

宝山堇菜 Pb 耐性相关基因筛选及表达特性*

邓冬梅¹, 艾红霞², 邓金川², 廖斌²

(1. 广西科技大学生物与化学工程学院//广西糖资源绿色加工重点实验室,
广西柳州 545006;

2. 中山大学生态进化学院//生物防治国家重点实验室//广东植物资源重点实验室,
广东广州 510275)

摘要: Cd 超富集植物宝山堇菜 *Viola baoshannensis* 也有一定 Pb 耐性/富集能力, 为了解宝山堇菜对 Pb 的耐性/富集分子机制, 采用抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH), 筛选了宝山堇菜根在 Pb 诱导下差异表达的基因片段, 进而对与 Pb 耐性与富集相关的基因克隆片段 (expressed sequence tags, ESTs) 进行半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交验证。利用 SSH 方法, 从宝山堇菜根部获得 27 个在 Pb 胁迫下特异表达的无重复的有意义 EST 克隆片段。半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交进一步证实和 *Lycopersicon esculentum* 木葡聚糖内源转糖基酶 (xyloglucan endotransglycosylase, XTH) 基因、*Arabidopsis thaliana* GTP 结合蛋白基因 (GTP binding mRNA) 基因相似的 2 个克隆片段在宝山堇菜受 Pb 胁迫时, 为上调表达基因。可初步假设, Pb 胁迫下, 伴随有细胞壁的变化, GTP 结合蛋白可能参与宝山堇菜体内 Pb 胁迫信号的传导。

关键词: 超富集植物; 宝山堇菜; Pb; SSH

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2018) 01-0029-07

The screening and expression pattern analysis of lead tolerant related gene in *Viola baoshannensis*

DENG Dongmei, AI Hongxia, DENG Jinchuan, LIAO Bin

(1. College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi Key Laboratory of Green Processing of Sugar Resources, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, Guangdong Key Laboratory of Plant Resources, College of Ecology and Evolution, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *Viola baoshannensis*, an identified Cd hyperaccumulator can also tolerate and accumulate a certain amount of Pb. To understand the resistance/enrichment molecular mechanism of *Viola baoshannensis* to Pb, suppression subtractive hybridization (SSH) was performed to screen gene segments induced by Pb, and semi-quantitative RT-PCR along with Northern blotting was then used to verify the relationship between the screened expressed sequence tags (ESTs) and Pb tolerant/accumulation in *V. baoshannensis*. Twenty-seven different cDNA fragments were obtained via sequences analysis of cDNA inserts obtained from SSH subtractive cDNA library of *V. baoshannensis* roots. The results of both RT-PCR and Northern blot analysis showed that two cDNA fragments with high homology with xyloglucan endotransglycosylase (XTH) and GTP binding gene were up-regulated under Pb stress. It could be speculated that, in re-

* 收稿日期: 2017-04-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31570506, 31700470); 广西自然科学基金 (2017GXNSFBA198099); 广西重点实验室基金 (YB2014201, 2016TZYKF10)

作者简介: 邓冬梅 (1980 年生), 女; 研究方向: 超富集植物和环境微生物; E-mail: deng-dongmei@163.com

通信作者: 廖斌 (1969 年生), 女; 研究方向: 超富集机理; E-mail: liaobin2005@126.com

sponse to Pb stress, cell wall might have some changes and GTP binding protein might play a role in signal transduction.

Key words: hyperaccumulator; *Viola baoshanensis*; Pb; SSH

超富集植物 (hyperaccumulator) 是指能够超量吸收重金属 (或非金属) 并将其转运到地上部分贮藏起来的植物, 在重金属污染土壤的植物修复中有重要应用潜力^[1]。深刻探讨超富集植物对重金属的耐性和富集基因, 对进一步利用基因技术提高重金属污染土壤植物修复效率有重要意义^[2]。相对于其他重金属, 在分子水平上对 Pb 超富集机理的探索很少^[3]。

宝山堇菜 *Viola baoshanensis* 是我国发现的一种 Cd 超富集植物^[4-5], 也具有较强的 Pb 耐性和富集能力^[6], 因此, 宝山堇菜为重金属富集、耐性相关基因的研究提供了丰富的基因资源。但目前, 基本没有在分子水平上对宝山堇菜的 Pb 超富集机理的探索。

就发现与某一性状相关基因的方法来讲, 抑制差减杂交 (SSH) 被认为是一种较为适合的技术, 可在转录水平上发现两材料间差异表达的基因^[7]。据此, 本研究利用 SSH 技术筛选宝山堇菜根在 Pb 胁迫下特异表达的 EST (Expressed Sequence Tags) 基因克隆片段, 并选择部分克隆片段分别进行半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交分析验证其表达特征, 为从分子水平揭示宝山堇菜对 Pb 的耐性和富集机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以组织培养获得的无菌宝山堇菜为材料, 选取大小一致, 根系发达的无菌苗, 流水洗去根表面琼脂, 于 1/2 Hogland 营养液中培养 2 周后用于后续实验。

1.2 宝山堇菜 SSH 文库构建

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 对预培养 2 周的宝山堇菜进行 300 $\mu\text{mol/L}$ Pb (NO_3)₂ 处理, 并设立不加 Pb 的对照处理。处理 2 d 后, 用 Trizol 方法提取两个处理宝山堇菜根中的 RNA, 并利用 OligotexTM mRNA 纯化试剂盒 (QiaGen 公司) 分离 RNA 中的 mRNA, 利用 Super SMARTTM cDNA 反转录试剂盒 (Clontech 公司) 合成 cDNA, 并利用 QIAquick PCR Purification Kit (QiaGen 公司) 纯化合成的 cDNA。

1.2.2 SSH 差减杂交 以 Pb 处理的 cDNA 为 test-

er, 以不加 Pb 对照处理为 driver, 利用 PCR - Select cDNA Subtraction Kits (Clontech 公司) 构建 SSH 文库。首先对 tester 和 driver 进行 *RsaI* 酶切, 等分成两份, 分别连接上不同接头, 而 Driver cDNA 不连接头。连有不同接头的 Tester cDNA 分别与过量的 Driver cDNA 混合, 进行两次差减杂交。

1.2.3 差异 cDNA 文库建立及序列分析 以杂交产物为模板, 以接头 1 和 2R 设计的巢式引物为引物, 进行两次抑制 PCR。将 2 种杂交的 PCR 产物分别克隆至 pGEM - T vector (Promega 公司) 中, 建立差异 cDNA 文库。将有效克隆的菌液送去上海英竣公司测序, 得到每个克隆的 EST 序列, 所有的 ESTs 在 NCBI 的网站上 ([http // www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 进行比对。

1.3 宝山堇菜 Pb 特异表达基因检测

1.3.1 植物处理及 RNA 提取 对预培的宝山堇菜无菌苗分别进行不同浓度 (0、60、300、600 $\mu\text{mol/L}$ Pb (NO_3)₂, 处理 2 d) 和时间 (0、1、2、7 d, 处理浓度 300 $\mu\text{mol/L}$ Pb (NO_3)₂) 的 Pb 处理, 及不同胁迫处理 (300 $\mu\text{mol/L}$ CdSO₄, 100 mmol/L NaCl 和 $\varphi = 37\%$ 的 H₂O₂, 处理 1 d)。处理结束后, 利用 2.2 中方法提取各处理宝山堇菜根和叶片中 RNA。

表 1 PS10、PS13 号 EST 克隆片段及 18S rRNA RT-PCR 特异引物

Table 1 Primer sequences of RT-PCR of PS10, PS13 gene clone, and 18S rRNA

序列	5' - 3'
PS10	上游 TGCATTGGACGGTAGA
	下游 GAGGACTTGCCAAACAGAT
PS13	上游 CAACAGTCAATTCATCCCAGTC
	下游 AATGCAGCTCGTGCCAAAT
18S rRNA	上游 CTGGCACCAGACTTTCCTC
	下游 CTTCTAAGGAAGGCAGCAGG

1.3.2 半定量 PCR 利用 OmniscriptTM Reverse Transcriptase (QiaGen 公司) 合成 cDNA 第一链。以宝山堇菜体内 18S rRNA 扩增片断为内参。为研究 PS10 和 PS13 号 EST 克隆片段在宝山堇菜中的表达特性, 利用 Primer Premier 5 设计 18S rRNA 及 PS10 和 PS13 号 EST 克隆片段上下游扩增特异引物

(表 1), 并利用设计引物进行半定量 PCR。

反应体系 (25 μL) 包括: ExTaq 酶 mix 19 μL , cDNA 第一链模板 2.0 μL , 上下游引物各 2 μL 。PCR 温度程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 0.5 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 0.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 循环 28 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 样品进行 $w = 2\%$ 琼脂糖胶电泳, 目的条带与 18S rRNA 条带的强度比代表了目的基因的相对表达水平。

1.4 Northern 印迹转移

对 2.1 中提取的各处理的 RNA 进行 $w = 1.2\%$ 琼脂糖电泳, 电泳完毕后, 将 RNA 从凝胶转移到带正电的尼龙膜上, 并通过紫外交联固定于膜上。

提取需要检测的克隆片段的质粒 DNA, 然后采用 SSH 技术中的第一次 PCR 的程序进行扩增, PCR 产物纯化后作为探针模板。同时利用 Oligo-labelling Kit (TaKaRa 公司) 进行 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ dCTP 探针制备。将转接有 RNA 的尼龙膜在 42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 4 h 后, 加入 5 μL 已标记好的探针, 42 $^{\circ}\text{C}$ 下进一步杂交 16 h, 然后洗去未杂交探针, 压入磷屏进行放射自显影, 在台风 (Typhoon) 仪器上读取磷屏数据。

2 结果与讨论

2.1 RNA、cDNA 及文库质量检测

对照与 Pb 处理下宝山堇菜根中的 RNA 电泳可看到 28S rRNA 和 18S rRNA 的清晰条带, 无拖尾现象, 并且 28S rRNA 条带近乎是 18S rRNA 条带宽度的 2 倍, 另外看不到基因组 DNA 以及蛋白污染 (图 1), 说明提取的 RNA 质量较好, 无降解。

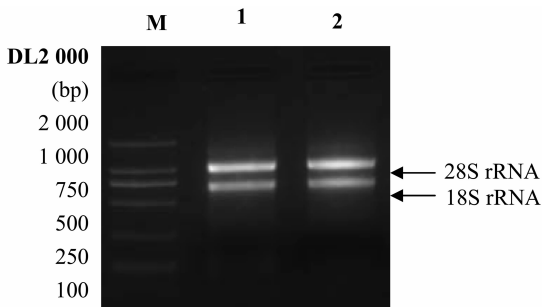


图 1 宝山堇菜对照和 300 $\mu\text{mol/L}$ Pb 处理根中总 RNA

1. CK; 2. 300 $\mu\text{mol/L}$ Pb^{2+}

Fig. 1 Total RNA of control and 300 $\mu\text{mol/L}$ Pb in *V. baoshanensis* root

1. CK; 2. 300 $\mu\text{mol/L}$ Pb^{2+}

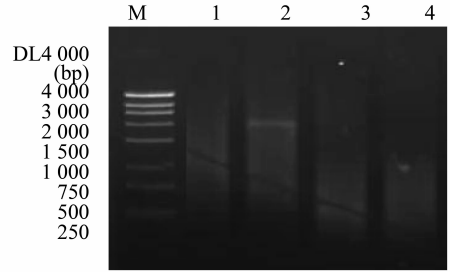


图 2 宝山堇菜 cDNA 合成及 *Rsa* I 酶切产物的电泳检测

Fig. 2 Double strand cDNA syntheses of *V. baoshanensis* and its *Rsa* I digestion

1 和 2 分别为对照和 Pb 处理的双链 cDNA; 3 和 4 分别为对照和 Pb 处理的酶切产物

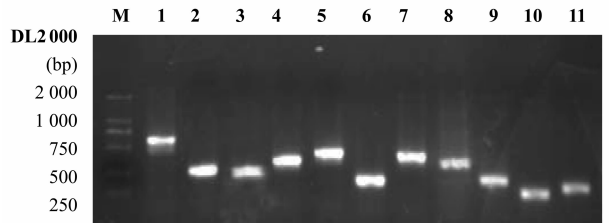


图 3 SSH 文库部分克隆质粒的 PCR 产物

Fig. 3 PCR detection of partial clone plasmid of SSH library 1 - 11; the PCR product of clone plasmid

宝山堇菜对照和 Pb 处理的双链 cDNA 分布在 0.2 ~ 2 kb 之间, 在 0.5 ~ 1 kb 之间的丰度较高, 说明双链 cDNA 的完整性有保证, 能充分代表 mRNA 在片段分布及丰度上的特点。而 *Rsa*I 酶切产物的分布范围为 0.1 ~ 1 kb, 最高丰度在 500 bp 左右, 分布范围明显缩小, 说明酶切效果明显 (图 2)。PCR 检测结果显示, 文库中绝大部分克隆含有插入片段, 片段大小介于 150 ~ 1 000 bp 之间, 平均的插入片段大小约 500 bp 左右 (图 3)。

2.2 EST 测序分析

检索结果显示随机测序的 140 个克隆代表 40 个独立片段, 片段大小在 120 ~ 890 bp 之间, 有 27 个独立片段与已知基因有同源性 (表 2), 它们在细胞生命活动过程中有着很广泛的作用, 根据其功能分为 5 类: ① 抗氧化酶类; ② 胁迫蛋白类; ③ 信号转导类; ④ 代谢相关; ⑤ 其它功能待确定 cDNA (表 2)。这些与 EST 克隆片段同源性较高的基因很多也为重金属胁迫、解毒相关基因, 如 IIB 型 Ca - ATP 酶 (type IIB calcium ATPase)^[8 - 9], 泛素延长蛋白 (ubiquitin extension protein)^[10 - 11], 金属硫蛋白基因 (putative metallothionein-like protein (Mt2) mRNA)^[12 - 13] 等, 另外还有一些与其他

胁迫相关的基因, 如: 琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase)^[14 - 15], 磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglyceromutase)^[16 - 17]。说明宝山莴菜对 Pb 胁迫

的响应也有很多胁迫相关基因表达, 且不是一个简单的调控过程, 而是一个整体层面的反应。

表 2 利用 SSH 技术筛选出的差异表达克隆在 GeneBank 中的核酸同源性比较结果

Table 2 Blastn results of the different expressed clones via SSH comparing with the genes in GeneBank

EST 序号	编码的同源蛋白	相似性	GeneBank 注册号 (E - 值) / 来源植物
抗氧化酶类			
PS1	oxidoreductase	44/49 (89%)	AK228425.1 (1e-05) / <i>A. thaliana</i>
PS2	mitochondrial peroxiredoxin	231/283 (81%)	AJ717306.1 (8e-33) / <i>Pisum sativum</i>
PS3	CHAPERONIN 20	52/59 (88%)	NM_122079.3 (4e-07) / <i>A. thaliana</i>
PS4	heat shock cognate protein (SCHSP70)	144/162 (88%)	AF002667.1 (5e-42) / <i>Solanum commersonii</i>
PS5	chaperonin precursor	131/146 (89%)	U21139.1 (1e-39) / <i>Pisum sativum</i>
防卫胁迫相关蛋白			
PS6	deltoides metallothionein 2a (MT2a)	41/42 (97%)	AF201384.1 (2e-10) / <i>Petunia hybrida</i>
PS7	ubiquitin extension protein	75/88 (85%)	DQ116441.1 (6e-10) / <i>Gossypium hirsutum</i>
PS8	type 2 metallothionein	42/45 (93%)	AJ628146.1 (7e-08) / <i>Posidonia oceanica</i>
PS9	membrane protein	109/131 (83%)	AY701397.1 (1e-13) / <i>Brassica juncea</i>
PS10	xyloglucan endotransglucosylase - hydrolase	49/53 (92%)	AY365421.1 (4e-10) / <i>Sesamum indicum</i>
PS11	type IIB calcium ATPase	90/107 (84%)	AY059633.1 (3e-11) / <i>Medicago truncatula</i>
胁迫信号转导相关蛋白			
PS12	ATPase	75/91 (82%)	NM_125214.4 (3e-04) / <i>A. thaliana</i>
PS13	GTP binding mRNA	90/107 (84%)	NM_121064.2 (3e-11) / <i>A. thaliana</i>
PS14	phosphoglyceromutase	128/146 (87%)	emb X70652.11 (2e-32) / <i>R. communis</i>
PS15	ACD11 (ACCELERATED CELL DEATH 11)	89/103 (86%)	NM_129023.3 (4e-16) / <i>A. thaliana</i>
PS16	Pti1 kinase - like protein	74/85 (87%)	AF249318.1 (1e-12) / <i>Glycine max</i>
代谢类			
PS17	strictosidine synthase	30/31 (96%)	AB182104.1 (6e-04) / <i>Silene latifolia</i>
PS18	threonine synthase	46/50 (92%)	NM_105939.3 (2e-08) / <i>A. thaliana</i>
PS19	putative succinate dehydrogenase	179/218 (82%)	AY063053.1 (6e-25) / <i>A. thaliana</i>
PS20	cationic amino acid transporter	55/62 (88%)	NM_112208.3 (1e-08) / <i>A. thaliana</i>
其他			
PS21	protein binding (AT2G18290) mRNA	57/67 (85%)	NM_127387.1 (6e-04) / <i>A. thaliana</i>
PS22	unknown protein (AT1G50040)	82/97 (84%)	NM_103892.2 (3e-10) / <i>A. thaliana</i>
PS23	hypothetical protein	81/90 (90%)	AJ311660.1 (1e-20) / <i>Gossypium hirsutum</i>
PS24	unknown protein (AT1G03140)	116/143 (81%)	NM_100196.2 (5e-09) / <i>A. thaliana</i>
PS25	autophagy protein 9	27/27, 100%	AM085516.1 (1e-04) / <i>Zea mays</i>
PS26	putative COX VIIa - like protein	37/41 (90%)	AY601870.1 (0.003) / <i>Utricularia subulata</i>
PS27	catalytic (AT4G24340) mRNA	38/41 (92%)	NM_118567.2 (2e-05) / <i>A. thaliana</i>

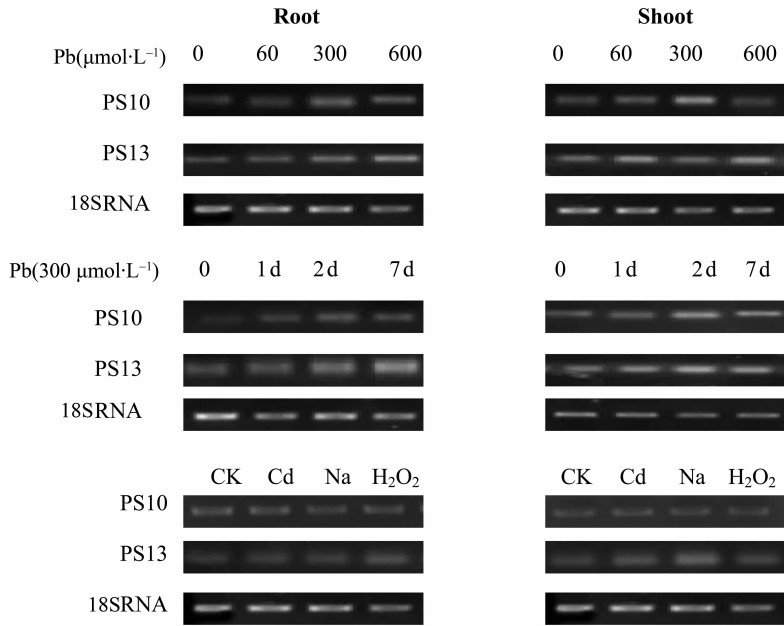


图 4 PS10 号和 PS13 号克隆的 RT-PCR 半定量分析
Fig. 4 RT-PCR analysis of the expression of the PS10 and PS13 clone

2.3 半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交分析

文库中和 *Sesamum indicum* 木质素转糖基酶 (xyloglucan endotransglycosylase, XTH) 基因同源的 PS10 号 EST 克隆片段在 Pb 胁迫下宝山堇菜根和叶中均属上调表达, 其表达量随胁迫浓度增加先升高, 在 300 μmol/L Pb 最高, 胁迫浓度继续升高时表达量略有下降, 此外该克隆片段表达量随胁迫时间的延长逐渐上升, 但对其他胁迫响应不太明显 (图 4, 图 5)。木质素转糖基酶催化木质素的水解, 受赤霉素 GA3 等植物激素调节, 在细胞壁延

伸和重建过程中起作用^[18]。在菟丝子侵染、干旱、低温和高盐胁迫和蚜虫噬咬下, 该基因都有表达^[19 - 20]。Krzesłowska 等^[21]研究表明细胞壁的增厚是很多植物对 Pb 胁迫的主要响应方式。拟南芥属、杂交白杨和浮萍等不同植物在收到 Pb 胁迫后都出现细胞壁的增厚, 以将更多的 Pb 固定在细胞壁上。宝山堇菜中, 木质素转糖基酶的上调表达是否和此过程相关需要进一步实验来解释。但木质素转糖基酶基因对其他胁迫没有明显响应说明不同植物对胁迫的响应机制是不相同的。

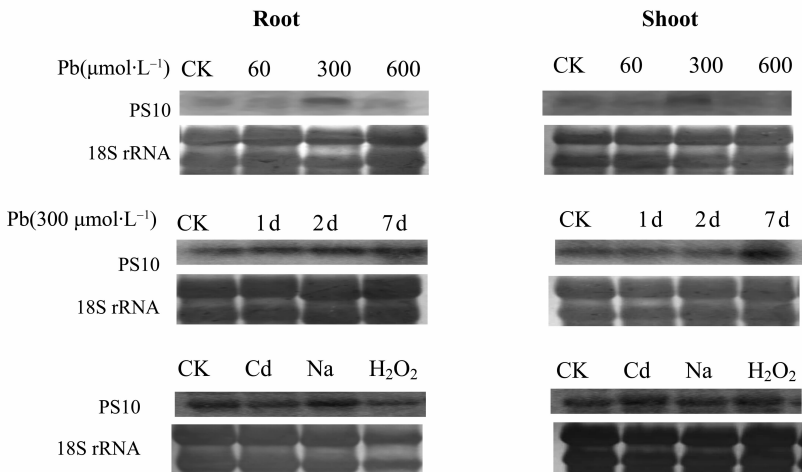


图 5 PS10 号克隆的 Northern 分析
Fig. 5 Northern hybridization of the PS10 clone

文库中 PS13 号克隆片段和 GTP 结合蛋白 (GTP binding mRNA) 同源性很高。GTP 结合蛋白可能在 Ca 离子, 茉莉酸 (JAs) 和水杨酸 (SA) 等介导的信号传导途径中起到重要的作用, 为细菌侵染和高温等胁迫下的响应基因^[22-23]。JAs 和 SA 介导的信号传递途径与植物抗性密切相关, 且 JAs 的积累也和重金属 Cu 和 Cd 的抗性有关^[24]。但 GTP 结合蛋白和 Pb 胁迫间的直接相关关系目前还没有报道。PS13 号 EST 克隆片段随 Pb 胁迫浓度的增加, 表达量逐渐增加, 在 600 $\mu\text{mol/L}$ Pb 时达到

最大。在叶中, 该片段表达量的变化和 Pb 胁迫浓度增加无明显关系。300 $\mu\text{mol/L}$ Pb 胁迫下, 随处理时间的延长, 宝山堇菜根和叶中该片段的表达量也逐步上升, 处理时间为 7 d 时表达量最大。对其他胁迫, 该片段在宝山堇菜根和叶中的变化基本不明显, Na 胁迫下, 在宝山堇菜叶中表达量略有增加 (图 4、图 6)。这说明, 宝山堇菜根中, Pb 胁迫下, GTP 结合蛋白基因可能是上调表达基因, GTP 结合蛋白可能参与 Pb 胁迫信号的传导, 其作用方式需进一步研究。

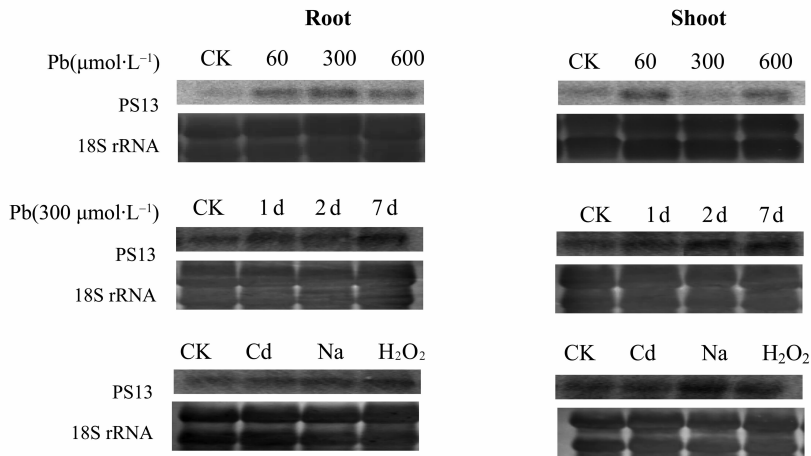


图 6 PS13 号克隆的 Northern 分析

Fig. 6 Northern hybridization of the PS13 clone

3 结 论

1) 利用 SSH 技术筛选得到 27 个在 Pb 胁迫下特异表达的 EST 基因克隆片段, 这些基因在植物体内执行多种功能, 说明宝山堇菜对 Pb 胁迫的响应是一个整体层面的灵敏反应。

2) 半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交分析表明, 与 GTP 结合蛋白、木葡聚糖内源转糖基酶基因相似性高的 2 个克隆片段在宝山堇菜根中为 Pb 胁迫上调表达基因。Pb 胁迫下, 木葡聚糖内源转糖基酶可能参与宝山堇菜在 Pb 胁迫下的生理调节反应, 而 GTP 结合蛋白可能直接参与宝山堇菜体内 Pb 胁迫信号的传导。

参考文献:

- [1] 徐在超, 史亚楠, 张仁铎, 等. 三株具重金属抗性油菜内生真菌对镉铅锌富集特性研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2016, 55: 153-160.
XU Z C, SHI Y N, ZHANG R T, et al. Bioaccumulation of Cd, Zn and Pb by three heavy metal-resistant endo-

- phytic fungi isolated from rapes [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2016, 55: 153-160.
[2] ALI H, KHAN E, SAJAD M A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications [J]. Chemosphere, 2013, 91: 869-881.
[3] VERBRUGGEN N, HERMANS C, SCHAT H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants [J]. The New phytologist, 2009, 181: 759-776.
[4] 束文圣, 刘威, 蓝崇钰. 湖南堇菜科一新种——宝山堇菜 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2003, 42: 118-119.
SHU W S, LIU W, LAN C Y. *Viola baoshanensis* Shu, Liu et Lan, a new species of Violaceae from Hunan Province, China [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2003, 42: 118-119.
[5] LIU W, SHU W S, LAN C Y. *Viola baoshanensis*, a plant that hyperaccumulates cadmium [J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49: 129-132.
[6] WU C, LIAO B, WANG S L, et al. Pb and Zn accumulation in a Cd-hyperaccumulator (*Viola baoshanensis*)

- [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2010, 12: 574 – 585.
- [7] 袁芳, 甄梓娟, 徐元江, 等. 西藏八角莲与桃儿七根及根茎 SSH 文库的建立 [J]. *西北植物学报*, 2016, 36: 467 – 471.
- YUANG F, ZHEN Z J, XU Y J, et al. Construction of suppression subtractive hybridization library from the root and rhizome of *Dysosma tasyuensis* Ying and *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36: 467 – 471.
- [8] HUDA K M K, YADAV S, BANU M S A, et al. Genome-wide analysis of plant-type II Ca²⁺ ATPases gene family from rice and *Arabidopsis*: potential role in abiotic stresses [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 65: 32 – 47.
- [9] MONS A. Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots [J]. *FEBS Letters*, 2003, 553: 370 – 376.
- [10] CHEN J, LI X, WANG D, et al. Identification and testing of reference genes for gene expression analysis in pollen of *Pyrus bretschneideri* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2015, 190: 43 – 56.
- [11] TSUI C, RAGURAJ A, PICKART C M. Ubiquitin binding site of the ubiquitin E2 variant (UEV) protein Mms2 is required for DNA damage tolerance in the yeast RAD6 pathway [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 19829 – 19835.
- [12] GALLEGO S M, PENA L B, BARCIA R A, et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2012, 83: 33 – 46.
- [13] ROOSENS N H, LEPLAE R, BERNARD C, et al. Variations in plant metallothioneins: the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a study case [J]. *Planta*, 2005, 222: 719 – 726.
- [14] ACEVEDO R M, MAIALE S J, PESSINO S C, et al. A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraguariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 65: 48 – 54.
- [15] VIVAS A, MARULANDA A, RUIZ-LOZANO J M, et al. Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress [J]. *Mycorrhiza*, 2003, 13: 249 – 256.
- [16] NIU X, XU J, CHEN T, et al. Proteomic changes in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves under salt stress [J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 91: 255 – 263.
- [17] COSTA V M, AMORIM M A, QUINTANILHA A, et al. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7 [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33: 1507 – 1515.
- [18] VISSENBERG K, VAN SANDT V, FRY S C, et al. Xyloglucan endotransglucosylase action is high in the root elongation zone and in the trichoblasts of all vascular plants from *Selaginella* to *Zea mays* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54: 335 – 344.
- [19] CHO S K, KIM J E, PARK J A, et al. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580: 3136 – 3144.
- [20] DIVOL F, VILAINE F, THIBIVILLIERS S, et al. Involvement of the xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery XTH1 and *Arabidopsis* XTH3 in the phloem response to aphids [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2007, 30: 187 – 201.
- [21] KRZESŁOWSKA M, RABĘDA I, BASIŃSKA A, et al. Pectinous cell wall thickenings formation-A common defense strategy of plants to cope with Pb [J]. *Environmental Pollution*, 2016, 214: 354 – 361.
- [22] MALY K, HECHENBERGER G, STRESE K, et al. Regulation of calcium signaling by the small GTP-binding proteins Ras and Rac1 [J]. *Advances in Enzyme Regulation*, 2007, 47: 169 – 183.
- [23] 霍冲, 安艳秋, 王凤涛, 等. 小麦小 GTP 结合蛋白基因 TaRop3 克隆及其表达分析 [J]. *植物保护学报*, 2013, 40: 488 – 494.
- HUO C, AN Y Q, WANG F T, et al. Cloning and expression analyses of the wheat gene *TaRop3* encoding a small GTP-binding protein [J]. *Acta Phytologica Sinica*, 2013, 40: 488 – 494.
- [24] MAKSYMIEC W, WIANOWSKA D, DAWIDOWICZ A L, et al. The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 1338 – 1346.