

AMP 对铝胁迫诱导丹波黑大豆柠檬酸分泌及其铝耐受性的影响

郭传龙,赵 艳,武孔焕,李昆志,陈丽梅

(昆明理工大学 生命科学与技术学院生物工程技术研究中心,云南 昆明 650500)

摘要:为了考察 AMP(Adenosine 5'-monophosphate)对铝耐受型丹波黑大豆(RB)柠檬酸的分泌及铝抗性的影响,在 50 mmol·L⁻¹ 铝溶液中添加 100 mmol·L⁻¹ AMP 共处理 RB,结果表明 RB 根的相对生长率显著小于单独用 50 mmol·L⁻¹ 铝胁迫处理的植株。免疫共沉淀分析显示铝胁迫下 AMP 的存在降低 RB 根中 14-3-3 蛋白与磷酸化质膜 H⁺-ATP 酶的相互作用,使根尖质膜 H⁺-ATP 酶活性降低约 1 倍,氢泵活性和 H⁺ 分泌能力显著降低,根柠檬酸的分泌量减少约 1 倍。说明铝胁迫下 AMP 通过抑制 14-3-3 蛋白和质膜 H⁺-ATP 酶的互作来减少 RB 根尖的氢泵活性和柠檬酸分泌作用,从而降低 RB 根的相对生长率及其对铝胁迫的耐受性。

关键词:铝胁迫;丹波黑大豆;铝诱导的柠檬酸分泌;14-3-3 蛋白;质膜 H⁺-ATP 酶

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.01.0082

Effects of AMP on the Al-induced Citrate Exudation and Al-resistance of Tamba Black Soybean

GUO Chuan-long, ZHAO Yan, WU Kong-huan, LI Kun-zhi, CHEN Li-mei

(Biotechnology Research Centre, Faculty of Life Science and Biotechnology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: To investigate the effect of Adenosine 5'-monophosphate (AMP) on the citrate secretion and Al-resistance of Al-resistant Tamba black soybean (RB). RB was cotreated with AMP and 50 mmol·L⁻¹ Al. The results showed that the relate root growth rate of RB co-treated with 100 mmol·L⁻¹ AMP and 50 mmol·L⁻¹ Al for 8 h was significantly lower than that of the plants treated with 50 mmol·L⁻¹ Al alone. Co-immunoprecipitation showed that the presence of AMP under Al stress decreased the Al-enhanced interaction of PM H⁺-ATPase and 14-3-3 protein in root tips of RB, which reduced PM H⁺-ATPase activity by approximately 1-fold and thereby led to a significant decrease in H⁺ efflux and citrate secretion (approximately 1-fold) in RB roots. Those results indicated that AMP decreases H⁺ activity and citrate exudation in RB *via* its inhibition on the interaction between 14-3-3 protein and PM H⁺-ATPase under Al stress, thereby reducing the relate root growth rate of RB and its Al-tolerance.

Keywords: Al stress; Al resistant black soybean; 14-3-3 protein; Plasma membrane H⁺-ATPase; Adenosine 5'-monophosphate

铝毒是酸性土壤中影响植物生长和作物产量的主要限制因素,主要体现在抑制植物根的生长和发育,从而影响植物根系对水分和养分的吸收。铝诱导有机酸的分泌被认为是植物抗铝的主要机制^[1]。质膜 H⁺-ATP 酶是细胞膜上最丰富的蛋白质,有研究结果显示,铝毒和缺磷胁迫下植物根尖质膜 H⁺-ATP 酶活性与根系柠檬酸的分泌有关^[2],在铝胁迫下添加质膜 H⁺-ATP 酶的抑制剂钒酸盐(VA)可以显著降低大豆质膜 H⁺-ATP 酶的活性和根尖柠檬酸的分泌量^[3-4]。越来越多的研究结果证实 14-3-3 蛋白对植物质膜 H⁺-ATP 酶的活性有重要的调控作用,它通过与质膜 H⁺-ATP 酶的结合而增加其活性^[5]。在铝溶液中添加 14-3-3 蛋白与质膜 H⁺-ATP 酶结合的激活剂可增加大豆^[6]和蚕豆^[7]质膜

H⁺-ATP 酶活性和柠檬酸的分泌量。

体外实验研究表明腺苷-5'-单磷酸(Adeosine 5'-Monophosphate,AMP)能够抑制 14-3-3 蛋白与质膜 H⁺-ATP 酶的结合从而抑制质膜 H⁺-ATP 酶的活性,所以 AMP 可用作质膜 H⁺-ATP 酶的抑制剂。我们之前的研究结果显示铝胁迫能够增强铝耐受型丹波黑大豆 RB 根尖质膜 H⁺-ATP 酶的磷酸化及其与 14-3-3 蛋白的结合,从而提高质膜 H⁺-ATPase 的活性并增强根尖柠檬酸的分泌^[6]。为了考察 AMP 对铝耐受型丹波黑大豆(RB)柠檬酸的分泌及铝抗性的影响,本研究在铝胁迫下用 AMP 处理 RB,考察铝胁迫下 AMP 对 RB 根的相对生长率、根尖中 14-3-3 蛋白和质膜 H⁺-ATPase 的相互作用、根尖质膜 H⁺-ATPase 的活性、柠檬酸分泌作用及铝

耐受性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

铝耐受型丹波黑大豆(RB)种子在恒温(25℃)黑暗的培养箱中浸种催芽,待种子长出 2~3 cm 根后转移到有针眼孔的薄泡沫板上,置于完全营养液中于温室中漂浮培养,每隔 1 d 更换一次培养液。

1.2 方法

1.2.1 RB 的 Al 胁迫和 AMP 处理 选取生长一致的 RB 幼苗,先用 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ (pH4.3)预处理过夜后分两组处理,其中一组用 0, 10, 50, 100 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的不同浓度的 AMP 分别处理 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h,作为单独的 AMP 处理组;另一组在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铝处理液中添加 0, 10, 50, 100 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 AMP 分别处理 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h,作为 Al + AMP 同时处理,以不添加铝和 AMP 处理作为对照。

1.2.2 相对根伸长量(RRG)的测定 铝对植物的毒害作用最典型的症状表现在对根伸长的抑制作用。因此通过测定根的伸长率来分析植物耐受铝毒的能力。每个不同处理时间点做 6 个重复,记录经 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 预处理过夜后处理前的根长,然后再分别记录每个处理时间点处理后的根长度。

相对根伸长率(%) = (处理后根长度 - 处理前得根长度) / (对照处理后的根长度 - 对照处理前的根长度) × 100。

1.2.3 质膜的分离 选取生长一致水培 14 d 的 RB 幼苗,先用 pH4.3 的 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 预处理过夜,然后分别置于 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AMP}$ (含有 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$)、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 加 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AMP}$ (含有 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$) 中处理 8 h,收集处理后的 RB 根尖。采用 Dextran (右旋糖苷) T500/PEG 3350 组成的两相法提取根尖组织质膜。

1.2.4 质膜纯度的检测和质膜 H^+ -ATPase 活性和 H^+ 泵活性的测定 H^+ -ATP 酶主要有 3 种类型:P 型(质膜)、V 型(液泡膜、内质网膜、高尔基体膜等)和 F 型(线粒体和叶绿体),其专一性抑制剂分别为 Na_3VO_4 、 KNO_3 和 NaN_3 ,根据 H^+ -ATP 酶对各专一性抑制剂的敏感性来检测所得分离质膜的纯度。使用 Bradford 的方法测定质膜蛋白的浓度,然后参照 Guo 等^[6]的方法测定质膜 H^+ -ATP 的活性,质膜 H^+ 泵活性的测定参照 Guo 等^[6]的方法。

1.2.5 免疫共沉淀(CO-IP)和 Western Blot 分析 用免疫共沉淀的方法分析 RB 根质膜 H^+ -ATP 酶与 14-3-3 蛋白的相互作用。在 $200 \mu\text{g}$ 质膜蛋白溶液中添加适量 Triton X-100 或 0.02% Brij (w/v),使原位膜翻转充分暴露 H^+ -ATP 酶蛋白的 C 末端,再加入特异性质膜 H^+ -ATP 酶磷酸化抗体(VHA2p)^[7] 及 protein A/G plus-agarose 沉淀相互结合的质膜 H^+ -ATP 酶与 14-3-3 蛋白,取适量沉淀蛋白于聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离沉淀蛋白。经过电转 PVDF 膜后,使用 VHA2p 抗体或大豆 14-3-3 蛋白抗体作一抗进行 Western Blot 分析,加入二抗观察结果。

1.2.6 根柠檬酸分泌量的测定 RB 的根用 1.4 的方法处理后,收集含有根系分泌物的处理液,将处理液真空干燥后溶解于蒸馏水中,用滤器过滤后使用 HPLC 法测定柠檬酸的含量^[6]。柠檬酸的含量根据标准曲线计算。

1.3 数据分析

各项生理指标的检测均进行 3 次生物学重复,采用统计学分析软件 SPSS16.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计学分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

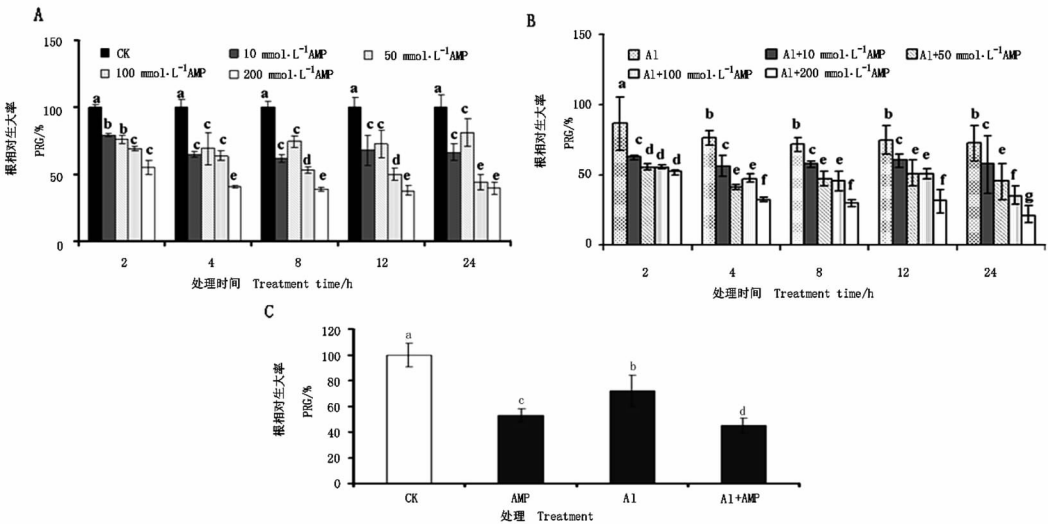
2.1 铝胁迫下添加 AMP 对 RB 根相对生长量的影响

由图 1A 可知,在没有铝胁迫条件下,低浓度(10 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 AMP 处理对 RB 根的生长有微弱的抑制作用,且这两个浓度抑制生长的效果类似,与对照相比,在每个时间点对 RB 根生长的抑制效率大约为 30% 左右。高浓度(100 和 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 AMP 处理对 RB 根生长的抑制作用较为明显,随着处理时间的增加,100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AMP 处理对 RB 根的生长抑制作用呈现增强的趋势,在 2~4 h 内,RB 根的生长大约被抑制 35%,在处理 8~12 h 内 RB 根的生长被抑制 50% 左右,在 AMP 处理 24 h 时,RB 根的生长被抑制 60%;当 AMP 的处理浓度达到 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,处理 2 h 时 RB 根的生长被抑制 50% 左右,而后随着处理时间的增加抑制作用更为明显,在处理 4~24 h 内,AMP 对 RB 根的生长抑制作用趋于稳定状态,根的生长大约被抑制 65%。

由图 1B 可知,在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铝胁迫下随着处理时间的增加根的相对生长量呈现出微弱的下降趋势,在 Al 处理 2~24 h 时根的生长大约被抑制 30% 左右。在铝胁迫的同时添加不同浓度的 AMP 处理不同时间后,RB 根 RRG 的变化模式与单独的 AMP 处理一致,但 Al 和 AMP 同时处理后对 RB 根生长的抑制作用更为严重,在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Al 胁迫

下,添加 10 和 50 mmol · L⁻¹ 的 AMP 处理时, RB 根的生长大约被抑制 40%; 添加 100 mmol · L⁻¹ 的 AMP 在处理时间为 2 h 时根的 RRG 为 53%, 在 2 ~ 12 h 时期内 RB 根的 RRG 大约降低至 50% 左右, 当处理时间达到 24 h 时, RB 根的 RRG 大约为 30% ;

添加 200 mmol · L⁻¹ 的 AMP 时, 随着处理时间的增加 AMP 对 RB 根生长抑制作用增强, 在 4 ~ 24 h 内 RB 根的生长大约被抑制 70% 。 这些结果说明 AMP 的存在降低了 RB 对铝胁迫的耐受性。



A:不同浓度 AMP 对 RB 的 RRG 的影响;B:在 50 mmol · L⁻¹ 铝胁迫下添加不同浓度的 AMP 对 RB 的 RRG 的影响;C:在 50 mmol · L⁻¹ 铝胁迫添加 100 mmol · L⁻¹ 的 AMP 处理 8 h 后 RB 的 RRG 变化。

A: Effect of different content of AMP on RRG of RB; B: Effect of different content of AMP with on RRG of RB; C: Change of RRG of RB treated with 100 mmol · L⁻¹ AMP and 50 mmol · L⁻¹ Al stress for 8 hours.

图 1 在无铝和铝胁迫下添加 AMP 对 RB 根的相对生长率(RRG)影响

Fig. 1 Effects of AMP application on the RRG of RB roots under Al stress and non - Al stress

以上的结果说明低浓度(10 和 50 mmol · L⁻¹) 的 AMP 处理对 RB 根生长的抑制效果不显著,当 AMP 浓度增加到 100 ~ 200 mmol · L⁻¹ 以上时对 RB 根生长的抑制作用才比较明显(达到 50% ~ 65%), 并且在整个处理时期(2 ~ 24 h) 内的抑制效果类似。在 50 mmol · L⁻¹ 的 Al 胁迫下添加 AMP 同时处理对 RB 根生长的抑制效果更为明显, 因为 100 mmol · L⁻¹ 的 AMP 处理 8 h 时就能产生稳定的抑制效果,故后续试验中 AMP 的浓度为 100 mmol · L⁻¹, 处理时间为 8 h。由图 1C 在无铝和有铝胁迫下添加 100 mmol · L⁻¹ 的 AMP 处理 8 h 后 RB 根 RRG 的变化可知,单独的 AMP 处理 8 h 后 RB 根的生长大约被抑制 50%, 50 mmol · L⁻¹ 的 Al 单独胁迫处理 8 h 时 RB 根的生长被抑制 30%, 在 Al 胁迫下添加 AMP 处理 8 h 时对 RB 根生长的抑制增加至 60%。

2.2 铝胁迫下添加 AMP 对 RB 根尖质膜 H⁺ - ATP 酶与 14 - 3 - 3 蛋白互作及其活性的影响

用磷酸化质膜 H⁺ - ATP 酶抗体做 Co - IP 分析 50 mmol · L⁻¹ 铝胁迫下添加 100 mmol · L⁻¹ AMP 处理 RB 根 8 h 后质膜 H⁺ - ATP 酶的磷酸化水平及与之结合的 14 - 3 - 3 蛋白量的变化(图 2A)。结果说明与对照 CK 相比, RB 经铝胁迫处理后质膜 H⁺ - ATP 酶磷酸化水平显著增高(图 2A), 结合的

14 - 3 - 3 蛋白量增加(32%) (图 2B); 而 RB 经 AMP 处理后质膜 H⁺ - ATPase 磷酸化水平显著下降, 结合的 14 - 3 - 3 蛋白量也减少(16%) (图 2B); 用铝和 AMP 同时处理 RB 时, 根尖质膜 H⁺ - ATP 酶的磷酸化水平下降至低于对照的水平(图 2A), 且与之结合的 14 - 3 - 3 蛋白量也显著降低至低于对照的水平, 说明铝胁迫下添加 AMP 降低铝对质膜 H⁺ - ATP 与 14 - 3 - 3 蛋白互作的诱导作用。

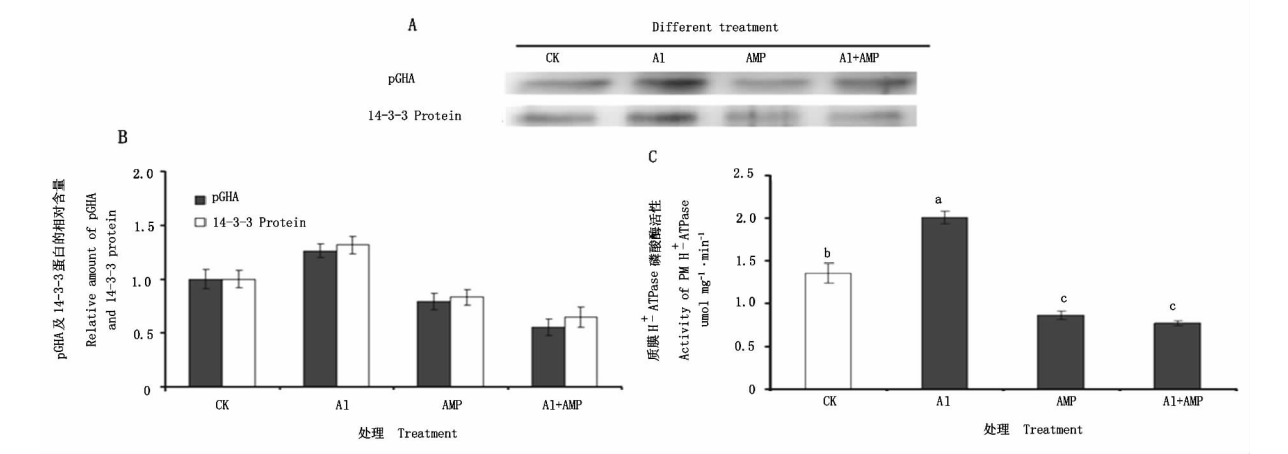
对 50 mmol · L⁻¹ 铝胁迫下添加 100 mmol · L⁻¹ 的 AMP 处理 RB 根 8 h 后根尖质膜 H⁺ - ATP 酶的活性(图 2C) 进行研究, 结果表明: RB 根尖质膜 H⁺ - ATP 酶的活性变化与质膜 H⁺ - ATPase 磷酸化水平变化一致, 与 CK 相比, 单独的铝胁迫处理使 RB 根尖质膜 H⁺ - ATP 酶的活性提高 50%; AMP 单独处理后 RB 根尖质膜 H⁺ - ATP 酶活性降低 34.4%; Al 和酶 AMP 同时处理后其活性降低 43.7%, 说明铝胁迫下添加 AMP 降低铝对质膜 H⁺ - ATP 酶活性的诱导作用。

2.3 铝胁迫下添加 AMP 对 RB 根尖质膜 H⁺ 泵活性和柠檬酸分泌的影响

在 50 mmol · L⁻¹ 铝胁迫下添加 100 mmol · L⁻¹ AMP 处理 RB 根 8 h 后根尖的 H⁺ 泵活性(图 3A) 及 H⁺ 分泌作用(图 3B) 结果表明: 与对照 CK 相比,

铝胁迫处理(+ Al)使 RB 根尖的 H⁺ 泵活性显著提高至对照的 157.9%。在溴甲酚酯染色实验中,RB 根周围黄色比 CK 的重,说明铝诱导 RB 的 H⁺ 外排作用。在铝胁迫处理时添加 AMP 下(Al + AMP)使 RB 根尖的 H⁺ 泵活性降低至对照的 39.5%,在溴甲酚酯染色实验中也观察相应的变化,RB 根周围黄

色变浅,范围变小,说明铝胁迫下添加 AMP 抑制质膜 H⁺-ATP 酶的活性的同时也降低 RB 根尖的氢泵活性及 H⁺ 分泌作用。在质膜提取液中加入短杆菌肽后显著消除了 H⁺ 泵的活性,这证实所提取的质膜纯度比较高,能够用于 H⁺ 泵活性的分析。

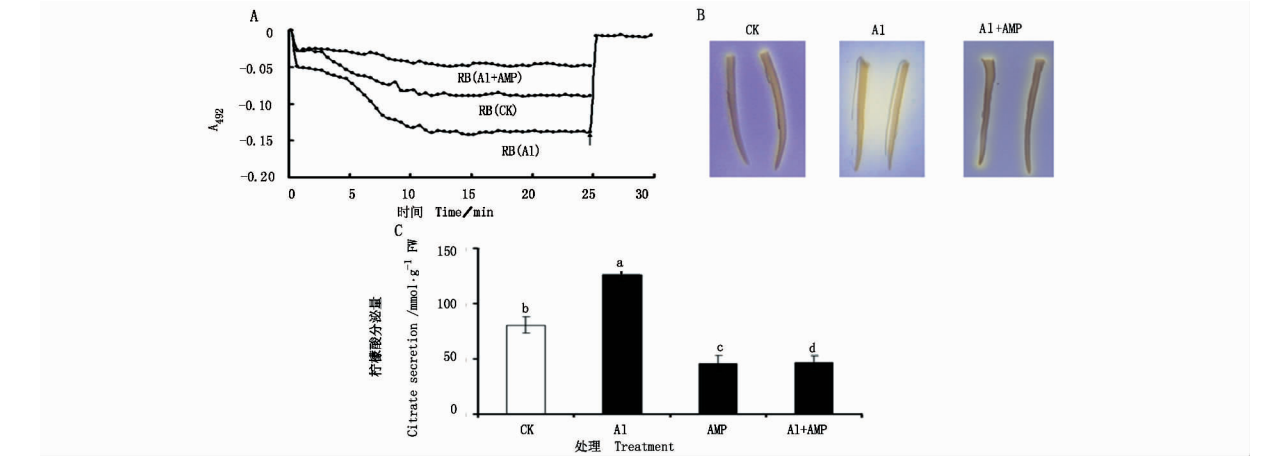


A: 在 50 μmol · L⁻¹ 铝胁迫处理下添加 100 μmol · L⁻¹ 的 AMP 处理 8 h 后根尖质膜 H⁺-ATP 酶的磷酸化水平变化;(B)质膜 H⁺-ATP 和 14-3-3 蛋白互作的相对定量;(C)质膜 H⁺-ATPase 活性。

A: Change of PM H⁺-ATPase in root tips of RB treated with 50 μmol · L⁻¹ Al and 100 μmol · L⁻¹ AMP for 8 hours;B: Relative amount of pGHA and 14-3-3 protein; C: Activity of PM H⁺-ATPase.

图 2 铝胁迫下添加 AMP 对 RB 质膜 H⁺-ATP 酶磷酸化及其活性的影响

Fig. 2 Effects of AMP application on the interaction between PM H⁺-ATPase and 14-3-3 protein, and activity of PM H⁺-ATPase in root tips of RB under Al stress and non-Al stress



A:RB 根尖 H⁺ 泵活性;B:H⁺ 分泌的溴甲酚酯染色;C:RB 根柠檬酸分泌水平。

A:Root tip H⁺ activity; B:Bromocresol ester dyeing; C: Citrate secretion level of RB root.

图 3 铝胁迫下添加 AMP 对 RB 根尖 H⁺ 泵活性和 H⁺ 分泌的影响

Fig. 3 Effects of AMP application on H⁺ pump activity, H⁺ efflux, and citrate secretion in RB under Al stress and non-Al stress

对 RB 根柠檬酸分泌的检测结果表明柠檬酸分泌量的变化(图 3C)与质膜 H⁺-ATP 酶的活性一致,RB 经铝处理后柠檬酸的分泌量大约是 CK 的 1.6 倍,AMP 单独处理后其柠檬酸的分泌量仅达到 CK 的 56%。Al 和 AMP 的同时处理使 RB 根柠檬酸的分泌量降低为 CK 的 60%,说明铝胁迫下添加

AMP 降低质膜 H⁺-ATP 酶的活性的同时导致 RB 根柠檬酸分泌水平下降。

3 结论与讨论

在 14-3-3 蛋白的第 4 个和第 5 个螺旋中有

AMP 的结合位点^[8],因此 AMP 是 14-3-3 蛋白的一个普遍调控因子。有 AMP 结构的类似物 ARCIR 可以穿过细胞膜被吸收进入细胞内,具有 AMP 的功效^[89]。Paul 等^[10]的研究表明 ARCIR(5- aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside monophosphate)在体内环境中能与 14-3-3 蛋白结合,因而能抑制 14-3-3 蛋白与靶蛋白的结合。体内和体外实验结果说明 AMP 抑制 14-3-3 蛋白与质膜 H⁺-ATPase C 末端的结合。虽然还没有研究报道 AMP 处理是否抑制植物细胞的生长或伸长,但 Zhao 等^[11]的研究说明转基因烟草中质膜 H⁺-ATP 酶的共抑制表达影响转基因植物的生长,PMA4 是烟草中表达最广泛的质膜 H⁺-ATP 酶亚型,其表达被抑制后转基因植物气孔开度减少,光合作用水平下降,生长受抑制,植株矮小,因此不难理解本研究观察到 AMP 处理抑制 RB 根的生长作用。AMP 的作用效果与质膜 H⁺-ATP 酶的共抑制表达相似。铝胁迫增加 RB 根中质膜 H⁺-ATP 酶与 14-3-3 的结合^[6],在铝胁迫下添加 AMP 减少二者的结合,降低铝对质膜 H⁺-ATP 酶与 14-3-3 互作的诱导作用,从而抑制 RB 根的生长作用,使 RRG 下降,耐铝能力减弱。由于 AMP 是细胞的正常代谢中间产物,在细胞内可被代谢,因此需要较高的浓度其作用效果才较显著,低浓度时其作用效果很小。

VA 因为可以和 ATP 竞争结合质膜 H⁺-ATP 酶的催化位点,所以也是质膜 H⁺-ATP 酶的一种抑制剂,铝胁迫下添加 VA 的处理显著降低质膜 H⁺-ATP 酶的活性,因此也降低大豆柠檬酸的分泌作用^[3],在磷缺乏条件下 VA 的存在也降低白羽扇豆羽根质膜 H⁺-ATPase 的活性和柠檬酸分泌量^[12-13]。AMP 因为具有 14-3-3 蛋白的结合位点,所以可以抑制 14-3-3 蛋白与质膜 H⁺-ATP 酶的相互作用,从而降低质膜 H⁺-ATP 酶的活性,本研究结果证实 AMP 的添加确实降低了无铝条件下 RB 根中 14-3-3 蛋白与质膜 H⁺-ATP 酶的结合及质膜 H⁺-ATP 酶的活性,抵消铝胁迫对 14-3-3 蛋白与质膜 H⁺-ATP 酶互作的诱导,减少质膜 H⁺-ATP 酶的活性和质子的外排作用及柠檬酸的分泌作用,可见 AMP 虽然与 VA 作用机制不同,但都有相似的作用效果。

参考文献

[1] Ma J F, Furukawa J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: A minireview [J]. Journal of In-

organic Biochemistry, 2003, 97:46-51.

- [2] Ohno T, Koyama H, Hara T. Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion [J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44 (2):156-162.
- [3] Shen H, He L, Sasaki T, et al. Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress: Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation, of plasma membrane H⁺-ATPase [J]. Plant Physiology, 2005, 138:287-296.
- [4] Kim Y S, Park W, Nian H, et al. Aluminum tolerance associated with enhancement of plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex of soybean [J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2010, 56 (1):140-149.
- [5] Sehnke P C, DeLille J M, Ferl R J. Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity [J]. Plant Cell, 2002, 14 (Sup.): 339-354.
- [6] Guo C L, Chen Q, Chen X Q, et al. Al-enhanced expression and interaction of 14-3-3 protein and plasma membrane H⁺-ATPase is related to Al-induced citrate secretion in an Al-resistant black soybean [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31 (4) DOI:10.1007/s11105-013-0569-0.
- [7] Chen Q, Guo C L, Wang P, et al. Up-regulation and interaction of the plasma membrane H⁺-ATPase and the 14-3-3 protein are involved in the regulation of citrate exudation from the broad bean (*Vicia faba* L.) under Al stress [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 70:504-511.
- [8] Camoni L, Visconti S, Marra M, et al. Adenosine 5'-Monophosphate inhibits the association of 14-3-3 protein with the plant plasma membrane H⁺-ATPase [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(34):31709-31712.
- [9] Toroser D, Athwal G S, Huber S C. Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins [J]. FEBS Letters, 1998, 435(1): 110-114.
- [10] Paul A L, Sehnke P C, Ferl R J. Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in *Arabidopsis* seems to be driven by client interactions [J]. Molecular Biology of the Cell, 2005, 16:1735-1743.
- [11] Zhao R, Dielen V, Kinet J M, et al. Cosuppression of a plasma membrane H⁺-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility [J]. Plant Cell, 2000, 12(4):535-546.
- [12] Ligaba A, Yamaguchi M, Shen H, et al. Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H⁺-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus pilosus*) [J]. Function Plant Biology, 2004, 31(11):1075-1083.
- [13] Ma gorzata J R. Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses [M]//Shanker A, Venkateswarlu B. Abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives. Rijeka, Croatia: InTech, 2011, 197-218.