

重金属镉、铅对多年生黑麦草细胞内几种抗氧化酶基因表达的影响

王慧忠, 李 鹄

(滁州学院化学与生命科学系, 安徽 滁州 239000)

摘 要: 重金属胁迫作为逆境条件之一对植物抗逆境代谢基因表达影响状况是筛选污染环境治理时草被植物的主要依据。本文利用 Northern 印记杂交技术, 对重金属离子处理后多年生黑麦草幼苗内的几种抗氧化酶基因表达的 ploy(A)⁺mRNA 进行分析。初步研究表明, 镉、铅离子胁迫处理对幼苗根系内超氧化物酶基因(*Mn-sod*)、过氧化氢酶基因(*Cat*)、抗坏血酸过氧化物酶基因(*Apx*)、谷胱甘肽过氧化物酶基因(*Gpx*)的表达产生不同影响, 这与上述基因编码的相应代谢酶在抗逆代谢中的作用有一定关系。由于镉离子胁迫时产生的活性氧物质远大于铅离子胁迫, 不同离子处理后上述基因表达情况出现一些差异。其中, *Mn-sod* 在镉胁迫 4 h 内被快速诱导, 而铅胁迫后 12 h 该基因表达量才达到相近的表达强度; *Cat* 表达量在镉胁迫 8 h 后达到较高值且持续增加, 而铅胁迫后 12 h 内仍然较低, 24 h 时达到与镉胁迫相近的表达强度; 两种金属离子对 *Gpx* 表达的影响相似, 但镉离子诱导的基因表达强度要远大于铅离子; 铅离子胁迫 4 h 后 *Apx* 表达强度开始持续增加, 但镉胁迫对 *Apx* 表达影响可能因试验误差造成降低的结果(有必要做进一步重复研究)。可见, 重金属胁迫与其他逆境胁迫一样对植物逆境适应代谢, 以及相关基因的表达均产生积极影响, 在植物抗逆代谢研究中应该引起足够重视。

关键词: 重金属污染; 镉; 铅; 多年生黑麦草; 基因表达

中图分类号: X503.233 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)06-2371-06

Effect of Cadmium Ion and Lead Ion Induced Stress on Anti-oxidative Genes Expression in Perennial Ryegrass Cells

WANG Hui-zhong, LI Juan

(Department of Chemistry and Life Science, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China)

Abstract: Heavy metal ion-induced stress is one of adverse conditions to plant grown, Cadmium (Cd) and Lead (Pb) are among the most toxic of industrial pollutions. When the heavy metal is accumulated in soil by heavy metal pollutant, it will enter into plant and will badly menace agricultural products. Anti-oxidative enzyme is the most important metabolism enzyme in cells which metabolism and catabolism reactive oxygen species (ROS) in cells induced by adverse condition stress. The expression of the anti-oxidative enzyme gene will be affected by ROS. So, the state of some anti-oxidative enzymes genes expression affected by heavy metal ion-induced stress is important reference factor of selecting some tolerate plant. Using comparison between RNA blot, the paper analyzed the expression of *Mn-sod* (manganese-containing superoxide dismutase gene), *Cat* (catalase gene), *Gpx* (glutathione peroxidase gene) and *Apx* (ascorbate peroxidase gene) by heavy metal-induced, in perennial ryegrass (*Lolium perenne*) exposed to heavy metal ion-induced stress for 0~24 h. Because of the influence upon the perennial ryegrass cell genes expression induced by both of metal ions is different, cadmium ion stress caused more intense oxidation stress to cell metabolism than lead ion stress, and the enzymes genes expression have been induced by this stresses is different, too. Northern blot analyses showed that the transcription of 4 genes is induced by both of ion-induced oxidative stress. In continuous cultures, the expression of *Mn-sod* is strongly stimulated upon increased to both metal ions within 4 h after stress treatment. *Mn-sod* transcript level is continued to increase until 24 h. But, the gene expressional intensity induced by cadmium stress is more than that induced by lead stress in same time. *Cat* transcript level began increased after stress 8 h and remained at elevated levels until 24 h. *Gpx* and *Apx* transcript level is not alike deal with different metal ions. The effect of cadmium ion-induced stress on the gene expressional intensity is more than that of lead ion-induced stress, too.

Keywords: heavy-metal ions stress; cadmium; lead; perennial ryegrass; gene expression

收稿日期: 2007-12-14

基金项目: 滁州学院科研启动项目

作者简介: 王慧忠 (1963—), 男, 博士, 教授, 主要从事环境科学 (环境生物学) 和草业科学方向的研究。E-mail: wanghuizhong@126.com

重金属污染已经严重影响到我国农田土壤的可持续利用和农、畜产品的安全,近年来这方面的研究报告已以几何基数方式在增长。逆境胁迫引起的活性氧物质对生物相关基因表达的影响研究始终比较活跃,研究成果非常丰富^[1-3]。相对而言,重金属离子胁迫对植物细胞内相关基因表达影响研究相对较为落后,尤其是在国内该类研究资料很少。Miguel A Rodriguez Milla 等^[4]开展了金属铝胁迫对黑麦(*Secale cereale* L. cv Blanco)根系生长与部分基因表达影响研究,发现铝胁迫会引起黑麦和小麦根系生长发育减缓、部分基因表达出现异常变化对现象,并建立了相应 cDNA 基因库。Igor Kovalchuka 等^[5]和 Herbettea S 等^[6]进行重金属镉、铅对拟兰芥等植物根系生长发育和部分基因表达影响等研究。王慧忠等^[7]较早时期就重金属镉、铅对部分草被植物生长发育与根系代谢和毒理症状等进行了研究报道,但对相关抗氧化酶基因表达影响方面国内研究比较少。由于草被植物具有先锋植物特性和可以多次刈割并再生的特点,可以在对污染土壤的治理恢复土壤再利用过程中发挥重要作用。鉴于此,展开重金属污染物对草被植物抗逆性响应及其对抗性基因表达的影响,对于了解草被植物对污染物适应性和发挥它们在污染土壤治理中的作用具有理论价值。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养与重金属胁迫处理

多年生黑麦草种子用 25%(V/V) 的次氯酸钠消毒,在 25℃/15℃、16 h/8 h 变温条件下进行发芽预处理。然后播种在蛭石内并以 0.5×Hoagland 营养液灌溉至含水量约为 85%饱和度。幼苗出苗后 5 d,分别按硝酸镉溶液浓度 0.5 mmol·L⁻¹ 和醋酸铅溶液浓度 1.0 mmol·L⁻¹ 加入营养液中,调整 pH 到 4.0,对幼苗进行重金属胁迫处理。胁迫培养时每隔 4 h 测试基质中重金属离子含量,并根据测试结果补充营养液中金属离子浓度满足处理条件。在不同时段内基因表达差异研究中,用不含重金属离子的营养液作为对照样品,待胁迫处理 0、4、8、12 和 24 h 后,在大约 1 000 株幼苗中随机收集约 100 株幼苗,并收集幼苗根系作为测试样品。

1.2 总 RNA 提取与 Poly(A)⁺mRNA 的制备分离

总 RNA 提取分离采用硫氰酸胍/酚/氯仿法^[8],并根据 Chomczynski P 等^[9]和郑晓飞^[10]方法进行定量检测。Poly(A)⁺RNA 的分离纯化采用寡聚脱氧胸苷纤

维素层析法,从总 RNA 中用 Quickprep micro mRNA 净化试剂盒 (Amersherm, Pharmacia Biotech 公司),按其说明书方法进行。对分离提纯后的沉淀物用小体积 DEPC-H₂O 溶解 RNA 后测定吸光度,最后将回收的 poly(A)⁺mRNA 移入 eppendorf 管中,并保存在 -70℃^[10]。

1.3 cDNA 探针的放射性标记

分别参考 Sabine D 等^[11]、Masanobu M 等^[12]、Andrzej T 等^[13]和 Pierre F 等^[14]已发表的资料设计了几种抗氧化酶基因 cDNA 探针制备的引物并委托上海博亚公司合成。探针放射性标记用随机底物和 [α-³²P] dCTP 标记 (DNA 标记试剂盒,Pharmacia Biotech 公司)。第一阶段逆转录 PCR 过程为:在 42℃反应 30 min,然后通过 95℃加热 5 min 灭活反转录酶。在上述 PCR 产物中分别加入相应基因的上下游引物,第二阶段 PCR 过程为:90℃变性,55℃,35 s;72℃,40 s;接下来 72℃,扩充 10 min,循环 30 次。未结合的放射性物质通过旋转柱分离纯化^[10]。

1.4 poly(A)⁺mRNA 的 Northern 印迹与杂交

将分离的 poly(A)⁺mRNA 用甲醛/琼脂糖凝胶进行电泳,并转移在尼龙膜 (Hybond-N, Amersham Biotech 公司)上,采用紫外透视仪照射 3~5 min 固定 RNA 在膜上,印迹用亚甲基蓝染色形成^[15]。Northern 杂交条件为预杂交液加入塑料袋中,并 42℃水浴 2~4 h。然后加入预先变性探针 (95℃,10 min),杂交时间 42℃中 12~16 h,导出杂交液后,对膜在室温下用漂洗缓冲液漂洗 1~3 次,每次 15 min。

1.5 杂交后成像及杂交信号分析

晾干杂交膜后,将膜放在 X 线暗盒底部,胶片放在其上进行自显影曝光,条件 -70℃下曝光 1~2 d,取出胶片后在自动 X 线底片处理仪上冲洗,自动成像。杂交信号用 Molecular Analyst software 软件进行评估测定。在 poly(A)⁺mRNA 杂交时,获得所有结果均用 25S rRNA 信号进行加权处理以修正 RNA 点样时产生的微小差异。

2 结果与分析

2.1 重金属胁迫下多年生黑麦草中毒症状及出现时间

作者在较早时期曾就重金属胁迫对草坪植物生物量、生长发育,以及严重胁迫后植物出现中毒症状和症状出现时间进行观察,先将铅胁迫下多年生黑麦草出现中毒症状及其时间列为表 1。表 1 资料说明,

植物出现明显的中毒症状及其出现时间是与胁迫处理浓度和胁迫时间密切相关的。出现的中毒症状主要以根冠出现膨大变黑、腐烂,叶片褪绿甚至枯萎等,且随胁迫处理浓度不同,出现中毒症状等时间也有差异^[7]。

表 1 铅胁迫下多年生黑麦草出现等中毒症状及出现时间^[7]

出现症状时间 /d	Pb 处理浓度 / $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$					
	CK	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
初期	—	—	20	15	10	8
严重期	—	—	20	20	15	12
晚期	—	—	—	—	20	17

注:根冠膨大变黑、叶片变黄为中毒初期,根冠变黑腐烂、叶片枯黄为中毒严重期,叶片枯萎为中毒晚期^[7]。

2.2 0.5 mmol·L⁻¹ 硝酸镉对植物主要抗氧化酶基因表达的影响

硝酸镉处理后多年生黑麦草细胞内与抗氧化代谢有关的基因表达量发生了积极变化,以作为重金属胁迫引起的适应性反应。重金属离子胁迫处理多年生黑麦草幼苗后,重金属胁迫在细胞内引起氧自由基物质的产生与积累,它们除对相应代谢酶活性产生影响外,对相应酶基因的表达量存在重大影响^[16]。硝酸镉处理后不同时间内多年生黑麦草细胞中 *Mn-Sod*、

Cat、*Gpx* 和 *Apx* 基因 poly(A)⁺mRNA 表达丰度变化如图 1 和图 2。

从图 1、图 2 中可以看出多年生黑麦草幼苗在遭受重金属离子胁迫后,随细胞内产生的活性氧物质的形成和积累,细胞内 *Mn-Sod*、*Cat*、*Gpx* 和 *Apx* 等 4 种抗氧化酶基因表达被快速诱导。尤其是 *Mn-Sod* 基

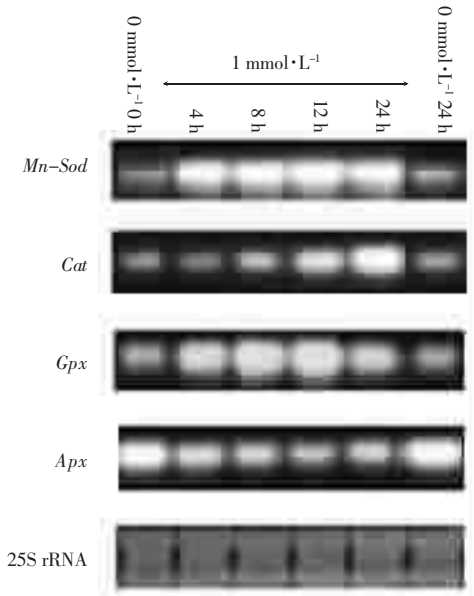


图 1 镉离子处理后不同时段内多年生黑麦草根尖细胞中抗氧化酶基因表达丰度变化

Figure 1 Change of some anti-oxidative genes expression on cadmium stress at different time in ryegrass roots

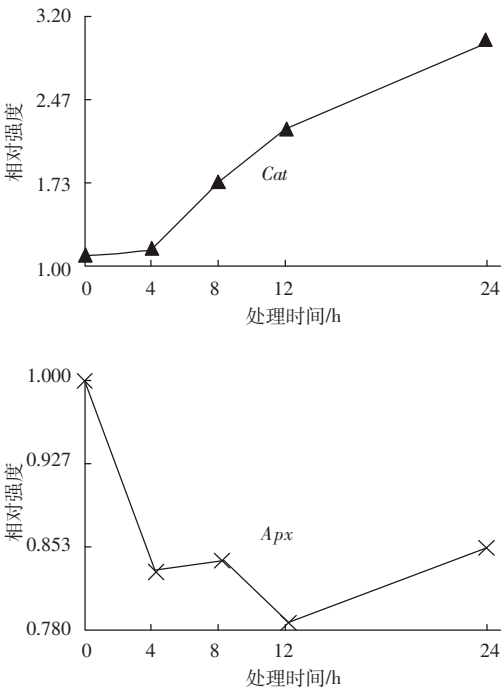
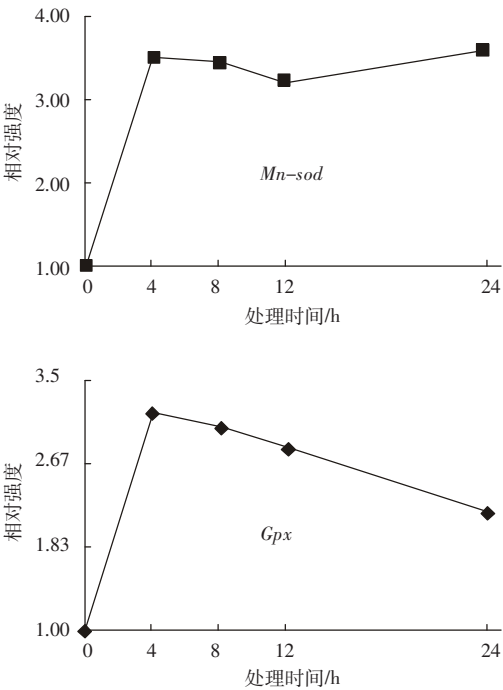


图 2 镉离子处理后多年生黑麦草根尖细胞抗氧化酶基因相对表达强度变化

Figure 2 Comparison between RNA-blot analyze for cadmium stress-inducible anti-oxidative genes expression in ryegrass roots

因、*Cat* 基因和 *Gpx* 基因的转录物在胁迫处理 4 h 后即被诱导表达,随时间的推移,这类基因的转录物快速增加。其中,*Mn-Sod* 在重金属离子处理 4 h 后的 mRNA 已明显增加,其相对表达强度是对照的 3.5 倍,而且随胁迫的持续其转录物是继续增加的。*Cat* 基因在镉胁迫的最初的 4 h 内,其转录物的增加不是非常明显,只有在处理 8 h 以后,其转录物的增加量快速增加,24 h 时达到对照 3 倍水平,显示出重金属离子处理对 *Cat* 基因的调控属于下游调控的特性。*Gpx* 基因表达转录量来看,该基因对镉胁迫显示出在处理的 4 h 内,其 mRNA 快速增加,在 4~8 h 时达到最高峰,而后该基因的转录物达到相对稳定的特征。*Apx* 基因表达对镉胁迫响应特性可能由于试验误差关系出现降低情况,对这种现象有必要进一步重复试验,以获得正确的结果。

2.3 1.0 mmol·L⁻¹ 醋酸铅对植物主要抗氧化酶基因表达的影响

醋酸铅处理后多年生黑麦草细胞内 *Mn-Sod*、*Cat*、*Gpx* 和 *Apx* 基因 poly(A)⁺mRNA 表达丰度变化如图 3 与图 4。由图 3、图 4 结果同样可以看出,几种基因表达特征与硝酸镉处理后特征相似。从结果发现 *Mn-Sod* 基因表达量在铅胁迫对 4~8 h 内是逐渐增加的,到 12 h 后达极大值且较为稳定,该时间段内基因表达强度是对照的 4 倍。*Cat* 基因在胁迫的 8 h 内表

达强度变化不大,12 h 后开始增加,24 h 时该基因表达强度时对照的 3 倍。*Gpx* 基因转录强度变化与镉胁迫时变化相似,但其表达强度相对对照言其增加要弱于镉胁迫。铅离子处理后 8 h,*Apx* 基因转录开始增加,表达强度时对照的 1.5 倍,随胁迫时间延长其表达强度时持续量增加的。

由上述结果可以看出,重金属离子胁迫植物细胞

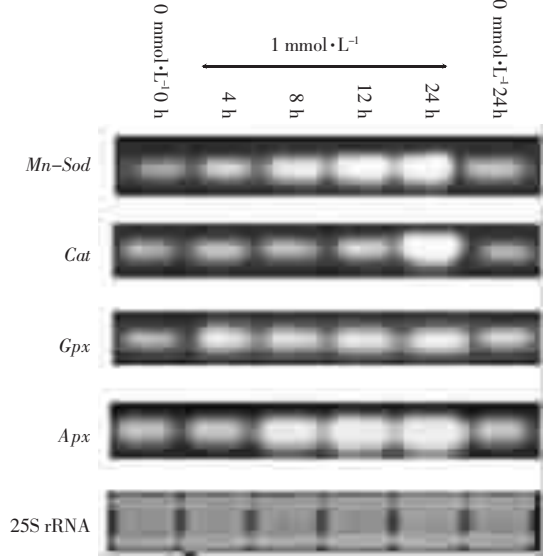


图 3 铅离子处理后不同时段内多年生黑麦草根尖细胞中抗氧化酶基因表达丰度变化

Figure 3 Change of some anti-oxidative genes expression on lead stress at different time in ryegrass roots

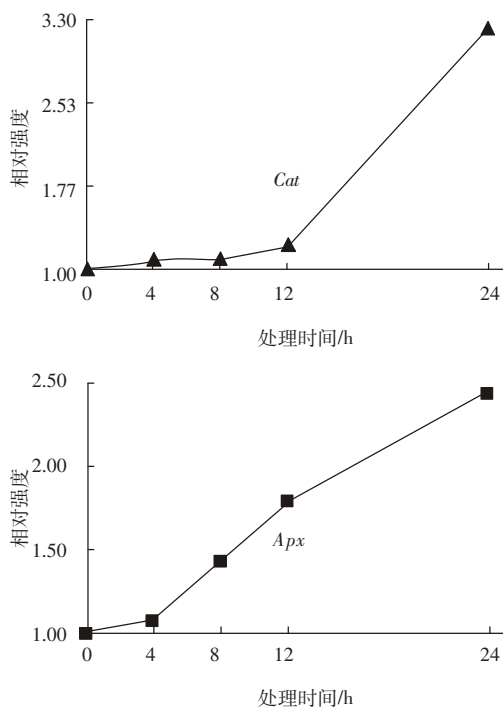
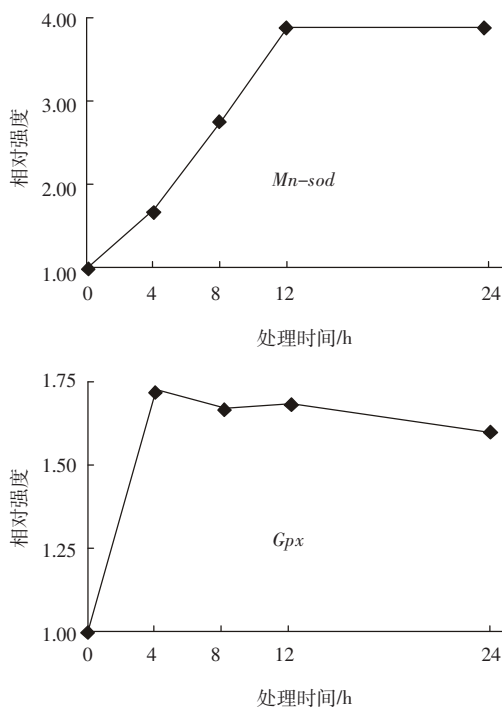


图 4 铅离子处理后多年生黑麦草根尖细胞抗氧化酶基因相对表达强度变化

Figure 4 Comparison between RNA-blot analyze for lead stress-inducible anti-oxidative genes expression in ryegrass roots

后,将产生超量的活性氧物质。镉胁迫时产生的活性氧物质远大于铅胁迫,所以表现在对相关酶编码基因对调控响应出现差异。胁迫后 *Mn-Sod* 在短时间内被快速诱导,而 *Cat* 在胁迫 8~12 h 时被明显诱导,这与 *Cat* 代谢的底物为 Sods 代谢的产物有关,即 Sods 代谢形成的 H_2O_2 积累后, H_2O_2 进一步调节 *Cat* 基因的大量表达有关。*Gpx* 和 *Apx* 基因表达相对独立,可能说明它们的基因序列不属于同一个操纵子结构。

逆境对相关模式植物基因表达的影响已有大量报道,如 Ludmila R 等^[17]的干旱、热应激对烟草(*Nicotiana tabacum*) 中 *CAT*、*GPX*、*APX* 以及硫氧还蛋白过氧化物酶(Thioredoxin peroxidase, *TPX*)等的基因表达研究。Didier H 等^[18]、Wim Van Camp 等^[19]分别从 MnSOD 与 Cu/ZnSOD 酶基因的启动子角度探讨了在逆境条件时转基因烟草中的 SODs 酶活性与转入基因的转录物表达的特征,以及抗氧化酶基因在逆境条件中的表达特性,从而在分子机制上对 SODs 受逆境胁迫诱导的特性作了探讨。这些研究成果理所当然地成为逆境胁迫对其他植物相关基因表达影响研究中值得借鉴的方法和相关基因序列的参照物。

重金属胁迫能强烈地诱导植物细胞内对逆境胁迫的各种适应性响应的基因的表达,这与植物在响应病原物侵染、紫外线危害(UV)、臭氧、热应激胁迫和植物受伤后引起的 PR 蛋白响应的情况一致,这预示着植物适应逆境条件下可能存在某些共同的机制^[16]。Chen Zhixiang 等^[20]认为,在外界病原物侵染植物叶片时,病原物将促使细胞内合成水杨酸(SA),SA 属一种内源性信使分子,它通过抑制细胞 CAT 活性而提高 H_2O_2 浓度, H_2O_2 等 ROS 能够活化细胞防卫基因的表达。Miguel A 等^[21]研究了黑麦根系中铝胁迫下基因表达的特征,发现在铝胁迫引发的氧化胁迫中,*GPX*、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、*APX* 以及与金属离子代谢有关的特殊蛋白合成酶基因表达均受到调节。Sangman Lee 等^[22]发现,镉胁迫时在转基因拟兰芥中植物螯合素合成酶基因(*AtPCS1*)表达快速上升,以此作为镉胁迫逆境响应,而植物螯合素在细胞壁结合固定重金属中发挥重要作用。Wu Guohai 等^[23]在研究了春小麦和冬小麦在干旱与低温冻害胁迫下线粒体 *Mn-Sod* 和叶绿体 *Cu/Zn-Sod* 基因表达,发现 *Mn-Sod* 的 mRNA 受干旱诱导,在恢复供水后基因表达会下降。相反,*Cu/Zn-Sod* 的 mRNA 不受干旱诱导,而且供给水分后 mRNA 上升,当春小麦和冬小麦幼苗暴露在 2 ℃ 的低温中时,根系中 *Mn-Sod* 基因的转录物在 7~49 h 中持

续上升,并达到最大,说明 *Mn-Sod* 基因明显受到低温的诱导。Ludmila R 等^[17]研究了干旱和热应激对烟草中某些基因转录的影响,发现干旱诱导了 *Cat*、*Gpx* 转录水平的提高,*Apx* 则是在热应激时被诱导,但在干旱与热应激复合胁迫时 *Apx* 基因被抑制,而 *AOX*、*GPX* 和苯丙氨酸裂解酶编码基因的表达却受到诱导。上述研究成果从不同侧面都说明,在包括重金属离子胁迫在内的逆境胁迫中,胁迫产生的活性氧物质对许多基因的表达产生影响。与抗氧化代谢密切相关的抗氧化酶基因的表达同样受到调控,且抗氧化酶基因表达强度中某种程度上表明了植物对胁迫适应能力。

3 初步结论

(1)初步研究结果发现,重金属离子胁迫时草被植物细胞内的 *Mn-sod*、*Cat*、*Apx* 和 *Gpx* 基因的表达量明显强于对照,说明重金属胁迫与其他逆境胁迫一样对植物逆境适应代谢产生积极影响,而这些基因的快速诱导转录也是植物对重金属胁迫形成对逆境条件积极响应方式之一。

(2)在持续的重金属胁迫下,*Mn-sod*、*Cat*、和 *Gpx* 等基因的表达迅速被诱导,这类基因的转录物快速增加,到胁迫处理 4 h 时 *Mn-sod* 基因已明显增加,且镉胁迫时该基因相对表达强度是对照的 3.5 倍、铅胁迫时是对照的 1.8 倍,胁迫 8 h 后达到相对稳定水平。*Cat* 基因在处理 4~8 h 时才开始增加,12 h 快速诱导表达,24 h 后该基因转录相对强度是对照的 3 倍以上。*Gpx* 在胁迫的 4 h 内即被快速诱导且稳定在较高水平,而 *Apx* 在胁迫的早期表达量变化不大,在 4~12 h 后开始逐渐增加。说明这些抗氧化酶基因的表达量确实受到细胞中产生的活性氧物质的影响,且这类物质产生的先后顺序和积累量大小对上述基因表达强度产生不同的影响^[9]。

(3)镉离子胁迫产生对活性氧数量远强于铅离子胁迫,所以镉胁迫时植物细胞内抗氧化酶基因被诱导的时间及诱导强度大于铅胁迫。

参考文献:

- [1] O Keith Okamoto, Deborah L Robertson, Thomas F Fagan, et al. Different regulatory mechanisms modulate the expression of a dinoflagellate iron-superoxide dismutase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001,23: 19989-19993.
- [2] Ludmila Rizhsky, LIANG Hong-jian, Ron Mittler. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco[J].

Plant Physiology, 2002, 130: 1143–1151.

- [3] Juan M Ruiz-Lozano, Carlos Collados, José M Barea, et al. Cloning of encoding sods from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 50(364):2241–2242.
- [4] Miguel A Rodriguez Milla, Ed Butler, Alicia Rodriguez Huete, et al. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130:1706–1716.
- [5] Igor Kovalchuka, Victor Titova, Barbara Hohnb, et al. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead[J]. *Mutation Research*, 2005, 570: 149–161.
- [6] Herbetta S, Tacconnath L, Hugouvieux V, et al. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots[J]. *Biochimie*, 2006, 88:1751–1765.
- [7] 王慧忠, 何翠屏, 赵楠. 铅对草坪植物生物量与叶绿素水平的影响[J]. 草业科学, 2003, 20(6):73–75.
- WANG Hui-zhong, HE Cui-ping, ZHAO Nan. Effect of lead on turf-grass biomass and chlorophyll level[J]. *Pratacultural Science*, 2003, 20(6):73–75.
- [8] [德]F.希尔德布兰特, [美]P 伊格莱西著. 林建银, 郑志弘, 章涛, 等译. 现代生物技术译丛—分子医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- Write F Hilldebulant, P Yigelaxii. Translate: LIN Jingyin, ZHENG Zhi hun, ZHANG Tao, et al. Modern Organism Technique[M]. Science Technique Press, Beijing, 2000.
- [9] Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Analytical Biochem*, 1987, 162:156–159.
- [10] 郑晓飞主编. RNA 试验技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 86–90, 129–140.
- ZHENG Xiao-fei. A notebook about RNA experiment technique[M]. Beijing: Science Technique Press, 2004. 86–90, 129–140.
- [11] Sabine Dieterich, Ursula Bielick, Kathrin Beulich, et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart[J]. *Circulation*, 2000, 101:33–39.
- [12] Masanobu Mino, Kenji Maekawa, Kenichi Ogawa Hiroshi Yamagishi, et al. Cell death processes during expression of hybrid lethality in inter-specific F₁ hybrid between *Nicotiana glauca* Domin and *N. tabacum* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130:1776–1787.
- [13] Andrzej Talarczyk, Magdalena Krzymowska, Wojciech Borucki, et al. Effect of yeast CTA-1 gene expression on response of tobacco mosaic virus infection[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129:1032–1044.
- [14] Pierre Focercroy, Gerard Vansuyt, Sergei Kushnir, et al. Iron-regulated expression of a cytosolic ascorbate peroxidase encoded by the *Apx1* gene in *Arabidopsis* seedlings[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134:605–613.
- [15] Herrin D L, Schmidt D W. Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization[J]. *Biotechniques*, 1988, 6:196–197.
- [16] 王慧忠. 自由基种类及其在植物抗病分子调控中的作用[J]. 山地农业生物学报, 2005, 24(2):170–175.
- WANG Hui-zhong. Reactive oxygen species(ROS) acts as activating cells death and genes expression in plant [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2005, 24(2):170–175.
- [17] Ludmila Rizhsky, LIANG Hong-jian, Ron M. The combined effect drought stress and heat shock on genes expression in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130:1143–1151.
- [18] Didier Herouart, Marc Van Montagu, Dirk Luze. Developmental and environmental regulation of the *Nicotiana plumbaginifolia* cytosolic Cu/ZnSOD promoter in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiology*, 1994, 104:873–880.
- [19] Wim Van Camp, Didier Herouart, Hild Willekens, et al. Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112:525–535.
- [20] Chen Zhi-xiang, Joseph W Ricigliano, Daniel F Klessig. Purification and characterization of soluble salicylic acid-binding protein from tobacco[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:9533–9537.
- [21] Miguel A Rodriguez Milla, Alicia Rodriguez Huete, Cincly F Wilson, et al. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130:1706–1716.
- [22] Sangman Lee, Jae s Moon, Tae-Seok Ko, et al. Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 656–663.
- [23] WU Guo-hai, Ronald W W, Albert J R, et al. Isolation, chromosomal localization and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120:513–520.