

基于转录组测序金丝草叶片响应铅胁迫的抗氧化酶相关基因

朱晨璐, 武欣怡, 喻君保, 黄偲祺, 曹树一, 翟林, 韩雪洁, 侯晓龙

引用本文:

朱晨璐, 武欣怡, 喻君保, 黄偲祺, 曹树一, 翟林, 韩雪洁, 侯晓龙. 基于转录组测序金丝草叶片响应铅胁迫的抗氧化酶相关基因[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2158–2169.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0218>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

铅胁迫对蜀葵重金属积累及抗氧化酶活性的影响

黄亚萍, 俎丽红, 沈广爽, 高张莹, 周美利, 石福臣

农业环境科学学报. 2017, 36(9): 1746–1752 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0328>

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

田保华, 张彦洁, 张丽萍, 马晓丽, 金竹萍, 刘志强, 刘旦梅, 裴雁曦

农业环境科学学报. 2016(2): 240–246 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016.02.005>

铅胁迫对金丝草AsA-GSH循环及铅积累的影响

韩航, 陈顺钰, 赵雅曼, 侯晓龙, 蔡丽平, 刘爱琴, 周垂帆

农业环境科学学报. 2018, 37(4): 656–664 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1523>

纳米硫对铅胁迫下油菜幼苗生长和铅积累的影响

原海燕, 刘清泉, 张永侠, 符佳豪, 王银杰, 孙玉明, 佟海英

农业环境科学学报. 2021, 40(3): 517–524 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0798>

醋糟生物炭对尖孢镰刀菌胁迫下番茄系统抗性的影响

裴广鹏, 李俞昕, 朱宇恩, 刘伟, 李华

农业环境科学学报. 2022, 41(2): 267–276 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0881>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

朱晨璐, 武欣怡, 喻君保, 等. 基于转录组测序金丝草叶片响应铅胁迫的抗氧化酶相关基因[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(10): 2158–2169.

ZHU C L, WU X Y, YU J B, et al. Antioxidant enzyme-related genes of *Pogonatherum crinitum* leaves in response to lead stress based on RNA-Seq[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(10): 2158–2169.



开放科学 OSID

基于转录组测序金丝草叶片响应铅胁迫的抗氧化酶相关基因

朱晨璐¹, 武欣怡¹, 喻君保¹, 黄偲祺¹, 曹树一¹, 翟林¹, 韩雪洁¹, 侯晓龙^{1,2,3*}

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002; 2. 南方红壤区水土保持国家林业和草原局重点实验室, 福州 350002; 3. 海峡两岸红壤区水土保持协同创新中心, 福州 350002)

摘要: 为了深入揭示植物抗氧化酶的相关基因及其响应重金属胁迫的作用机制, 以重金属铅(Pb)超富集植物金丝草 [*Pogonatherum crinitum* (Thunb.) Kunth.] 为研究对象, 设置Pb浓度0、300、500、1 000 mg·L⁻¹和2 000 mg·L⁻¹的水培模拟胁迫试验, 测定不同Pb浓度下金丝草叶片的抗氧化酶活性, 并对Pb胁迫处理的金丝草叶片进行RNA-Seq测序, 将转录组测序得到的Unigenes通过GO与KEGG富集注释, 筛选出叶片抗氧化酶相关的DEGs, 并利用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)进行验证。结果表明: 随Pb胁迫浓度的增加, 金丝草叶片过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性呈增加趋势, 丙二醛(MDA)含量则呈先增加后降低的趋势; 转录组测序得到总碱基数为56.34 Gb, 各样品碱基质量达到Q20、Q30水平的均大于90%, 测序结果可靠; 筛选出的DEGs通过GO与KEGG数据库进行对比注释发现, 金丝草叶片DEGs在“过氧化物酶体”“氧化还原酶活性”“氧化还原酶活性, 作用于CH-OH供体组”“活性氧代谢过程”和“过氧化氢代谢过程”等与抗氧化相关的GO功能条目上显著富集, 在“谷胱甘肽代谢”“抗坏血酸和醛糖代谢”“植物激素信号转导”“黄酮类生物合成”和“MAPK信号通路-植物”等与抗氧化相关的KEGG通路上显著富集; Pb胁迫下金丝草叶片抗氧化酶相关基因*PcSOD*、*PcPOD*和*PcCAT*上调表达, qRT-PCR验证结果与转录组测序结果一致, Pb胁迫下这些基因的相对表达量与抗氧化酶活性的变化趋势一致。研究表明, 金丝草可通过提高抗氧化酶活性来适应Pb胁迫, 抗氧化酶相关基因*PcSOD*、*PcPOD*和*PcCAT*参与了金丝草应对Pb胁迫的调控过程。

关键词: 超富集植物; 金丝草; 铅胁迫; 抗氧化酶; 实时荧光定量聚合酶链反应

中图分类号: X173 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2022)10-2158-12 doi:10.11654/jaes.2022-0218

Antioxidant enzyme-related genes of *Pogonatherum crinitum* leaves in response to lead stress based on RNA-Seq

ZHU Chenlu¹, WU Xinyi¹, YU Junbao¹, HUANG Siqi¹, CAO Shuyi¹, ZHAI Lin¹, HAN Xuejie¹, HOU Xiaolong^{1,2,3*}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of State Administration of Forestry and Grassland on Soil and Water Conservation of Red Soil Region in Southern China, Fuzhou 350002, China; 3. Cross-Strait Collaborative Innovation Center of Soil and Water Conservation, Fuzhou 350002, China)

Abstract: To further reveal the related genes of plant antioxidant enzymes and their mechanisms of response to heavy metal stress,

收稿日期: 2022-03-05 录用日期: 2022-04-15

作者简介: 朱晨璐(1997—), 女, 山西晋中人, 硕士研究生, 从事修复生态与生态工程研究。E-mail: 13835498588@163.com

*通信作者: 侯晓龙 E-mail: xl.hou@fafu.edu.cn

基金项目: 福建省科技厅对外合作项目(2019I0007); 国家自然科学基金项目(31901298); 福建农林大学科技创新专项基金(CXZX2020143C, 71202103D); 福建龙净环保股份有限公司项目(201906)

Project supported: Project for Foreign Cooperation of Fujian Provincial Department of Science and Technology (2019I0007); The National Natural Science Foundation of China (31901298); Special Grant for Science and Technology Innovation of Fujian Agriculture and Forestry University (CXZX2020143C, 71202103D); Fujian Longking Environmental Protection Co., Ltd. (201906)

Pogonatherum crinitum was used as the research object, and a hydroponic simulated stress experiment with lead concentrations of 0, 300, 500, 1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and 2 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was carried out. In addition, the antioxidant enzyme activity in the leaves of *P. crinitum* at different concentrations was determined, and the sequencing of the RNA-Seq of *P. crinitum* leaves by Pb treatments was performed. The unigenes obtained by transcriptome sequencing were enriched and annotated with GO and KEGG, and the DEGs related to leaf antioxidant enzymes were screened out and verified using qRT-PCR. The results revealed that, with the increase in lead stress concentration, the activities of POD, SOD, and CAT in the leaves of *P. crinitum* showed an increasing trend; however, MDA content showed an increasing trend firstly and then decreased. The total number of bases obtained by sequencing was 56.34 Gb. The base quality of each sample reached Q20 and Q30 exceeded 90%, indicating that the database was reliable. The selected DEGs were compared and annotated through GO and KEGG databases, and the result showed that antioxidant-related GO functional terms such as “peroxisome” “oxidoreductase activity” and “oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors” “reactive oxygen species metabolic process” and “hydrogen peroxide metabolic process” were significantly enriched in the DEGs of *P. crinitum*. Moreover, the DEGs were significantly enriched in antioxidant-related KEGG pathways such as “glutathione metabolism” “ascorbate and aldarate metabolism” “plant hormone signal transduction” “flavonoid biosynthesis” and “MAPK signaling pathway-plant”. The expression of antioxidant enzyme-related genes *PcSOD*, *PcPOD*, and *PcCAT* in the leaves of *P. crinitum* were upregulated under Pb stress. The qRT-PCR results were consistent with the transcriptome sequencing results, and the relative expression levels of these genes were consistent with the changing trend of the antioxidant enzyme activities under Pb stress. This study shows that *P. crinitum* adapts to heavy metal Pb stress by increasing the activity of antioxidant enzymes, and the antioxidant enzyme-related genes *PcSOD*, *PcPOD*, and *PcCAT* are involved in the regulation of *P. crinitum* in response to heavy metal Pb stress.

Keywords: hyperaccumulator; *Pogonatherum crinitum*; Pb stress; antioxidantase; qRT-PCR

土壤重金属污染是世界普遍关注的环境问题,土壤重金属污染修复是目前研究的热点^[1]。植物修复克服了传统物理和化学修复投资大、破坏土壤结构并且容易造成二次污染等缺点,是一项经济、绿色、环保的修复技术,受到普遍青睐^[2]。近年来,有关学者在重金属超富集植物的筛选、植物效果和耐性机理方面开展了较多研究^[3-5],筛选出了一些针对不同重金属的超富集植物,例如:砷(As)超富集植物蜈蚣草(*Pteris Vittata* L.)^[6]、2007年发现的铬(Cr)超富集植物李氏禾(*Leersia hexandra* Sw.)^[7]、镉(Cd)超富集植物东南景天(*Sedum alfredii* Hance)^[8]等。但是,目前筛选出的超富集植物普遍具有生物量小、富集重金属单一等问题,因此限制了植物修复技术的大范围应用^[5]。植物对重金属的转运、耐受及富集能力是植物修复技术的关键,寻找超富集植物并探讨其对重金属胁迫的响应机制,从而进一步提升植物修复效率,已受到学者们的广泛关注^[9]。研究表明一些超富集植物可通过形态的改变或生理的调控来适应重金属胁迫,但目前对植物适应重金属胁迫的内在机制尚不清晰,特别是在分子生物学机制方面还有待进一步深入探索。

金丝草 [*Pogonatherum crinitum* (Thunb.) Kunth.] 是一种重金属铅(Pb)的超富集植物,该植物能在Pb含量高达20 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的胁迫环境中正常生长,在重金属矿区金丝草生物转运系数可以达到10.18^[10]。

重金属Pb胁迫下,金丝草可通过提高抗氧化酶活性[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)]、提高渗透性调节物质含量[脯氨酸(Pro)、可溶性糖(SS)、可溶性蛋白(Cpr)]和调控抗坏血酸-谷胱甘肽(ASA-GSH)循环等策略来适应Pb胁迫环境^[11],特别是随Pb胁迫浓度的增大,金丝草体内抗氧化酶活性呈增加趋势^[12],说明抗氧化系统在抵御重金属毒害中起重要作用,但对其分子生物学过程尚不清楚。目前,国内外对植物响应逆境胁迫的抗氧化酶相关基因已开展一些研究。邵文静等^[13]的研究发现高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 的 *SbSODs*、*SbPODs* 等基因在低温胁迫下上调表达,这一发现为探讨高粱耐低温机制提供了参考;肖生鸿等^[14]的研究发现低浓度的汞(Hg)会诱导 *POD3*、*CAT2* 等基因上调,以此来降低重金属的毒害。研究表明芥菜 [*Brassica juncea* (L.) Czern.] 幼苗通过提高与CAT、POD和SOD等酶相关基因的表达量,加强抗氧化系统抗逆性,从而响应胁迫^[15];ALARAIDH等^[16]的研究发现在Pb、Cr和Cd胁迫下,葫芦巴 (*Trigonella foenum-graecum* L.) 通过调控CAT、POD等酶的相关基因不同程度地表达来减弱重金属对其的毒害作用;通过对苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 的研究发现,非生物胁迫环境可刺激抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)和SOD等相关酶的表达使之适应胁迫环境^[17]。但目前对金

草耐 Pb 的分子机制尚未明确,对其响应 Pb 胁迫的抗氧化酶相关基因及其作用机制尚不清晰。

本研究以 Pb 超富集植物金丝草为研究对象,设计不同 Pb 浓度模拟胁迫试验,比较不同 Pb 胁迫处理下金丝草抗氧化酶活性的差异,对 Pb 胁迫处理的金丝草叶片进行转录组测序,筛选出与抗氧化酶活性相关的差异表达基因并进行 qRT-PCR 验证,揭示与金丝草响应 Pb 胁迫的抗氧化酶相关基因及其作用机理,为更深入揭示植物响应 Pb 胁迫的内在机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的金丝草采用种子培养,种子采自福建三明铅锌矿区。将种子均匀撒到温室中的苗床上,保持土壤含水量为田间持水量的 70% 左右,待金丝草长至 15 cm 左右时开展胁迫试验。

1.2 试验设计

选择长势一致的金丝草幼苗,清洗干净根系后,移栽到盛有 1/8 Hoagland 营养液的水培装置中,并使用定植篮、定植棉固定,每盆移栽幼苗 15 株,在营养液中缓苗 3 d 后开始 Pb 胁迫试验。设置不同浓度 Pb 处理,分别为 300、500、1 000 mg·L⁻¹ 和 2 000 mg·L⁻¹ (分别用 Pb300、Pb500、Pb1000 和 Pb2000 表示),采用 (CH₃COOH)₂Pb 配制的 60 mg·L⁻¹ 的 Pb 溶液,按照设计的 Pb 胁迫浓度加入相应 Pb 溶液于装有营养液的培养装置中,同时设置无 Pb 胁迫的对照试验 (CK)。营养液为 1/8 的 Hoagland 营养液,营养成分见表 1,其中 KH₂PO₄ 浓度由原配方的 0.136 g·L⁻¹ 减少为 0.680 mg·L⁻¹,以避免产生沉淀。用去离子水反复清洗金丝草根后移入不同 Pb 浓度的胁迫液中,置于人工气候培养箱中进行胁迫试验,温度为 25 ℃,湿度为 75%,光照强度为 6 000 lx,昼夜光照时间为 16 h/8 h,胁迫时间为 7 d。选取新鲜金丝草叶片剪碎混匀装入离心管,经液氮速冻,置于 -80 ℃ 冰箱备用。CK、Pb300、Pb500、Pb1000 和 Pb2000 处理的样品用于抗氧化酶活性和丙二醛 (MDA) 含量测定、RNA 提取,并供荧光定量使用,每个处理各 3 次重复。同时选取

CK、Pb1000 处理的样品用于 RNA 测序分析,每组 3 次重复。

1.3 试验方法

1.3.1 抗氧化酶的测定

制备酶液:称取金丝草新鲜叶片 0.2 g,使用液氮在研钵中研磨成匀浆后放入 4 mL 离心管,加入 1 mL 0.05 mol·L⁻¹ pH 7.8 的磷酸盐缓冲液,定容至 4 mL。利用涡旋仪混匀,放入冷冻高速离心机 4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,取上清液放入 4 ℃ 冰箱备用。金丝草叶片 SOD、CAT、POD 活性和 MDA 含量分别采用氮蓝四唑法、紫外吸收法、愈创木酚法和硫代巴比妥酸法测定^[18]。

1.3.2 RNA 提取、测序和组装

新鲜植株使用 TIANGEN 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,利用超微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度 (浓度需大于 50 ng·μL⁻¹, OD 值在 1.8~2.0 之间,保证 RNA 纯度)。配制 1% 的琼脂糖胶,将 RNA 样品加入进样口,电泳约 20 min,将胶放置在全自动凝胶成像仪上观察样品的完整度及是否存在 DNA 污染跑胶。得到的 RNA 经质检后建立文库,使用 Illumina HiSeq 4000 测序平台测序,将最终得到的 clean reads 利用组装软件 Trinity^[19] 进行组装并评估。用 RSEM 软件对组装出来的 unigene 定量。

1.3.3 差异基因分析

将基因表达水平中的 reads count 数据,使用 DE-Seq2^[20] 软件进行分析,得到差异基因。FDR (错误发现率) < 0.05 且 |log₂ FC| > 1 的基因为显著差异基因,将显著差异的 Unigene 向 GO 数据库的各条目映射进行功能分析,同时将 Unigene 与 KEGG 数据库比对确定基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。结合两种富集分析结果,筛选需要的差异基因。

1.3.4 反转录与荧光定量

使用全式金公司生产的 Uni All-in-one First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 反转录试剂盒进行反转录得到 cDNA。使用 NCBI 中 premier designing tools 设计筛选出的与金丝草叶片抗氧化酶相关的耐 Pb 基因对重金属 Pb 胁迫响应的引物,如表 2 所示。

使用福州都拜特生物技术有限公司的 QuanStu-

表 1 Hoagland 营养液组分

Table 1 Components of Hoagland nutrient solution

KH ₂ PO ₄ / (mg·L ⁻¹)	KNO ₃ / (g·L ⁻¹)	MgSO ₄ ·7H ₂ O/ (g·L ⁻¹)	H ₃ BO ₃ / (g·L ⁻¹)	CuSO ₄ ·5H ₂ O/ (mg·L ⁻¹)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O/ (mg·L ⁻¹)	MnCl ₄ ·H ₂ O/ (g·L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ MoO ₄ / (mg·L ⁻¹)	Na ₂ ·EDTA/ (mg·L ⁻¹)	FeSO ₄ ·7H ₂ O/ (mg·L ⁻¹)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O/ (g·L ⁻¹)
0.680	0.505	0.492	0.002	0.079	0.219	0.002	0.098	0.037	0.031	1.180

dio3 System 荧光定量 PCR 仪,反应体系为:上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$, $2\times\text{PerfectStart Green qPCR SuperMix}$ $10\text{ }\mu\text{L}$, Nuclease-free Water $8.2\text{ }\mu\text{L}$, 共 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应过程为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , 共 40 个循环。每个样品设 3 个生物学重复, 每个生物学重复设 3 个技术重复, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因的相对表达量。

1.4 数据处理

使用 SPSS 25 软件, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Tukey's post-hoc 检验对试验数据进行多重比较。抗氧化酶活性与分子生物学指标均做 3 次重复试验, 试验结果用平均值 $\pm$ 标准差表示。采用 Origin 2017 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 Pb胁迫对金丝草叶片抗氧化酶活性的影响

不同 Pb 胁迫浓度下, 金丝草叶片抗氧化酶活性的变化如图 1 所示。随着 Pb 浓度的增加, 金丝草叶片 POD 酶活性呈上升趋势, Pb1000、Pb2000 处理下的 POD 酶活性显著大于 CK 及其他处理($P<0.05$), 分别比 CK 处理提高 10.16%、10.27%。Pb 胁迫下, 金丝草叶片 CAT 酶活性随 Pb 浓度的增加而增加, 且 Pb2000、Pb1000 及 Pb500 处理下的酶活性显著大于 CK 处理($P<0.05$), 分别是 CK 处理的 2.14、1.90 倍和 1.82 倍。叶片 SOD 酶活性则是随着 Pb 浓度的增加呈逐渐上升的变化规律, 且 Pb1000、Pb2000 处理的酶活性显著大于 CK 处理($P<0.05$), 相较于 Pb1000 处理, Pb2000 处理下的 SOD 酶活性提高了 18.54%, 二者差异显著($P<0.05$)。随着 Pb 浓度增加, 金丝草叶片 MDA 含量总体呈上升趋势, 与 CK 处理相比, Pb500、Pb1000 处理下的 MDA 含量分别提高了 0.57、1.30 倍, 差异显著($P<0.05$), 但 Pb2000 处理下的 MDA 含量显

著低于其他处理($P<0.05$)。由此可见, 金丝草叶片可能通过抗氧化酶响应及 MDA 含量的变化来适应 Pb 胁迫, 不同抗氧化酶通过不同响应方式提高植物耐性, 减少 Pb 胁迫对植株的毒害。

2.2 测序结果

由于 Pb 浓度为 $1\text{ }000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的金丝草叶片抗氧化酶活性变化显著, 故选择对照(CS)处理与 $1\text{ }000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 胁迫(TS)处理的金丝草叶片样品进行高通量转录组测序, 每组 3 个重复, 共 6 个样品, 测序结果如表 3 所示。两组样品经组装、过滤后得到总碱基数共 56.34 Gb, GC 比例为 57.37%~58.06%, 碱基组成平衡。各样品碱基质量值达到 Q20 以上水平的碱基数目占比均大于 95%, 达到 Q30 以上的碱基数目占比均大于 90%, 说明各样品测序质量高, 达到建库要求。

2.3 差异基因表达

通过 Deseq2 软件分析 TS 与 CS 处理金丝草叶片的差异表达基因, 基于差异分析结果筛选 $\text{FDR}<0.05$ 且 $|\log_2\text{FC}|>1$ 的基因为显著差异基因(图 2)。分析发现 TS 与 CS 处理金丝草的叶片 Unigenes 共有 3 282 个差异基因(DEGs), 其中有 1 626 个上调基因和 1 656 个下调基因。由图 3 可知, 金丝草耐 Pb 相关基因在 CS 与 TS 处理下差异显著。与 CS 处理组相比, TS 处理组与抗氧化酶相关的基因(POD、CAT、SOD、GSH、Unigene0049346、Unigene0015966、Unigene0002954、Unigene0032786 和 Unigene0041749 等)表达上调, 与 Pb 胁迫下金丝草叶片抗氧化酶活性变化趋势一致。除此之外, 金属硫蛋白(MTs)、蛋白激酶(Kinase)、类甜蛋白(Thaumatococcus-like protein)、BOX、ZIP、NAC 转运蛋白、ABC 转运蛋白和转录因子等均为上调表达, 这些可能也与提高植物抗逆性来适应 Pb 胁迫有关; 叶绿体多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, chloroplastic)、蛋白质线粒体(Protein mitochondrial)和组织蛋白酶

表 2 候选基因名称及定量引物序列

Table 2 Candidate gene names and primer sequences used in qRT-PCR

基因 ID Gene ID	引物名称 Primer name	引物序列(5'~3')Primer sequence	产物大小 Amplification product size
Unigene0039410	GAPDH-F	F:GAAGCACAGTGACATCAGCC	271
	GAPDH-R	R:AAGATCCGAGGTGTACTTGTCC	
Unigene0029007	CAT-F	F:ACATGGAGGGCTTTGGTGTGTC	100
	CAT-R	R:CATTTCACGCCACAAGTCGG	
Unigene0041749	SOD-F	F:AAGGATCAGGTTGGGCTTGG	232
	SOD-R	R:GCCTCACTGTACCGCTTTGA	
Unigene0069373	POD-F	F:TGCTGGACGGGAACAACAC	155
	POD-R	R:TCCGTATTTAGCCGCGATGG	

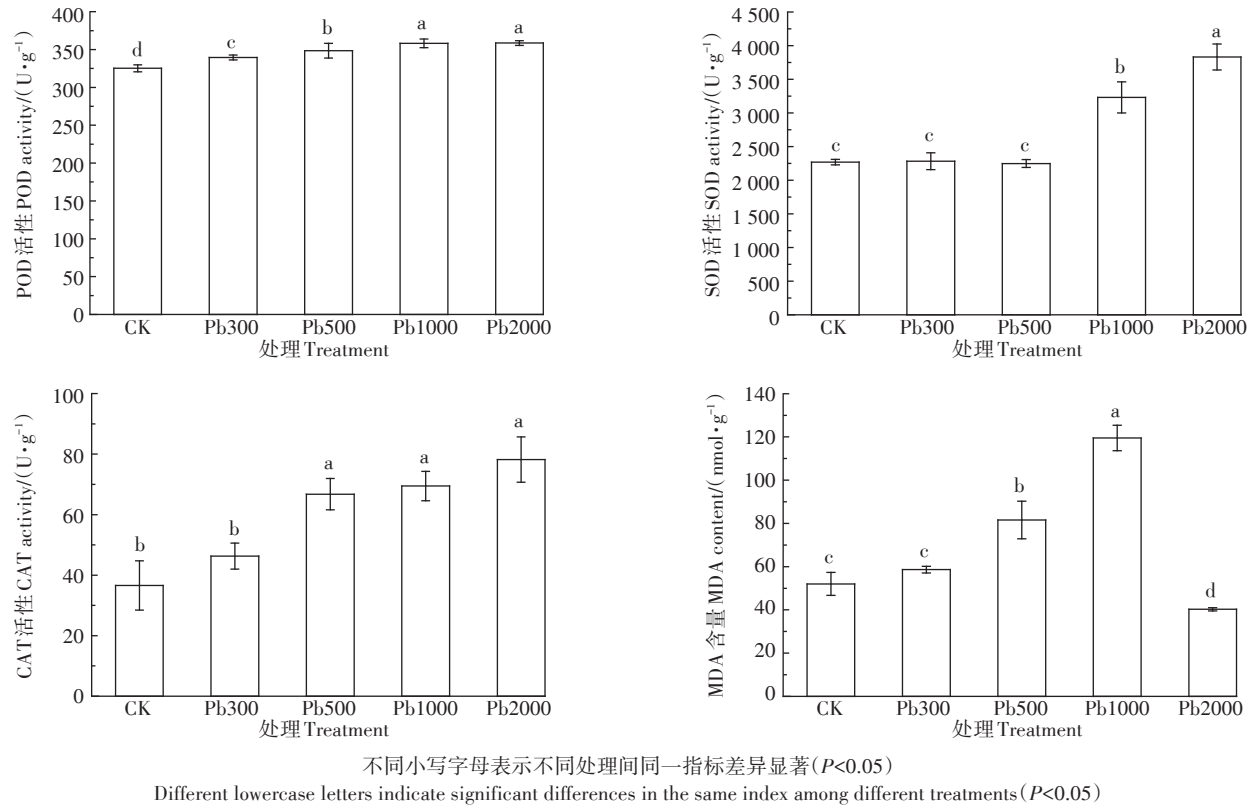


图1 不同Pb胁迫浓度对金丝草叶片抗氧化酶活性和MDA含量的影响

Figure 1 Effects of different Pb stress concentrations on antioxidant enzyme activities and MDA content in the leaves of *P. crinitum*

表3 金丝草叶片转录组测序结果分析

Table 3 Analysis of transcriptome sequencing data of *P. crinitum*

样品名称 Sample	原始数据 Raw data/bp	清洁数据 Clean data/bp	Q20/ %	Q30/ %	GC/ %
CS1	10 075 513 200	9 967 603 237	96.37	90.72	57.59
CS2	8 612 987 100	8 522 345 394	95.82	90.03	57.91
CS3	8 621 332 500	8 540 528 782	96.43	90.85	58.06
TS1	11 216 248 800	11 132 795 823	96.32	90.60	57.37
TS2	9 179 044 800	9 113 261 254	96.52	91.00	57.93
TS3	9 141 927 900	9 064 171 045	96.23	90.48	58.01

(Cathepsin)等则为下调表达,这类基因与植株机能代谢有关,说明Pb胁迫下植株部分机能受损。

2.4 差异表达基因的GO富集

将差异表达基因与GO数据库比对进行注释与富集分析,进一步了解Pb胁迫下DEGs的功能。共有1 032条DEGs富集在GO数据库,这些基因所富集的GO条目可分为生物学过程(Biological process)、细胞组分(Cellular componet)和分子功能(Molecular function)3大类(图4)。在生物学过程方面,代谢过程(Metabolic process)、细胞过程(Cellular process)和单

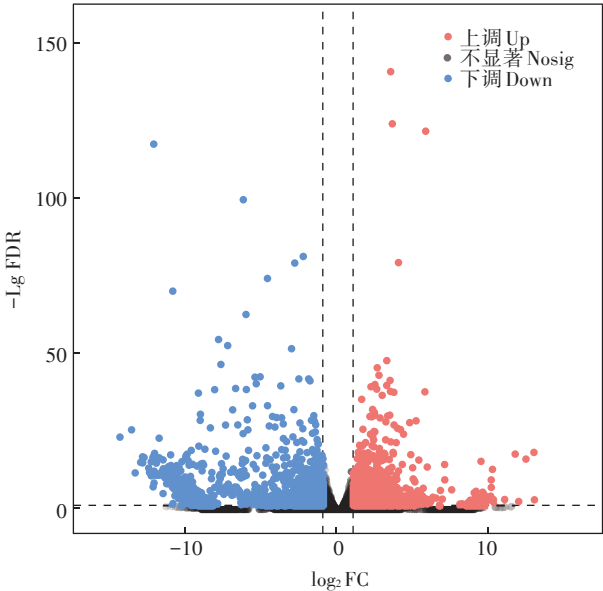


图2 CS-vs-TS差异火山图

Figure 2 CS-vs-TS difference volcano map

一有机物过程(Single-organism process)占主要部分,分别占30.52%、24.32%和20.93%。在细胞组分中,差异表达基因主要富集在细胞(Cell)以及细胞组成

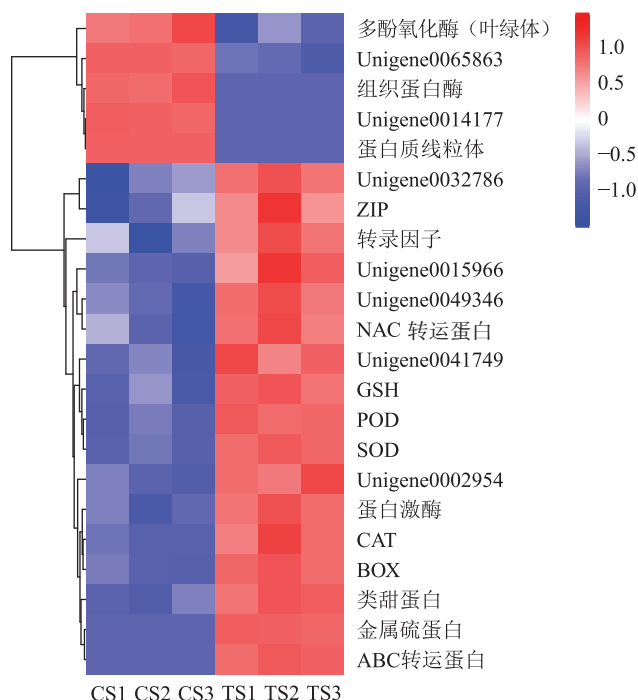


图3 金丝草耐Pb差异基因(DEGs)表达量热图

Figure 3 Heat map of the expression of some Pb-tolerant DEGs in the leaves of *P. crinitum*

(Cell part)部分,均占富集在GO数据库总DEGs的18.80%,其次为细胞器(Organelle)、膜(Membrane)。在分子功能方面,催化活性(Catalytic activity)富集的差异表达基因最多,占比27.71%,其次为连接(Binding),再次为转运活动(Transporter activity),其占比3.01%。这表明Pb胁迫下金丝草叶片可通过代谢、催化各类酶活性和转运蛋白等方式适应重金属毒害。

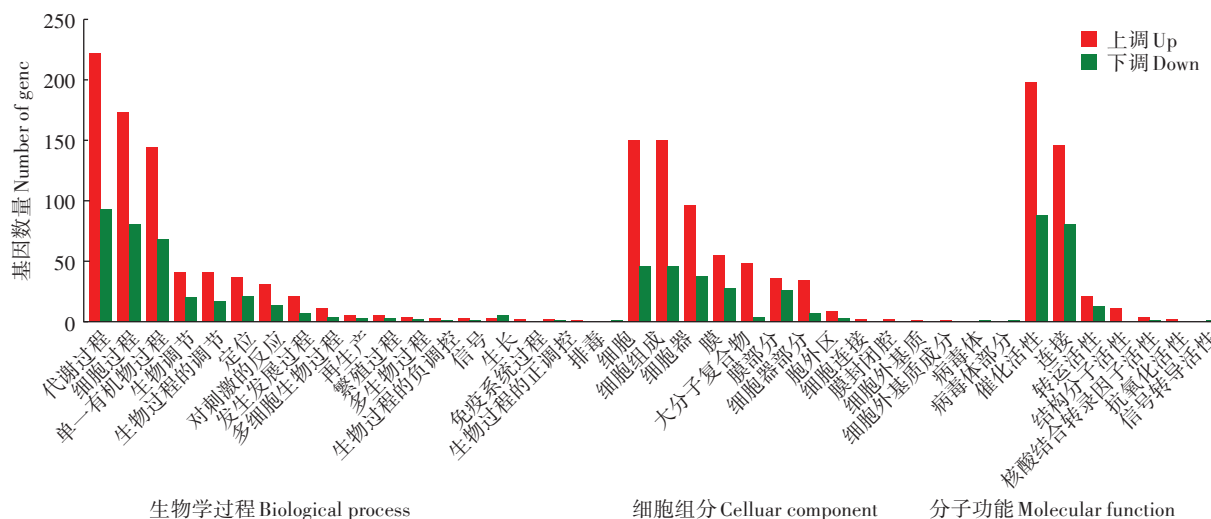


图4 Pb胁迫下金丝草叶片差异表达基因的GO富集分类图

Figure 4 GO enrichment classification map of differentially expressed genes in the leaves of *P. crinitum* under Pb stress

共有143条DEGs富集在与抗氧化酶相关的36个GO条目上,包括“过氧化物酶体”“氧化还原酶活性”“分子内氧化还原酶活性”“氧化活性”“过氧化物酶活性”“二硫氧化还原酶活性”“活性氧代谢过程”“过氧化氢代谢过程”“氧化还原辅酶代谢过程”“超氧化物代谢过程”“氧化还原工艺”“对活性氧的响应”和“对氧化应激的反应”等(表4),其中有82条DEGs显著富集在GO功能中($P < 0.05$),如“过氧化物酶体”“氧化还原酶活性”“氧化还原酶活性,作用于CH-OH供体组”“氧化还原酶活性,作用于其他含氮化合物作为供体,铁硫蛋白作为受体”“活性氧代谢过程”和“过氧化氢代谢过程”。

2.5 差异表达基因的KEGG富集

将DEGs与KEGG数据库比对进行功能注释与通路富集分析,共有476条DEGs被注释到121条KEGG通路上,其中25条通路被显著富集($P < 0.05$)。如图5富集散点图所示,在“核糖体(Ribosome)”通路上的63条DEGs富集最为显著($P < 0.05$),占有注释到KEGG通路DEGs的13.24%。在“代谢通路(Metabolic pathways)”上参与的DEGs最多,共有225个,占比47.27%,其中主要富集在“碳代谢(Carbon metabolism)”“苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism)”通路;其次为“次生代谢物的生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)”通路,占比31.51%,说明Pb胁迫下,叶片的代谢系统具有重要作用,体内碳代谢、苯丙氨酸代谢等均有明显变化。DEGs在“苯丙氨酸代谢(Phenylalanine metabolism)”“苯丙烷生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)”“苯丙氨酸、酪氨酸和

表4 抗氧化酶相关基因的GO分析
Table 4 GO analysis of antioxidant enzyme-related genes

GO 条目(Level 1) GO term(Level 1)	GO 名称(Level 2) GO ID(Level 2)	功能描述 Function description	差异基因数量 Number of DEGs
细胞组分 Cellular componet	GO:0005777	过氧化物酶体 Peroxisome	2
分子功能 Molecular function	GO:0016491	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	56
	GO:0016860	分子内氧化还原酶活性 Intramolecular oxidoreductase activity	2
	GO:0016209	氧化活性 Antioxidant activity	2
	GO:0004601	过氧化物酶活性 Peroxidase activity	1
	GO:0015036	二硫氧化还原酶活性 Disulfide oxidoreductase activity	2
生物学过程 Biological process	GO:0072593	活性氧代谢过程 Reactive oxygen species metabolic process	6
	GO:0042743	过氧化氢代谢过程 Hydrogen peroxide metabolic process	5
	GO:0006733	氧化还原辅酶代谢过程 Oxidoreduction coenzyme metabolic process	5
	GO:0006801	超氧化物代谢过程 Superoxide metabolic process	1
	GO:0055114	氧化还原工艺 Oxidation-reduction process	3
	GO:0000302	对活性氧的响应 Response to reactive oxygen species	1
	GO:0006979	对氧化应激的反应 Response to oxidative stress	1

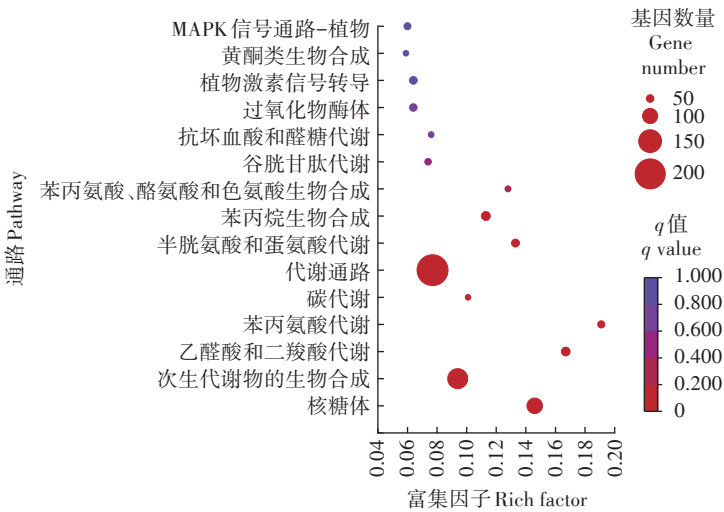


图5 Pb胁迫下部分金丝草叶片差异基因的KEGG分析
Figure 5 KEGG analysis of partial DEGs in leaves of *P. crinitum* under Pb stress

色氨酸生物合成(Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)”和“过氧化物酶体(Peroxisome)”等抗氧化酶相关的通路上显著富集($P<0.05$),共占比12.18%,金丝草叶片可能通过这些通路参与抗氧化过程,去除活性氧抵御Pb毒害。除此之外,还有一些DEGs被注释到与抗氧化酶相关的“谷胱甘肽代谢(Glutathione metabolism)”“抗坏血酸和醛糖代谢(Ascorbate and aldarate metabolism)”“植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)”“黄酮类生物合成(Flavonoid biosynthesis)”和“MAPK 信号通路-植物(MAPK signaling pathway-plant)”等通路上。

2.6 抗氧化酶相关基因的筛选与荧光定量验证

结合DEGs的表达及功能注释结果,从富集显著($P<0.05$)并与抗氧化酶相关的GO条目与KEGG通路中筛选出差异显著的与抗氧化酶相关的上调DEGs,如图6所示(其引物见表2),共有*PcCAT*(Unigene0029007)、*PcSOD*(Unigene0041749)和*PcPOD*(Unigene0069373)3个候选基因。*PcCAT*、*PcSOD*参与“过氧化物酶体(Peroxisome)”通路,作用于抗氧化酶系统中的过氧化氢代谢,属于过氧化物酶体靶向信号(PTS1 type),表示金丝草叶片受到Pb胁迫后,可能通过过氧化物酶体产生信号,促进抗氧化酶相关基因

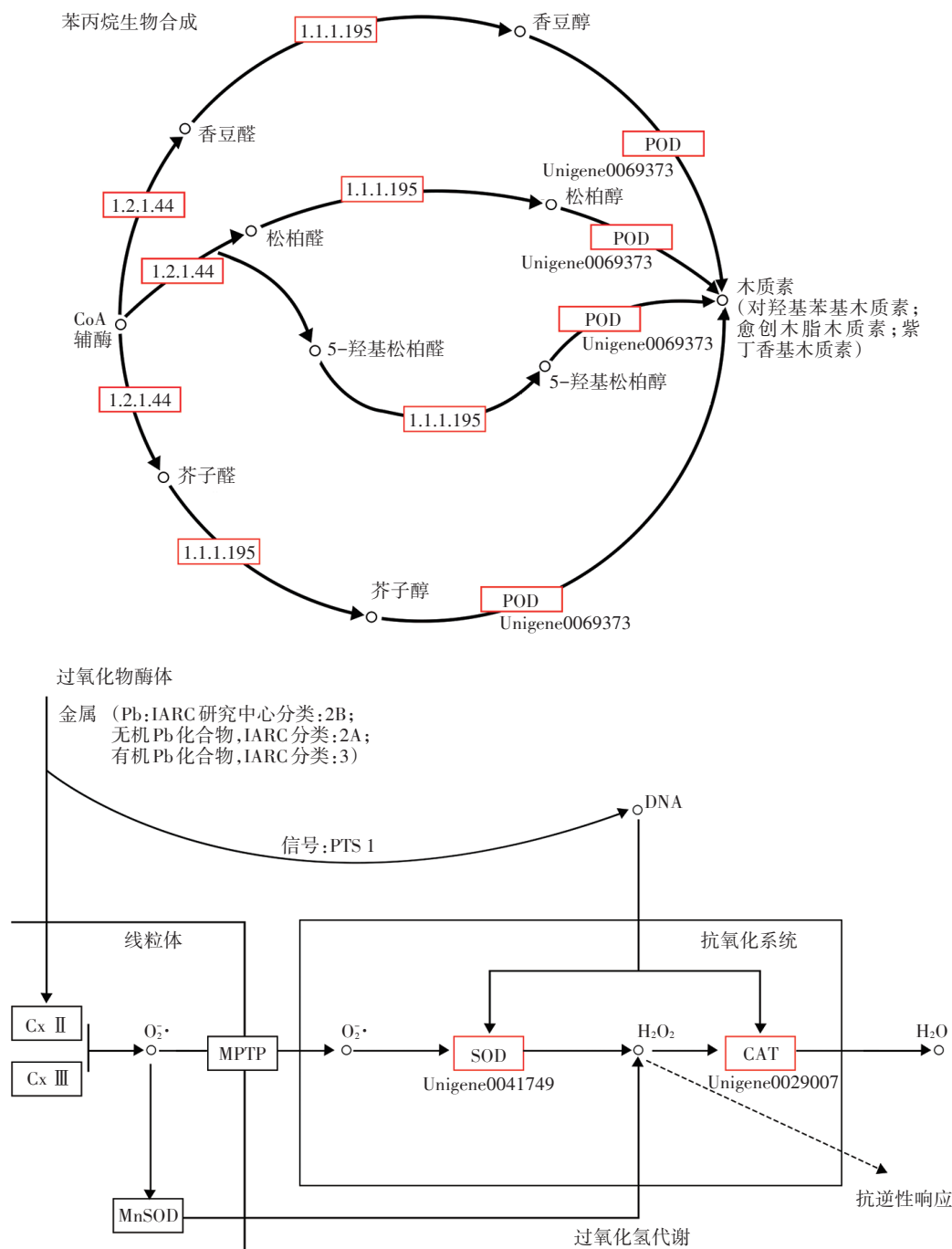


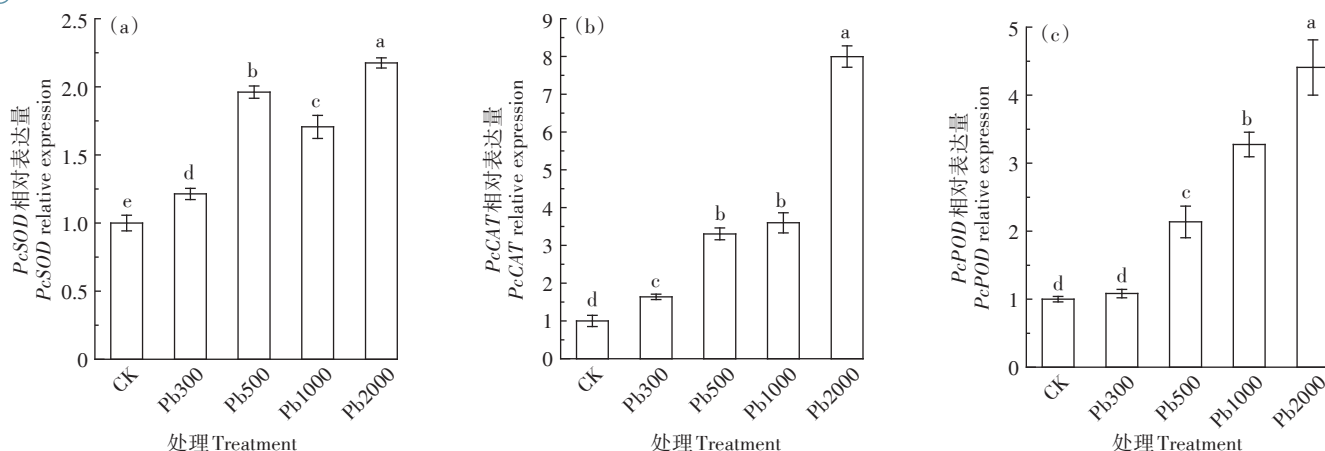
图6 候选基因代谢通路富集图

Figure 6 Enrichment map of candidate gene metabolic pathways

表达,恢复细胞稳态。*PcPOD*参与“苯丙烷生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)”通路,上、下游分别为酚类醇类、木质素类,表明金丝草叶片该候选基因可能参与了香豆醇(p-Coumaroyl alcohol)、松柏醇(Coniferyl alcohol)和芥子醇(Sinapyl alcohol)转化为木质素(Lignin)的过程,从而响应Pb胁迫环境。

为了验证金丝草叶片转录组测序结果以及与抗

氧化酶相关的候选基因,本试验对筛选出的3个Pb胁迫下与叶片抗氧化酶相关的DEGs(*PcSOD*、*PcCAT*和*PcPOD*)进行表达量分析。如图7所示,Pb1000处理下,基因*PcSOD*的相对表达量低于Pb500处理,除此之外,金丝草叶片过氧化物酶相关基因*PcSOD*的相对表达量随着Pb胁迫浓度的增加呈线性上升的趋势。随着Pb胁迫浓度的增加,抗氧化酶相关基因*PcCAT*与

图7 抗氧化酶相关基因 *PcSOD*、*PcCAT*和*PcPOD*的相对表达量Figure 7 The relative expression of antioxidant enzyme-related genes *PcSOD*, *PcCAT* and *PcPOD*

*PcPOD*的相对表达量均显著上调,且Pb2000处理下相对表达量达到最大。不同处理下各DEGs的相对表达量均显著大于CK处理,这与转录组测序的结果一致,表明本试验中转录组测序结果真实准确。

3 讨论

Pb胁迫影响植物正常生长,刺激植物产生活性氧(ROS),积累过剩的ROS会造成植株体内氧化损伤,MDA含量增加,甚至会造成细胞死亡^[21],植物对Pb毒害的主要防卫方式为提高植物抗氧化性^[22]。有研究表明,在一定的Pb胁迫范围内,玉蝉花(*Iris ensata* Thunb.)叶片SOD、POD酶活性随着Pb浓度的增加而增加,且在Pb浓度为800 mg·L⁻¹时达到峰值,通过此种抗氧化系统调节方式使玉蝉花适应Pb胁迫^[23]。本研究中,随Pb胁迫浓度的增加金丝草叶片抗氧化酶(POD、SOD和CAT)活性总体呈上升趋势。这可能是因为Pb胁迫激活了金丝草叶片抗氧化酶活性,通过提高SOD、POD和CAT酶活性来清除植株体内过多的ROS,提高植物抗氧化性,从而提高其耐Pb性,与MAŁECKA等^[24]对芥菜的研究结果以及HELAOUI等^[25]对紫花苜蓿的研究结果类似。MDA是植物膜脂化的产物之一,同时也反映了植株膜脂化程度^[26]。本研究中,在一定范围内,金丝草叶片MDA含量随着Pb浓度的增加而增加,说明Pb胁迫对金丝草叶片造成了膜脂化损伤,刺激了抗氧化系统,且随着浓度的增加该伤害程度增大。在Pb浓度为2 000 mg·L⁻¹时,MDA含量显著低于其他处理,可能是因为高浓度Pb胁迫对金丝草叶片的过氧化伤害严重且达到不可逆转的程度,造成了细胞死亡;也可能是因为此时叶片

中抗氧化酶清除了过量的活性氧,抗氧化抵御系统降低了膜脂化程度,从而提高植物耐性,与吴桂容等^[27]及CEDENO等^[28]的研究结果相似,使得超富集植物金丝草可在20 000 mg·kg⁻¹的Pb胁迫环境下正常生长^[10]。

目前,对金丝草分子生物学方面的研究较少,且在NCBI数据库中没有公开的关于金丝草基因组及转录组的数据。本研究通过RNA-seq测序技术对Pb胁迫和对照组的金丝草叶片进行测序,利用DESeq2软件以表达量为依据,筛选出与金丝草叶片抗氧化酶相关的候选DEGs。将得到DEGs与GO数据库比对并进行富集,发现DEGs最显著富集的GO条目为代谢过程,其次为催化活性。这可能是因为植物响应外界刺激的主要方式之一为代谢物调控,通过代谢或生成次级代谢产物来抵御非生物胁迫^[29]。Pb处理与CK处理的小麦幼苗的DEGs主要富集于免疫系统过程和代谢过程等,在分子功能方面主要富集于催化活性等^[30],这可能是因为植物通过催化抗氧化酶活性来适应环境压力,与本研究结果一致。本研究中金丝草叶片的DEGs在“氧化还原酶活性”“活性氧代谢过程”和“过氧化氢代谢过程”等GO条目中显著富集,这是因为植物在非生物胁迫下会产生大量ROS,清除过量的ROS是植物适应胁迫毒害的主要方式,该反应最关键、最主要的影响因子是抗氧化相关酶^[31]。除此之外,DEGs还在“氧化还原酶活性,作用于CH-OH供体组”上显著富集,这可能是因为CH-OH作为常见的ROS,更容易获取氢原子而引起氧化链式循环反应,造成脂质、蛋白质和DNA等多种损伤,加剧胁迫毒害^[32],因此抗氧化酶相关基因更集中作用在CH-OH

供体组。本研究中,通过与KEGG通路数据库比对并进行富集,发现CK处理与重金属Pb胁迫处理的金丝草叶片DEGs主要富集在代谢通路和次代谢的生物合成等代谢途径。这可能是因为非生物胁迫下,植物通过次生代谢物的生成,如细胞色素^[33]等基因表达量上调,促进抗氧化酶活性提高,从而增加植物抗逆性^[34]。Pb胁迫下,金丝草叶片DEGs在“苯丙氨酸代谢”“苯丙烷生物合成”和“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成”等抗氧化酶相关的通路上显著富集,这是因为黄酮、木质素等酚类化合物作为苯丙烷代谢的产物主要作用于清除植物体内多余ROS、提高植物抗氧化^[35],而苯丙氨酸作为主要的氨化酶参与该代谢过程^[36],因此金丝草叶片通过基因调控促进苯丙烷生物合成,提高自身耐性来适应Pb胁迫。本研究中叶片DEGs还显著富集在“过氧化物酶体”通路上,这是因为Pb胁迫下植物体内过氧化物酶体会产生逆向信号响应胁迫^[37],同时过氧化物酶体也是产生与调节ROS的重要细胞器之一^[32]。

本研究中筛选出的PcCAT、PcSOD抗氧化酶基因在“过氧化物酶体”通路上,作用于抗氧化系统中的PTS1信号,且均为上调表达。过氧化物酶体作为响应非生物胁迫的重要细胞器自身无法生成相关酶,需要靶向信号(PTS)指引酶分子前体进入过氧化物酶体中^[38]。Pb胁迫可能刺激金丝草叶片中过氧化物酶体产生PTS1,推动核糖体定向运输到过氧化物酶体中,促进PcCAT、PcSOD上调表达合成抗氧化酶,清除O₂·。Pb胁迫下金丝草叶片PcPOD在“苯丙烷生物合成”通路上上调表达,这可能是因为PcPOD是木质素合成途径中的上游基因,Pb胁迫下叶片中该基因的上调表达促进了酚类醇(香豆醇、松柏醇和芥子醇)向木质素转化。木质素作为细胞壁的重要组分,其含量的增加意味着金丝草叶片通过抑制ROS产生^[39]和增加细胞壁强度^[40]来提高植株对Pb胁迫的抗性,本研究结果与LU等^[41]发现沙梨[Pyrus pyrifolia (Burm.f.) Nakai]通过抗氧化相关基因调控木质素代谢物质生成从而适应非生物胁迫一致。本研究发现,随Pb胁迫浓度的增加,抗氧化酶相关基因PcSOD、PcCAT和PcPOD的相对表达量呈逐渐上升趋势,这与研究发现随Pb浓度的增加,金丝草叶片POD、SOD和CAT酶活性逐渐增加的趋势基本一致,说明金丝草可能通过这些抗氧化酶相关基因调控植株酶活性使之适应Pb胁迫环境。但在Pb1000处理下,PcSOD的表达量的变化与该活性变化不一致,这可能是在该处理下有其

他相关基因参与了SOD酶的调控。李兰^[42]通过研究发现,Cr胁迫促进油菜(*Brassica napus* L.)叶片的SOD、POD和ZS758(与CAT相关)的相关基因表达上调,与对应的酶活性变化趋势一致。Cd胁迫下,小麦(*Triticum aestivum* L.)抗氧化系统起主要的解毒作用,植株体内POD、SOD和CAT基因表达量与酶活性明显增加^[43]。ZHAO等^[44]对商陆(*Phytolacca americana* Roxb.)的研究发现锰(Mn)、铜(Cu)会诱导植株POD等抗氧化相关酶基因表达,说明提高植物抗氧化能力是应对重金属胁迫的重要策略。此外,结合转录组测序及注释结果,金丝草抗氧化系统还受多种基因调控,后期应持续深入研究。

4 结论

(1) Pb胁迫下金丝草可通过提高过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶活性,清除活性氧自由基,从而适应Pb胁迫环境。

(2) Pb胁迫下,金丝草叶片差异基因主要集中在与代谢、催化活性相关的功能条目中,其中差异基因显著富集在“氧化物酶体”“氧化还原酶活性”“氧化还原酶活性,作用于CH-OH供体组”“活性氧代谢过程”和“过氧化氢代谢过程”以及“苯丙氨酸代谢”“苯丙烷生物合成”“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成”和“过氧化物酶体”等与抗氧化相关的GO条目与KEGG通路中。

(3) 金丝草叶片抗氧化酶相关基因PcSOD、PcPOD和PcCAT的qPCR验证结果与转录组测序结果一致,不同浓度Pb胁迫下其相对表达量与抗氧化酶活性变化趋势基本一致,说明这3个基因参与了金丝草应对Pb胁迫的调控过程。

参考文献:

- [1] 张英婷,李紫龙,蒋妮娜,等. 重金属污染土壤修复技术及其研究进展[J]. 能源与环境, 2021(5): 78-79, 83. ZHANG Y T, LI Z L, JIANG N N, et al. Remediation technology of heavy metal contaminated soil and its research progress[J]. *Energy and Environment*, 2021(5): 78-79, 83.
- [2] 赵怡阳,陶祥运,张易旻,等. 农田重金属污染土壤的植物修复工程研究[J]. 浙江农业科学, 2022, 63(2): 391-395. ZHAO Y Y, TAO X Y, ZHANG Y M, et al. Research on phytoremediation engineering of heavy metal contaminated soil in farmland[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2022, 63(2): 391-395.
- [3] 朱兴旺,陈虹,张水琳,等. 云南重金属富集植物研究进展[J]. 云南冶金, 2021, 50(5): 141-144. ZHU X W, CHEN H, ZHANG S L, et

- al. Research progress on heavy metal hyperaccumulator in Yunnan[J]. *Yunnan Metallurgy*, 2021, 50(5):141-144.
- [4] 任军, 石遥, 刘方, 等. 贵州锰矿废渣堆场重金属污染风险评估及草本植物重金属吸收特征[J]. 草业学报, 2021, 30(8):86-97. REN J, SHI Y, LIU F, et al. An assessment of heavy metal absorption patterns in herbaceous plants and pollution risks in manganese mining areas in Guizhou Province[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(8):86-97.
- [5] 亓琳, 杨莹博, 张博, 等. 丛枝菌根真菌强化高粱幼苗修复镉污染土壤的研究[J]. 草业学报, 2018, 27(12):103-112. QI L, YANG Y B, ZHANG B, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) enhance phytoremediation of strontium-contaminated soil by sorghum bicolor seedlings[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(12):103-112.
- [6] 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(3):207-210. CHEN T B, WEI C Y, HUANG Z C, et al. The As hyperaccumulator plant *Pteris Vittata* L. and its accumulation characteristics for As[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002(3):207-210.
- [7] ZHANG X H, LIU J, HUANG H T, et al. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(6):1138-1143.
- [8] WU L H, LIU Y J, ZHOU S B, et al. *Sedum plumbizincicola* X. H. Guo et S. B. Zhou ex L. H. Wu (Crassulaceae): A new species from Zhejiang Province, China[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2013, 299(3):487-498.
- [9] 何玉君, 孙梦荷, 沈亚婷, 等. 超富集植物与重金属相互作用机制及应用研究进展[J]. 岩矿测试, 2020, 39(5):639-657. HE Y J, SUN M H, SHEN Y T, et al. Research progress on the interaction mechanism between hyperaccumulator and heavy metals and its application[J]. *Rock and Mineral Analysis*, 2020, 39(5):639-657.
- [10] HOU X L, HAN H, MENG F R, et al. Intermittent lead-induced stress on antioxidant enzyme activity and subcellular distribution of Pb in *Pogonatherum crinitum* seedlings[J]. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 2019, 21(4):634-642.
- [11] 韩航, 陈顺钰, 赵雅曼, 等. 铅胁迫对金丝草 AsA-GSH 循环及铅积累的影响[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(4):656-664. HAN H, CHEN S Y, ZHAO Y M, et al. Influence of lead stress on the ascorbate-glutathione cycle and subcellular distribution in leaves and roots of *Pogonatherum crinitum*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(4):656-664.
- [12] 韩航, 陈顺钰, 薛凌云, 等. 铅胁迫对金丝草生长及生理生化的影响[J]. 草业学报, 2018, 27(4):131-138. HAN H, CHEN S Y, XUE L Y, et al. Effects of lead stress on growth and physiology of *Pogonatherum crinitum*[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(4):131-138.
- [13] 邵文静, 张今杰, 盖胜男, 等. 低温胁迫下高粱幼苗叶片生理变化及相关基因表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(5):857-870. SHAO W J, ZHANG J J, GAI S N, et al. Physiological changes and related genes expression analysis of sorghum (*Sorghum bicolor*) seedlings under low temperature stress[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(5):857-870.
- [14] 肖生鸿, 邓倩仪, 黄洁婷, 等. 汞胁迫对桉树 3 个保护酶活性及基因表达的影响[J]. 西北林学院学报, 2021, 36(2):91-96. XIAO S H, DENG Q Y, HUANG J T, et al. Effects of mercury stress on enzyme activities and gene expression of three protective enzymes in *Eucalyptus*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2021, 36(2):91-96.
- [15] KOHLI S K, HANDA N, SHARMA A, et al. Interaction of 24-epibrassinolide and salicylic acid regulates pigment contents, antioxidative defense responses, and gene expression in *Brassica juncea* L. seedlings under Pb stress[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(15):15159-15173.
- [16] ALARAIDH I A, ALSAHLI A A, RAZIK E A. Alteration of antioxidant gene expression in response to heavy metal stress in *Trigonella foenum-graecum* L.[J]. *South African Journal of Botany*, 2018, 115:90-93.
- [17] LOU Y, GUAN R, SUN M, et al. Spermidine application alleviates salinity damage to antioxidant enzyme activity and gene expression in alfalfa[J]. *Ecotoxicology*, 2018, 27(10):1323-1330.
- [18] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995:76-99. ZOU Q. Experiment guidance of plant physiology and biochemistry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995:76-99.
- [19] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7):644.
- [20] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12):550.
- [21] ROMERO M C, TERRON L C, PELAEZ M, et al. Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, 161:107-119.
- [22] 宋波, 曾伟铨, 徐婷. 工程修复铅污染土壤的植物筛选与分类[J]. 环境工程, 2015, 33(9):144-147, 73. SONG B, ZENG W Q, XU T. Review on engineering application of plants for phytoremediation of lead-contaminated soil[J]. *Environmental Engineering*, 2015, 33(9):144-147, 73.
- [23] 薄伟, 王松, 康红梅, 等. 铅胁迫对玉蝉花生长及生理生化的影响[J]. 森林与环境学报, 2021, 41(4):373-381. BO W, WANG S, KANG H M, et al. Effects of lead stress on the growth and physio-biochemistry of *Iris ensata*[J]. *Journal of Forest and Environment*, 2021, 41(4):373-381.
- [24] MAŁECKA A, KONKOLEWSKA A, HANĆ A, et al. Insight into the phytoremediation capability of *Brassica juncea* (v. Malopolska): Metal accumulation and antioxidant enzyme activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(18):4355.
- [25] HELAOUI S, BOUGHATTAS I, HATTAB S, et al. Physiological, biochemical and transcriptomic responses of *Medicago sativa* to nickel exposure[J]. *Chemosphere*, 2020, 249:126121.
- [26] 毛雪飞, 何金娇, 韩忠康, 等. 铅胁迫对金银花生长、生理及积累特性的影响[J]. 东北农业科学, 2019, 44(5):69-75, 87. MAO X F, HE J J, HAN Z K, et al. Effects of lead stress on growth and physiological metabolism and Accumulation characteristics of *Lonicera Japonica*[J]. *Journal of Northeast Agricultural Sciences*, 2019, 44(5):69-75,

- 87.
- [27] 吴桂容, 严重玲. 镉对桐花树幼苗生长及渗透调节的影响[J]. 生态环境, 2006(5): 1003–1008. WU G R, YAN C L. Effects of Cd on the growth and osmotic adjustment regulation contents of *Aegiceras conniculatum* seedlings[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2006(5): 1003–1008.
- [28] CEDENO C, MALDONADO A. The copper ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts[J]. *Plant Physiology*, 1972, 50: 698–701.
- [29] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909–930.
- [30] GAO J, SUN L, YANG X E, et al. Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance[J]. *PLoS One*, 2017, 8(6): e64643.
- [31] 鲁琳, 杨尚谕, 刘维东, 等. 基于转录组测序烟草响应盐胁迫活性氧清除相关基因的挖掘[J]. 生物技术通报, 2020, 36(12): 42–53. LU L, YANG S Y, LIU W D, et al. Mining of genes to reactive oxygen species scavenging in response to salt stress in *Nicotiana glauca* based on transcriptome sequencing[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(12): 42–53.
- [32] 张梦如, 杨玉梅, 成蕴秀, 等. 植物活性氧的产生及其作用和危害[J]. 西北植物学报, 2014, 34(9): 1916–1926. ZHANG M R, YANG Y M, CHENG Y X, et al. Generation of reactive oxygen species and their functions and deleterious effects in plants[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, 34(9): 1916–1926.
- [33] 王怡仁, 聂梦杰, 王玉泉, 等. 小麦幼苗根系应答重金属Pb胁迫的转录组分析[J]. 河南农业科学, 2020, 49(6): 8–15. WANG Y R, NIE M J, WANG Y Q, et al. Transcriptome analysis of wheat roots in response to heavy metal Pb stress[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2020, 49(6): 8–15.
- [34] 黄志远. 荷花对重金属铜胁迫响应及转录组学研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2020: 36–37. HUANG Z Y. Response of lotus to heavy metal copper stress and transcriptomics study[D]. Zhengzhou: Henan Agriculture University, 2020: 36–37.
- [35] 谢棒祥, 张敏红. 生物类黄酮的生理功能及其应用研究进展[J]. 动物营养学报, 2003(2): 11–15. XIE B X, ZHANG M H. The recent advances on the function and application of flavonoids[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2003(2): 11–15.
- [36] TABAK H F, VAN A, BRAAKMAN I. Peroxisomes: Minted by the ER[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, 20(4): 393–400.
- [37] 朱健康, 倪建平. 植物非生物胁迫信号转导及应答[J]. 中国稻米, 2016, 22(6): 52–60. ZHU J K, NI J P. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. *China Rice*, 2016, 22(6): 52–60.
- [38] 赵守城. 过氧化物酶体的生物发生与疾病[J]. 生命科学, 2000(4): 181–184. ZHAO S C. Peroxisome biogenesis and disease[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2000(4): 181–184.
- [39] ORTEG F, PERAGON J. The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europaea* L. cv. Picual)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, 89(9): 1565–1573.
- [40] LEVIN D E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway[J]. *Genetics*, 2011, 189(4): 1145–1175.
- [41] LU G, LI Z, ZHANG X, et al. Expression analysis of lignin-associated genes in hard end pear (*Pyrus pyrifolia* Whangkeumbae) and its response to calcium chloride treatment conditions[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34(2): 251–262.
- [42] 李兰. 油菜素内酯调控铜和铬胁迫下油菜生理生化与分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019: 117–118. LI L. Physio-biochemical and molecular mechanism of exogenous brassinosteroids in regulating growth of *Brassica napus* under copper and chromium stress[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019: 117–118.
- [43] NAVABPOUR S, YAMCHI A, BAGHERIKIA S, et al. Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(4): 793–802.
- [44] ZHAO H J, WU L Q, CHAI T Y, et al. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(13): 1243–1252.