

李娟, 田保华, 刘旦梅, 等. 硫化氢调节谷子幼苗 P-ATPase 响应镉胁迫[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(1):52–57.

LI Juan, TIAN Bao-hua, LIU Dan-mei, et al. Hydrogen sulfide regulates cadmium stress resistance through P-ATPases in foxtail millet seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(1): 52–57.

硫化氢调节谷子幼苗 P-ATPase 响应镉胁迫

李娟¹, 田保华², 刘旦梅¹, 裴雁曦^{1*}

(1.山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2.太原理工大学, 太原 030024)

摘要:为了研究 H₂S 对谷子幼苗中 ATPases 活性的影响及其与金属转运蛋白 *HMA*s 基因表达调控的关系,以及 H₂S 对谷子幼苗细胞内 Cd 离子的解毒作用。在 Cd 胁迫条件下,对可溶性糖和可溶性蛋白以及 ATPase 活性进行测定,对谷子 *HMA* 家族转运蛋白进行系统进化分析并对 H₂S 对转运蛋白 *HMA*s 转录水平的影响进行分析。结果表明,在 Cd 胁迫条件下,谷子幼苗的可溶性糖和可溶性蛋白含量降低,ATPase 活性被抑制,同时 *HMA* 家族基因表达量升高;H₂S 处理可使可溶性糖含量提高的同时增强 ATPase 的活性,此外 *HMA* 的基因表达量也有相应变化。研究表明,硫化氢可以调节谷子幼苗 P-ATPase 的表达和活性,进而缓解 Cd 胁迫对谷子幼苗的毒害作用。

关键词:谷子幼苗;硫化氢;镉胁迫;三磷酸腺苷酶

中图分类号:X171.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2018)08-0052-06 **doi:**10.11654/jaes.2017-0908

Hydrogen sulfide regulates cadmium stress resistance through P-ATPases in foxtail millet seedlings

LI Juan¹, TIAN Bao-hua², LIU Dan-mei¹, PEI Yan-xi^{1*}

(1.College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2.Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

Abstract: Hydrogen sulfide (H₂S), a newly found gasotransmitter, has been shown to play crucial roles in the development of plants, as well as in their resistance to various biotic or abiotic stresses. Cadmium is one of the heavy metals that are highly toxic to the growth of plants. In this study, the relationship among the exogenous H₂S, the activity of key ATPases, and the expression levels of heavy metal ATPase (*HMA*) genes, which encode a class of metal transporters, was analyzed under Cd stress conditions, and the mechanism to relieve Cd toxicity in foxtail millet was eventually determined. We determined the contents of soluble sugar and proteins and the activities of ATPases in the foxtail millet seedlings growing under Cd stress conditions. Additionally, the phylogenetic analysis of *HMA* proteins and the expression level analysis of the *HMA* genes were carried out under the exogenous application of H₂S and Cd. In the seedlings growing under Cd stress, the contents of soluble sugars and proteins were decreased, the activity of ATPases (Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, and H⁺-ATPase) were inhibited, and the expression levels of *HMA* genes in the P_{1B}-ATPase family were increased. The H₂S treatment could increase the content of soluble sugar and the activities of three kinds of ATPases, upregulate the expression levels of *HMA1* and *HMA2*, and down regulate the expression level of *HMA3*. These results showed that H₂S could regulate the activities of P-ATPases to alleviate Cd stress in foxtail millet seedlings.

Keywords: foxtail millet seedlings; hydrogen sulfide; cadmium stress; adenosine triphosphate

硫化氢 (Hydrogen sulfide, H₂S), 一直以来被认为是一种有毒气体,并且具有臭鸡蛋气味。然而在气体信号分子一氧化氮 (NO) 和一氧化碳 (CO) 之后, H₂S

也成为了气体信号分子的一员^[1], 虽然其研究起步较晚, 但发展迅速^[2]。起初, H₂S 被证明在动物体内有多种生理功能。近年来, 已经有许多研究报道证明植物

收稿日期: 2017-06-27 录用日期: 2017-08-10

作者简介: 李娟 (1991—), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 从事植物分子与生理研究。E-mail: 859851939@qq.com

田保华, 与李娟同等贡献。

* 通信作者: 裴雁曦 E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31671605); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31501772); 山西省应用基础研究计划项目 (201601D021097)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (31671605); The Young Scientists Fund of the National Natural Science Foundation of China (31501772); Applied Basic Research Project of Shanxi Province (201601D021097)

内源 H_2S 也有多种生理生化功能,如在种子的萌发^[3]、根形态的建成、植物的光合作用和细胞程序性死亡等生理过程中都发现有 H_2S 的参与^[3-5];此外 H_2S 在对植物抗逆性方面也扮演着重要的角色,如抵抗干旱胁迫^[6]、温度胁迫、重金属胁迫^[7-8]等。总之,植物整个生长、发育、成熟和衰老的过程都有 H_2S 的参与。

三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)是生物细胞中的一种活性物质,三磷酸腺苷酶(Adenosine triphosphatase, ATPase)在 ATP 分解释放出能量过程中扮演着重要的角色。ATPase 主要包括 F 型、P 型、V 型和 ABC 型四类^[9]。主要定位于植物细胞的叶绿体内膜和线粒体内膜,还有少部分存在于微生物中,其活性受环境以及各种因素的影响。ATP 是生命活动的主要物质,ATPase 在植物细胞的生长、气孔开闭、跨膜运输以及抵御非生物胁迫等方面有重要作用^[10]。

P 型 ATPases 作为 ATPase 家族中的一个成员,在植物响应重金属胁迫方面有着重要的作用。它们可以通过氨基酸序列中的天冬氨酸残基的磷酸化循环使一些阳离子进行跨膜运输。P 型 ATPase 主要包括 P_{1A} -ATPase 和 P_{1B} -ATPase, HMA 是 P_{1B} -ATPase 亚家族中一员,亚家族根据其金属特征可分为 $Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}/Co^{2+}$ 组和 Cu^+/Ag^+ 组。对于 Cd 胁迫产生毒害作用的关键步骤是根部吸收并向地上部分运输,因此削弱 Cd 向上运输,从而阻止 Cd 进入木质部和韧皮部是一个研究热点^[10-11, 13],但是,不同物种的 HMA 家族对 Cd 胁迫的响应存在差异。

目前,对于 Cd 胁迫处理下 ATPase 和 H_2S 的关系,以及 H_2S 与具有金属转运蛋白活性的 P_{1B} -ATPase 亚家族中 HMA 的关系尚无相关研究报道,本研究以谷子幼苗为材料,研究 H_2S 在植物响应重金属 Cd 的过程中, H_2S 与 ATPase 及 HMA 之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

晋谷 21 号由山西农科院谷子所提供。

1.2 培养条件

选用萌发后生长 5 d 的幼苗作为实验材料。种子消毒处理:将种子放于相应的离心管,75% 的乙醇洗 1 min,弃掉乙醇后用浓度为 6% 的次氯酸钠洗 10 min,最后用无菌水清洗 3 次。然后将消毒后的种子播种于培养皿中,23 °C 黑暗浸泡 24 h。并且每天换 10 mL 新的 1/4 Hoagland 营养液,保持水分^[17]。

1.3 胁迫处理

在进行胁迫处理时,选取生长一致的谷子幼苗分为 4 组。其中 3 组分别用 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $CdCl_2$ (Cd)、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS(H_2S)、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS 与 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $CdCl_2$ (H_2S +Cd) 进行处理,另外 1 组未处理的幼苗作为对照(CK)。所有实验进行三次重复,其中 H_2S 处理采用熏蒸法处理,将 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHS 置于小盖子中放入培养皿中进行 H_2S 处理。分别处理 24 h 后取样,然后测定 ATPase 的活性以及 HMA 基因的表

1.4 生理指标测定

可溶性蛋白含量和可溶性糖含量测定参照李合生^[18]的方法。

1.5 ATPase 酶活性的测定

剪取 1 g 谷子幼苗,加入 2 倍(体积:质量)体积预冷的研磨缓冲液($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-MES, $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, 1.5% PVP, 0.5% BSA, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, pH 7.0),在冰上研磨,然后在 4 °C 冷冻离心机下 $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min,取上清测定 ATPase 的活性^[19]。

H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 活性的测定:反应体系为 1 mL, Ca^{2+} -ATPase 和 Mg^{2+} -ATPase 的反应体系中包含 Tris-Mes $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 6.5)、ATP- Na_2 $3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $(NH_4)_2MoO_4$ $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaN_3 1.0 、 $NaNO_3$ $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、EDTA- Na_2 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; H^+ -ATPase 的反应体系除 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 体系中所包含的试剂,还包括 $CaCl_2$ $3.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $MgCl_2$ $5.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以上三种酶反应均由 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP- Na_2 进行启动,水浴 37 °C 下反应 30 min,最后终止反应进而测定无机磷的含量。

1.6 谷子幼苗 HMA 家族蛋白进化分析

谷子幼苗 HMA 家族蛋白进化分析,用 NCBI 网站中 BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找与 HMA 蛋白同源性高的序列,然后用 ClustalW (<http://www.e-bi.ac.uk/clustalw/>) 对所找的同源序列进行排序并分析,用 MEGA 5.0 软件的最大简约法(MP)构建系统进化树,校验参数为 BootStrap,重复 1000 次。

1.7 RNA 提取和 Real-time PCR

分别取各处理组的谷子幼苗,用 RNAiso Plus 试剂进行 RNA 的提取,用反转录试剂盒反转录,具体操作方法按照试剂的说明书进行。以 cDNA 为模板,用谷子 ACTIN 基因作为内参,用荧光定量 PCR 仪进行检测,最后分析各处理组基因表达水平的变化,每个实验均重复 3 次。表 1 为用于 Real-time PCR 的引

物,表 2 为 Real-time PCR 反应体系。

1.8 实验数据分析

用 Excel 和 SPSS 12.0 软件进行数据处理与分析,然后用 t 检验进行显著性分析和图表的制作。

2 结果与分析

2.1 外源 H_2S 对 Cd 胁迫下谷子幼苗的可溶性蛋白、可溶性糖含量的影响

如图 1 所示,与对照组相比,Cd 处理、 H_2S 处理以及 H_2S +Cd 处理的可溶性蛋白含量略微降低,降幅分别为 4.2%、3.1% 和 1.5%,三种不同处理对谷子幼苗的可溶性蛋白含量几乎没有影响;Cd 处理可溶性糖的含量明显降低,而 H_2S +Cd 处理则可以缓解 Cd 胁迫所引起的可溶性糖含量的降低。糖是调节渗透胁迫的小分子物质。以上实验结果表明, H_2S 可以通过增加谷子幼苗可溶性糖的含量进而缓解重金属 Cd 导致的渗透胁迫的损伤。

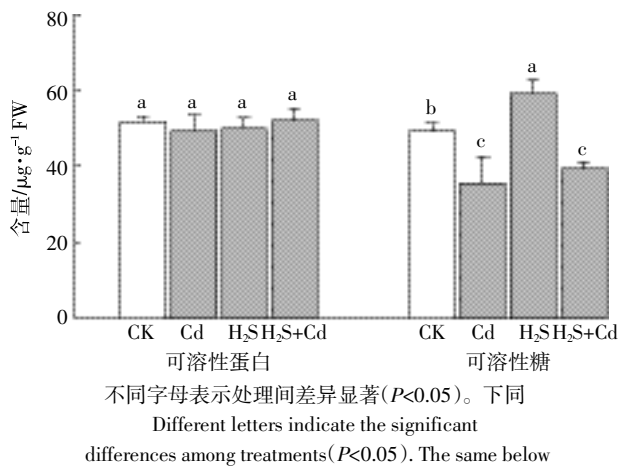


图 1 H_2S 处理对 Cd 胁迫下谷子幼苗可溶性蛋白和可溶性糖含量的影响

Figure 1 Effects of H_2S on soluble protein and soluble sugar contents in foxtail millet seedlings under Cd stress

表 2 Real-time PCR 反应体系

Table 2 Real-time quantitative PCR reaction system

体系成分	组分体积/ μL
cDNA	2
Primer mix	0.4
PCR mix	10.00
Eva Green	1.00
ddH ₂ O	6.2
总计	20.00

2.2 H_2S 对 Cd 胁迫下谷子 ATPase 活性的影响

如图 2 所示,与对照组比较,Cd 处理的 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 和 H^+ -ATPase 活性显著降低; H_2S 处理的 Mg^{2+} -ATPase 活性高于对照,而 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的活性与对照相比没有显著变化;与 Cd 处理组相比, H_2S +Cd 处理的 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的活性显著上升, Mg^{2+} -ATPase 的活性也有所升高,但并不显著。以上实验结果表明, H_2S 可以提高 Cd 胁迫下谷子 ATPase 活性,增加 ATP 等生物能量的生成,从而增强根系的主动吸收,进而缓解 Cd 胁迫对谷子

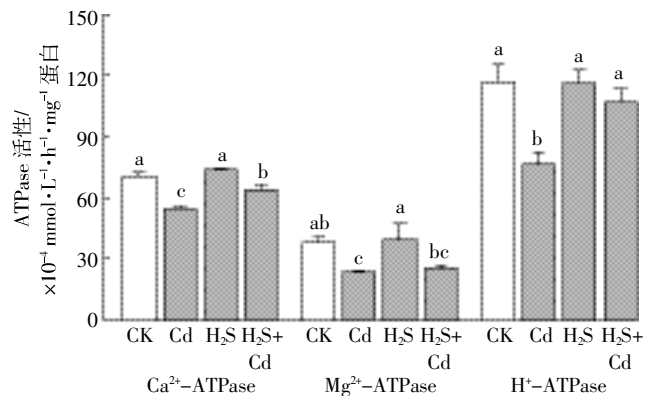


图 2 H_2S 对 Cd 胁迫下谷子幼苗 ATPase 活性的影响

Figure 2 Effect of H_2S on ATPase enzyme activity in foxtail millet seedlings under Cd stress

表 1 Real-time PCR 特异性引物

Table 1 Primers used for Real-time quantitative PCR

基因	基因注释	引物序列	长度/bp
<i>Actin</i>	Millet_GLEAN_10003390	F:GGTATGGAGTCGCCTGGAATCC R:CGGCTCAGCAATACCAGGAAC	110
<i>HMA1-1</i>	Millet_GLEAN_10030470	F:CAGTGGCTGTGGCAGATGT R:CGTCAACCAAAGAGGAAGA	176
<i>HMA1-2</i>	Millet_GLEAN_10023137	F:TAGGGGTTCAATTTACCGTG R:AGACTGACAAGCAGAAAGAG	163
<i>HMA2</i>	Millet_GLEAN_10027412	F:GCACCGTAATCGTCCTCCA R:TGCCGTAAGCTCGAACAGA	102
<i>HMA4</i>	Millet_GLEAN_10013714	F:CGGGAACATACACAAAAGGG R:CCGGGCTAGATGCGAAAT	205

幼苗的损伤。

2.3 谷子 HMA 家族蛋白系统进化分析

从拟南芥序列库中查找出 8 个 HMAs 的家族相关蛋白,分别命名为 *AtHMA1*–8,接下来,通过比对的方法又从谷子数据库找出 11 条相关基因。对这 19 条 HMA 基因编码蛋白按距离法 (Neighbor-joining method) 构建了它们的进化树,如图 3 所示在拟南芥中有 4 个基因属于 Cu^+/Ag^+ 亚家族,分别为 *AtHMA5*–8,而谷子中该亚家族中有 6 个成员;对于 $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ 亚家族,拟南芥中有蛋白 *AtHMA1*–4 4 个成员,而谷子中含有 5 个成员并且其中的 2 个与 *AtHMA1* 亲缘关系很近,将其命名为 *SiHMA1*–1、*SiHMA1*–2。由以下分析结果可得出,家族分类结果与其功能基本是一致的。

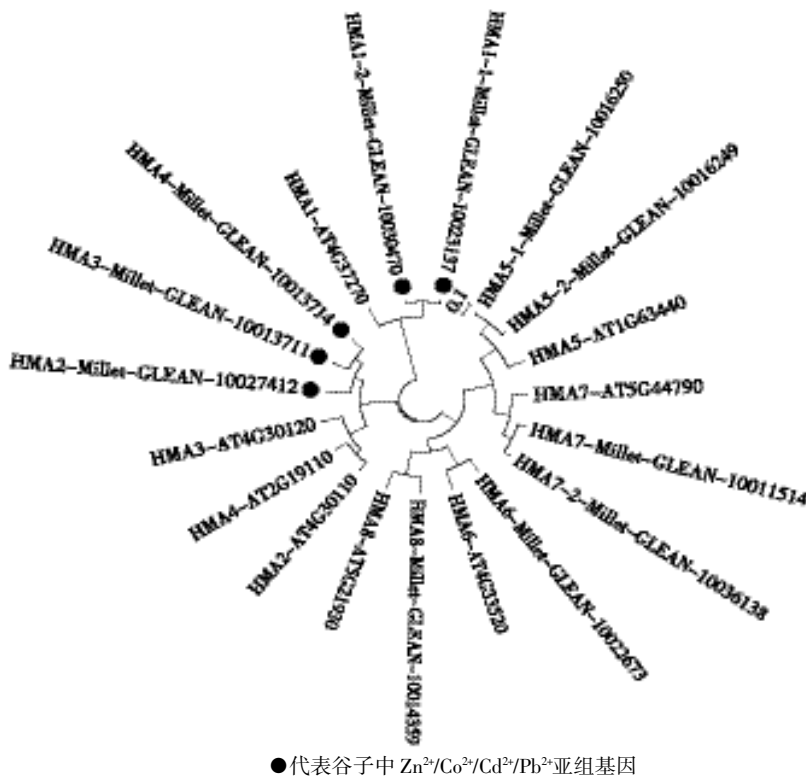
2.4 H_2S 对 HMAs 家族基因表达的影响

为了研究 H_2S 缓解 Cd 胁迫的分子机理,直接参照拟南芥 HMA 家族基因序列设计引物,并通过 qRT-PCR 在谷子中扩增出目的片段,对 Cd 胁迫下, H_2S 对谷子 $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ 亚组中 *HMA1*–4 的表达量进行了分析,实验结果如图 4 显示, Cd 处理组 *SiHMA1*–1、*SiHMA1*–2、*SiHMA2*、*SiHMA3* 和

SiHMA4 显著上调,与之相比, $\text{H}_2\text{S}+\text{Cd}$ 处理组 5 个基因的表达量则均有显著的下调。综上所述表明, H_2S 可能通过调节谷子幼苗中起金属转运作用的 HMAs 家族基因的表达量,来缓解 Cd 胁迫对谷子幼苗的损伤。

3 讨论

ATP 是一种高能磷酸化合物,是细胞各项生命活动的能量供应。而根系的主要功能之一为吸收水分和无机盐,这一过程则需要 ATPase 催化 ATP 水解进而提供能量。位于细胞质膜上的 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 是较为重要的 ATP 酶类,其活性可直接反映出细胞质膜的作用,并且质膜 H^+ -ATPase 所构成的跨膜质子梯度,是根部吸收营养物质的重要驱动力。已有研究报道 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$ 能够显著抑制根系的质膜 H^+ -ATPase 活性。这表明 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$ 可以将细胞质膜的功能破坏,同时也对根系主动吸收的能力有所抑制^[9];同时也有研究报道,不同浓度的 CdCl_2 胁迫处理对龙葵和长春花等幼苗的 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 活性影响比较显著^[22–23]。本研究发现,在 CdCl_2 胁迫下 Ca^{2+} -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase



The dark circles indicate the five members in the $\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ subgroup in foxtail millet seedlings

图 3 谷子和拟南芥 HMAs 家族系统树

Figure 3 Phylogenetic analysis of the foxtail millet seedlings and *Arabidopsis* HMAs family proteins

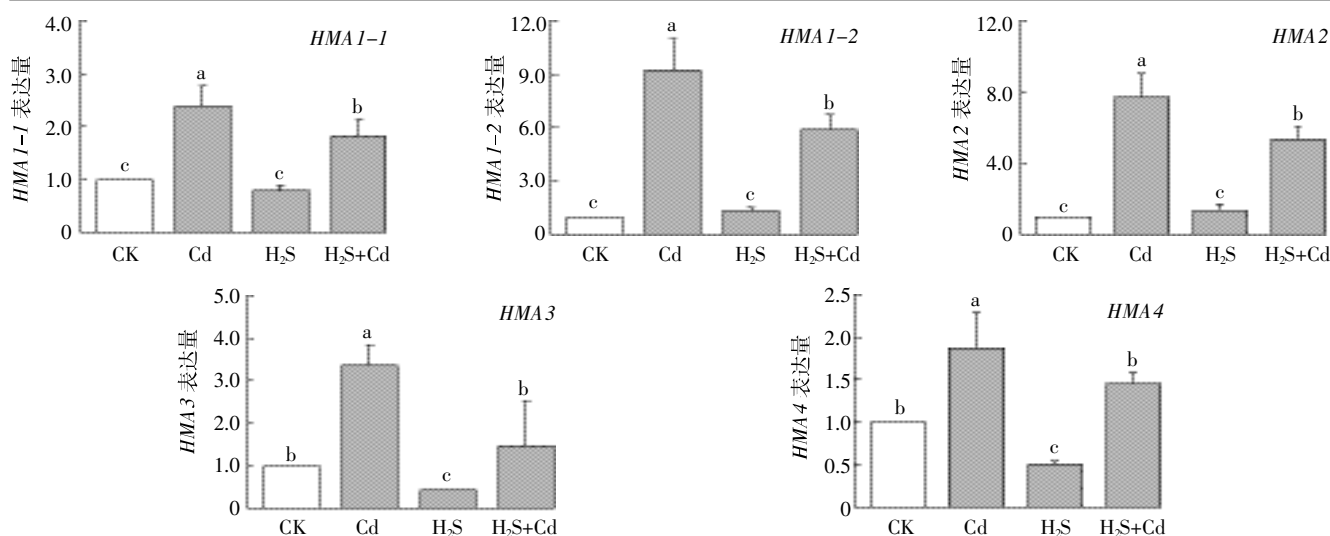


图4 H₂S对谷子HMA_s家族金属转运基因的表达调控

Figure 4 The expression levels of the HMA_s family of the metal transporter genes under H₂S treatment

和H⁺-ATPase的活性显著被抑制,而H₂S处理则可以缓解这一现象,这与H₂S可以缓解Al对小麦ATPase活性的抑制^[24]这一研究报道相一致。尽管Cd胁迫对ATPase的影响有众多研究,但并无一致的结果,因此在这方面还值得进一步深入研究。

P型ATPases存在于大部分真核生物中,它们对生物体的离子运输、信号转导以及稳态维持,尤其是在应对环境胁迫的生理过程中发挥着重要作用。P型ATPases家族成员中P_{1B}-ATPases(HMA_s)则为植物中的重要金属转运蛋白。HMA_s亚家族分为Cu⁺/Ag⁺和Zn²⁺/Co²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺两个亚族,研究报道拟南芥AtHMA1-4属于Zn²⁺/Co²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺亚族^[10]。本研究利用生物信息学方法,在谷子中预测到有5个编码基因属于Zn²⁺/Co²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺亚组。进一步的Real-time PCR表达分析(图4)表明,H₂S处理使得在Cd胁迫下谷子幼苗中*SiHMA1-1*、*SiHMA1-2*、*SiHMA2*、*SiHMA3*和*SiHMA4*表达的上调有所抑制。由此推测,根细胞内的Cd往地上部分运输时受H₂S抑制,从而将Cd集中于根细胞的液泡中,进而缓解了Cd对谷子幼苗的损伤。这一结果与H₂S可以下调龙葵HMA4基因的表达,抑制Zn向地上部分转运,从而缓解Zn对龙葵幼苗的毒害^[20]结果相一致。AtHMA3和OsHMA3可使得Zn²⁺/Co²⁺/Cd²⁺/Pb²⁺储存于植物液泡当中,AtHMA3也是唯一能使Cd在叶片中积累发生变化的一个转运蛋白^[11];而拟南芥HMA家族中的另外两成员HMA2、HMA4和水稻中OsHMA2的主要功能则是分别把根中Zn和Cd从根细胞中运输至地上部分^[10-11]。

从以上分析可以推测,不同物种中的HMA_s家族基因及其亚组中的转运蛋白都有着功能差异性。

因此,本实验研究H₂S在谷子幼苗响应重金属Cd胁迫机制中的作用,为进一步深入研究谷子对重金属Cd的调控机制提供理论支持。但是,目前对HMA_s家族的功能及更深的研究尚不清楚。因此,对谷子中HMA_s家族进行详细的功能分析与基因定位是我们后续研究的方向。

4 结论

(1)在Cd胁迫处理下谷子幼苗会产生一系列生理指标和转录水平的变化,主要表现为可溶性糖和可溶性蛋白含量均降低,三种ATP酶活性下降,以及P_{1B}-ATPase转运家族HMA_s的基因表达升高,从而导致谷子幼苗受到不同程度的损伤。

(2)H₂S处理则可以增加Cd胁迫下谷子幼苗的可溶性糖含量,提高Cd胁迫下谷子幼苗的三种ATP酶活性,下调HMA1、HMA2、HMA3和HMA4基因的表达,从而提高根系主动吸收能力,将Cd集中于根细胞的液泡中,进而缓解Cd对谷子幼苗的损伤。

参考文献:

- [1] 裴雁曦. 植物中的气体信号分子硫化氢: 无香而立, 其臭如兰[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(7): 721-733.
PEI Yan-xi. Gasotransmitter hydrogen sulfide in plants: Stinking to high heaven, but refreshing to fine life[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 32(7): 721-733.

- [2] 程双妮, 叶迦宁, 金东宁, 等. 硫化氢在番茄耐受镉胁迫过程中的作用[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(5): 140-143.
CHENG Shuang-ni, YE Jia-ning, JIN Dong-ning, et al. The function of hydrogen sulfide in tomato under cadmium stress condition[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2017, 45(5): 140-143.
- [3] Zhang H, Hu L Y, Hu K D, et al. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(12): 1518-1529.
- [4] Zhang H, Tang J, Liu X P, et al. Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2009, 51(12): 1086-1094.
- [5] Zhang H, Hu S L, Zhang Z J, et al. Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants[J]. *Postharvest Biology & Technology*, 2011, 60(3): 251-257.
- [6] Jin Z P, Shen J J, Qiao Z J, et al. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(3): 481-486.
- [7] Fang H H, Liu Z Q, Pei Y X, et al. Hydrogen sulfide interacts with calcium signaling to enhance the chromium tolerance in *Setaria italica*[J]. *Cell Calcium*, 2014, 56(6): 472-481.
- [8] Zhang H, Hu L Y, Li P, et al. Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat[J]. *Biologia Plantarum*, 2010, 54(4): 743-747.
- [9] 邓林, 陈少良. ATPase与植物抗盐性[J]. 植物学通报, 2005, 22(增刊): 11-21.
DENG Lin, CHEN Shao-liang. ATPase and salt resistance in plants[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 22(Suppl): 11-21.
- [10] Lin Y F, Aarts M G M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2012, 69(19): 3187-3206.
- [11] Takahashi R, Bashir K, Ishimaru Y, et al. The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(12): 1605-1607.
- [12] Zorrig W, Abdelly C, Berthomieu P, et al. The phylogenetic tree gathering the plant Zn/Cd/Pb/Co P_{1B}-ATPases appears to be structured according to the botanical families[J]. *Comptes Rendus-Biologies*, 2011, 334(12): 863-871.
- [13] Fang X L, Wang L, Deng X, et al. Genome-wide characterization of soybean P_{1B}-ATPases gene family provides functional implications in cadmium responses[J]. *Bmc Genomics*, 2016, 17(1): 1-15.
- [14] Zhang Z C, Yu Q, Du H Y, et al. Enhanced cadmium efflux and root-to-shoot translocation are conserved in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* (Crassulaceae family)[J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(12): 1757-1764.
- [15] Jin Z P, Pei Y X. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: Pleasant exploration behind its unpleasant odour[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, Article ID 397502.
- [16] Guo H M, Xiao T Y, Zhou H, et al. Hydrogen sulfide: A versatile regulator of environmental stress in plants[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(1): 1-13.
- [17] 田保华, 张彦洁, 张丽萍, 等. 镉/铬胁迫对谷子幼苗生长和NADPH氧化酶及抗氧化酶体系的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(2): 240-246.
TIAN Bao-hua, ZHANG Yan-jie, ZHANG Li-ping, et al. Effects of cadmium or chromium on growth and NADPH oxidase and antioxidant enzyme system of foxtail millet seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(2): 240-246.
- [18] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
LI He-sheng. Technology of plant physiological and biochemical[M]. Beijing: China Higher Education Press, 2006.
- [19] 邵小杰, 杨洪强, 冉昆, 等. 水杨酸对镉胁迫下葡萄根系质膜ATPase和自由基的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(7): 1441-1447.
SHAO Xiao-jie, YANG Hong-qiang, RAN Kun, et al. Effects of salicylic acid on plasma membrane ATPase and free radical of grape root under cadmium stress[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(7): 1441-1447.
- [20] Forbush B. Assay of Na, K-ATPase in plasma membrane preparations: Increasing the permeability of membrane vesicles using sodium dodecyl sulfate buffered with bovine serum albumin[J]. *Analytical Biochemistry*, 1983, 128(1): 159-163.
- [21] 陈国忠, 李文均, 徐丽华, 等. 16S rRNA二级结构的研究进展及其在系统分类中的应用[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(5): 54-57.
CHEN Guo-zhong, LI Wen-jun, XU Li-hua, et al. Advanced in 16S rRNA secondary structure and its application in systematic classification[J]. *Journal of Microbiology*, 2005, 25(5): 54-57.
- [22] 刘柿良, 杨容才, 马明东, 等. 土壤镉胁迫对龙葵(*Solanum nigrum* L.)幼苗生长及生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(2): 240-247.
LIU Shi-liang, YANG Rong-jie, MA Ming-dong, et al. Effects of soil cadmium on growth and physiological characteristics of *Solanum nigrum* L. plants[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(2): 240-247.
- [23] 刘柿良, 潘远智, 杨容才, 等. 外源一氧化氮对镉胁迫下长春花质膜过氧化、ATPase及矿质营养吸收的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(2): 445-458.
LIU Shi-liang, PAN Yuan-zhi, YANG Rong-jie, et al. Effects of exogenous NO on mineral nutrition absorption, lipid peroxidation and ATPase of plasma membrane in *Catharanthus roseus* tissues under cadmium stress[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(2): 445-458.
- [24] Dawood M, Cao F B, Jahangir M M, et al. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 209/210(1): 121-128.
- [25] Li L, Zhou W H, Dai H X, et al. Selenium reduces cadmium uptake and mitigates cadmium toxicity in rice[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 235/236(2): 343-351.
- [26] Liu X, Chen J, Wang G H, et al. Hydrogen sulfide alleviates zinc toxicity by reducing zinc uptake and regulating genes expression of antioxidant enzymes and metallothioneins in roots of the cadmium/zinc hyperaccumulator *Solanum nigrum* L.[J]. *Plant & Soil*, 2015, 400(1): 1-16.