

木薯 *MePCS1* 基因的克隆、表达分析及功能验证

梁宝娟^{1,2,3}, 葛玉建^{1,2,3}, 侯静怡^{1,2}, 张慧敏^{1,2,3}, 任治欣^{1,2,3}, 耿梦婷¹, 王亚杰^{2,3},
郭建春^{2,3*}, 姚 远^{2,3*}

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/海南热带农业资源研究院/海南省热带农业生物资源保护与利用重点实验室, 海南海口 571101; 3. 中国热带农业科学院三亚研究院/热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572000

摘 要: 植物络合素合酶 (PCS) 是催化植物络合素 (PC) 合成的关键酶, PC 可通过络合作用减轻重金属对植物的毒害。土壤重金属污染增加木薯食用安全风险, 对木薯络合素合酶基因 *MePCS1* 进行功能分析, 对木薯重金属减控研究具有重要意义。本研究通过 PCR 技术克隆了 SC8 木薯品种的 *MePCS1* 基因的编码区, 全长为 1512 bp, 共编码 503 个氨基酸。蛋白序列分析表明: *MePCS1* 蛋白为亲水性蛋白, 含有 41 个磷酸化位点和 2 个糖基化位点, 不含有信号肽。构建系统进化树发现, 木薯 *MePCS1* 蛋白与橡胶树的 PCS 蛋白亲缘关系最近。利用 qPCR 技术分析表明, *MePCS1* 基因在茎中表达量最高; 在木薯块根发育过程中, *MePCS1* 基因在块根膨大期的表达量最高; 铅 (Pb) 胁迫诱导 *MePCS1* 基因表达。*MePCS1* 基因能提高 BY4741 酵母对 Pb 的耐受能力。本研究结果为进一步解析 *MePCS1* 基因功能特性及其对木薯的 Pb 减控机制提供新的信息。

关键词: 植物络合素合酶; 重金属 Pb 胁迫; 酵母表达

中图分类号: S533

文献标志码: A

Cloning, Expression Analysis, and Functional Verification of the *MePCS1* Gene in Cassava

LIANG Baojuan^{1,2,3}, GE Yujian^{1,2,3}, HOU Jingyi^{1,2}, ZHANG Huimin^{1,2,3}, REN Zhixin^{1,2,3}, GENG Mengting¹,
WANG Yajie^{2,3}, GUO Jianchun^{2,3*}, YAO Yuan^{2,3*}

1. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources / Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya, Hainan 572000, China

Abstract: Phytochelatin synthase (PCS) is a key enzyme that catalyzes the synthesis of phytochelatin (PC). PC can reduce the toxicity of heavy metals to plants through complexation. Heavy metal pollution in soil increases the risk of cassava food safety. It is of great significance to study the reduction and control of heavy metals in cassava by analyzing the function of *MePCS1* gene. In this study, the coding region of *MePCS1* gene in cassava variety SC8 was cloned by PCR. The full length was 1512 bp, encoding 503 amino acids. Protein sequence analysis showed that *MePCS1* protein was a hydrophilic protein, containing 41 phosphorylation sites and 2 glycosylation sites, without signal peptide. The phylogenetic tree showed that the cassava *MePCS1* protein had the closest relationship with the PCS protein of the rubber tree. The qPCR analysis showed that the *MePCS1* gene had the highest expression level in the stem. During the development of cassava roots, the expression level of *MePCS1* gene was the highest in the root enlargement period. Lead

收稿日期 2024-04-24; 修回日期 2024-05-09

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC709, No. 324QN318); 国家自然科学基金项目 (No. 32301740)。

作者简介 梁宝娟 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 作物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 郭建春 (GUO Jianchun), E-mail: jianchunguo@163.com; 姚 远 (YAO Yuan), E-mail: yaoyuan@itbb.org.cn。

(Pb) stress induced *MePCS1* gene expression. *MePCS1* gene can improve the tolerance of BY4741 yeast to Pb. The results of this study provide new information for further analysis of the functional characteristics of the *MePCS1* gene and its mechanism for reducing Pb in cassava tuber roots.

Keywords: phytochelatin synthases; heavy metal Pb stress; yeast expression

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.11.001

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz), 又称树薯、南洋薯、木番薯, 为大戟科多年生作物, 是世界上 10 亿人口的主要食物^[1]。随着人类工业化进程的发展, 土壤重金属污染已经成为全球的重大问题, 危害着人类的身体健康和作物的粮食安全。木薯作为热带地区重要的经济作物与粮食作物, 具有淀粉含量高、耐贫瘠等特点。块根为木薯淀粉的主要贮藏器官, 木薯受到重金属污染后, 金属离子容易在木薯块根中积累, 导致木薯生长受限, 产量降低。因此解析木薯响应重金属关键的基因, 减少重金属在木薯块根的积累, 对创制木薯新种质、提高木薯食用的安全性具有十分重要的意义。

植物受到金属胁迫后, 植物络合素 (phytochelatin, PC) 可与金属结合形成较稳定的复合物, 减轻金属的毒害。植物络合素的结构一般为 (γ -Glu-Cys) $_n$ -X ($n=2\sim 11$, X 为 Gly、Clu、Cln、Ser 和 β -Ala 的形式存在), 以 (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly 的结构较为常见, 其中半胱氨酸 Cys 中 (-SH) 巯基可以与重金属结合具有解毒功能。植物络合素合酶 (phytochelatin synthases, PCS) 可催化 GSH 合成 PC。目前对拟南芥^[2]、豆类^[3]、烟草^[4]、水稻^[5]的 PCS 研究较为深入, 过表达 PCS 基因可增强植物对重金属的耐受性。通过分析不同物种中 PCS 基因的启动子, 发现其含有多个顺式作用的元件, 说明 PCS 基因的表达受多种因素调控^[6]。如转录因子 MYB40 可以诱导 *AtPCS1* 的表达, 在 As^{2+} 胁迫条件下拟南芥中 *AtMYB40* 被诱导表达, *AtMYB40* 正调控 *AtPCS1* 表达^[7]; 水稻中 Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 金属离子可以诱导 *OsPCS7* 表达, Cd^{2+} 与 Zn^{2+} 金属离子可以诱导 *OsPCS9* 表达^[8]; 番茄叶片在 Pb 胁迫下, *SlPCS1* 基因表现出较高的表达水平^[9]。

为了研究木薯 *MePCS1* 基因在金属胁迫下的功能, 本研究克隆了木薯 *MePCS1* 基因, 并对其进行生物信息学分析、基因表达的组织特异性分析、不同发育时期的块根表达模式分析、重金属 Pb 胁迫条件下的表达分析以及在酵母中的功能

验证分析。为进一步研究 *MePCS1* 基因参与金属 Pb 胁迫的耐受性, 减少重金属胁迫对木薯的危害提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料华南 8 号木薯 (SC8) 由中国热带农业科学院提供; 酵母感受态 BY4741、大肠杆菌感受态 DH5 α 均购自上海唯地生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒购自成都福际生物技术有限公司; MonScript™ RTIII Super Mix with dsDNase (Two-Step) 反转录试剂盒购自莫纳生物科技有限公司; PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 *MePCS1* 基因的克隆 提取 SC8 木薯总 RNA, 利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。根据木薯 *MePCS1* 基因 CDS 区设计特异性引物 (表 1), 以 SC8 木薯 cDNA 为模板, 利用 PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 高保真酶扩增 *MePCS1* 基因。反应体系为: PrimeSTAR HS (Premix) DNA Polymerase 25 μ L, *MePCS1*-F/R 引物 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH $_2$ O 补充至总体积为 50 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 40 s, 35 个循环。PCR 产物于 4 $^{\circ}$ C 下保存。

1.2.2 木薯 *MePCS1* 蛋白理化性质分析 对 *MePCS1* 的蛋白序列进行生物信息学分析, 所用软件见表 2。

1.2.3 *MePCS1* 基因的表达模式分析 以田间种植 6 个月的 SC8 木薯块根、须根、茎、叶柄、成熟叶、嫩叶、顶芽、腋芽等 8 个组织部位为材料, 提取其总 RNA, 反转录成 cDNA, 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *MePCS1* 基因的表达模式。基于本实验室前期的 SC8 木薯块根形成期 (种植后的 80 d)、块根膨大期 (种植后的 130、180 d)、块根成熟期 (种植后的 230、280 d) 的转录组数据, 对 *MePCS1* 基因在块根不同发育时期的表达

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
MePCS1-F/R	F: ATGGCAATGGCTGGATTGTACC R: AAGTCCTAGGCGAGAGGTGCAC	<i>MePCS1</i> 基因克隆
PYES2-检测-F/R	F: AATATACCTCTATACTTTAACGTC	检测通用引物
PYES2- Detection -F/R	R: GCGTGAATGTAAGCGTGAC	
PYES2-MePCS1-F/R	F: TTGGTACCGAGCTCGGATCCATGGCAATGGCTGGATTGTA R: GATGGATATCTGCAGAATTCGGCGAGAGGTGCACCAAGAT	酵母载体构建
MePCS1-qPCR-F/R	F: GGGCAGCACAGAGGGTTTAT R: GAGAAAGGAAGGCTGGCTGT	<i>MePCS1</i> 定量
Tubulin-F/R	F: ATGCGGTTCTTGATGTTGTTC R: TCGGTGAAGGAATACAGAGA	

表 2 木薯 *MePCS1* 蛋白理化性质分析软件
Tab. 2 Software of physical and chemical properties analysis of *MePCS1* protein

软件名称 Software name	网址 Website	功能 Function
ExPASy	https://web.expasy.org/protaram/	基本理化性质分析
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	信号肽预测分析
NetPhos	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1	磷酸化位点分析
NetNGlyc	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	糖基化位点分析
Protscale	https://web.expasy.org/protscale/	亲疏水性预测分析

模式进行分析。

利用 1.2 mmol/L Pb(NO₃)₂ 处理种植 60 d 的 SC8 木薯组培苗移栽幼苗，分别胁迫处理 0、3、6、12、24、48 h。提取处理后材料的总 RNA 反转录成 cDNA，荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 *MePCS1* 基因的表达模式，反应体系和程序参照 LU 等^[10]的方法。使用 SPSS 26 软件进行邓肯单因素多样本差异显著性方差分析。

1.2.4 *MePCS1* 基因功能验证 (1) *MePCS1* 基因酵母表达载体构建。以扩增出 *MePCS1* 基因 PCR 产物为模板，根据 pYES2 载体多克隆位点与 *MePCS1* 基因 CDS 序列设计含有同源重组接头引物 PYES2-MePCS1-F/R (表 1)，通过 PCR 将重组接头引入该基因 CDS 区的两端，纯化回收目的片段。利用同源重组方法将纯化 *MePCS1* 目的片段与线性化的酵母表达载体 pYES2 进行重组，利用 pYES2 载体检测引物 PYES2-检测-F/R 进行菌液 PCR 鉴定，选取阳性的大肠菌液进行测序。将测序比对正确的阳性克隆菌液进行扩大培养提取重组质粒，新质粒命名 pYES2-MePCS1。将重组质

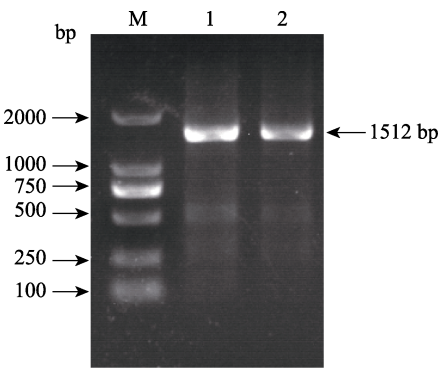
粒转化到酵母感受态 BY4741 中，PCR 鉴定选出阳性菌斑，用于后续实验。

1.2.5 *MePCS1* 基因在酵母中的功能验证 将含有 pYES2-MePCS1 酵母菌液与空载 pYES2 酵母菌液分别在 SD-Ura 液体培养基中扩大培养后，将初始 OD₆₀₀ 调至 0.4，并逐级稀释 5 个浓度梯度 (10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵)；各取 4 μL 在含有 50 mmol/L Pb²⁺ 的 SD-Ura (含有 2%葡萄糖) 固体培养基上进行点板，30 ℃倒置培养 3 d，观察含 pYES2-MePCS1 与空载 pYES2 酵母菌的生长情况。

2 结果与分析

2.1 木薯 *MePCS1* 基因的克隆

通过 Blast 搜索木薯基因组数据库，获得木薯 *MePCS1* 基因序列，设计特异性引物克隆该基因的编码区 (CDS)。以 SC8 木薯组培苗的 cDNA 为模板，PCR 扩增获得预期大小目的条带 (图 1)。将目的条带进行 Sanger 测序，发现 *MePCS1* 基因的 CDS 序列全长为 1512 bp，共编码 503 个氨基酸。



M: DL2000 DNA marker.

图 1 *MePCS1* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *MePCS1* gene

2.2 MePCS1 蛋白的理化性质分析

对木薯 MePCS1 蛋白的基本理化性质分析发现, 其原子组成为 $C_{2456}H_{3890}N_{670}O_{730}S_{33}$, 理论等电点为 6.04, 分子质量为 (Mw) 55.54 kDa。该蛋白含有 20 种氨基酸残基, Leu (L) 的含量最高 (58 个), 占 11.5%; Trp (W) 的含量最低 (8 个), 占 1.6%。在氨基酸正/负总残基中, 带负电荷残基 (Asp+Glu) 总数为 61 个, 带正电荷残基 (Arg+Lys) 总数为 53 个。

MePCS1 蛋白的总亲疏水性平均值为 0.136, 推测该蛋白为亲水性蛋白。磷酸化位点预测分析结果发现, 该蛋白含有 41 个磷酸化位点, 其中 Ser 位点含量较高, 为 27 个。糖基化位点预测发现, MePCS1 蛋白可能含有 2 个糖基化位点。信号肽分析发现, MePCS1 含有信号肽的可能性为 0.0021, 因此推测该蛋白不含有信号肽。

2.3 系统进化树分析

为了分析 MePCS1 蛋白与不同物种的 PCS 蛋白的亲缘关系, 使用 DNAMAN 软件分析 MePCS1

与橡胶树 (*Hevea brasiliensis*, XP_021678313.2)、麻疯树 (*Jatropha curcas*, XP_012085275.1)、蓖麻 (*Ricinus communis*, XP_015581239.2)、乌桕 (*Triadica sebifera*, ARV78463.1)、南欧大戟 (*Euphorbia peplus*, WCJ38289.1)、杨柳 (*Salix brachista*, kAB5527907.1)、毛杨果 (*Populus trichocarpak*, AI5566116.1)、毛白杨 (*Populus tomentosa*, kAG6750280.1)、大枣 (*Ziziphus jujuba*, XP_015891301.1)、苦楝 (*Melia azedarach*, kAJ4726927.1)、柑橘 (*Citrus sinensis*, DO60421.1)、芒果 (*Mangifera indica*, XP_044491381.1)、长叶黄麻 (*Corchorus olitorius*, OMP11136.1)、伞花草 (*Herrania umbratica*, XP_021281249.1)、木槿 (*Hibiscus syriacus*, XP_039005780.1)、棉花 (*Gossypium barbadense*, kAB2057009.1) 等其他 16 个物种的 PCS 蛋白序列进行比对, 其氨基酸序列一致性为 90.1%~78.9%, 其中 N 端区域高度保守 (图 2)。MePCS1 蛋白与橡胶树 PCS 蛋白的同源性最高, 达到



图 2 木薯 MePCS1 与其他物种的 PCS 氨基酸序列对比

Fig. 2 Amino acid sequence comparison of cassava MePCS1 with PCS proteins of other species

90.1%。使用 MEGA 软件进行 1000 次的统计检验，构建系统进化树。结果表明，木薯 *MePCS1* 蛋白与橡胶树的 PCS 蛋白亲缘关系较近，其次为麻疯树、蓖麻、乌桕等植物，同棉花、木槿等植物的 PCS 蛋白亲缘关系较远（图 3）。

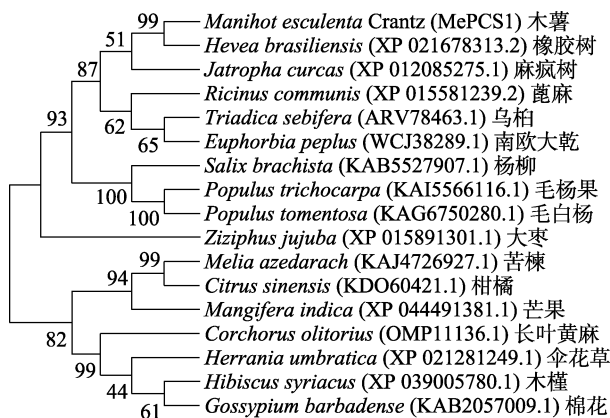
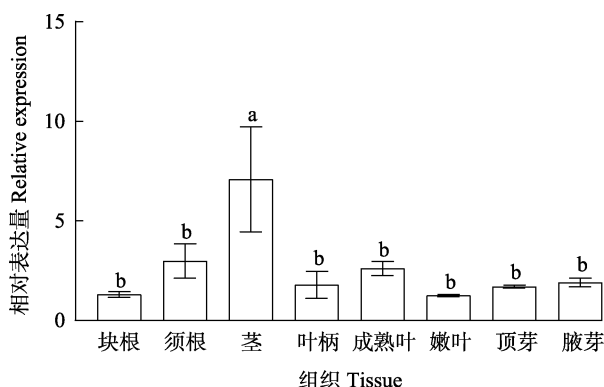


图 3 木薯 *MePCS1* 与其他物种 PCS 蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of cassava *MePCS1* protein and PCS proteins of other species

2.4 *MePCS1* 基因在 SC8 木薯中的表达模式分析

2.4.1 *MePCS1* 基因在不同组织器官的表达模式分析 采用荧光定量 PCR 技术分析 *MePCS1* 基因在木薯不同组织中的表达情况。结果表明，木薯 *MePCS1* 基因在茎中的表达量最高，在块根、须根、叶柄、成熟叶、嫩叶、顶芽、腋芽中的表达量无显著差异（图 4）。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

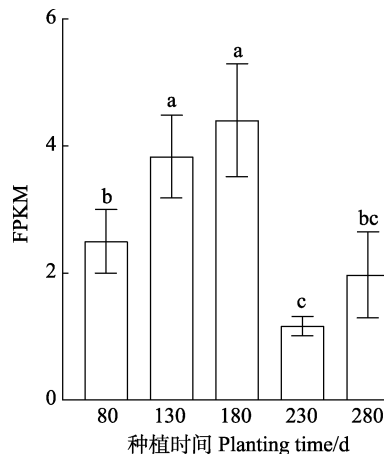
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 4 *MePCS1* 基因表达的组织特异性分析

Fig. 4 Tissue-specific analysis of *MePCS1* gene expression

2.4.2 *MePCS1* 基因块根发育不同时期的表达模式分析 基于实验室前期的块根发育不同时期转

录组数据，分析 *MePCS1* 基因在块根中的表达模式。结果表明，*MePCS1* 基因主要在块根膨大期（种植后的 130、180 d）的表达量最高，在成熟块根期（种植后的 230、280 d）的表达量最低（图 5）。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

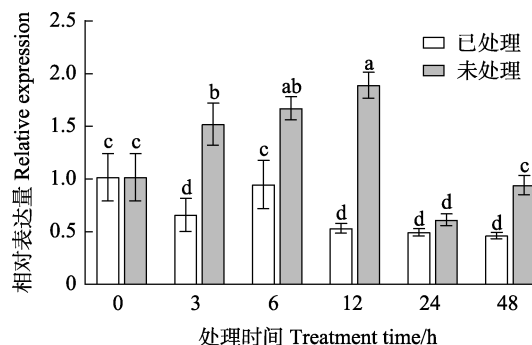
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 5 *MePCS1* 基因在木薯块根发育中的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *MePCS1* gene in cassava tuber root development

2.5 *MePCS1* 基因在 Pb 胁迫条件下表达水平分析

为了探究 *MePCS1* 基因表达对 Pb 胁迫的响应，本研究采用 1.2 mmol/L $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫处理木薯 SC8 幼苗，并通过荧光定量 PCR 分析根系中 *MePCS1* 基因在处理 0、3、6、12、24、48 h 时的表达变化。结果发现，*MePCS1* 基因快速响应在 Pb^{2+} 胁迫，3 h 的表达量显著高于对照组，且在 6 和 12 h 的表达量逐步提高，然后 24 h 和 48 h 的表达量显著降低（图 6）。此结果表明 *MePCS1* 基因参与木薯对 Pb^{2+} 胁迫的响应。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

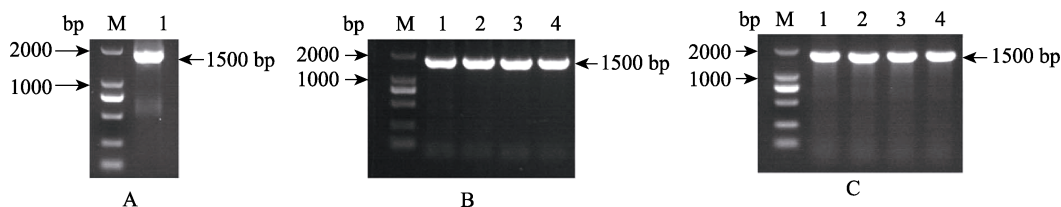
图 6 *MePCS1* 基因在 Pb^{2+} 胁迫条件下表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *MePCS1* gene under Pb^{2+} stress conditions

2.6 *MePCS1* 基因功能验证

2.6.1 *MePCS1* 基因的酵母表达载体构建 为了验证 *MePCS1* 基因的功能,本研究通过 PCR 将重组接头引入该基因编码区的两端(图 7A),并通过同源重组将 *MePCS1* 与线性化的酵母表达载体 pYES2 连接。连接产物转化大肠,菌液 PCR 筛选

阳性克隆,获得正确的 pYES2-*MePCS1* 质粒(图 7B)。将 pYES2-*MePCS1* 质粒转化 BY4741 酵母,在 SD-Ura 固体培养基中培养获得单菌落后进行酵母菌斑 PCR 鉴定。结果发现 PCR 扩增获得与预期片段大小相同的条带(约 1500 bp),表明 pYES2-*MePCS1* 质粒成功转化到 BY4741 酵母中(图 7C)。



A: 接头 *MePCS1* 基因的 PCR 扩增; B: pYES2-*MePCS1* 大肠重组质粒的转化; C: pYES2-*MePCS1* 酵母重组质粒转化; M: DL2000 DNA marker。

A: PCR amplification of splice *MePCS1* gene; B: Transformation of pYES2-*MePCS1* recombinant plasmid into *Escherichia coli*; C: Transformation of pYES2-*MePCS1* recombinant plasmid into yeast; M: DL2000 DNA marker.

图 7 *MePCS1* 基因酵母表达载体的构建

Fig. 7 Construction of yeast expression vector of *MePCS1* gene

2.6.2 *MePCS1* 基因在酵母中的功能验证 将含有 pYES2-*MePCS1*、pYES2 质粒的酵母菌液,梯度稀释后点在含有 Pb^{2+} 的 SD-Ura (含有 2% 半乳糖) 固体培养基上,分析酵母的生长情况。结果发现,在不含有 Pb^{2+} 的培养基上,2 种酵母菌的长势一致,而在含有 50 mmol/L Pb^{2+} 的培养基上,含有 pYES2-*MePCS1* 的酵母菌株长势优于空载 pYES2 酵母菌株(图 8)。结果表明 *MePCS1* 基因可提高酵母对 Pb^{2+} 的抗性。

生理功能紊乱^[11]。此外, Pb 还可以通过干扰矿物质营养吸收,影响植物的营养平衡^[12]。对人体而言, Pb 主要通过食物链累积,长期摄入会对中枢神经系统产生毒性,特别是对儿童可能导致学习障碍和身心活动受限等问题^[13]。 Pb 还可以损害肾脏功能,增加心血管疾病风险^[14]。 *PCS1* 基因是植物体内合成植物螯合素的关键酶,在减轻 Pb 的毒性效应方面具有重要作用^[15]。本研究克隆了木薯 *MePCS1* 基因,基因编码区为 1512 bp,共编码 503 个氨基酸。生物信息学分析表明, *MePCS1* 蛋白为亲水性蛋白,无跨膜结构且不含有信号肽。木薯 *MePCS1* 蛋白与橡胶树、麻风树 *PCS* 蛋白的亲缘关系较近,以上 3 个物种均为大戟科植物。 *MePCS1* 基因主要在木薯茎中表达,以及在块根形成期和块根膨大期表达。植物受到 Pb 、 Cd 等重金属胁迫时, *PCS1* 基因的表达通常会上调,以增强植物对重金属的耐受性。 Cd 胁迫可诱导雀稗 *PvPCS1* 和 *PvPCS2*^[16]、大麻 *BnPCS1* 基因表达上升^[17]。蓝藻 *CaPCS* 基因被 AS 胁迫诱导^[18];马铃薯 *StPCS* 受重金属 Pb 、 Cd 、 Cu 、 Zn 诱导表达^[19]; Pb 胁迫木薯幼苗发现,胁迫 6、12 h 后 *MePCS1* 基因的表达量显著上升,24 h 后表达量降低,表明该基因的表达受 Pb 胁迫的诱导,参与木薯对 Pb 胁迫的响应。

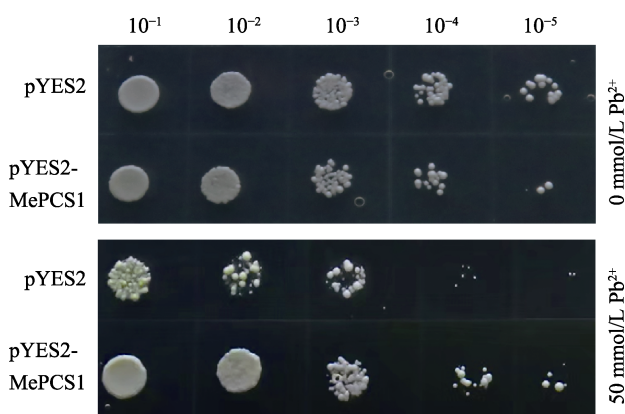


图 8 *MePCS1* 基因在酵母中的功能验证

Fig. 8 Functional validation of *MePCS1* gene in yeast

3 讨论

Pb 是一种重金属污染物,对植物和人体均有严重危害。在植物体内, Pb 可以抑制多种酶的活性,干扰光合作用和水分吸收,导致生长受阻和

在酵母细胞中进行异源表达是验证植物重金属胁迫响应相关基因功能的有效手段。水稻金属伴侣 *OsHIPP17*、*OsHIPP19* 可增强酵母对 Cd 的

耐受性^[20]；苦荞麦 *FtPCS*、*FtMTPC2*、*FtPCSL*、*FtVCE1a*、*FtNramp3* 可增强酵母对 Pb 的耐受性^[21]。本研究将 *MePCS1* 基因克隆到 pYES2 酵母表达载体，并转化到酵母菌株 BY4741，分析转基因酵母对 Pb 胁迫（50 mmol/L）的耐受性。结果发现 *MePCS1* 基因可提高酵母对金属 Pb 的耐受能力，因此推测 *MePCS1* 基因可提高木薯对 Pb 胁迫的抗性。在未来的研究工作中，将利用过量表达和基因编辑技术，进一步鉴定 *MePCS1* 基因功能特性，并筛选低 Pb 积累的木薯新种质，以提高木薯食用的安全性。

参考文献

- [1] AMELWORK A B, BAIRU M W. Advances in genetic analysis and breeding of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): a review[J]. Plants, 2022, 11(12): 1617.
- [2] VATAMANIUK O K, MARI S, LU Y P, REA P A. *AtPCS1*, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(12): 7110-7115.
- [3] OVEN M, PAGE J E, ZENK M H, KUTCHAN T M. Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(7): 4747-4754.
- [4] LEE B D, HWANG S. Tobacco phytochelatin synthase (NtPCS1) plays important roles in cadmium and arsenic tolerance and in early plant development in tobacco[J]. Plant Biotechnology Reports, 2015, 9: 107-114.
- [5] POSTRIGAN B N, KNYAZEVA A V, KULUEV B R, CHEMERIS A V. Effect of cadmium on promoter activity of rice phytochelatin synthase gene in transgenic tobacco plants[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2013, 60: 701-705.
- [6] FILIZ E, SARACOGU I A, OZYIGIT I I, YALCIN B. Comparative analyses of phytochelatin synthase (PCS) genes in higher plants[J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2019, 33(1): 178-194.
- [7] CHEN Y, WANG H Y, CHEN Y F. The transcription factor MYB40 is a central regulator in arsenic resistance in *Arabidopsis*[J]. Plant Communications, 2021, 2(6): 100234.
- [8] SHEN G M, ZHU C, DU Q Z. Genome-wide identification of phytochelatin and phytochelatin-synth domain-containing phytochelatin family from rice[J]. Electronic Journal of Biology, 2010, 6(3): 73-79.
- [9] KISA D. Responses of phytochelatin and proline-related genes expression associated with heavy metal stress in *Solanum lycopersicum*[J]. Acta Botanica Croatica, 2019, 78(1): 9-16.
- [10] LU X H, WANG Y J, ZHEN X H, YU H, PAN M, FU D Q, LI R M, LIU J, LUO H Y, HU X W. Functional characterization of the *MeSSIII-1* Gene and its promoter from cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(9): 4711.
- [11] KUMAR A, PRASAD M N V. Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 166: 401-418.
- [12] ZULFIQAR U, FAROOQ M, HUSSAIN S, MAQSOOD M, HUSSAIN M, ISHFAQ M, ANJUM M Z. Lead toxicity in plants: impacts and remediation[J]. Journal of Environmental Management, 2019, 250: 109557.
- [13] KUMAR A, KUMAR A, MMS C P, CHATURVEDI A K, SHABNAM A A, SUBRAHMANYAM G, MONDAL R, GUPTA D K, MALYAN S K, KUMAR S S, KHAN S A, YADAV K K. Lead toxicity: health hazards, influence on food chain, and sustainable remediation approaches[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2020, 17(7): 2179.
- [14] CHEN Z, HUO X, CHEN G, LUO X, XU X. Lead (Pb) exposure and heart failure risk[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28: 28833-28847.
- [15] SEREGIN I V, KOZHEVNIKOVA A D. Phytochelatin: sulfur-containing metal (loid)-chelating ligands in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2430.
- [16] CHEN Y, CHEN C, TAN Z, LIU J, ZHUANG L, YANG Z, HUANG B. Functional identification and characterization of genes cloned from halophyte seashore paspalum conferring salinity and cadmium tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 9(7): 102.
- [17] VATAMANIUK O K, MARI S, LANG A, CHALASANI S, DEMKIV L O, REA P A. Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis: stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(21): 22449-22460.
- [18] DIAZ S, AGUILERA Á, FIGUERAS C G, FRANCISCO P, OLSSON S, PUENTE S F, GONZALEZ P J E. Heterologous expression of the phytochelatin synthase *CaPCS2* from *Chlamydomonas acidophila* and its effect on different stress factors in *Escherichia coli*[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(13): 7692.
- [19] 杨巾. 马铃薯 *StPCS* 基因的克隆分析及不同重金属对其表

- 达的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2019.
- YANG J. Cloning and analysis *StPCS* gene of potato (*Solanum tuberosum* L) and effects of different heavy metals on its expression[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2019.
- [20] SHI Y, JIANG W, LI M, JIANG N, HUANG Y, WANG M, DU Z, CHEN J, LI J, WU L, ZHONG M, YANG J, HUANG J. Metallochaperone protein OsHIPP17 regulates the absorption and translocation of cadmium in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 245: 125607.
- [21] WANG L, ZHENG B, YUAN Y, XU Q, CHEN P. Transcriptome profiling of *Fagopyrum tataricum* leaves in response to lead stress[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20: 1-14.