, TAKAHASHI R, NAKANISHI H, NISHIZAWA NK. The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 15.
- [7] BOONYAVES K, WU TY, GRUISSEM W, BHULLAR NK. Enhanced grain iron levels in rice expressing an iron-regulated metal transporter, nicotianamine synthase, and *ferritin* gene cassette[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 130.
- [8] BOUIS HE, HOTZ C, MCCLEFFERTY B, MEENAKSHI JV, PFEIFFER WH. Biofortification: a new tool to reduce micronutrient malnutrition[J]. Food and Nutrition Bulletin, 2011, 32(1 Suppl): S31-S40.
- [9] HU H, JIN Q, KAVAN P. A study of heavy metal pollution in China: current status, pollution-control policies and countermeasures[J]. Sustainability, 2014,

- 6(9): 5820-5838.
- [10] YU JP, LIU CL, LIN H, ZHANG B, LI XX, YUAN QL, LIU TJ, HE HY, WEI ZR, DING SL, ZHANG C, GAO HS, GUO LB, WANG Q, QIAN Q, SHANG LG. Loci and natural alleles for cadmium-mediated growth responses revealed by a genome wide association study and transcriptome analysis in rice[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 1-15.
 - [11] KHUSH G, BRAR D. Plant introduction and rice improvement for south Asia[J]. Indian Journal of Plant Genetic Resources, 2005, 18: 2-3.
 - [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中污染物限量: GB2762—2017[S]. 中国标准出版社, 2017.
NHFP, State Food and Drug Administration. National Food Safety Standard Limit of Pollutants in Food: GB2762—2017[S]. China Standard Press, 2017 (in Chinese).
 - [13] URAGUCHI S, FUJIWARA T. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation[J]. Rice, 2012, 5(1): 5.
 - [14] CHENG SP. Heavy metal pollution in China: origin, pattern and control[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2003, 10(3): 192-198.
 - [15] JULIANO BO. Rice in human nutrition[C]. Cereals International Proceedings of an International Conference, Brisbane. 1991.
 - [16] MASUDA H, AUNG MS, NISHIZAWA NK. Iron biofortification of rice using different transgenic approaches[J]. Rice, 2013, 6(1): 40.
 - [17] QU LQ, TAKAIWA F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2(2): 113-125.
 - [18] QU LQ, YOSHIHARA T, OYAMA A, GOTO F, TAKAIWA F. Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds[J]. Planta, 2005, 222(2): 225-233.
 - [19] MASUDA H, ISHIMARU Y, AUNG MS, KOBAYASHI T, KAKEI Y, TAKAHASHI M, HIGUCHI K, NAKANISHI H, NISHIZAWA NK. Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 543.
 - [20] SAPPIN-DIDIER V, VANSUYTS G, MENCH M, BRIAT JF. Cadmium availability at different soil pH to transgenic tobacco overexpressing ferritin[J]. Plant and Soil, 2005, 270(1): 189-197.
 - [21] KIM SA, PUNSHON T, LANZIROTTI A, LI LT, ALONSO JM, ECKER JR, KAPLAN J, GUERINOT ML. Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1[J]. Science, 2006, 314(5803): 1295-1298.
 - [22] ZHANG Y, XU YH, YI HY, GONG JM. Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2012, 72(3): 400-410.
 - [23] LUO JS, GU TY, YANG Y, ZHANG ZH. A non-secreted plant defensin AtPDF2.6 conferred cadmium tolerance via its chelation in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100(4): 561-569.
 - [24] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
 - [25] GONG JM, LEE DA, SCHROEDER JI. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelators and cadmium in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(17): 10118-10123.
 - [26] MOMONOI K, YOSHIDA K, MANO S, TAKAHASHI H, NAKAMORI C, SHOJI K, NITTA A, NISHIMURA M. A vacuolar iron transporter in tulip, TgVIT1, is responsible for blue coloration in petal cells through iron accumulation[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2009, 59(3): 437-447.
 - [27] YOSHIDA K, NEGISHI T. The identification of a vacuolar iron transporter involved in the blue coloration of cornflower petals[J]. Phytochemistry, 2013, 94: 60-67.
 - [28] CONNORTON JM, JONES ER, RODRÍGUEZ-RAMIRO I, FAIRWEATHER-TAIT S, UAUY C, BALK J. Wheat vacuolar iron transporter TaVIT2 transports Fe and Mn and is effective for biofortification[J]. Plant Physiology, 2017, 174(4): 2434-2444.
 - [29] CHE J, YAMAJI N, MA JF. Role of a vacuolar iron transporter OsVIT2 in the distribution of iron to rice grains[J]. The New Phytologist, 2021, 230(3): 1049-1062.
 - [30] LUCCA P, HURRELL R, POTRYKUS I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2002, 21(3 Suppl): 184S-190S.

- [31] LIU XF, JIN WL, THEIL EC. Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(7): 3653-3658.
- [32] VASCONCELOS M, DATTA K, OLIVA N, KHALEKUZZAMAN M, TORRIZO L, KRISHNAN S, OLIVEIRA M, GOTO F, DATTA SK. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene[J]. *Plant Science*, 2003, 164(3): 371-378.
- [33] THEIL EC. Iron, ferritin, and nutrition[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2004, 24: 327-343.
- [34] WIRTH J, POLETTI S, AESCHLIMANN B, YAKANDAWALA N, DROSSE B, OSORIO S, TOHGE T, FERNIE AR, GÜNTHER D, GRUISSEM W, SAUTTER C. Rice endosperm iron biofortification by targeted and synergistic action of nicotianamine synthase and ferritin[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(7): 631-644.
- [35] ISHIMARU Y, SUZUKI M, TSUKAMOTO T, SUZUKI K, NAKAZONO M, KOBAYASHI T, WADA Y, WATANABE S, MATSUHASHI S, TAKAHASHI M, NAKANISHI H, MORI S, NISHIZAWA NK. Rice plants take up iron as an Fe^{3+} -phytosiderophore and as Fe^{2+} [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2006, 45(3): 335-346.
- [36] TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SENOURA T, SHIMO H, ISHIKAWA S, ARAO T, NAKANISHI H, NISHIZAWA NK. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14): 4843-4850.
- [37] TAKAHASHI R, ISHIMARU Y, SHIMO H, OGO Y, SENOURA T, NISHIZAWA NK, NAKANISHI H. The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2012, 35(11): 1948-1957.
- [38] BASHIR K, TAKAHASHI R, AKHTAR S, ISHIMARU Y, NAKANISHI H, NISHIZAWA NK. The knockdown of OsVIT2 and MIT affects iron localization in rice seed[J]. *Rice*, 2013, 6(1): 31.

(本文责编 郝丽芳)