DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201408020
黄守程,刘爱荣,叶梅荣. 大豆 GmDnaJ1 蛋白对几种重金属胁迫的响应研究[J]. 广西植物,2015,35(2):288 - 294
Huang SC, Liu AR, Ye MR. Expression characterization of soybean GmDnaJ1 in response to heavy metal stresses[J]. Guihaia, 2015, 35(2):288 - 294

大豆 GmDnaJ1 蛋白对几种重金属胁迫的响应研究

黄守程, 刘爱荣*, 叶梅荣

(安徽科技学院 生命科学学院, 安徽 凤阳 233100)

摘 要: 通过对大豆铝胁迫下的转录组测序分析,发现一个差异表达的基因,其编码一个具有 101 个氨基酸残基的 DnaJ-like 分子伴侣蛋白-GmDnaJ1(*Glycine max* DnaJ1),等电点为 8.97;序列分析表明该蛋白具有典型的高度保守的 J domain 功能域,是一种类型 III 的 J 蛋白;通过对其序列的同源性及进化关系分析,推测该蛋白可能响应重金属胁迫。为进一步探究 GmDnaJ1 是否能够对重金属胁迫产生应答反应,试验分别以 0 或 100 μmol·L^{-1} Cu^{2+}、Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 溶液胁迫处理的不同时间(0、12、24、48 和 72 h)大豆根尖 RNA 为材料,通过实时定量 PCR 研究了该蛋白基因的表达特征。结果表明:与对照相比,*GmDnaJ1* 受 Cu、Pb 和 Cd 等重金属的诱导而强烈表达,呈现先升高后降低的趋势,其中 Pb、Cd 处理 24 h 后表达水平达到峰值,而 Cu 处理 48 h 后达到峰值;此外,*GmDnaJ1* 对 Cu、Pb 和 Cd 胁迫的响应程度也不同,表明该基因对这三种重金属的响应模式存在差异。根据以上研究结果,推测大豆 GmDnaJ1 蛋白不仅响应铝毒胁迫,而且可能在响应重金属胁迫方面具有重要的作用,参与了大豆对重金属毒害的抵抗。该结果为深入研究 *GmDnaJ1* 在重金属胁迫响应中的功能及其分子机制提供了一定的依据。

关键词: 大豆; DnaJ-like 蛋白; 重金属胁迫; 重金属响应; 分子伴侣
中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)02-0288-07

Expression characterization of soybean GmDnaJ1 in response to heavy metal stresses

HUANG Shou-Cheng, LIU Ai-Rong*, YE Mei-Rong

(*College of Life Sciences*, *Anhui Science and Technology University*, Fengyang 233100, China)

Abstract: Although necessarily contributing to regulating the activities of the proteins that involved in maintaining growth and development of living organisms, heavy metal elements, such as Cu, Pb and Cd, will become detrimental to plants at excess concentrations in the environment. However, plants can respond to and survive in heavy metal contaminated conditions through different strategies, among which arousing multiple heavy metal-related genes is very essential. Therefore, identification and functional analysis of crucial genes that associated with heavy metal response is of great importance in elucidating the plant tolerance mechanism and finally improving the resistance to heavy metal stress. DnaJ proteins, belonging to molecular chaperone family, were widely found to be very important in response to biotic and abiotic stresses. In the present study, we first identified an aluminum responsive gene, *GmDnaJ1*, (*Glycine max* DnaJ1) from soybean transcriptome sequencing data. Then we analyzed the sequence of this gene and found that it encoded a DnaJ-like protein, containing 101 amino acids with the isoelectric point of 8.97. By means of homogeneous analysis, we further

收稿日期: 2014-11-25 **修回日期:** 2015-03-17
基金项目: 安徽省自然科学基金(KJ2013080);安徽科技学院自然科学研究项目(ZRC2013372)。
作者简介: 黄守程(1980-),男,安徽六安人,硕士研究生,讲师,从事抗性生理及分子机制研究,(E-mail)huangsc@ahstu.edu.cn。
* **通讯作者:** 刘爱荣,教授,从事植物抗性生理研究,(E-mail)liuar@ahstu.edu.cn。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

revealed that GmDnaJ1 had the highly conserved J domain structure, which was the typical characteristics of type III DnaJ proteins. Phylogenetic analysis of *GmDnaJ*1 with other J proteins from different plant species implied that the protein probably exerted its role in response to heavy metal stress. In order to investigate the possible function of *GmDnaJ*1, we used pre-cultured and uniformly grown soybean seedlings and then treated with 0 or 100 μmol · L^{-1} Cu^{2+}, Pb^{2+} and Cd^{2+} solutions. The root tips of each sample were subsequently harvested at 0, 12, 24, 48 and 72 h, respectively. RNA were extracted and subjected to reverse transcription. After that, real time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to reveal the expression patterns of *GmDnaJ*1 under different heavy metal stresses for different times. The results indicated that comparing with the controls, *GmDnaJ*1 could be dramatically up-regulated by Cu, Pb and Cd stresses over time. The expression level of *GmDnaJ*1 increased at first and then decreased. We noticed that the peak of *GmDnaJ*1 expression appeared at 24 h after being treated with Pb or Cd solution, whereas the peak of the gene occurred at 48 h when the soybean suffered from Cu stress; Furthermore, we observed that the extent of *GmDnaJ*1 expression varied in response to different heavy metal elements, implying a possibility that *GmDnaJ*1 exhibited different response models when the plants suffered from different heavy metal stresses. The above results suggested that the soybean GmDnaJ1 not only involved in aluminum response, but also played an important role in response to heavy metal stresses, such as Cu, Pb and Cd, and probably participated in the resistance to heavy metal toxicity. The present findings will provide some experimental basis for the functional analysis of *GmDnaJ*1 and its molecular mechanism in response to heavy metal stress.

Key words: soybean; DnaJ-like protein; heavy metal stress; heavy metal response; molecular chaperone

重金属 Cd、Pb、Ag、As 等是植物非必需元素，较低的浓度下即对植物产生毒害作用，导致生长发育受抑甚至死亡（Gill，2014）；而有些重金属如 Cu、Zn 等作为酶的活化剂，对植物生长是必需的，但当浓度超过一定限度即损害植物的生长发育（Hall，2002）。重金属进入细胞内会导致蛋白质的结构破坏，活性丧失或影响细胞对其他营养元素的吸收（Van Asschee *et al.*，1990；Dennis *et al.*，1994）。重金属胁迫还导致 DNA 的断裂（葛才林等，2002）、抑制细胞分裂和维管束的形成等（Nilima *et al.*，2014）。Cu、Cd 和 Hg 抑制小麦种子萌发过程中淀粉酶的活性（葛才林等，2002），而 Cu、Zn 和 Cd 导致纤细角毛藻叶绿体荧光参数 Fv/Fm 和 Fv/Fo 下降，并显著降低叶绿素含量，导致光合作用受抑（梁英等，2008）。草坪植物早熟禾在 Cu、Zn、Cd 和 Pb 的胁迫下，表现出显著的根系生长受阻，生物量及叶绿素含量的下降（多立安等，2006）。富集 Pb 的蕨类植物在高浓度 Pb 胁迫下也表现出光合色素的下降（龚双姣等，2009）。此外，重金属胁迫还导致细胞膜系统和亚细胞结构的破坏（杨丹慧，1991；Mishra *et al.*，1999；韦江玲等，2014）。

植物在进化过程中产生多样化的对抗重金属胁迫的机制，外部机制包括细胞壁（Bringezu *et al.*，1999；刘清泉等，2014）和根系分泌物的排斥作用（Ma *et al.*，1997），内部机制包括活性氧介导的抗氧化酶保护作用（Zhang *et al.*，2007）、植物螯合肽（Phytochelatins）和金属硫蛋白（Metallothioneins）的螯合作用（Cobbett *et al.*，2002）、热激蛋白（heat shock proteins，HSPs）的保护作用（Lewis *et al.*，1999；Lewis *et al.*，2001；Kim *et al.*，2014）、液泡的区室化作用（Davies *et al.*，1992）以及有机酸和氨基酸的解毒作用等（Boominathan *et al.*，2003；Dresler *et al.*，2014）。

热激蛋白（heat-shock proteins，HSPs）是生物遭受胁迫（如干旱、低温、重金属离子等）之后大量产生的一类特殊蛋白质（Morimoto，1993）。DnaJ（HSP40）是最早在 *E. coli* 中发现的一种调节蛋白（Hartl *et al.*，1994），在动物、植物以及真菌中广泛存在与 DnaJ 功能相似的蛋白，称为 DnaJ-like 蛋白（Craig *et al.*，1993；Zhu *et al.*，1993；Kazutoyo，1997）。DnaJ-like 蛋白广泛分布于细胞内多个细胞器（Rajan *et al.*，2009），参与植物多种多样的胁迫应答反应，在植物的生物与非生物胁迫中具有非常重要的作用。如响应病原菌的侵染（Jelenska *et al.*，2007；Koramutla *et al.*，2014；Wang G *et al.*，2014）、增强植物对高温（Kong *et al.*，2014a，b）、干旱（Wang G *et al.*，2014；Wang X *et al.*，2014）、盐（Yang *et al.*，2010）以及重金属（Venkatachalam *et al.*，2009）胁迫的抗性等。但目前关于 DnaJ-like 蛋白在重金属胁迫中的研究较少。我们从大豆铝胁迫下的转录组鉴定出一个差异表达的编码 DnaJ-like 蛋白的基因，命名为 *GmDnaJ*1。我们通过实时定量

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

PCR(real time quantitative PCR,RT-qPCR)探讨了该基因在铜(Copper,Cu)、镉(Cadmium,Cd)、铅(Plumbum,Pb)胁迫的表达特征,以期为进一步研究DnaJ-like蛋白在重金属胁迫中的功能及抗性机制提供实验基础,并为增强植物在重金属胁迫环境下的抗性提供潜在的靶标。

1 材料与方法

1.1 材料准备与处理

选取大豆(*Glycine max*)品种BaXi10为材料。大豆种子经0.1%升汞消毒15 min后,至少用蒸馏水反复冲洗5次后置于装有珍珠岩培养盆中于25 ℃、黑暗中放置1 d;萌发后于生长室内培养2 d(日/夜温度为26 ℃/22 ℃,16 h/8 h光周期,光照强度400 μmol·m^{-1}·s^{-1},相对湿度70%),然后转入1/2 Hoagland营养液中培养4天,之后选取生长良好且一致的幼苗进行0 μmol·L^{-1} Al^{3+}(含100 μmol·L^{-1} $CaCl_2$,pH4.6)或50 μmol·L^{-1} Al^{3+}(含100 μmol·L^{-1} $CaCl_2$,pH4.6)处理,分别收集48 h的大豆根尖RNA用于转录组测序。另外,分别配制含有100 μmol·L^{-1}的$CdCl_2$、$CuSO_4$和$Pb(NO_3)_2$的Hoagland溶液,对预培养7 d的大豆幼苗进行根胁迫处理,再分别收集0、12、24、48和72 h根尖作为实验材料用于后续分析。

1.2 转录组测序

转录组测序由Hiseq2000平台进行,纯化并片段化mRNA后反转录合成双链cDNA,经处理后与接头连接,然后纯化并构建cDNA文库用于高通量测序。用RPKM(Reads Per Kilo bases per Million reads)值衡量基因在样本中的表达,用2-fold change和P-value进行表达差异判断。

1.3 序列比对及分析

根据基因的ID,从Ensembl Plants网站(http://plants.ensembl.org/index.html)获取目的基因编码蛋白的氨基酸序列号进行Blast比对(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi),根据比对结果,选取不同物种的相关基因序列,用DNAman软件进行多重序列比对,用MEGA6软件构建NJ(Neighbor-joining)进化树。

1.4 RT-qPCR表达验证

样品根尖总RNA提取用Trizol试剂盒(Takara)进行。根据Promega公司的反转录试剂盒用1 μg总RNA合成cDNA第一链。将cDNA稀释12倍作为模板备用。20 μL RT-qPCR反应体系如下:4 μL稀释的cDNA、3 μL 2 μmol·L^{-1}特异性引物和10 μL SYBR Green Real-time PCR Master Mix(Toyobo),反应在7300 Real Time PCR System(Applied Biosystems)上进行。程序如下:95 ℃预变性1 min,然后95 ℃15 s,55 ℃ 15 s和72 ℃ 45 s,共40个循环。每个样品做3个生物学重复和3个实验重复,以大豆看家基因*GAPDH*为内参基因,采用相对定量法对基因的表达模式进行分析,根据算式$2^{-[\Delta Ct(\text{specific gene})-\Delta Ct(\text{specific gene})\text{ the lowest level}]}$计算基因的相对表达量。所用引物如下:大豆*GmDnaJ1*基因(5′-GAAAGCTCAGCGAACCAATT-3′和5′-TTCCCATTTCCTTCCACTTC-3′)及大豆*GAPDH*基因(5′-TGGACACTGGAAGCATCACG-3′和5′-AACAGTCTTCTGGGTAGCGG-3′)。

1.5 数据处理与分析

数据处理、差异显著性检验(T检验,双尾,$\alpha=0.05$)采用GraphPad Prism 5专业软件进行,图表绘制采用Microsoft Excel 2010进行。

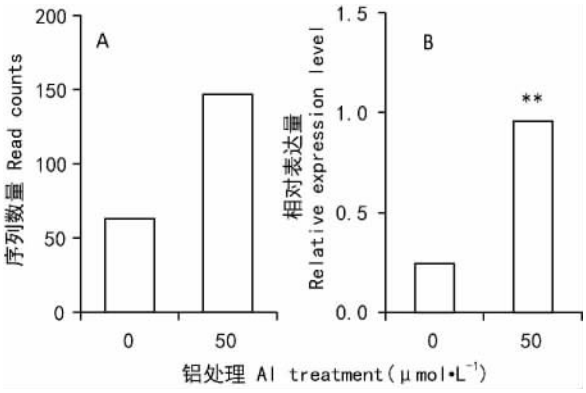

图1 *GmDnaJ1*在铝胁迫下的差异表达情况 **A.** 高通量测序结果; **B.** RT-qPCR结果 ** 表示处理组与对照组之间在$P<0.01$水平上差异显著。

Fig. 1 Differential expression of *GmDnaJ1* in response to Al stress **A.** High throughput sequencing results; **B.** RT-qPCR results ** on the graph indicate significant difference ($P<0.01$) between Al treated and Al free samples. Data are shown as mean ± SD ($n=3$).

2 结果与分析

2.1 *GmDnaJ1*基因差异表达分析

转录组测序结果显示*GmDnaJ1*在对照样品中

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

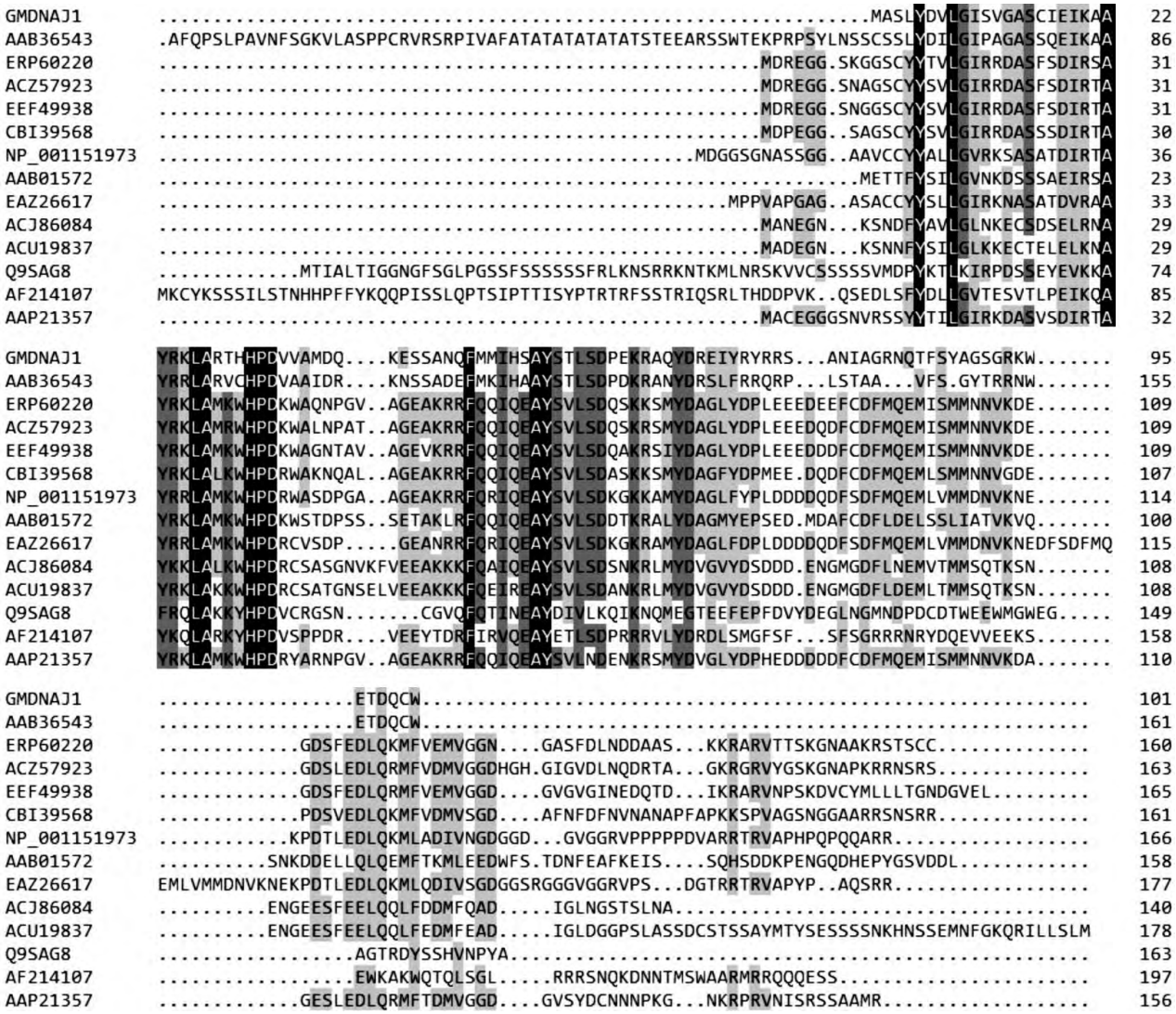

图 2　GmDnaJ1 与其他物种 DnaJ-like 蛋白氨基酸 N-末端同源性比对分析

Fig. 2　Alignment comparison of N-terminal region of the deduced amino acid sequences of *GmDnaJ*1 with the J proteins of other species

的 reads 数是 63.11，50 μmol · L^{-1} Al^{3+} 胁迫下的 reads 数是 146.77，Log2（fold-change）为 1.22，p 值为 0.038，表明该基因为差异表达的基因。RT-qPCR 进一步验证显示该基因在 Al 处理下表达上调 3.9 倍，表明 GmDnaJ1 可能参与大豆耐铝胁迫（图 1）。

2.2 多序列比对及进化树分析

序列分析发现 *GmDnaJ*1 的开放阅读框（ORF）包含 306 个核苷酸，编码一个具有 101 个氨基酸残基的多肽链，分子量为 11 556.0 Da，等电点为 8.97。如图 2 所示，GmDnaJ1 氨基酸序列与其他具有 N-末端的 DnaJ 蛋白的氨基酸序列进行了多重序列比对表明，该蛋白的 N-末端（4 ~ 72 aa）具有高度保守的 J domain，但没有典型的富含甘氨酸结构域（G/P domain）、Cys 区域（CRR domain），因此可以推断 GmDnaJ1 属于类型 III DnaJ 蛋白，即仅具有 J domain 而没有其他保守结构域。我们以多重序列的比对为基础进行进化树分析，聚类结果显示 GmDnaJ1 与 AAB36543 具有较高的同源性（62.9%），暗示其可能具有相似的功能（图 3）。Chai *et al.*（2000）研究发现芸豆（*Phaseolus vulgaris*）的一个 DnaJ-like 蛋白基因——*PvSR*6（AAB36543）受 Cu、Zn、Hg、Cd 和 As 等重金属的诱导而强烈表达。因此，我们推测 *GmDnaJ*1 可能也响应重金属的胁迫，参与胁迫应答。

2.3 Cu、Pb 和 Cd 胁迫下 *GmDnaJ*1 不同时间点的表达特征分析

为进一步探究 *GmDnaJ*1 对重金属胁迫的响应

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

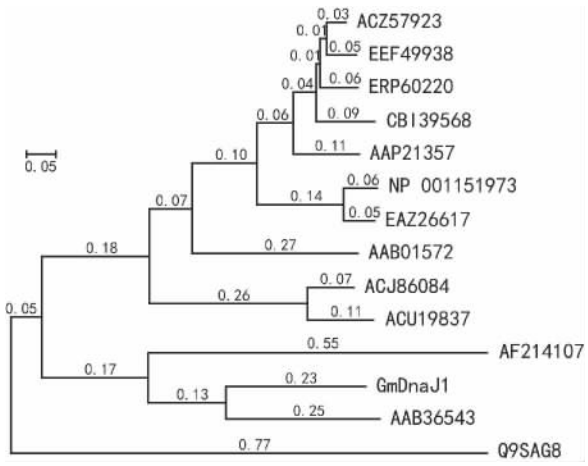

图 3 *GmDnaJ1* **与其他物种** J protein **的进化树分析**
芸豆(AAB36543)、**欧洲大叶杨**(ERP60220)、**大豆**(ACZ57923)、**蓖麻**(EEF49938)、**葡萄**(CBI39568)、**玉米**(NP_001151973)、**白云杉**(AAB01572)、**水稻**(EAZ26617)、**苜蓿**(ACJ86084)、**大豆**(ACU19837)、**拟南芥**(Q9SAG8)、**拟南芥**(AF214107)、**拟南芥**(AAP21357)。**线上数值代表分支长度**。

Fig. 3 Phylogenetic relationship of *GmDnaJ1* with other J-proteins *Phaseolus vulgaris* (AAB36543), *Populus trichocarpa* (ERP60220), *Glycine max* (ACZ57923), *Ricinus communis* (EEF49938), *Vitis vinifera* (CBI39568), *Zea mays* (NP_001151973), *Picea glauca* (AAB01572), *Oryza sativa Japonica* (EAZ26617), *Medicago truncatula* (ACJ86084), *Glycine max* (ACU19837), *Arabidopsis thaliana* (Q9SAG8), *Arabidopsis thaliana* (AF214107), *Arabidopsis thaliana* (AAP21357). The numbers on each line indicate length of the branch.

特征,我们用 RT-qPCR **分析了** 100 μmol·L^{-1} Cu、Pb **和** Cd **处理不同时间下的** *GmDnaJ1* **表达模式。如图** 4 **所示,在对照组中,** *GmDnaJ1* **表达量很低,而在不同的重金属胁迫下表达量均急剧上升,表明** *GmDnaJ1* **受** Cu、Pb **和** Cd **的诱导表达。我们发现在不同重金属处理后,** *GmDnaJ1* **的表达水平总体上呈现随时间先升高后降低的趋势,但在** Pb、Cd **处理** 24 h **后表达水平即达到峰值,而在** Cu **处理** 48 h **后其表达水平才达到峰值,表明** *GmDnaJ1* **虽对不同重金属胁迫有着相似的应答模式,但存在着响应时间的差异。此外,该基因对三种重金属的响应能力存在差异,其中** Cu **处理** 12、24、48 **和** 72h **后,其表达量分别是对照的** 61、83、140 **和** 88 **倍;**Pb **处理** 12、24、48 **和** 72 h **后,其表达量分别是对照的** 35、57、28 **和** 10 **倍;而** Cd **处理** 12、24、48 **和** 72 h **后,其表达量分别是对照的** 165、807、331 **和** 388 **倍。** *GmDnaJ1* **对持续的重金属胁迫的应答反应暗示着其可能参与了大豆对重金属胁迫的解毒作用。**

3 讨论与结论

现代工农业的飞速发展和随意排污导致了环境污染的加剧,其中重金属污染在我国较为严重。我国从 20 **世纪** 90 **年代开始探索土壤重金属污染的植物修复技术,并取得了一定成果(闫研等,**2008;**胡鹏杰等,**2014)。**阐明植物对重金属的抗性机制是培育超富集植物、提高植物在重金属环境中生长发育能力的重要理论基础,而与重金属胁迫应答相关基因的筛选、鉴定及功能分析是研究其分子机制的前提条件。**Zhen *et al.* (2007)**通过大豆蛋白质组学发现三个** DnaJ-like **蛋白受铝诱导而强烈表达,其中有两个蛋白是被新诱导表达,另一个蛋白在铝胁迫** 24、48 **和** 72 h **的表达量分别是对照的** 3.75、11.45 **和** 9.07 **倍。通过** cDNA **芯片方法分离铝胁迫下玉米根系的基因表达差异,也发现一个在玉米中差异表达的** DnaJ-like **蛋白(**Cancado *et al.*,2008)。

本文基于转录组高通量测序技术发现了一个受铝胁迫而显著上调表达的 DnaJ-like **蛋白基因** *GmDnaJ1*,**具有一个** 306 **核苷酸组成的开放阅读框(**Open Reading Frame,ORF),**编码** 101 **个氨基酸残基的** J **蛋白(**J protein),**包含一个高度保守的** J **结构域(**J domain)。**同源性分析表明该基因与芸豆(***Phaseolus vulgaris***)的一个** DnaJ-like **蛋白——**PvSR6 **具有较高的同源性,因** *PvSR6* **的表达受到重金属的强烈诱导(**Chai *et al.*,2000),**我们推测** *GmDnaJ1* **也响应重金属胁迫。**RT-qPCR **结果显示** *GmDnaJ1* **确能响应** Cu、Pb **和** Cd **等重金属的胁迫,在处理** 12、24、48 **和** 72 h **后呈现显著的上调表达模式,且均在处理后** 48 h **内达到表达峰值,表明** *GmDnaJ1* **能在短时间内迅速增强表达,以应对重金属导致的胁迫效应,这与** Chai *et al.* (2000)**的研究结果相似,但随着时间的持续,可能由于植物的毒害程度加剧,导致该基因的表达水平下降。从** *GmDnaJ1* **在不同重金属胁迫下的表达特征来看,我们推测该基因对这三种重金属的响应能力可能存在差异,表现为对** Cu **的耐受力较强,对** Pb **的耐受力次之,而对** Cd **的耐受力较弱。另外,** *GmDnaJ1* **在三种重金属胁迫下的表达量变化存在差异,推测可能是由于不同重金属产生的胁迫程度的差异所导致。**

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

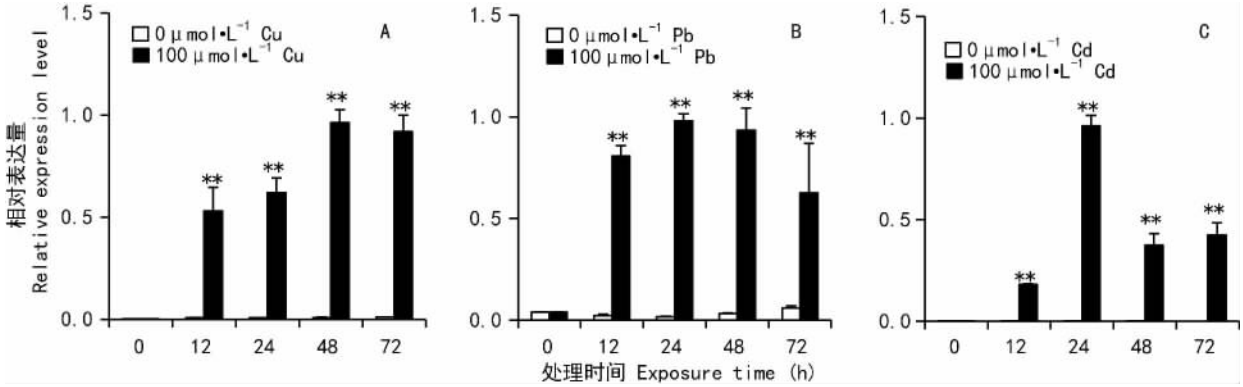

图 4　*GmDnaJ1* 在不同重金属胁迫下的表达模式　＊＊ 表示处理组与对照组之间在 $P<0.01$ 水平上差异显著。

Fig. 4　Expression patterns of *GmDnaJ1* under different heavy metals treatments　＊＊ on the graphs indicate significant difference ($P<0.01$) between Al treated and Al free samples. Data are shown as mean ± SD ($n=3$).

本文初步研究了大豆铝响应 DnaJ-like 蛋白基因—*GmDnaJ1* 对三种重金属(Cu、Pb 和 Cd)胁迫的响应特征，为深入理解重金属胁迫下分子伴侣的胁迫响应特征提供一定的理论依据，但其响应机制并不清楚；另外，该基因的诱导表达能否有效提高大豆对重金属胁迫的抵抗能力，仍需进一步研究。下一步工作将通过转基因过表达和 RNA 干扰(RNA interference，RNAi)等手段继续探究 GmDnaJ1 的功能及抗性机制。

参考文献：

Boominathan R，Doran PM. 2003. Organic acid complexation，heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species [J]. *J Biotechnol*，**101**(2)：131－146

Bringezu K，Lichtenberger O，Leopold I，*et al*. 1999. Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris* [J]. *J Plant Physiol*，**154**(4)：536－546

Cancado GMA，Nogueira FTS，Camargo SR. 2008. Gene expression profiling in Maize roots under aluminum stress [J]. *Biol Plant*，**52**(3)：475－485

Chai TY，Zhang YX，Zhao WM. 2000. Cloning of cDNA and expression analysis of a Dnaj-like gene under heavy metal stress in bean [J]. *Prog Nat Sci*，**10**(3)：198－205

Cobbett C，Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins：Roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. *Ann Rev Plant Biol*，**53**：159－182

Craig EA，Gambill BD，Nelson RJ. 1993. Heat shock proteins：Molecular chaperones of protein biogenesis [J]. *Microbiol Rev*，**57**(2)：402－414

Davies KL，Davies MS，Francis D. 1992. Zinc-induced vacuolation in root meristematic cells of cereals [J]. *Ann Bot*，**69**(1)：21－24

Dennis BL，Magaly R，Thomas WR，*et al*. 1994. Aluminum accumulation and associated effects on $^{15}NO_3^-$ influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance [J]. *Plant Soil*，**164**：291－297

Dresler S，Hanaka A，Bednarek W，*et al*. 2014. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of Zea mays plants treated with cadmium and copper [J]. *Acta Physiol Plant*，**36**(6)：1 565－1 575

Duo LA(多立安)，Gao YB(高玉葆)，Zhao SL(赵树兰). 2006. Growth responses of *Poapratensis* to the stress of four heavy metals (早熟禾对4种重金属胁迫生长响应特征) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报)，**26**(1)：183－187

Ge CL(葛才林)，Yang XY(杨小勇)，Sun JH(孙锦荷)，*et al*. 2002. Effect of heavy metal stress on the amylase activityin germinating rice seeds(重金属胁迫对水稻萌发种子淀粉酶活性的影响) [J]. *J NW A & F Univ*：*Nat Sci Ed*(西北农林科技大学学报·自然科学版)，**30**(3)：47－52

Ge CL(葛才林)，Yang XY(杨小勇)，Sun JH(孙锦荷)，*et al*. 2002. DNA damage caused by heavy metal stress in rice and wheat seedlings(重金属胁迫引起的水稻和小麦幼苗 DNA 损伤) [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报)，**28**(6)：419－424

Gill M. 2014. Heavy metal stress in plants：a review [J]. *Int J Adv Res*，**2**(6)：1 043－1 055

Gong SJ(龚双姣)，Ma TW(马陶武)，Jiang YF(姜业芳)，*et al*. 2009. Leaf cell damage and change of photosynthetic pigment contents induced by lead stress in three species of mosses(铅胁迫对3种藓类植物细胞伤害及光合色素含量的影响) [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报)，**29**(8)：1 630－1 636

Hartl FU，Hlodan R，Langer T. 1994. Molecular chaperones in protein folding：the art of avoiding sticky situations [J]. *Trends Biochem Sci*，**19**(1)：20－25

Jelenska J，Yao N，Vinatzer BA，*et al*. 2007. A J domain virulence effector of *pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses [J]. *Curr Biol*，**17**(6)：499－508

Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance [J]. *J Exp Bot*，**53**：1－11

Hu PJ(胡鹏杰)，Li Z(李柱)，Zhong DX(钟道旭)，*et al*. 2014. Research progress on the phytoextraction of heavy metal contaminated soils in China(我国土壤重金属污染植物吸取修复研究进展) [J]. *Chin Bull Bot*(植物生理学报)，**50**(5)：577－584

Kazutoyo T，Masaki K，Bernd B，*et al*. 1997. The human DnaJ homologue Dj2 facilitates mitochondrial protein import and luciferase refolding [J]. *J Cell Biol*，**139**：1 089－1 095

Kim BM，Rhee JS，Jeong CB，*et al*. 2014. Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein(HSP) modulation in the intertidal copepod *tigriopusjaponicus* [J]. *Comp Biochem Phys C*，**166**(0)：65－74

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Kong F, Deng Y, Wang G, *et al*. 2014a. LeCDj1, a chloroplast Dnaj protein, facilitates heat tolerance in transgenic tomatoes [J]. *J Integr Plant Biol*, **56**(1): 63 – 74

Kong F, Deng Y, Zhou B, *et al*. 2014b. A chloroplast-targeted Dnaj protein contributes to maintenance of photosystem II under chilling stress [J]. *J Exp Bot*, **65**(1): 143 – 158

Koramutla M, Kaur A, Negi M, *et al*. 2014. Elicitation of jasmonate-mediated host defense in *Brassica juncea* (L.) attenuates population growth of mustard aphid *Lipaphis erysimi* (kalt.) [J]. *Planta*, **240**(1): 177 – 194

Lewis S, Donkin ME, Depledge MH. 2001. Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors [J]. *Aquat Toxicol*, **51**(3): 277 – 291

Lewis S, Handy RD, Cordi B, *et al*. 1999. Stress proteins (HSPs): Methods of detection and their use as an environmental biomarker [J]. *Ecotoxicology*, **8**(5): 351 – 368

Liang Y (梁英), Wang S (王帅), Feng LX (冯力霞), *et al*. 2008. Effects of heavy metal stress on the growth and chlorophyll fluorescence of *Chaetocerosgracilis* (重金属胁迫对纤细角毛藻生长及叶绿素荧光特性的影响) [J]. *Period Ocean Univ Chin* (中国海洋大学学报), **38**(1): 59 – 67

Liu QQ (刘清泉), Chen YH (陈亚华), Shen ZG (沈振国), *et al*. 2014. Roles of cell wall in plant heavy metal tolerance (细胞壁在植物重金属耐性中的作用) [J]. *J Plant Physiol* (植物生理学报), **50**(5): 605 – 611

Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H, *et al*. 1997. Detoxifying aluminium with buckwheat [J]. *Nature*, **390**(6 660): 569 – 570

Mishra A, Choudhuri MA. 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice [J]. *Biol Plant*, **42**(3): 409 – 415

Morimoto RI. 1993. Cell in stress: Transcription activation of heat shock proteins [J]. *Science*, **259**: 1 409 – 1 410

Nilima K, Arunabha C, Pranab KB, *et al*. 2014. Response of fenugreek (*Trigonellafoenum graecum* L.) seedlings under moisture and heavy metal stress with special reference to antioxidant system [J]. *Afr J Biotechnol*, **13**(3): 434 – 440

Rajan VBV, D'Silva P. 2009. *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors [J]. *Funct Inte Genomic*, **9**(4): 433 – 446

Van Assche F, Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants [J]. *Plant Cell Environ*, **13**(3): 195 – 206

Venkatachalam P, Srivastava AK, Raghothama KG, *et al*. 2009. Genes induced in response to mercury-ion-exposure in heavy metal hyperaccumulator *Sesbania drummondii* [J]. *Environ Sci Technol*, **43**(3): 843 – 850

Wang G, Cai G, Kong F, *et al*. 2014. Overexpression of tomato chloroplast-targeted Dnaj protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiol Biochem*, **82**(0): 95 – 104

Wang X, Jia N, Zhao C, *et al*. 2014. Knockout of AtDjB1, a J-domain protein from *Arabidopsis thaliana*, alters plant responses to osmotic stress and abscisic acid [J]. *Physiol Plant*, **152**(2): 286 – 300

Wei JL (韦江玲), Pan LH (潘良浩), Chen YS (陈元松), *et al*. 2014. Physiological and ecological characteristics of *Cyperus malaccensis* to Cr^{6+} stress (重金属 Cr^{6+} 胁迫对茳芏生理生态特征的影响) [J]. *Guihaia* (广西植物), **34**(1): 89 – 94

Yang Y, Qin Y, Xie C, *et al*. 2010. The *Arabidopsis* chaperone J3 regulates the plasma membrane H^+-ATPase through interaction with the PKS5 kinase [J]. *Plant Cell*, **22**(4): 1 313 – 1 332

Yan Y (闫研), Li JP (李建平), Zhao ZG (赵志国), *et al*. 2008. Advances in the mechanisms of heavy metal tolerance and accumulation in hyperaccumualtors (超富集植物对重金属耐受和富集机制的研究进展) [J]. *Guihaia* (广西植物), **28**(4): 505 – 510

Yang DH (杨丹慧). 1991. The effects of heavy metal on the structure and function of photosynthetic membrane in higher plants (重金属离子对高等植物光合膜结构与功能的影响) [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **8**(8): 26 – 29

Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, *et al*. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) [J]. *Chemosphere*, **67**(1): 44 – 50

Zhen Y, Qi JL, Wang SS, *et al*. 2007. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean [J]. *Physiol Plant*, **131**(4): 542 – 554

Zhu JK, Shi J, Bressan RA, *et al*. 1993. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ [J]. *Plant Cell*, **5**(3): 341 – 349

(上接第 235 页 Continue from page 235)

[J]. *Acta Hortic Sin* (园艺学报), **39**(3): 469 – 476

Wang CG (王春国), Li H (李慧), Song WQ (宋文芹). 2006. Identification and analysis of the specific molecular marker associated with fertile maintenance of cytoplasmic male sterility cauliflower (细胞质雄性不育花椰菜保持系特异分子标记的鉴定及序列分析) [J]. *J Mol Cell Biol* (分子细胞生物学报), **39**(3): 236 – 242

Wang WM (王巍敏), Li YC (李云昌), Hu Q (胡琼), *et al*. 2008. Regulation mechanism studies of cytoplasmic male sterility in plants (植物细胞质雄性不育基因的鉴定及育性调控机理) [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), **6**(6): 1 139 – 1 145

Yamagishi H, Terachi T. 2001, Intra-and inter-specific variations in the mitochondrial gene *orf*138 of Ogura-type male-sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *R. raphanistrum* [J]. *Theor Appl Genet*, **103**(5): 725 – 732

Zhang DS (张德双), Zhang FL (张凤兰), Wang YJ (王永健), *et al*. 2007. Molecular identification and sequence analysis of cytoplasmic male-sterile types in Chinese cabbage (大白菜细胞质雄性不育的分子鉴定及序列分析) [J]. *Acta Hortic Boreal-Sin* (华北农学报), **22**(6): 53 – 59

Zhou GL (周国林), Lin CF (林处发), Hu ZH (胡侦华), *et al*. 2011. Molecular identification of cytoplasmic male sterile types non-heading Chinese cabbage and Chinese flowering cabbage (小白菜和菜薹细胞质雄性不育类型的分子鉴定) [J]. *J Changjiang Veget* (长江蔬菜), (4): 21 – 24

Zhu YY (朱玉英), Yang XF (杨晓锋), Hou RX (侯瑞贤), *et al*. 2006. Extraction and RAPD analysis of mitochondrial DNA of cytoplasmic male sterile (CMS) line in broccoli (青花菜细胞质雄性不育系线粒体 DNA 的提取与 RAPD 分析) [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), **24**(6): 505 – 508

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net