

林木金属硫蛋白研究进展

杜佳, 杨静莉, 李成浩*

东北林业大学, 林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨150040

摘要: 金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种低分子量、富含半胱氨酸残基的金属结合蛋白, 广泛分布于自然界中。随着工业化的发展和环境污染的加重, 导致土壤中重金属的积累加剧。林木的植物修复在清除环境污染中占有越来越重要的作用, 林木金属硫蛋白的研究也越来越热, 本文就其分类, 功能, 表达等特点进行综述, 并对其研究前景进行展望。

关键词: 金属硫蛋白; 植物修复; 基因功能; 杨树

Research Progress in Forest Tree Metallothioneins

DU Jia, YANG Jing-Li, LI Cheng-Hao*

State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Metallothionein, which widely distribute in eukaryotic and prokaryotic organisms, is a class of cystein-rich and heavy metal-binding proteins with low molecular weights. Development of industrialization and increase of environmental pollution have led to accumulation of heavy metals in soil. The forest tree phytoremediation involved in environmental pollution cleanup is playing more and more important roles, researches of forest tree metallothioneins are also increasingly hot. The classification, function, expression, characteristic are reviewed in this paper and the research prospects are also proposed.

Key words: metallothionein; phytoremediation; gene function; populus

随着全球现代化的发展, 人类对自然资源, 能源, 尤其是化石能源的过度依赖, 导致土壤的严重污染、温室效应加剧和不可替代能源的衰竭, 进入20世纪以来, 生态环境可持续发展已经成为世界各国的重要战略问题。因此, 培育优质速生的、具有植物修复能力的树种, 已成为当务之急。

金属硫蛋白在植物中普遍存在, 是一种金属结合蛋白, 参与了许多生理过程, 如生长发育、胚胎发生、小孢子发生、衰老、果实的发育、成熟和抗逆等。对金属硫蛋白的研究正逐渐展开并得到许多重要的研究成果, 据报道, 金属硫蛋白可能与植物的重金属的平衡和耐受性, 抵抗植物病原菌感染, 以及胚胎发育、果实成熟、叶片衰老等过程有关(Cobbett和Goldsbrough 2002; Bhalerao等2003; Liu等2002; Yu等1998; Akashi等2004; Zhou和Goldsbrough 1995; Murphy等1997; Lee等2004; Giritch等1998)。这表明金属硫蛋白可能起着某些重要的作用。了解金属硫蛋白对植物生长发育等生理过程的影响, 并揭示植物对重金属逆境的适应机制, 对再生资源的可持续利用具有重要的意义。加速林木育种进程, 提高森林生产力是当前

面临的世界性的重要研究课题。本文概要介绍了以林木为主的植物MT的分类、功能及重金属解毒方面的研究进展。

1 植物金属硫蛋白的分类

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于生物界中的低分子质量(2~7 kDa)、富含半胱氨酸(20%~30%)、不含组氨酸和芳香族氨基酸的一类金属结合蛋白质。动物的MT是由Margoshes和Vallee (1957)首次从蓄积Cd的马肾中发现的。而植物MT最早是由Casterline和Barnett于1982年从大豆根中发现的, 该蛋白被证明是一种重要的金属结合蛋白并参与植物抗重金属胁迫过程。植物金属硫蛋白在氨基酸序列、电荷、半胱氨酸数目及分布模式以及连接区域长度方面与动物金属硫蛋白有很大的不同(Mi等2004)。据推测, 按照氨基酸序列中Cys残基的位置及排列方式, 可将植物

收稿 2011-06-13 修定 2011-08-09

资助 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-098B)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(DL09-CA12)。

* 通讯作者(E-mail: chli0@163.com; Tel: 0451-82190607)。

金属硫蛋白分为4类(Cobbett和Goldsbrough 2002)。

第1类MT含有6个Cys-Xn-Cys元件(Xn为非Cys残基),集中分布在链的N端和C端2个区域,C端和N端结构域中含3个元件,2个结构域之间是由40个氨基酸组成的不含Cys的间隔区,间隔区氨基酸残基大多是多数植物MTs的共同特征。

第2类MT与第1类MTs类似,但第1个和第2个Cys以Cys-Cys形式出现,而且位于多肽的第3和第4位,N端有一个高度保守的序列MSC-CG-GNCGCG,C端结构域有3个Cys-Xn-Cys单元。

第3类MT也含有连接2个富含Cys的区域,它们由大约40个氨基酸残基连接在一起,但是在Cys数目和排列方式上与第1类有明显的不同,第3类MTs的N端有4个Cys,前面3个以Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys方式排列,第4个Cys多包含在Gln-Cys-Xn-Lys-Lys-Gly单元中,C端结构域含有6个Cys,以Cys-Xn-Cys的形式存在。

第4类MT的显著特征是含有3个Cys结构域,每个结构域有5个或6个Cys残基,结构域之间为10~15个氨基酸残基组成的间隔区,多数Cys以Cys-Xn-Cys的形式存在。

在拟南芥、水稻、甘蔗等多种植物中已经发现了所有类型的MT的存在。一般认为第1类MT基因主要在根中表达,而第2类MT基因在叶等地上部分的表达量相对丰富。但就所有MT基因的表达而言,因不同的物种、不同的类型而表达特性各异。另外植物MT参与许多重要的发育过程,例如水果的成熟、根的发育和栓化作用(Chatthai等1997; Mir等2004; Yuan等2008)。在拟南芥中,已经证明不同种类的MT有独特的和重叠的功能,具有保持重金属体内平衡、解毒和保护细胞内氧化胁迫作用(Murphy等1997; Miller等1999; Lee等2004)。

2 植物金属硫蛋白的空间结构

经二维2D-NMR及X-射线晶体衍射法测定后得出,MT分子三级结构呈现哑铃状,没有 α 螺旋和 β 折叠,有2个大小相当(直径1.52 nm)的结构域(A和B)构成(Haq等2005),N端B结构域包含9个Cys,C端A结构域包含11个半胱氨酸(Cys),20个Cys可以结合7个 Zn^{2+} 或 Cd^{2+} ,如果仅结合 Cu^{2+} ,可以结合12个,具有不同的结合金属元素的能力。天然的MT

分子不含二硫键,也没有游离的巯基(-SH)存在,这种络合结构构象坚固,使MT分子呈现出独特的金属硫四面体络合结构,金属硫蛋白的耐热性和抗蛋白酶解的能力可能与此结构有关(田晓丽和郭军华2005)。

3 植物金属硫蛋白的功能

在动物中,MT已经被证明具有活性氧清除和保护DNA免受氧化损伤的作用,与哺乳动物类似,许多基因和cDNA编码的植物MT已经被分离出来,MT被多家基因编码。大多数关于它们特定功能的信息是从在发育中的表达研究和对不同环境刺激的反应中得到的。除了重金属,植物MT基因被不同的环境刺激诱导,包括干旱、高盐和低温,MT不仅仅在保持金属离子稳态和重金属解毒中起作用,对一般的压力也做出相应的反应(Brklijacic等2004; Jin等2006)。烟草等模式植物研究中证明MT参与植物体内重金属的解毒和活性氧清除功能,同时在植物生长发育中也起着重要的作用。Zhou和Goldsbrough (1995)通过MT缺陷型酵母的功能互补实验,首次证明拟南芥的2个MT基因对Cu和Cd胁迫具有抗性。植物中不同MT基因功能是从基因敲除和过表达植株中得到的(Guo等2003; Freisinger 2007; Yuan等2008)。一般认为植物MT基因是一个与Cu结合有关的蛋白,因为植物的MT基因可被Cu离子诱导进而表达,而Cu离子又可以诱导拟南芥、水稻、小麦、烟草中MT基因的表达。在拟南芥中MT2基因的表达水平与不同浓度Cu的诱导相关(Murphy和Taiz 1995)。MT基因主要由Cu诱导(Zhou和Goldsbrough 1995; Murphy和Taiz 1995; Guo等2003);同时,Cd和Zn也诱导MT表达(Zhou和Goldsbrough 1995; Murphy和Taiz 1995)。从重金属超富集植物遏兰菜(*Thlaspi caerulescens*)中分离的TcMT3基因,经酵母功能互补和Northern杂交实验证明它对保持Cu离子的动态平衡具有重要作用(Roosens等2004)。MT具有重金属解毒作用,但并不是对所有能诱导它的金属都具有解毒作用,主要对体内必需的微量元素Cu和Zn的代谢调控过程中占据中心地位(Miller等1999),而对Cd、Hg和Pb等环境有毒重金属的稳定结合能力相对较弱。植物MT种类很多,可能由于每种MT只对某种特定的金属亲和性较高,对其他金属亲和性

较低(Foley等1997)。

越来越多的研究证明了MT在清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)方面可能具有重要作用,认为MT是细胞中防御自由基伤害的一种重要机制,通过清除自由基来达到防止DNA损害的发生。金属硫蛋白的巯基(-SH)与金属结合以阻止其参与氧化还原的自由基反应。Akashi等(2004)第一次证明了植物MT与抗氧化特性的关系,他们从野生西瓜中分离出金属硫蛋白CLMT2,发现其具有强的活性氧自由基清除能力,说明MT基因是植物体内重要的活性氧自由基清除剂之一。

在棉花的幼苗中GHMT3的表达量随着高盐干旱、低温、ABA、ROS胁迫增强(Xue等2009),而烟草GHMT3的过表达又增强了植物对ROS胁迫的耐受性,GHMT3a能够结合植物体内过量的Zn离子,清除氧化还原的自由基反应产生的ROS。GHMT3具有活性氧的清除能力(Tucker等2004)。在活性氧清除机制中,ROS取代MT的Cys残基上的金属离子,减少体内ROS的积累,避免了细胞损伤。一些专家认为释放下来的金属离子可能参与信号的重叠过程。但具体的信号传导路线目前尚不清楚。

4 林木中的MT基因

4.1 杨树MT基因及分类

在林木中研究MT基因的报道很少,目前只有杨树等少数林木中有过MT基因的报道。杨树的基因组含有至少6个MT基因,在NCBI中搜索发现毛果杨(*P. trichocarpa* × *deltoides*)中存在6个不同MT cDNAs序列,分成了3个亚族(MT1a、MT1b、MT2a、MT2b、MT3a和MT3b),分别属于植物MT四类的前3类。由于第4类MT的表达在发育的种子中受到限制,所以至今在杨树的ESTs中未发现(Guo等2003)。PtdMT1 cDNAs含有219 bp的ORF编码73个氨基酸,预测其分子量是7.594 kDa (PtdMT1a)和7.640 kDa (PtdMT1b)。PtdMT1a和PtdMT1b的序列相似性为90.4%。PtdMT1a和PtdMT1b的序列与苜蓿和水稻的第1类型的MT比较相似,而与拟南芥的第1类型的MT结构上相差较远。PtdMT2a cDNA含有237 bp的ORF编码79个氨基酸,预测分子量为7.792 kDa。而PtdMT2b cDNA含有234 bp的ORF编码78个氨基酸,预计分子量为

7.901 kDa。PtdMT2a和PtdMT2b的序列相似性为70.9%,他们与PtdMT1a的相似性为57% (PtdMT2a)和74% (PtdMT2b)。PtdMT2a和PtdMT2b属于第2类型的MT。PtdMT3 cDNAs含有198 bp的ORF编码66个氨基酸,分子量PtdMT3a为6.966 kDa, PtdMT3b为6.857 kDa。PtdMT3a和PtdMT3b的相似性为83%,但是它们与PtdMT1a的相似性分别为27%和26%。PtdMT3a和PtdMT3b为第3类型的MT,在N末端只有4个半胱氨酸(Cobbett和Goldsbrough 2002)。

在NCBI中所搜索的毛果杨MT基因序列(PtdMT1a、PtdMT1b、PtdMT2a、PtdMT2b、PtdMT3a和PtdMT3b)的cDNA的EST标签序列号分别为AY594295、AY594296、AY594296、AY594298、AY594299和AY594300)发现MT基因含有1~3个内含子。内含子区域为71~275 bp。在PtdMT1a、PtdMT1b、PtdMT2a和PtdMT2b中,第1个内含子(82~258 bp)插在ATG起始密码子的上游。分析5'上游起始密码子,发现此区域存在结合位点,可以更好的分析MT的调控能力。杨树的MT基因在8~635 bp处都含有TATA和CAAT框。其他相似的调控元素也在杨树的MT基因中发现。例如,PtdMT1a和PtdMT1b都含有MYC和MYB结合位点,参与干旱和脱落酸表达的调控。PtdMT2a和PtdMT2b含有ABRE和MYB结合位点,参与胁迫的调节等。

4.2 杨树MT的表达模式

对模式植物MT基因的表达模式研究基本已经成熟。关于杨树MT基因的表达模式只在最近的研究中有所提及,它们不同的表达模式与PtdMTs在独特的发育阶段(根的发育与叶片的衰老)和环境的诱导中起了不同的作用和功能。PtdMT1a和PtdMT1b主要在根部表达,而PtdMT3b表达量在叶中比在根中更高,相比之下PtdMT2a、PtdMT2b在根部、茎部和叶部均有表达。PtdMT2除了在上述组织中高表达外,在花、木质部和种子中表达量也相对较高,而PtdMT3a出现在木质部和根部。另外杨树MT的转录水平也随着衰老、重金属处理、病毒感染而增加(Bhalerao等2003; Kohler等2004)。有报道称PtdMT2a和PtdMT3a在叶和根中的表达随着水胁迫的增强而增加(Street等2006; Bogeat-Triboulot等2007)。杨树MT基因表达研究

的报道还不是很多,需要更深入的研究。

4.3 林木MT基因的功能

4.3.1 金属硫蛋白的重金属解毒功能 Kohler等(2004)将杨树MT基因转入酵母中,发现对照酵母在 $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd浓度的培养基中不能生长,而转入PtdMT基因的酵母能够生长,耐受能力最强的($125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd)是转入基因为PtdMT2a、PtdMT2b和PtdMT3a的酵母。证明了PtdMTs基因有抗重金属胁迫的能力。用 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu、 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd、 $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn的培养基培养,18 h后检测杨树根部PtdMT的表达量,发现PtdMT3a和PtdMT3b基本没有表达,而PtdMT1a、PtdMT1b、PtdMT2a和PtdMT2b均有表达,且随着胁迫时间的延长表达量有所增加。分析得出,在Cd、Cu和Zn三种重金属中,杨树的PtdMTs基因主要在Zn的新陈代谢和解毒机制中发挥作用(Kohler等2004)。Macovei等(2010)研究发现,转VFMT2基因的转基因白杨(*Populus alba*)悬浮培养细胞分别在一定浓度的Cd($150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Zn($2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和Cu($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基中培养,对照细胞全部死亡,而转化细胞的死亡率仅为Cd 27%、Cu 28%和Zn 21%,证明了VFMT2提高了植物金属抗性(Macovei等2010)。本实验室从盐生、旱生和沙生的植物怪柳(*Tamarix hispida*)中克隆了ThMT3基因(GenBank No. EH057039),研究发现,ThMT3基因受Cu、Zn、Cd和NaCl诱导(Yang等2011)。ThMT3基因过表达提高了转基因酵母对Cu、Zn、Cd胁迫的耐受性及活性氧清除能力;ThMT3基因过表达选择性诱导抗氧化酶基因的表达,即Cd诱导SOD基因表达,Zn诱导CAT1基因表达,Cu诱导GPXI基因表达,NaCl诱导SOD、CAT、GPXI基因表达;改变转基因酵母的重金属液泡转运系列基因的表达水平。与大多数已报告的植物MT基因的研究结果相反(Hassinen等2011),ThMT3转基因酵母选择性吸收Cd和Zn,而不吸收Cu(Yang等2011)。综合分析,推测ThMT3基因通过与抗逆相关的多基因协同表达来提高重金属抗性;ThMT3可能为Cd或Zn结合蛋白,ThMT3基因过量表达也能提高转基因植物的Cd或Zn的吸收能力。尽管我们已经对ThMT3基因做了一些初步研究,但仍然对ThMT3基因的抗重金属机理了解不够清楚。例如ThMT3基因的上游表达基因信号

通路是什么?ThMT3基因通过哪些基因的协同表达来提高抗重金属能力?林木的MT基因的抗重金属精确功能和途径需要更深入的研究。

4.3.2 金属硫蛋白的活性氧清除功能除了重金属解毒作用外,杨树的MT基因也有活性氧清除功能。干旱胁迫增强植物体内ROS的产生量,ROS连续性的积累导致一些对植物生长不利的一系列酶反应(Apel和Hirt 2004)。在干旱胁迫的条件下,白杨(white poplar)叶中和形成层部PtdMT基因的表达量明显提高(Berta等2009)。PtdMT3基因在叶片中和形成层表达量相对其他几个基因来说最高,并且随着胁迫处理的条件改变,表达量相应变化。暗示了杨树的PtdMT基因在干旱防御机制中发挥作用,是植物体内的ROS清除剂(Brosche等2005)。在巴基斯坦沙漠地区生长的胡杨,PtdMT基因随着降水量的改变表达量相应发生变化,随着PtdMT表达量的增高ROS在体内的积累量减少,证明MT在清除体内ROS机制中发挥作用(Brosche等2005)。PtdMT表达产生了一系列参与活性氧防御的酶,但此酶与其他参与活性氧防御的酶(CAT和SOD),表现出不同的转录水平,证明了MT在ROS解毒中发挥作用,但具体的发挥作用的途径和机制还没有详细的报道。

在调查PtdMT在重金属解毒和参与其他植物生长和发育的机制中,用Cd处理转录后的*P. tremula*细胞,其生长抑制和基因表达量都发生改变,尤其是参与调节活性氧胁迫处理的蛋白含量减少。据报道,在*Populus × euramericana*中,用高浓度的Zn处理后,转化的植物细胞生长量减少并且光合参数改变(Baccio等2003)。在白杨的细胞悬浮培养中用不同Cu含量处理后,观察得到NO的产量增加,同时提高了细胞程序性死亡和坏死的比率(Bal-estrazzi等2009)。MT的抗逆生理功能的研究虽然在不断深入,但除抗氧化作用以及抗重金属胁迫外,对植物生长调节机制还不清楚。

5 林木的植物修复

25年以前,植物修复技术的研究寥寥无几,直到污染问题越来越严重,人们对植物修复才开始重视起来。植物修复技术是以植物提取、植物降解、根滤作用、植物固定和植物挥发为基础除去土壤中的污染物(Salt等1995)。植物修复技术近来

被广泛的利用。许多生物具有高富集能力(Peer等2005)。然而, 由于林木发达的根系和高生物量, 林木对重金属污染土壤的植物修复能力才更有效(Fischerová等2006)。以柳树和白杨的植物修复能力为研究重点, 证明了他们在重金属污染土壤中的修复能力(Jensen等2009)。瑞典城镇周围工厂排出的废水严重影响居民的生活, 在污染严重地区大量种植柳树, 不仅减少了废水中有机氯等污染物, 而且对周围土壤和垃圾填埋场土壤中的重金属有明显的吸收, 达到了植物修复的作用, 既经济又不造成二次污染(Dimitriou和Aronsson 2005)。杨树是林木中植物修复具有代表性的树种, 把杨树种在重金属污染严重的区域, 在种植第一年时, 测定此地区土壤中Zn、Cd和Pb的含量高达606、44和33 mg·kg⁻¹。3年后杨树成活率为18%~53%, 土壤中的重金属含量明显降低, 而植物组织中重金属含量上升, 组织内重金属含量的分布随着叶、树皮、茎和根部明显呈下降趋势(Pierzynski等2002)。

杨树中的MT是家族基因蛋白, 许多报道证明, MT基因的表达与它们在重金属解毒和维持植物体内离子平衡相关。随着植物金属离子胁迫能力的加剧, MT基因的表达量有所提高, 说明植物修复污染的土壤和吸收污染土壤的重金属离子都与MT息息相关。林木中的MT基因转入拟南芥、烟草和酵母中都增强重金属修复能力。而转基因林木的植物修复作用又如何呢? 对于模式植物转基因的研究打开了对高生物量林木遗传转化的大门。杨树(白杨、三角叶杨和山杨)和杂交树种成为了林木生物技术的模式植物(Bradshaw等2000), 为应用于林木修复重金属污染, 提供了分子生物学和基因工程学依据。

6 MT在林木学领域的应用前景

MT的研究成果已涉及医学、毒理学、环境科学、营养学、生物工程、美容护肤等多个领域, 从目前的研究来看, 大多数的MT基因克隆自拟南芥等草本植物, 在木本植物的研究很少。木本植物在生长发育、生理及形态结构等诸多方面与草本植物不同, 其重金属抗性机理与草本植物也会有所区别。一些林木对极端逆境具有很强的适应能力, 表明其体内具有高效的抗逆功能基因。从极端环境生长的林木中分离和鉴定出来的抗逆基

因已引起了国内外相关研究机构的高度重视。林木中MT基因的研究才处于起步状态, 但有着广泛的应用前景和巨大的市场潜力。由于杨树的快速生长能力, 发达的根系使其成为木材供应的重要来源, 并且是植物修复的候选树种, 有着巨大的经济和生态价值。已经证明MT基因的过表达对杨树重金属能力的提高起积极作用, 有必要进一步利用转基因技术将不同来源的MT基因导入林木中, 培育出对污染重金属具有高抗性和高富集能力, 以及对非生物胁迫有抵抗能力的林木品种, 为修复污染环境和保护人类健康做出贡献。

参考文献

- 田晓丽, 郭军华(2005). 金属硫蛋白的研究进展. 国外医学药理学杂志, 32 (2): 119~124
- Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A (2004). Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 72~78
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Baccio DD, Tognetti R, Sebastiani L, Vitagliano C (2003). Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol*, 159: 443~451
- Balestrazzi A, Macovei A, Testoni C, Raimondi E, Dona M, Carbonera D (2009). Nitric oxide biosynthesis in white poplar (*Populus alba* L.) suspension cultures challenged with heavy metals. *Plant Stress*, 3: 1~6
- Berta M, Giovannelli A, Potenza E, Traversi ML, Racchi ML (2009). Type 3 metallothioneins respond to water deficit in leaf and in the cambial zone of white poplar (*Populus alba*). *J Plant Physiol*, 166: 521~530
- Bhalerao R, Keskitalo J, Sterky F, Erlandsson R, Bjorkbacka H, Birve SJ, Karlsson J, Gardestrom I P, Gustafsson P, Lundeberg J, Jansson S (2003). Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiol*, 131: 430~442
- Bogeat-Triboulot MB, Brosche M, Renaut J, Jouve L, Le Thiec D, Fayyaz P, Vinocur B, Witters E, Laukens K, Teichmann T et al (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol*, 143: 876~892
- Bradshaw HD, Ceulemans R, Davis J, Stettler R (2000). Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *J Plant Growth Reg*, 19: 306~313
- Brkljacic JM, Samardzic JT, Timotijevic GS, Maksimovic VR (2004). Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein-like gene (*MT3*) under different stress and

- physiological conditions. *J Plant Physiol*, 161: 741~746
- Brosche M, Vinocur B, Alatalo ER, Lamminmaki A, Teichmann T, Ottow EA, Djilianov D, Afif D, Altman A et al (2005). Gene expression and metabolite profiling of *Populus euphratica* growing in the Negev desert. *Genome Biol*, 6 (12): R101
- Casterline JL, Barnett NM (1982). Cadmium-binding components in soybean plants. *Plant Physiol*, 69: 1004~1007
- Chatthai M, Kaukinen KH, Tranbarger TJ, Gupta PK, Misra S (1997). The isolation of a novel metallothionein related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Mol Biol*, 34: 243~254
- Cobbett C, Goldsbrough PB (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 159~182
- Dimitriou I, Aronsson P (2005). Willows for energy and phytoremediation in Sweden. *Unasylva*, 221: 47~50
- Fischerová Z, Tlustos P, Szakova J, Sichorova K (2006). A comparison of phytoremediation capability of selected plant species for given trace elements. *Environ Pollution*, 144: 93~100
- Foley RC, Liang ZM, Singh KB (1997). Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Mol Biol*, 33: 583~591
- Freisinger E (2007). Spectroscopic characterization of a fruit-specific metallothionein: *M. acuminata* MT3. *Inorg Chim Acta*, 360: 369~380
- Giritch A, Ganai M, Stephan UW, Baumlein H (1998). Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol Biol*, 37: 701~714
- Guo WJ, Bundithya W, Goldsbrough PB (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol*, 159: 369~381
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J (2005). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 533: 211~226
- Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat H, Karenlampi SO (2011). Plant metallothioneins—metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol*, 13: 225~232
- Jensen JK, Holm PE, Nejrup J, Larsen MB, Borggaard OK (2009). The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environ Pollution*, 157: 931~937
- Jin S, Cheng Y, Guan Q, Liu D, Takano T, Liu S (2006). A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. *Biotechnol Lett*, 28: 1749~1753
- Kohler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F (2004). Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytol*, 164: 83~93
- Lee J, Shim D, Song WY, Hwang I, Lee Y (2004). *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol Biol*, 54: 805~815
- Liu P, Goh CJ, Loh CS, Pua EC (2002). Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiol Plant*, 114: 241~250
- Macovei A, Ventura L, Dona M, Fae M, Balestrazz A, Carbonera D (2010). Effect of heavy metal treatment on metallothionein expression profiles in white poplar (*Populus alba* L.) cell suspension cultures. *Fascicula Biol*, (2): 274~279
- Margoshes M, Vallee BL (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*, 29: 4813~4814
- Miller JD, Arteca RN, Pell EJ (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 120: 1015~1023
- Mir G, Domènech J, Hugué G, Guo WJ, Goldsbrough P, Atrian S, Molinas M (2004). A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *J Exp Bot*, 55: 2483~2493
- Murphy A, Taiz L (1995). Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes: Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol*, 109: 945~954
- Murphy A, Zhou J, Goldsbrough PB, Taiz L (1997). Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 113: 1293~1301
- Peer WA, Baxter IR, Richards EL, Freeman JL, Murphy AS (2005). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. In: Tamas M, Martinoia E (eds). *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Berlin: Springer-Verlag, 299~340
- Pierzynski GM, Schnoor JL, Youngman A, Licht L, Erickson LE (2002). Poplar trees for phytostabilization of abandoned zinc-lead smelter. *ASCE*, 6: 177~183
- Roosens NH, Bernard C, Leplae R, Verbruggen N (2004). Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett*, 577: 9~16
- Salt DE, Blaylock M, Nanda Kumar PBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nat Biotechnol*, 13: 468~474
- Street NR, Skogstrom O, Sjo din A, Tucker J, Rodriguez-Acosta M, Nilsson P, Jansson S (2006). The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *Plant J*, 48: 321~341
- Tucker SL, Thornton CR, Tasker K, Jacob C, Giles G, Egan M, Talbot NJ (2004). A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, 16: 1575~1588
- Xue TT, Li XZ, Zhu W, Wu CA, Yang GD, Zheng CC (2009). Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J Exp Bot*, 60: 339~349
- Yang JL, Wang YC, Liu GF, Yang CP, Li CH (2011). *Tamarix hispida* metallothionein-like *ThMT3*, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and NaCl in transgenic yeast. *Mol Biol Rep*, 38: 1567~1574
- Yu LH, Umeda M, Liu JY, Zhao NM, Uchimiya H (1998). A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. *Gene*, 206: 29~35
- Yuan J, Chen D, Ren Y, Zhang X, Zhao J (2008). Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, *OsMT2b*, down-regulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice. *Plant Physiol*, 146: 1637~1650
- Zhou J, Goldsbrough PB (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet*, 248: 318~328