

陈焱山, 贾梦茹, 曹 越, 等. 蜈蚣草砷富集的分子机制研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(7): 1402–1408.

CHEN Yan-shan, JIA Meng-ru, CAO Yue, et al. Advances in molecular mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(7): 1402–1408.

蜈蚣草砷富集的分子机制研究进展

陈焱山, 贾梦茹, 曹 越, 马奇英

(南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210023)

摘 要:我国土壤砷污染形势严峻, 威胁我国粮食安全和居民健康。蜈蚣草是世界上第一种被发现砷超积累植物, 也是为数不多的、成功应用于土壤砷污染修复的植物。对蜈蚣草砷富集分子机制开展研究, 可为提高植物修复效率提供理论基础。本文介绍了蜈蚣草砷富集的分子机制, 重点阐述了蜈蚣草中参与砷代谢的关键基因及其功能, 并展望了相关研究的发展趋势。

关键词:蜈蚣草; 砷; 超富集; 植物修复; 分子机制

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2018)07-1402-07 doi:10.11654/jaes.2018-0563

Advances in molecular mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*

CHEN Yan-shan, JIA Meng-ru, CAO Yue, MA Qi-ying

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract: Increasing arsenic (As) pollution in soils is of great concern in China, impacting food safety and threatening human health. *Pteris vittata*, the first known As hyperaccumulator, is among few plants that have been successfully used to remediate As contaminated soils. To further improve phytoremediation by *P. vittata*, it is necessary to investigate the molecular mechanism of As hyperaccumulation in this extraordinary fern. This review introduced the molecular mechanisms of As hyperaccumulation, emphasizing on the critical genes that involved in As metabolism. Knowledge gaps and further studies in future were also discussed.

Keywords: *Pteris vittata*; arsenic; hyperaccumulation; phytoremediation; molecular mechanism

砷(Arsenic, As)是一种在自然界中广泛存在的化学元素, 其所导致的砷污染是全球范围内最常见的重金属污染之一。砷在环境中多以无机砷形式存在, 常见的无机砷有五价砷酸盐[Arsenate, As(V)]和三价亚砷酸盐[Arsenite, As(III)]^[1]。As(V)主要存在于透气性良好的有氧土壤中^[2], 而As(III)主要存在于水淹的还原环境^[3]。美国毒物和疾病登记署(ATSDR)一直将砷列为危害人体健康的化学品毒物的首位, 而国际癌症组织(IARC)则将无机砷列为人类I类致癌物。在我国, 砷是环保部五大重点监控的金

属元素之一。2014年, 原环保部和国土资源部联合发布的《全国土壤污染状况调查公报》显示, 我国土壤砷的点位超标率高达2.7%。砷容易被农作物吸收并在作物可食用部分累积, 并通过食物链危害人体健康^[4-5]。目前, 我国部分地区的砷污染已严重威胁到粮食安全和人体健康, 成为制约当地社会经济发展的瓶颈之一。

植物修复是当前最为经济有效的砷污染土壤修复技术之一, 它主要依托砷超富集植物的超积累特性实现砷的容纳和转移, 以达到净化土壤的目的, 具有

收稿日期: 2018-04-28 录用日期: 2018-06-04

作者简介: 陈焱山(1984—), 男, 湖北黄冈人, 博士, 副研究员, 从事植物砷代谢的分子机制和植物修复研究。E-mail: chenyanshan@nju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(21707068, 21637002); 江苏省自然科学基金项目(BK20160649)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(21707068, 21637002); Jiangsu Provincial Natural Science Foundation(BK20160649)

成本低、操作简单、对环境扰动较小等优点^[6]。蜈蚣草(*Pteris vittata*)是世界上第一种被发现砷超富集植物,具有极强的砷吸收能力、高效的砷转运富集能力以及植物细胞对砷的高度抗性,因此是一种极为理想的修复土壤砷污染的植物^[7-8]。蜈蚣草属凤尾蕨科凤尾蕨属多年生草本植物,在我国自然分布于秦岭以南^[9]。研究表明,蜈蚣草在高砷污染土壤中仍可生长,其地上部富集砷的浓度最高可超过干重的2%^[7]。目前,蜈蚣草已被广泛用于砷污染土壤的植物修复实践,同时结合刈割、施肥、水分管理、菌剂使用及辅助剂添加等措施,取得了一定的修复效果^[10-11]。

目前国内外对蜈蚣草研究已15年有余,从环境化学、植物生理学、生物化学等多方面开展了大量蜈蚣草富砷机理的研究,近年来在其砷代谢的分子机制研究方面也取得了一定的进展。相关研究对于认识蜈蚣草的富砷机制,提高植物修复效率,推动植物修复技术的发展提供了重要的理论基础。

1 As(V)的吸收

在有氧的土壤中,砷主要以As(V)的形式存在,蜈蚣草根际砷的形态也以As(V)为主。作为磷酸盐(Pi)的类似物,As(V)通过Pi的吸收系统进入植物,因此在植物吸收过程中二者表现出显著的竞争抑制^[12-13]。近年来,大量的分子证据证明As(V)通过磷酸盐转运蛋白Pht(Phosphate transporter)被植物吸收,例如,拟南芥中的Pht1;1和Pht1;4、水稻中的OsPht1;4、OsPht1;8等高亲和磷酸盐转运蛋白均介导了植物对As(V)的吸收^[14-16]。在一般植物中,这些为As(V)和Pi所共用的Pht对Pi的亲合力远高于As(V)^[17-18]。

与非砷超富集植物不同,蜈蚣草对As(V)的吸收极为高效^[19],但相同的是,蜈蚣草中As(V)和Pi的吸收也表现出显著的拮抗作用和吸收竞争抑制^[19-20],暗示蜈蚣草也是通过Pht吸收As(V)。最近,DiTusa等^[21]从蜈蚣草中克隆得到了3个磷酸盐转运蛋白基因:*PvPht1;1*、*PvPht1;2*和*PvPht1;3*。*PvPht1;3*定位于细胞质膜上,转录水平表达受As(V)诱导;在酵母自身磷酸盐转运蛋白缺失突变株PAM2($\Delta pho84\Delta pho89$)中表达*PvPht1;3*,发现*PvPht1;3*可以完全回补PAM2对磷的吸收缺陷,并导致酵母砷吸收积累量增加,对As(V)也更敏感,这些结果表明*PvPht1;3*对Pi和As(V)均具有转运能力^[21]。进一步研究表明,与一般Pht对Pi的亲合力远高于As(V)不同,*PvPht1;3*对As(V)的亲合力与其对Pi的亲合力

相当,较低浓度的As(V)即可显著抑制酵母中*PvPht1;3*对Pi的吸收^[21]。这一结果表明,*PvPht1;3*是一个高亲和的As(V)转运蛋白,很可能参与了蜈蚣草根系对As(V)的高效吸收^[21]。目前,对于*PvPht1;3*的功能研究还限于酵母系统,其在植物中的功能还有待进一步验证。

*PvPht1;1*和*PvPht1;2*基因编码蛋白的相似性为98.5%^[21],仅存在个别氨基酸差异。与*PvPht1;3*不同,*PvPht1;1/2*的转录水平表达不受As(V)诱导,其在酵母突变体中也不能完全回补PAM2酵母的磷吸收功能缺失所导致的生长抑制,表明其在酵母中对Pi的转运能力较*PvPht1;3*弱^[21]。为深入研究*PvPht1;1/2*的功能,Cao等^[22]进一步将*PvPht1;2*基因导入烟草,发现*PvPht1;2*编码一个有功能的磷转运蛋白,可有效提高转基因烟草对磷的吸收和转运,并显著促进烟草生长,但并不会提高烟草对As(V)的吸收,暗示*PvPht1;2*可能是没有As(V)转运能力的Pi转运蛋白,推测其在蜈蚣草中并未参与As(V)的吸收,但参与了蜈蚣草对磷的吸收和转运^[22]。目前,对蜈蚣草中不同Pht的功能及其调控机制进行研究将有助于进一步了解蜈蚣草高效吸收As(V)的分子机制,而不同Pht对Pi和As(V)的相对选择性也将是研究的重点。

2 As(III)的吸收

在蜈蚣草生长的土壤环境中,As(III)并不是主要的砷赋存形态,但由于根际微生物的还原作用以及植物根系的生物化学作用,蜈蚣草根际仍有可能存在一定比例的As(III)^[23-25]。植物通过水通道蛋白吸收As(III)^[26]。植物水通道蛋白包括NIPs(Nodulin 26-like intrinsic proteins)、PIPs(Plasma membrane intrinsic proteins)、TIPs(Tonoplast intrinsic proteins)等亚家族,其中NIPs是植物中最主要的As(III)吸收蛋白^[27-30]。此外,水稻中的部分PIPs也被证实具有As(III)透性^[31]。在蜈蚣草中,He等^[32]挖掘得到了一个TIP类水通道蛋白*PvTIP4;1*,并发现其可能参与蜈蚣草对As(III)的吸收,这也是植物中被发现的第一个参与As(III)吸收的TIP类水通道蛋白。蜈蚣草中其他水通道蛋白,尤其是NIPs,目前还未见报道。

3 As(V)的还原

As(V)被普通植物根部吸收后,大部分会被还原为As(III),并与谷胱甘肽(GSH)、植物络合素(Phyto-

chelators, PCs)等结合,从而降低砷的毒性^[33-34]。在蜈蚣草中,植物组织砷形态分析表明,大部分As(V)被吸收后也还原为As(III)^[7]。但与非超富集植物不同,蜈蚣草中As(III)多以自由状态存在于细胞内,很少与植物络合素形成复合物^[35]。

As(V)处理条件下,蜈蚣草根部和地上部As(III)的比例并不相同,地上部As(III)比例较高(50%~90%),而根部一般以As(V)为主,As(III)比例一般为10%~40%^[7,36-38]。Duan等^[39]发现,蜈蚣草根系提取物能将As(V)还原为As(III),但地上部羽叶提取物则不能,证明了蜈蚣草中砷酸还原酶的存在,并暗示羽叶中As(III)可能来自于根系中As(V)的还原。但是,蜈蚣草羽叶在As(V)处理条件下也能通过叶片吸收As(V)并将其还原为As(III),说明蜈蚣草羽叶中也存在As(V)的还原^[40-41]。蜈蚣草地上部羽叶中As(III)比例较根部As(III)比例高,则有可能是根部As(V)还原为As(III)后被高效地转运至地上部所致^[42]。

在真核模式生物酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,ACR2砷酸还原酶介导了As(V)的还原,也是酵母砷解毒的第一步^[43]。在植物中,植物的ACR2砷酸还原酶,如拟南芥AtACR2以及水稻OsACR2.1、OsACR2.2等均被认为是砷代谢的关键酶,介导了As(V)的还原^[44-45]。Ellis等^[46]在蜈蚣草中也克隆得到了PvACR2,并发现其介导As(V)的还原。研究表明,PvACR2具有和酵母ACR2相似的砷酸还原酶活性,能将As(V)还原成As(III),且它在蜈蚣草中的表达不受外界砷浓度的调控^[46]。很多重金属超富集植物都有一个共同的特点,即重金属代谢关键基因不受该重金属诱导且能持续高水平表达,这也暗示了PvACR2在蜈蚣草砷富集过程中起重要作用^[46]。

随着对植物砷酸还原酶研究的深入,一些证据显示,ACR2可能并非植物砷还原的关键酶,ACR2的功能缺失并不影响植物中砷的氧化还原、抗性或积累特性^[47-48]。另外,植物中一类新的砷酸还原酶被发现,这类名为HAC1(High Arsenic Content 1)或ARQ1(Arsenate Reductase QTL1)的砷酸还原酶不属于ACR2^[48-49]。在拟南芥中,HAC1介导了拟南芥根部外皮层中As(V)的还原,从而促进植物根中As(III)的外排。HAC1的功能缺失则导致As(V)还原受阻,As(III)外排减少,砷转运的增加以及植株对As(V)的耐性降低^[48]。在水稻中,OsHAC1;1、OsHAC1;2和OsHAC1;4均被认为介导了As(V)的还原,超表达这

些基因显著增强了水稻对As(V)的抗性,增加了水稻根系As(III)的外排并降低了水稻砷积累^[50-51]。目前,蜈蚣草中是否存在HAC1砷酸还原酶尚不清楚。由于植物ACR2在砷还原中的作用和功能存在疑问,且最新证据都表明HAC1在植物砷还原和砷代谢中发挥了至关重要的作用,这为研究蜈蚣草砷酸还原酶提出了新的思考。

4 砷的外排

在酿酒酵母中,As(III)逆转运蛋白ACR3能利用质子泵提供驱动力将酵母细胞中的As(III)外排至胞外,是酵母细胞实现砷解毒最重要的途径之一^[52]。与酿酒酵母类似,植物中也存在砷的外排现象。当As(V)被植物的根系吸收后,一部分砷会被植物还原成As(III)并以As(III)的形式重新外排到外界环境中^[53]。植物根系As(III)的外排在一定程度上降低了植物对砷的吸收,可能是砷解毒的方式之一。目前,植物根部As(III)的外排在很多植物中都被证实,这些植物在较低浓度、较短时间As(V)处理时就表现出显著的As(III)外排^[53-54]。与普通植物根部较强的As(III)外排不同,在蜈蚣草中,低砷处理时根部As(III)外排较弱,这在一定程度上解释了蜈蚣草对砷高效的吸收^[42]。此外,蜈蚣草在高砷处理时也会表现出较强的As(III)外排,推测可能与高砷胁迫下的砷解毒有关^[55]。

5 羽叶中砷的液泡区隔化

蜈蚣草将大量砷富集在地上部羽叶中,通过EDXA(Energy Dispersive X-ray Analyses)技术和XAS(X-ray Absorption Spectroscopy)原位观测砷的亚细胞分布,发现砷可能主要储存在液泡中^[36,38];而通过细胞组分和液泡分离分析,也进一步证实被蜈蚣草吸收的砷主要储存在羽液泡中,推测砷在羽叶中的液泡区隔化是蜈蚣草砷超富集的关键^[56-57]。

前文提到,ACR3在酵母中可将细胞中的As(III)外排至外界环境中,这对微生物砷解毒至关重要^[52,58]。相对于微生物,关于植物ACR3亚砷酸逆转运蛋白的功能研究十分匮乏,这主要是因为植物进化的过程中,ACR3在显花植物(被子植物)中丢失,仅在苔藓、蕨类等植物中存在^[59]。2010年,蜈蚣草中ACR3基因PvACR3被克隆得到,该基因沉默会导致蜈蚣草配子体对As(III)敏感^[59]。通过纯化质膜以及液泡膜并进行蛋白免疫印迹分析发现,PvACR3蛋白

与液泡膜共提取,推测 PvACR3 定位在蜈蚣草细胞液泡膜上,暗示 PvACR3 将 As(Ⅲ)泵到液泡中进行区隔化并实现蜈蚣草对砷的解毒和积累^[59]。蜈蚣草另一个 ACR3 基因 *PvACR3;1* 与 *PvACR3* 同时被发现,但该基因在当时并未被克隆得到,因此功能未知^[59]。Chen 等^[60]将 *PvACR3;1* 导入拟南芥中,发现 PvACR3;1 在拟南芥中定位于液泡膜上。因此 *PvACR3;1* 也有可能介导蜈蚣草中 As(Ⅲ)的液泡区隔化。

6 砷的木质部转运

从根部向地上部高效的砷转运是蜈蚣草区别于非砷超富集植物的最主要特征之一。在非砷超富集植物中,砷多滞留在根部而不能有效地转运至地上部,其砷的转运系数一般小于 1,而蜈蚣草的高效砷转运可使地上部的砷含量远高于根部,也远高于土壤中的砷浓度。前文提到,蜈蚣草根中砷很少与植物络合素形成复合物,大部分砷以自由态形式存在,As(Ⅲ)外排较弱,这些都是根部 As(Ⅲ)被高效转运至地上部的重要原因^[42]。

此前,研究人员对砷转运的分子机制并不清楚。近年来,随着对蜈蚣草 ACR3 的进一步研究,发现蜈蚣草中的 ACR3 基因有可能参与了蜈蚣草根向木质部中的高效装载和转运^[61-62]。Indriolo 等^[59]在报道蜈蚣草 ACR3 时指出,PvACR3 定位在蜈蚣草细胞液泡膜上,是介导砷在羽叶中液泡区隔化的关键转运蛋白。但 Indriolo 等^[59]同时也指出,在 As(V)处理条件下生长的蜈蚣草孢子体根部 *PvACR3* 转录水平的表达量是羽叶中表达量的 15 倍。如果 *PvACR3* 定位于液泡膜上,且在孢子体根部大量表达,可能会导致大量的砷被滞留在根部液泡中,从而不能实现砷从根部向地上部分的高效转移。这与蜈蚣草高效的砷转移效率以及羽叶中砷浓度较高、根部砷浓度较低的生物学特性是相悖的。此外,Indriolo 等在讨论中也指出,ACR3 除了介导 As(Ⅲ)向液泡中的运输之外,也可能介导根部 As(Ⅲ)向木质部的装载和运输^[59]。由此,PvACR3 定位于蜈蚣草液泡膜上并介导砷在羽叶中的区隔化的结论可能并不准确或并不全面。

Chen 等^[61]将 *PvACR3* 导入模式植物拟南芥中进行表达,发现表达 *PvACR3* 能显著提高拟南芥对砷的抗性,促进拟南芥根系及地上部分在砷胁迫条件下的生长。PvACR3-GFP 融合蛋白的荧光定位表明,PvACR3 定位于细胞的质膜上。同时研究还发现表达 PvACR3 能显著增加 As(V)胁迫条件下植物根部向

外界培养基中 As(Ⅲ)的外排,从而降低植物根部的砷含量;与此同时,在 As(Ⅲ)和 As(V)处理条件下,转基因拟南芥的砷转运系数均显著高于野生型,部分处理条件下地上部的砷含量甚至显著高于野生型对照,暗示 PvACR3 可能介导转基因拟南芥中 As(Ⅲ)向地上部的转运^[61]。Wang 等^[62]也发现,PvACR3 在拟南芥中定位于细胞质膜上,其异源表达能显著增加拟南芥对砷的抗性,但并未增加拟南芥根部 As(Ⅲ)的外排。此外,异源表达 PvACR3 极显著促进了拟南芥对砷的转运,导致拟南芥地上部的砷含量显著升高,在 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(Ⅲ)或 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As(V)条件下处理 2 d,拟南芥地上部砷较野生型对照分别增加 25~34 倍和 29~37 倍^[62]。这些结果均表明,PvACR3 介导了植物 As(Ⅲ)的转运,暗示其在蜈蚣草 As(Ⅲ)的木质部装载和转运过程中也发挥了关键作用^[61-62]。

7 展望

蜈蚣草是一种生长缓慢的多年生蕨类植物,基因组较大且遗传背景不清楚,缺少有效的转基因手段或基因敲除手段直接研究相关基因在蜈蚣草中的功能和作用机制。尽管 Indriolo 等^[59]利用基因枪转化法获得转基因的蜈蚣草配子体,但是仅在蜈蚣草中实现了基因的瞬时表达。此外,Muthukumar 等^[63]以孢子为转化受体,通过农杆菌介导的转化方法获得了稳定遗传的转化植株,但目前缺少实际转化成功案例的支持,而且蜈蚣草存在明显的世代交替,生活周期漫长,在实际研究中转化并获得稳定遗传的转基因蜈蚣草目前在操作上仍不可行。这些限制因素导致在蜈蚣草基因挖掘和分子机制方面的研究进展仍较为缓慢,明显落后于模式植物拟南芥和水稻中砷代谢的相关研究。

展望未来蜈蚣草的分子机制研究,可从以下几个方面开展工作:(1)利用高通量测序(包括基因组测序、转录组测序等)获取关于蜈蚣草更多的基因组、转录组等遗传信息,为研究蜈蚣草砷代谢的分子机制提供重要基础;(2)蜈蚣草高效吸收 As(V)的关键是磷酸盐转运蛋白 Pht,Pht 是一个庞大的基因家族,在植物中数量较多,因此需要挖掘更多的 Pht 并开展比较研究;(3)模式植物拟南芥和水稻中 HAC 砷酸还原酶的发现,为研究蜈蚣草砷代谢中极为重要的砷还原过程及其分子机制提供了重要参考;(4)蜈蚣草 ACR3 基因在蜈蚣草砷转运、解毒和富集中发挥着关键作用,其在蜈蚣草中的功能仍有待进一步研究。

蜈蚣草是为数不多的、成功应用于农田及耕地砷污染的超富集植物。田间试验表明,在砷浓度为60~70 mg·kg⁻¹的污染土壤中,通过合理施肥,在种植蜈蚣草7个月后,土壤中砷含量可下降5.0 mg·kg⁻¹,土壤修复效率可达7.8%^[64]。2014年,中科院地理资源所在湖南石门县白云乡启动“南方土壤重金属污染风险区划与修复技术研发示范”,经过2年修复,土壤砷含量降低了13.6%,为我国砷污染地区提供了重要的修复工程示范^[65]。蜈蚣草具有很高的应用价值,也具有很高的科研价值,深入挖掘其砷代谢关键基因,探究蜈蚣草砷富集的分子机制,可为科学高效地利用蜈蚣草开展植物修复提供理论支撑,为培育砷污染修复工程植物提供重要的基因资源。

参考文献:

- [1] Kaur S, Kamli M R, Ali A. Role of arsenic and its resistance in nature [J]. *Canadian Journal of microbiology*, 2011, 57(10): 769–774.
- [2] Meharg A A, Hartley-Whitaker J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species[J]. *New Phytologist*, 2002, 154(1): 29–43.
- [3] Hoffmann H, Schenk M K. Arsenite toxicity and uptake rate of rice (*Oryza sativa* L.) in vivo[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(10): 2398–2404.
- [4] Zhu Y G, Williams P N, Meharg A A. Exposure to inorganic arsenic from rice: A global health issue? [J]. *Environmental Pollution*, 2008, 154(2): 169–171.
- [5] Zhao F J, McGrath S P, Meharg A A. Arsenic as a food chain contaminant: Mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61:535–559.
- [6] Kramer U. Phytoremediation: Novel approaches to cleaning up polluted soils[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(2): 133–141.
- [7] Ma L Q, Komar K M, Tu C, et al. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic[J]. *Nature*, 2001, 409(6820): 579.
- [8] 陈同斌, 韦朝阳, 黄泽春, 等. 砷超富集植物蜈蚣草及其对砷的富集特征[J]. 科学通报, 2002, 47(3): 207–210.
CHEN Tong-bin, WEI Chao-yang, HUANG Ze-chun, et al. Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* and its characteristics in arsenic accumulation[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(3): 207–210.
- [9] 陈同斌, 张斌才, 黄泽春, 等. 超富集植物蜈蚣草在中国的地理分布及其生境特征[J]. 地理研究, 2005, 24(6): 825–833.
CHEN Tong-bin, ZHANG Bin-cai, HUANG Ze-chun, et al. Geographical distribution and characteristics of habitat of As-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. in China[J]. *Geographical Research*, 2005, 24(6): 825–833.
- [10] 廖晓勇, 陈同斌, 阎秀兰, 等. 提高植物修复效率的技术途径与强化措施[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 881–893.
LIAO Xiao-yong, CHEN Tong-bin, YAN Xiu-lan, et al. Enhancement of heavy metal removal in phytoremediation of soils contaminated with heavy metals[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(6): 881–893.
- [11] Lessl J T, Luo J, Ma L Q. *Pteris vittata* continuously removed arsenic from non-labile fraction in three contaminated-soils during 3.5-year of phytoextraction[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 279(4): 485–492.
- [12] Meharg A A, Naylor J, Macnair M R. Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1994, 23: 234–238.
- [13] Wu Z, Ren H, McGrath S P, et al. Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 498–508.
- [14] Shin H, Shin H S, Dewbre G R, et al. Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39(4): 629–642.
- [15] Wang P T, Zhang W W, Mao C Z, et al. The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(21): 6051–6059.
- [16] Cao Y, Sun D, Ai H, et al. Knocking out OsPT4 gene decreases arsenate uptake by rice plants and inorganic arsenic accumulation in rice grains[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(21): 12131–12138.
- [17] Meharg A A, Macnair M R. An altered phosphate uptake system in arsenate tolerant *Holcus lanatus* L.[J]. *New Phytologist*, 1990, 116(1): 29–35.
- [18] Elias M, Wellner A, Goldin-Azulay K, et al. The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments[J]. *Nature*, 2012, 491(7422):134–137.
- [19] Wang J R, Zhao F J, Meharg A A, et al. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1552–1561.
- [20] Lessl J T, Ma L Q. Sparingly-soluble phosphate rock induced significant plant growth and arsenic uptake by *Pteris vittata* from three contaminated soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(10):5311–5318.
- [21] DiTusa S F, Fontenot E B, Wallace R W, et al. A member of the Phosphate transporter 1 (Pht1) family from the arsenic-hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is a high-affinity arsenate transporter[J]. *New Phytologist*, 2016, 209(2):762–772.
- [22] Cao Y, Sun D, Chen J X, et al. Phosphate transporter PvPht1; 2 enhances phosphorus accumulation and plant growth without impacting arsenic uptake in plants[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(7):3975–3981.
- [23] Wang X, Ma L Q, Rathinasabapathi B, et al. Mechanisms of efficient arsenite uptake by arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(22):9719–9725.
- [24] Moreno-Jimenez E, Esteban E, Penalosa J M. The fate of arsenic in soil-plant systems[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 215:1–37.
- [25] Han Y H, Fu J W, Xiang P, et al. Arsenic and phosphate rock impacted the abundance and diversity of bacterial arsenic oxidase and reductase genes in rhizosphere of As-hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 321:146–153.

- [26] Ali W, Isayenkov S V, Zhao F J, et al. Arsenite transport in plants[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2009, 66(14):2329–2339.
- [27] Bienert G P, Thorsen M, Schussler M D, et al. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of $\text{As}(\text{OH})_3$ and $\text{Sb}(\text{OH})_3$ across membranes[J]. *BMC Biology*, 2008, 6:26.
- [28] Isayenkov S-V, Maathuis F J. The *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporin AtNIP7;1 is a pathway for arsenite uptake[J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(11):1625–1628.
- [29] Ma J F, Yamaji N, Mitani N, et al. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(29):9931–9935.
- [30] Kamiya T, Tanaka M, Mitani N, et al. NIP1;1, an aquaporin homolog, determines the arsenite sensitivity of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(4):2114–2120.
- [31] Mosa K A, Kumar K, Chhikara S, et al. Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants[J]. *Transgenic Research*, 2012, 21(6):1265–1277.
- [32] He Z Y, Yan H L, Chen Y S, et al. Anaquaporin PvTIP4;1 from *Pteris vittata* may mediate arsenite uptake[J]. *New Phytologist*, 2016, 209(2):746–761.
- [33] Zhao F J, Ma J F, Meharg A A, et al. Arsenic uptake and metabolism in plants[J]. *New Phytologist*, 2009, 181(4):777–794.
- [34] Pal R, Rai J P. Phytochelatin: Peptides involved in heavy metal detoxification[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(3): 945–963.
- [35] Zhao F J, Wang J R, Barker J H A, et al. The role of phytochelatin in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *New Phytologist*, 2003, 159(2):403–410.
- [36] Lombi E, Zhao F J, Fuhrmann M, et al. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *New Phytologist*, 2002, 156(2): 195–203.
- [37] Zhang W H, Cai Y, Tu C, et al. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 300(1/2/3): 167–177.
- [38] Pickering I J, Gumaelius L, Harris H H, et al. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(16): 5010–5014.
- [39] Duan G L, Zhu Y G, Tong Y P, et al. Characterization of arsenate reductase in the extract of roots and fronds of Chinese brake fern, an arsenic hyperaccumulator[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(1): 461–469.
- [40] Bondada B R, Tu S, Ma L Q. Absorption of foliar-applied arsenic by the arsenic hyperaccumulating fern (*Pteris vittata* L.)[J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 332(1):61–70.
- [41] Tu S, Ma L Q, MacDonald G E, et al. Effects of arsenic species and phosphorus on arsenic absorption, arsenate reduction and thiol formation in excised parts of *Pteris vittata* L.[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2004, 51(2): 121–131.
- [42] Su Y, McGrath S, Zhu Y, et al. Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *New Phytologist*, 2008, 180(2): 434–441.
- [43] Mukhopadhyay R, Rosen B P. *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 168(1):127–136.
- [44] Dhankher O P, Rosen B P, McKinney E C, et al. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (ACR2) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(14):5413–5418.
- [45] Duan G L, Zhou Y, Tong Y P, et al. A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase[J]. *New Phytologist*, 2007, 174(2): 311–321.
- [46] Ellis D R, Gumaelius L, Indriolo E, et al. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1544–1554.
- [47] Liu W, Schat H, Blik M, et al. Knocking out ACR2 does not affect arsenic redox status in *Arabidopsis thaliana*: Implications for arsenic detoxification and accumulation in plants[J]. *PLoS One*, 2002, 7(8):e42408.
- [48] Chao D Y, Chen Y, Chen J, et al. Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants[J]. *PLoS Biology*, 2014, 12(12):e1002009.
- [49] Sánchez-Bermejo E, Castrillo G, del Llano B, et al. Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5:4617.
- [50] Shi S, Wang T, Chen Z, et al. OsHAC1;1 and OsHAC1;2 function as arsenate reductases and regulate arsenic accumulation[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(3):1708–1719.
- [51] Xu J M, Shi S L, Wang L, et al. OsHAC4 is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice[J]. *New Phytologist*, 2017, 215(3):1090–1101.
- [52] Ghosh M, Shen J, Rosen B P. Pathways of $\text{As}(\text{III})$ detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(9):5001–5006.
- [53] Xu X Y, McGrath S P, Zhao F J. Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots[J]. *New Phytologist*, 2007, 176(3): 590–599.
- [54] Ali W, Isner J C, Isayenkov S V, et al. Heterologous expression of the yeast arsenite efflux system ACR3 improves *Arabidopsis thaliana* tolerance to arsenic stress[J]. *New Phytologist*, 2012, 194(3): 716–723.
- [55] Chen Y, Fu J W, Han Y H, et al. High As exposure induced substantial arsenite efflux in As-hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 2189–2194.
- [56] 陈同斌, 阎秀兰, 廖晓勇, 等. 蜈蚣草中砷的亚细胞分布与区隔化作用[J]. 科学通报, 2005, 50(24): 2739–2744.
- CHEN Tong-bin, YAN Xiu-lan, LIAO Xiao-yong, et al. Subcellular distribution and compartmentation of arsenic in *Pteris vittata*[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(24): 2739–2744.
- [57] Yang X X, Chen H, Dai X J, et al. Evidence of vacuolar compartmentalization of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata*[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54(22): 4229–4233.
- [58] Rosen B P. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(3): 689–693.
- [59] Indriolo E, Na G, Ellis D, et al. A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris*

- vittata* is missing in flowering plants[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(6): 2045–2057.
- [60] Chen Y, Hua C Y, Jia M R, et al. Heterologous expression of *Pteris vittata* arsenite antiporter PvACR3;1 reduces arsenic accumulation in plant shoots[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(18): 10387–10395.
- [61] Chen Y S, Xu W Z, Shen H L, et al. Engineering arsenic tolerance and hyperaccumulation in plants for phytoremediation by a PvACR3 transgenic approach[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(16): 9355–9362.
- [62] Wang C, Na G, Bermejo E S, et al. Dissecting the components controlling root-to-shoot arsenic translocation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*, 2018, 217(1): 206–218.
- [63] Muthukumar B, Joyce B L, Elless M P, et al. Stable transformation of ferns using spores as targets: *Pteris vittata* and *Ceratopteris thalictroides*[J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 648–658.
- [64] 廖晓勇, 陈同斌, 谢华, 等. 磷肥对砷污染土壤的植物修复效率的影响: 田间实例研究[J]. *环境科学学报*, 2004, 24(3): 455–462.
- LIAO Xiao-yong, CHEN Tong-bin, XIE Hua, et al. Effect of application of P fertilizer on efficiency of As removal from As contaminated soil using phytoremediation: Field study[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, 24(3): 455–462.
- [65] 陈同斌, 杨 军, 雷 梅, 等. 湖南石门砷污染农田土壤修复工程[J]. *世界环境*, 2016, 4: 57–58.
- CHEN Tong-bin, YANG Jun, LEI Mei, et al. Arsenic-contaminated farmland soil remediation project in Shimen, Hunan[J]. *World Environment*, 2016, 4: 57–58.