

黄新元, 赵方杰. 植物分子遗传学在挖掘作物重金属积累相关基因中的作用[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(7): 1396–1401.

HUANG Xin-yuan, ZHAO Fang-jie. Application of plant molecular genetics in identification of genes related to heavy metals accumulation in crops[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(7): 1396–1401.

植物分子遗传学在挖掘作物重金属积累相关基因中的作用

黄新元, 赵方杰

(南京农业大学资源与环境科学学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要:随着我国农田土壤重金属污染问题日益严重, 导致农产品重金属超标时常发生。如何阻控重金属在作物可食部位的积累, 保证农产品安全和重金属中、低污染农田的安全利用, 已成为我国农业生产急需解决的问题。培育重金属低积累作物品种, 实现作物可食部位重金属含量达标, 是解决重金属中低污染农田安全利用的经济而有效的手段之一。培育作物重金属低积累品种需要克隆控制重金属积累的相关基因, 并阐明其分子遗传机理。以 *OsNRAMP5*、*OsHMA3* 和 *CAL1* 三个控制水稻镉吸收、转运和分配的基因为实例, 介绍植物分子遗传学在挖掘作物重金属积累相关基因中的作用, 包括基于正向遗传学和反向遗传学的方法, 克隆控制镉在作物中积累的基因, 并阐述这些功能基因控制重金属积累的分子遗传机理, 同时展望这些基因在培育重金属低积累品种中的应用前景。

关键词: 分子遗传学; 重金属; 镉; 水稻

中图分类号: S511 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2018)07-1396-06 **doi:** 10.11654/jaes.2018-0323

Application of plant molecular genetics in identification of genes related to heavy metals accumulation in crops

HUANG Xin-yuan, ZHAO Fang-jie

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: With increasing contamination of heavy metals in paddy soils in China, exceedance of the national safe standard in food crops is widespread in some areas, especially Southern China. Minimizing the transfer of heavy metals from soil to eatable parts of food crops and thus ensure the safety of agricultural products is a top priority of agricultural production in China. Molecular breeding of crop varieties that accumulate less heavy metals in eatable parts to meet the national safe standard is one of effective and low-cost strategies that product safe product in contaminated soils. The breeding of crop varieties that accumulate less heavy metals in eatable parts is based on the identification and characterization of genes that involved the uptake, transport and allocation of heavy metals in crops. In this review, we take *OsNRAMP5*, *OsHMA3* and *CAL1* as examples, to describe the application of plant molecular genetics including the forward and reverse genetics in identification genes which are responsible for the accumulation of cadmium (Cd) in rice. The molecular mechanism of these genes underlying the Cd accumulation in rice and the potential application of these genes in molecular breeding of rice varieties with low Cd accumulation in grains are also discussed.

Keywords: molecular genetics; heavy metals; cadmium; rice

收稿日期: 2018-03-11 录用日期: 2018-04-24

作者简介: 黄新元(1981—), 男, 广西武宣人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物重金属和矿质营养元素积累的分子遗传机理研究。E-mail: xinyuan.huang@njau.edu.cn

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201403015); 南京农业大学基本科研业务费专项(KYZ201714); 国家自然科学基金项目(31772382)

Project supported: The Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201403015); The Fundamental Research Funds for the Central Universities (KYZ201714); The National Natural Science Foundation of China (31772382)

随着我国工业化、城市化的快速发展,土壤重金属污染问题日益突出。2014年原环保部和原国土资源部发布了全国土壤污染状况调查报告,报告指出我国耕地土壤点位污染物含量超标率达19.4%,其中重金属镉和类金属砷的超标率分别为7%和2.7%,污染程度以中、低污染为主^[1]。由于农田重金属污染造成的农产品重金属超标时常发生,其中以我国南方稻米重金属含量超标尤为严重^[2]。根据Du等^[3]和Zhu等^[4]的调查显示,我国湖南益阳地区和长株潭地区分别有60%和76%的稻米镉含量超过我国食品卫生标准中稻米镉限量值($0.2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),其中样品最高含量甚至超过限量值的24倍。湖南和广东地区受采矿影响的稻田稻米砷含量超标率也达到50%^[5]。由于土壤重金属的污染造成农产品重金属含量升高,已经导致了我国居民镉的摄入量逐年增加。我国国家卫生和计划生育委员会对我国居民人均每天镉的摄入量进行了长达25年的调查,结果显示我国居民人均每天镉的摄入量已从1990年的 $13.8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ 上升到了2015年的 $30.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$,25年间升高了122%,达到了世界卫生组织和世界粮农组织规定的日均镉允许摄入量的61%^[6]。对居民膳食来源分析表明,稻米是我国居民膳食中镉的主要来源,占人均每天镉摄入量的55%,其中在南方人群中则占到了65%^[6]。因此,由于农田重金属污染造成的农产品重金属超标已对我国居民身体健康构成了威胁,成为限制我国农产品质量和农业生产可持续发展的一个重要因素。

为保障农产品产地可持续利用及农产品质量安全,2016年国务院发布了《土壤污染防治行动计划》,提出了到2020年和2030年,受污染耕地安全利用率分别达到90%左右和95%以上的指标。然而,由于我国农田重金属污染范围较广、形态类型复杂,污染耕地的治理将是一个长期的过程。同时为了保持粮食总产量和保住18亿亩(1.2 亿 hm^2)耕地的底线,我国很多重金属中、低度污染农田仍继续从事高强度的农业生产,导致类似“镉大米”等农产品重金属超标事件频繁发生。因此,在这种国情下,研发阻控作物重金属积累的策略,保证农产品的质量和安全,保证农产品的安全利用,已成为我国目前农业生产的当务之急。

对于重金属中、低程度污染的农田,降低农产品重金属污染最有效并可以持久的策略是通过遗传改良和基因工程方法培育重金属低积累的作物品种,阻控重金属向可食部位的转运。而这一策略的实现需要建立在植物分子遗传学的方法上克隆与重金属吸

收、转运和积累等相关的功能基因,并且在系统、深入了解作物重金属积累的分子遗传调控机理的基础上。本文将在介绍常用基因定位克隆方法的基础上,以目前已经克隆的控制水稻吸收、转运和积累镉的相关基因为例,介绍如何通过分子遗传学的方法克隆这些基因,并对这些基因控制重金属积累的分子遗传机理进行阐述,同时展望这些基因在培育重金属低积累品种中的应用前景。

1 定位克隆控制重金属积累相关基因的常用方法

常用的定位和克隆控制作物重金属积累相关基因的方法主要有同源克隆和QTL(数量性状位点)定位方法。其中QTL定位包括连锁分析法和关联分析法等。

1.1 同源克隆

同源克隆的方法主要基于模式物种中已知具有控制重金属吸收、转运等功能的基因,根据这些基因的序列信息在作物中寻找与该基因序列保守的同源基因或者基因家族。然后将这些基因在作物中进行过量表达,或者通过RNA干涉(RNAi)、CRISPR/Cas9基因编辑等技术将这些基因的表达量降低或将基因进行敲除,考察转基因植株是否出现重金属吸收、转运和积累等表型的变化,从而明确这些同源基因是否具有控制作物重金属吸收、转运和积累的功能。同源克隆的方法主要用于早期没有基因组信息的农作物,利用细菌、酵母等低等生物以及拟南芥等模式植物中已经发现的控制重金属吸收和转运的相关基因,在水稻、小麦和玉米等基因组中寻找相关基因的同源基因。同源克隆的方法是从“基因”到“表型”,因此是一种反向遗传学的方法。随着作物基因组信息逐步完善,基因组上许多基因的功能都被注释。根据基因注释的功能,结合基因的表达模式,如在根内皮层或者节的维管束细胞特异表达等信息,挑选与重金属积累相关的转运蛋白进行过量表达或者基因敲除等,研究它们是否出现重金属积累相关表型,是目前通过反向遗传学克隆重金属积累相关基因的常用手段。

1.2 QTL定位与基因克隆

作物重金属含量是呈现连续变异的性状,因此属于数量性状。与其他农艺数量性状一样,作物重金属含量大都由多个数量性状基因位点(QTL)所控制。QTL定位的基本原理是通过建立适当的分离群体,发展分布较均匀的、覆盖全基因组的、具有多态性的分

子标记,构建密度较高的分子标记连锁图谱。然后利用分子标记对分离群体中的每个单株进行基因型鉴定,同时测定各单株的重金属含量等表型,随后对单株的标记基因型和性状的表型值进行统计分析,从而确定控制重金属含量相关QTL位点在分子标记连锁图中的位置。通过QTL定位分析,可以获得控制重金属含量的基因位于基因组上的初步位置,进一步通过精细定位和转基因互补实验,最终克隆到相应的基因。QTL定位主要涉及到定位群体的构建、分子标记的研发、遗传图谱的构建和进行连锁分析或者关联分析。

用于定位控制重金属积累相关QTL的定位群体主要有F2群体、重组自交系群体(RIL群体)、导入系群体(IL群体)、双单倍体群体(DH群体)和自然品系群体。F2群体是由两个亲本杂交后获得F1,将F1自交后所构建的群体。由于F2群体的下一代还会继续分离,因此是一种临时性群体,主要应用于突变体和重金属极端积累品种的初步定位。RIL群体是在F2群体的基础上,对下一代的每个株系随机选择一粒种子自交,连续进行多代自交获得的高世代单株,一般要自交到6代以上,其大部分基因组序列已经纯合,各染色体融合了双亲的片段。与RIL群体不同,IL群体在通过双亲杂交之后与其中一个亲本(受体亲本)进行多代回交,同时每一代都对各单株进行基因型鉴定,挑选染色体特定片段为其中一个亲本(供体亲本),而基因组其他位置为受体亲本,最终获得的IL群体覆盖了供体亲本的全基因组,群体中每个株系带有供体亲本基因组的染色体片段,而背景与轮回亲本相同。与RIL群体相比,IL群体由于具有一致的遗传背景,因此具有可以检测QTL间的上位效应、QTL定位灵敏度更高等优点。RIL群体和IL群体都需要经过多代的自交或者杂交,因此构建通常耗时很长。DH群体是由两个亲本杂交获得F1后,将F1通过花药组培将单倍体花粉经过人工加倍形成二倍体成苗,从而将F1杂合基因组固定为纯合,大幅缩短了群体构建的时间。与F2群体的后代还需继续分离不同,RIL群体、IL群体和DH群体的单株基因组基本纯合,下一代基因型基本不再分离,因此是永久性定位群体。自然群体则由不同的品种构成,这些品种从种质资源中根据品种间亲缘关系进行选择,一般用于全基因组关联分析。

构建好定位群体后,在测定各株系重金属含量进行表型鉴定的同时,需要利用分子标记对群体中的各株系进行基因型分析。早期常用的分子标记主要有

限制性片段长度多态性标记(RFLP)、随机扩增多态性DNA标记(RAPD)、简单重复序列标记(SSR)、扩增片段长度多态性标记(AFLP)和酶切扩增多态性序列标记(CAPS)等。随着高通量测序技术的迅速发展,目前常用的是单核苷酸多态性标记(SNP)。与上述标记相比,SNP标记在基因组上存在的数量更为丰富。在对群体各株系进行基因型鉴定之后,根据各分子标记之间的交换频率,确定它们在染色体上的位置,即构建分子遗传图谱。基于分子遗传图谱,将各株系的表型与基因型进行统计分析,即QTL定位分析。QTL分析主要分为连锁分析和关联分析,前者可以分为单标记分析法、区间作图法和复合区间作图法等,而后者则基于连锁不平衡,将全基因组的SNP标记与表型进行关联分析。全基因组关联分析(GWAS)是最近十几年来兴起的QTL定位分析方法,主要利用到具有遗传多样性较高的自然群体。与基于双亲的连锁分析不同,GWAS利用的是数百个品种构成的自然群体,遗传多样性更加丰富。同时由于GWAS采用的是覆盖全基因组的高密度SNP标记,QTL定位的精度通常要比连锁分析高很多。目前,通过GWAS对重金属含量进行QTL定位已经有不少报道^[7-9]。

2 定位克隆控制重金属积累相关基因的实例

目前在水稻等农作物中已经克隆出了多个控制重金属积累的相关基因。本研究以重金属镉为例,介绍如何通过分子遗传学的方法定位和克隆控制水稻镉吸收、转运和分配的三个基因:*OsNRAMP5*、*OsHMA3*和*CAL1*。

2.1 定位克隆控制水稻根部镉吸收的*OsNRAMP5*基因

水稻主要是通过根系从土壤中吸收镉,大气沉降的镉通过叶片吸收占籽粒镉的积累贡献非常小。因此,通过控制水稻根系镉的吸收可以有效减少镉在籽粒的积累。在水稻中,镉主要是通过锰和镉的转运蛋白*OsNRAMP5*进行吸收,由两个日本研究所团队采用完全不同的方法独立发现^[10-11]。Sasaki等^[10]采用的是反向遗传的方法,并对*OsNRAMP5*的作用机制进行了深入的研究;而Ishikawa等^[11]则通过正向遗传学的方法克隆到了*OsNRAMP5*基因,该研究通过辐射诱变获得的*osnramp5*突变体可以应用于低镉水稻育种。*NRAMP*基因编码的是天然免疫力相关巨噬细胞蛋白,最先是在哺乳动物中被克隆^[12]。随后研究表明NRAMP蛋白家族具有转运锰、镉、铁、铜和锌等二价

阳离子的活性。模式植物拟南芥和水稻中分别有6个和7个*NRAMP*基因,其中拟南芥的*AtNRAMP1*、*AtNRAMP2*和*AtNRAMP4*均具有转运锰、镉、铁的活性,而*AtNRAMP6*只特异转运镉^[12-17]。在水稻中,*OsNRAMP1*具有转运铁和镉的活性而不具有锰的转运活性^[16,18],*OsNRAMP6*则具有转运三价铝离子的活性。为了研究水稻其他*OsNRAMP*基因的功能,Sasaki等^[10]通过反向遗传学的方法,获得了*OsNRAMP5*基因T-DNA插入突变体,发现突变体根部锰、镉的吸收大幅度降低,其茎叶和籽粒锰、镉含量也显著降低。进一步研究发现*OsNRAMP5*蛋白定位在根部的外皮层和内皮层细胞外侧的细胞膜,负责将锰、镉离子转运到根细胞中。由于*OsNRAMP5*在锰吸收上起重要作用,在水培条件下*osnramp5*突变体比野生型对缺锰更为敏感^[10,19]。Ishikawa等^[11]则采用正向遗传学的方法克隆*OsNRAMP5*基因,他们将水稻粳稻品种越光进行离子束辐射诱变构建突变体库,通过对2592个突变单株进行筛选,获得了3株籽粒镉含量降低的突变体。通过将突变体与籼稻品种Kasalath杂交构建F2群体,利用图位克隆的方法,发现突变体中*OsNRAMP5*基因发生突变而丧失了功能,从而引起根部镉的吸收减少,籽粒镉的含量降低。在不同的大田种植条件下,野生型籽粒镉的含量为0.6~1.8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,而*osnramp5*突变体籽粒镉的含量最高仅为0.03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[11],显示了通过破坏*OsNRAMP5*基因的功能可以很好地控制镉在籽粒中的积累。因此,通过正向遗传学和反向遗传学的方法,均克隆到了控制根部镉吸收的关键基因*OsNRAMP5*。

2.2 定位克隆控制镉在水稻根部液泡区隔化的*OsHMA3*基因

镉离子通过植物根部吸收进入植物体内后通常被区隔化到液泡中。在水稻中这一过程由P-1B型重金属ATP酶*OsHMA3*负责^[20]。*OsHMA3*基因是通过QTL定位克隆到的。Ueno等^[21]测定了146份水稻品种地上部镉含量,筛选到多份地上部镉含量极端高的品种。随后选取高镉品种Anjana Dhan和低镉品种日本晴构建F2定位群体,将控制高镉基因定位在水稻7号染色体上1.9 Mb的范围内^[22]。为了进一步缩小定位,他们构建了包含965个单株的F2群体,并在定位区间内发展了新的分子标记。利用这些分子标记在F2群体中筛选重组交换个体,通过对交换个体的基因型和表型进行分析,最终将高镉基因定位在159 kb的范围内。通过对QTL定位区间内的候选基

因进行序列测定、在酵母检测镉的转运活性和转基因互补实验等,最终将高镉基因确定为*OsHMA3*基因。*OsHMA3*基因在根部各层细胞均表达,其编码的蛋白定位在液泡膜上,负责将镉转运到液泡中储存。在高镉品种中,由于*OsHMA3*基因发生突变造成功能丧失,不能将镉转运到液泡中而被转运到地上部和籽粒中,从而出现地上部和籽粒镉含量升高的表型^[20]。利用相同的QTL定位方法,Miyadate等^[23]也在高镉品种Cho-Ko-Koku中克隆到了*OsHMA3*基因,而且*OsHMA3*基因在Cho-Ko-Koku和在Anjana Dhan两个品种中具有相同的突变位点。事实上,*OsHMA3*基因在水稻品种中存在多种功能丧失型的突变形式,都造成了地上部和籽粒镉含量的升高^[24]。由于*OsHMA3*可以将镉转运到液泡中,而水稻根系中*OsHMA3*基因表达量较低,通过强启动子驱动其过量表达,可以将镉截留在根部液泡中,从而减少镉向地上部的运输和在籽粒的积累。将过量表达*OsHMA3*的转基因植株和非转基因对照植株种植于含有1.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 镉的污染土壤中,对照植株籽粒镉含量达到5.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右,而转基因植株则只有0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右^[20]。因此,过量表达*OsHMA3*与破坏*OsNRAMP5*基因的功能一样,都具有很好的控制镉在籽粒积累的效果。

2.3 定位克隆控制镉在水稻分配的*CAL1*基因

虽然通过破坏*OsNRAMP5*的功能和过量表达*OsHMA3*可以有效降低籽粒镉的积累,但是污染农田中的镉仍然滞留于农田土壤中。如果能将镉定向地分配到水稻地上部秸秆等非可食部分,而不向籽粒中积累,既可以保证水稻安全生产,同时又将通过秸秆将镉进行移除修复,这种“修复型”的水稻品种有望可以实现重金属中、低度污染农田的“边生产边修复”。

最近,Luo等^[25]在“修复型”水稻的遗传基础解析方面取得了重大进展,克隆到了一个特异调控镉在水稻叶片中积累的主效QTL基因*CAL1*。他们对212份能较好代表中国水稻遗传多样性的核心种质资源和一些代表水稻品种进行筛选,鉴定出了镉高积累的水稻品种台南1号(TN1)。利用TN1和春江06(CJ06)构建的双单倍体群体对叶片镉含量进行QTL定位分析,定位到3个分别位于水稻2、4、11号染色体的QTL位点。随后他们对定位在2号染色体上贡献率为12%的QTL位点进行了精细定位。通过将TN1与CJ06进行连续多代回交,获得了QTL定位区间携带有来源于TN1的基因组片段,而基因组其他片段均来源于CJ06的染色体单片段置换系。与TN1一样,染色体单片段

置换系的叶片镉含量也是高的。通过染色体单片段置换系与CJ06回交获得的包含3651单株的回交F3代,将控制叶片镉含量的基因定位在56 kb的基因组范围内,该区域内仅含有4个候选基因。通过转基因将这4个候选基因分别转到低镉品种CJ06中,发现仅其中一个候选基因*CAL1*可以提高CJ06叶片镉的含量,从而证明了*CAL1*是控制叶片镉含量的基因。*CAL1*基因编码一个植物防御素类似蛋白,该蛋白定位在细胞壁上。*CAL1*基因主要在根的外皮层和中柱木质部薄壁细胞以及剑叶的叶鞘木质部薄壁细胞中表达。*CAL1*蛋白可以通过其蛋白上的巯基与镉进行螯合,镉与*CAL1*结合之后可以从木质部薄壁细胞的细胞质中分泌出来,进入木质部中参与向地上部的长距离转运,从而促进镉在叶片的积累。由于镉与*CAL1*的紧密结合,可能影响了螯合态的镉再次跨细胞膜进入韧皮部向水稻籽粒的再分配过程,从而定向调控镉在叶片等营养器官的积累而不影响籽粒中镉的积累^[25]。因此*CAL1*基因可以应用于培育秸秆镉高积累而籽粒镉含量达标的“修复型”水稻品种,有望实现重金属中、低度污染农田的“边生产边修复”。

3 展望

随着分子遗传学、基因组学等学科的迅速发展,越来越多与重金属积累相关基因被发现。同时,随着包括基因编辑技术等技术的兴起,这些基因将有望应用于培育作物重金属低积累品种,实现对重金属中、低污染农田的安全利用。例如最近通过CRISPR/Cas9基因编辑技术将两系杂交稻的两个亲本华占和隆科638S中的*OsNRAMP5*基因同时进行敲除,以这两个亲本组配的杂交稻其籽粒镉含量比双亲降低了95%以上^[26]。在土壤镉含量为1.69~2.37 mg·kg⁻¹的污染大田条件下,两亲本籽粒镉含量超标10倍左右,杂交稻的籽粒镉含量仍然低于国家标准0.2 μg·g⁻¹,表现出很好地控制镉在籽粒中积累的效果^[26]。虽然通过辐射诱变或者基因编辑的方法都可以破坏*OsNRAMP5*基因的功能从而降低镉的吸收,但是*OsNRAMP5*同时也负责吸收必需矿质营养元素锰^[10,27],并参与体内锰从根部向地上部的转运以及再分配^[19]。因此在水培条件*osnramp5*突变体对缺锰更为敏感^[10,19],这可能限制了其在低锰农田中的应用。下一步通过结构生物学的方法,解析或者预测*OsNRAMP5*蛋白的三维结构,利用单碱基基因编辑技术改变蛋白的关键氨基酸位点,从而改变*OsNRAMP5*蛋白对金

属离子的选择性,使其只转运锰而不转运镉,这将极大地提高*OsNRAMP5*基因的应用价值。

另外,过量表达*OsHMA3*同样可以明显地降低籽粒镉的积累^[20]。最近克隆的特异定向调控镉在叶片等营养器官积累的*CAL1*基因,有望通过原位过量表达等手段,提高镉在水稻秸秆中富集的同时保证籽粒镉含量不超标,实现对镉中、低污染农田安全利用的同时对镉进行移除修复。上述两个基因都需要通过转基因的方法才能发挥阻控镉在籽粒中积累的作用,但目前我们国家尚未允许种植转基因水稻,这将极大地限制这些基因的应用。然而,包括*OsHMA3*和*CAL1*在内的基因都是水稻基因组中原本就存在的基因,并非外源基因,这些基因在控制镉积累的机制也十分清楚,通过转基因技术获得的低镉稻米,其食品安全性将会显著提升。因此,我们不应盲目地排除转基因技术在培育重金属低积累品种中的应用。通过CRISPR/Cas9基因编辑技术对基因进行敲除,可以在后代中分离得到不含转基因成分而目标基因被改造的植株,这应该更容易被大众所接受。

通过在水稻种质资源中挖掘重金属低积累优异等位基因,利用分子标记辅助选择育种的方法培育重金属低积累品种,是目前阻控重金属积累的一个很好的策略。随着高通量测序的成本越来越低,越来越多的水稻品种基因组被重测序,基因型的鉴定比以往更为简单和准确。同时伴随着离子组学、表型组学等学科的兴起,可以对多种元素进行高通量的测定,使表型的鉴定更为迅速和精确。因此,在种质资源中挖掘与重金属积累相关的自然变异优异等位基因将更为便捷,有望进一步通过全基因组选择等先进的育种手段,培育重金属低积累水稻新品种,实现重金属中、低污染农田的安全利用。

参考文献:

- [1] 环境保护部,国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[R]. http://www.mep.gov.cn/gkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.htm Ministry of Environmental Protection, Ministry of Land and Resources. Report on the national soil contamination survey[R]. http://www.mep.gov.cn/gkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.htm
- [2] Zhao F J, Ma Y, Zhu Y G, et al. Soil contamination in China: Current status and mitigation strategies[J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(2): 750-759.
- [3] Du Y, Hu X H, Wu X H, et al. Affects of mining activities on Cd pollution to the paddy soils and rice grain in Hunan Province, Central South China[J]. *Environ Monit Assess*, 2013, 185(12): 9843-9856.
- [4] Zhu H H, Chen C, Xu C, et al. Effects of soil acidification and liming on the phytoavailability of cadmium in paddy soils of central subtropi-

- cal China[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 219:99–106.
- [5] Williams P N, Lei M, Sun G, et al. Occurrence and partitioning of cadmium, arsenic and lead in mine impacted paddy rice: Hunan, China[J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(3):637–642.
- [6] Song Y, Wang Y, Mao W F, et al. Dietary cadmium exposure assessment among the Chinese population[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177978.
- [7] Norton G J, Douglas A, Lahner B, et al. Genome wide association mapping of grain arsenic, copper, molybdenum and zinc in rice (*Oryza sativa* L.) grown at four international field sites[J]. *PLoS One*, 2014, 9: e89685.
- [8] Shakoor N, Ziegler G, Dilkes B P, et al. Integration of experiments across diverse environments identifies the genetic determinants of variation in sorghum bicolor seed element composition[J]. *Plant Physiol*, 2016, 170(4):1989–1998.
- [9] 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 Biol*, 2014, 12(12): e1002009.
- [10] Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, et al. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(5):2155–2167.
- [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 U S A*, 2012, 109(47): 19166–19171.
- [12] Vidal S M, Malo D, Vogan K, et al. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg[J]. *Cell*, 1993, 73(3):469–485.
- [13] Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, et al. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency[J]. *Plant J*, 2003, 34(5):685–695.
- [14] Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron[J]. *EMBO J*, 2005, 24(23):4041–4051.
- [15] 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.
- [16] Curie C, Alonso J M, Le Jean M, et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport[J]. *Biochem J*, 2000, 347 Pt 3: 749–755.
- [17] Thomine S, Wang R, Ward J, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(9):4991–4996.
- [18] Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, et al. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice[J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(14):4843–4850.
- [19] Yang M, Zhang Y Y, Zhang L J, et al. OsNRAMP5 contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots[J]. *J Exp Bot*, 2014, 65(17):4849–4861.
- [20] Ueno D, Yamaji N, Kono I, et al. Gene limiting cadmium accumulation in rice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(38):16500–16505.
- [21] Ueno D, Kono I, Yokosho K, et al. A major quantitative trait locus controlling cadmium translocation in rice (*Oryza sativa*) [J]. *New Phytol*, 2009, 182(3):644–653.
- [22] Ueno D, Koyama E, Kono I, et al. Identification of a novel major quantitative trait locus controlling distribution of Cd between roots and shoots in rice[J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(12):2223–2233.
- [23] 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 Phytol*, 2011, 189(1):190–199.
- [24] Yan J, Wang P, Wang P, et al. A loss-of-function allele of OsHMA3 associated with high cadmium accumulation in shoots and grain of Japonica rice cultivars[J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(9):1941–1954.
- [25] Luo J S, Huang J, Zeng D L, et al. A defensin-like protein drives cadmium efflux and allocation in rice[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):645–654.
- [26] 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, 7:14438–14450.
- [27] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, et al. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport[J]. *Sci Rep*, 2012, 2:286–294.