

平邑甜茶延长根和吸收根抗凋亡基因的表达差异及其对 2,4-D 的响应

樊树雷, 杨洪强*, 冉 昆, 沈 伟, 张玮玮

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

摘 要: 以 3 年生平邑甜茶 [*Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang] 盆栽树为材料, 通过 2,4-D 水溶液灌根处理, 探讨了新根 (延长根和吸收根) 细胞死亡及其抗凋亡基因的表达特征。结果表明, 在 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 处理后的 70 d 内, 新根细胞死亡量和类 caspase3/7 (半胱天冬酶) 活性先上升后下降, ATP 含量和根系活力的变化与之相反。平邑甜茶抗凋亡基因 *MhBAG*、*MhBI-1* 与 *MhHSP70* 在新根中均受 2,4-D 诱导, 随着 2,4-D 处理时间的延长, *MhBAG* 基因的表达水平先下降后逐渐升高, *MhBI-1* 与 *MhHSP70* 则先升高后下降。在 2,4-D 处理下, 吸收根细胞死亡量与根系活力的变化幅度明显高于延长根, 吸收根 *MhBI-1* 与 *MhHSP70* 表达量的早期升高幅度大于延长根, 表明吸收根细胞对 2,4-D 的敏感性高于延长根; 但在基因表达高峰时, 延长根抗凋亡基因表达量的升高倍数明显高于吸收根, 暗示延长根比吸收根有更强的抗凋亡能力。

关键词: 平邑甜茶; 2,4-D; 延长根; 吸收根; 抗凋亡基因; 细胞死亡

中图分类号: S 661

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 07-1225-08

Differential Expression of Anti-apoptotic Genes in Extensive and Absorbing Roots of *Malus hupehensis* and Their Response to 2,4-D

FAN Shu-lei, YANG Hong-qiang*, RAN Kun, SHEN Wei, and ZHANG Wei-wei

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: The three-year old potted trees of *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang were irrigated with water solution of 2,4-D to investigate the characteristics of cell death and the expression of anti-apoptotic genes of new roots (extensive roots and absorbing roots). The result showed that the new roots' cell death quantity and caspase-like 3/7 activity increased first and then fell in the 70 days after the treatment of $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, however, the ATP content and the root activity changed in the contrary trend. After the treatment, the expression of anti-apoptotic genes *MhHSP70*, *MhBI-1*, *MhBAG* were induced and the expression levels of *MhBAG* first decreased then increased, however *MhHSP70* and *MhBI-1* increased first, and then decreased later. At the same time, the change range of cell death quantity and caspase-like 3/7 activity and the rising range of *MhHSP70* and *MhBI-1* expression levels in absorbing

收稿日期: 2013-01-22; **修回日期:** 2013-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171923); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08009-3); 高校博士学科点专项科研基金项目 (20123702130001; 20103702110003)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hqyang@sdaa.edu.cn; labft@sdaa.edu.cn)

roots were greater than that in extensive roots in the early stage of the 2,4-D treatment, which showed that absorbing roots had higher sensitivity to 2,4-D than extensive roots. When at peak value, the expression levels rising times of anti-apoptotic genes in extensive roots were significantly higher than that in absorbing roots, which indicated that the extensive roots had stronger anti-apoptotic ability than absorbing roots.

Key words: *Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; extensive roots; absorbing roots; anti-apoptotic gene; cell death

2,4-D (2,4 - 二氯苯氧乙酸) 是一种难降解和易淋溶的生长素类除草剂, 高浓度时会抑制植物生长, 促进植株衰老死亡 (吴星卫 等, 2009, 2011; Pazmiño et al., 2012)。在果树根区施用高浓度 2,4-D, 不仅能杀死杂草也会对果树根系造成一定伤害。已有试验表明, 2,4-D 浓度大于 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 明显抑制苹果根系生长, 甚至引起根系死亡 (杨洪强和束怀瑞, 2007)。根系死亡的本质是根细胞死亡, 细胞死亡包括细胞坏死和细胞凋亡, 细胞凋亡是一种主动死亡过程, 受到一系列基因产物调控, 其中最重要的调控因子是 caspase 家族和 Bcl-2 家族的蛋白 (Antoine et al., 2000; Adams, 2003)。caspase 是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate specific proteinase), 其家族成员分为凋亡起始者 (initiators) 和执行者 (executioners), 其中 caspase 3 和 caspase 7 是底物相近的执行者, 它们可分解细胞内的相关靶蛋白, 导致细胞结构和代谢改变, 最终引起细胞凋亡 (Antoine et al., 2000; Boatright & Salvesen, 2003); 植物也存在类 caspase 3/7 活性, 其活性水平可在一定程度上反映细胞程序性死亡的发生程度 (马怀宇 等, 2010)。Bcl-2 家族包括 BI-1 (bax inhibitor-1) 与 BAG (Bcl-2-associated athanogene) 等成员, BI-1 基因表达可以抑制 Bax 基因所诱导的细胞死亡 (Henke et al., 2011); BAG 即 Bcl-2 结合抗凋亡基因蛋白, 能够单独或通过与 Bcl-2、HSP70 等的相互作用而抑制细胞凋亡 (Townsend et al., 2005)。HSP70 为热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 家族的一员, 可作为分子伴侣防治蛋白质错误折叠、维持细胞结构、抵抗细胞凋亡等 (Sharma & Masison, 2009)。

苹果新根分为延长根和吸收根, 延长根生长旺盛, 寿命比较长, 吸收根主要行使吸收功能, 15~25 d 完成一次更新, 两者功能及生理特性不同, 对外界刺激的反应也不一样, 这种差别是果树在特定的遗传背景下适应环境的结果 (杨洪强和束怀瑞, 2007), 但人们对形成这种差别的机制并不清楚。

平邑甜茶 [*Malus hupehensis* (Pamp) Rehd. var. *pinyiensis* Jiang] 是苹果常用砧木。本研究中以平邑甜茶为材料, 探讨 2,4-D 灌根处理后苹果延长根和吸收根细胞死亡及其抗凋亡基因的表达, 为进一步揭示 2,4-D 对苹果不同新根死亡与更新的影响以及延长根和吸收根对其差异响应机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料处理与数据分析

试验在山东农业大学园艺试验站和山东农业大学生物学重点实验室进行, 试材为 3 年生盆栽平邑甜茶幼树。于 2012 年 5 月 1 日选取生长健壮、长势一致的植株用 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 水溶液 2 L 进行灌根处理, 对照用等量水灌溉; 每 3 株为一组处理, 每处理重复 3 次。处理后正常管理, 于处理当天 (0 d) 及处理后 7、15、60 和 70 d 取样, 分拣出延长根和吸收根后测定相关指标。用 DPS 数据处理系统进行差异显著性分析。

1.2 细胞死亡量测定

伊文思蓝 (Evans blue) 溶液可透过受损的细胞膜将死亡细胞染成蓝色, 可用细胞截留的伊文思蓝量来反映细胞的死亡量 (Gaff & Okong'O, 1971)。本研究中测定细胞死亡量即依据此原理。参照 Steffens 和 Sauter (2005)、Jiang 等 (2012) 的方法, 称取 0.1 g 新根, 在室温下用 0.25% 的伊文思蓝溶液染色 30 min 后用蒸馏水冲洗, 再用 50% 甲醇/1% SDS 于 50 °C 下水浴 30 min 抽提蓝色染料, 检测抽提液在 600 nm 下的吸光度, 以单位质量鲜根样品的吸光度表示细胞死亡量。

1.3 类 caspases3/7 蛋白酶活性检测

参照 Ma 等 (2007) 的方法进行, 称取材料 0.1 g, 加入 2 mL 磷酸缓冲液 (50 mmol · L⁻¹, pH 7.8) 和少量石英砂冰浴研磨, 4 °C, 12 000 × g 离心 20 min, 然后按照 Caspase-GloTM3/7 Assay (Promega) 试剂盒说明书测定类 caspases3/7 蛋白酶活性。

1.4 根活力测定

采用氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法测定根系活力 (root activity, RA), 用四氮唑的还原强度 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 表示其活力 (赵世杰 等, 2002)。RA 下降率 = $(\text{RA}_{\text{CK}} - \text{RA}_{\text{min}}) / \text{RA}_{\text{CK}}$, RA 回升率 = $(\text{RA}_{70} - \text{RA}_{\text{min}}) / \text{RA}_{\text{min}}$, 其中, RA_{CK} 为 15 d 时对照的根系活力, RA_{min} 为根活力最低时 (处理 15 d) 的值, RA_{70} 为处理 70 d 时的根系活力。

1.5 ATP 含量测定

ATP 含量采用荧光素—荧光素酶生物发光法测定 (王维光, 1985)。

1.6 基因表达测定

采用 CTAB 法提取样品总 RNA, 按照 TaKaRa 试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa Code: DRR047A) 进行反转录, 使用 iCycler iQ5 实时定量 PCR 仪器 (Bio-Rad, 美国) 进行 qPCR 检测。反应体系为 25.0 μL , 含有 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa), 50 ~ 100 ng cDNA 模板, 上、下游引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。运行程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 50 °C 30 s, 72 °C 15 s, 40 个循环。每个样品 3 次重复。

所设计的特异性引物见表 1, 以苹果 18S rRNA 基因为内参。

表 1 平邑甜茶抗凋亡基因 qRT-PCR 引物设计
Table 1 Primers set for the qPCR amplification of anti-apoptotic genes of *Malus hupehensis*

基因名称及功能 Gene name and function	登录号 No. in GenBank	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>MhBI-1</i> , bax inhibitor-1 gene	KC456613	F: 5'-CCGAGAAGAATGAGAAGAAG-3' R: 5'-GGCAACACTAGACAATCAC-3'
<i>MhHSP70</i> , heat shock proteins 70 gene	HQ876864	F: 5'-TCTATTGCTTCTGGATGTCA-3' R: 5'-GCTGATTGTCTGAGTAGGT-3'
<i>MhBAG</i> , Bcl-2-associated athanogene gene	HQ639935	F: 5'-GTTGGTGTGATGCTTCTG-3' R: 5'-CCTGTAGTCTTCGTCTTCA-3'
18S rRNA, reference gene		F: 5'-AAACGGCTACCACATCCA-3' R: 5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3'

采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算基因相对表达量, $\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{Target}} - \text{CT}_{\text{Actin}})_{\text{待测样本}} - (\text{CT}_{\text{Target}} - \text{CT}_{\text{Actin}})_{\text{校准样本}}$, $\text{CT}_{\text{Target}}$ 和 CT_{Actin} 分别是目标基因和内参基因的 CT 值 (Livak & Schmittgen, 2001)。将试验中 0 d 时样本作为校准样本, 将其值转换成 1, 将其他样品与之比较, 即获得相对表达值。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 对新根细胞死亡量的影响

2,4-D 处理前后, 吸收根的细胞死亡量均大于延长根, 随着 2,4-D 处理时间的延长, 吸收根和延长根的细胞死亡量在 7~15 d 时达到高峰, 之后逐渐下降; 在 2,4-D 处理早期 (处理后 7 d), 吸收根细胞死亡量的升高幅度高于延长根, 显示吸收根细胞对 2,4-D 的敏感性稍高于延长根 (图 1)。

2.2 新根细胞死亡相关代谢对 2,4-D 处理的响应

2.2.1 2,4-D 处理下新根根系活力变化

由图 2 可见, 2,4-D 处理后, 吸收根与延长根的根系活力先下降, 在 15 d 时达到最低点后回升。处理 15 d, 吸收根的根系活力比未处理时下降了 51.4%, 而延长根只下降了 35.4%。70 d 时, 吸收根根系活力回升了 88.6%, 延长根只回升了 32.4%。可见, 不论下降还是回升, 吸收根的根系活力的变化幅度都大于延长根。此外, 吸收根的根系活力始终高于延长根。

2.2.2 2,4-D 处理下新根 ATP 含量变化

由图 3 可见, 吸收根与延长根 ATP 含量在 2,4-D 处理处理后的变化与根系活力的变化类似, 也在 15 d 时降到最低值后回升, 并且吸收根 ATP 含量也始终高于延长根。

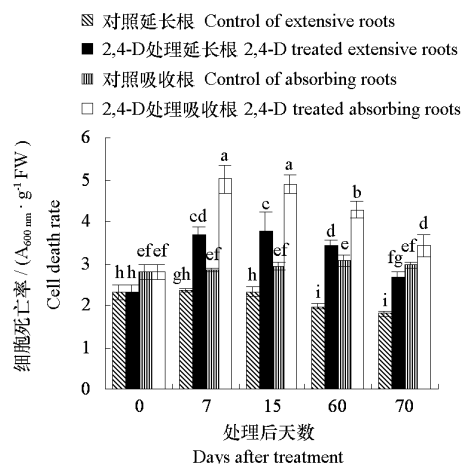


图 1 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根细胞死亡量的影响

不同字母表示在 $P=0.05$ 水平差异显著, 下同。

Fig. 1 Effect of 2,4-D on the cell death quantity of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

The different letters mean significant difference at $P=0.05$ level.

The same below.

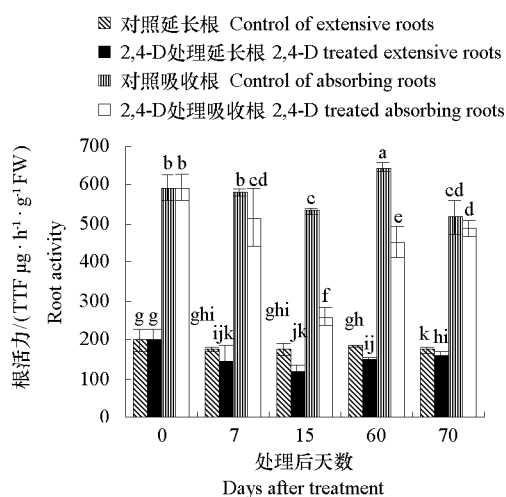


图 2 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根根系活力的影响

Fig. 2 Effect of 2,4-D on root activity of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

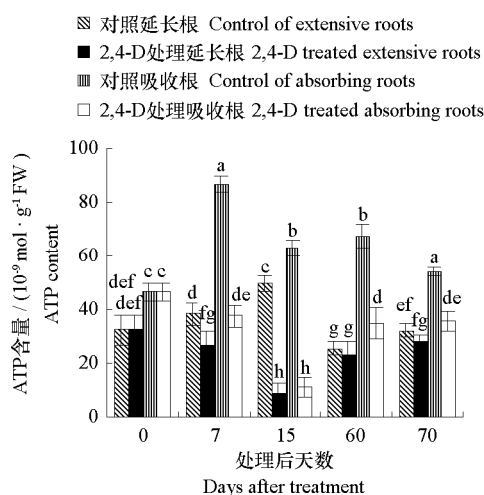


图 3 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根 ATP 含量的影响

Fig. 3 Effect of 2,4-D on ATP content of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

2.2.3 2,4-D 处理下新根类 caspases 3/7 活性变化

由图 4 可见在 2,4-D 处理过程中, 吸收根与延长根均是在 7 d 达到峰值后下降, 与新根细胞死亡量的变化类似, 而且吸收根类 caspases 3/7 活性水平明显高于延长根。

2.3 新根中 *MhBI-1* 对 2,4-D 处理的响应

吸收根与延长根中 *MhBI-1* 的表达均受 2,4-D 诱导, 吸收根中在 7 d 时达到峰值, 延长根中在 60 d 时达到峰值, 说明吸收根对 2,4-D 的响应比延长根迅速。

此外, 在 *MhBI-1* 表达量处于最高值时, 延长根中为对照的 249.6 倍, 吸收根中则为对照的 163.9 倍 (图 5)。

2.4 新根中 *MhHSP70* 对 2,4-D 处理的响应

由图 6 可见, *MhHSP70* 在吸收根与延长根中的表达均受 2,4-D 强烈诱导; 在处理 7 d 时, 吸收根 *MhHSP70* 表达量为对照 2.5 倍, 延长根中为对照的 1.1 倍; 在处理 60 d 时, 新根 *MhHSP70* 表达达到峰值, 此时吸收根 *MhHSP70* 表达量是对照的 157.8 倍, 延长根是对照的 194.3 倍。

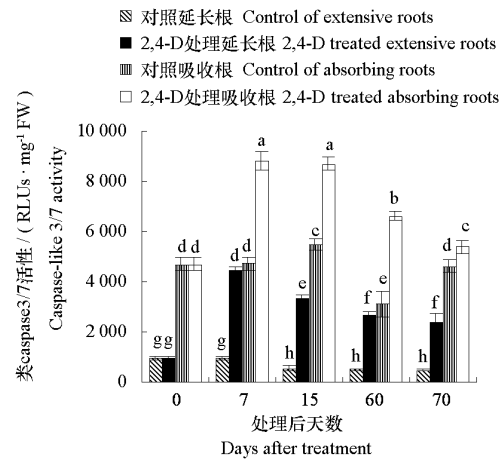


图 4 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根类 caspase 3/7 活性的影响

Fig. 4 Effect of 2,4-D on root caspase-like 3/7 activity of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

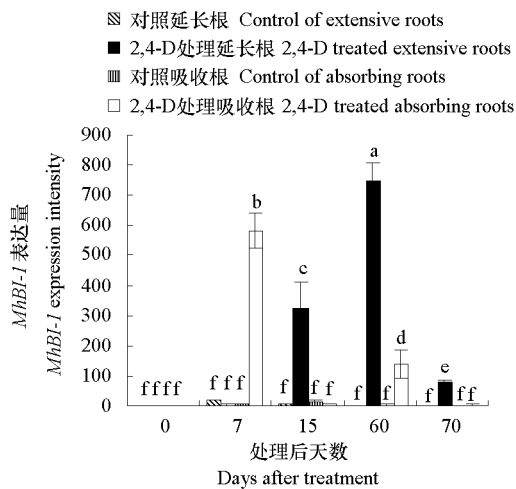


图 5 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根 *MhBI-1* 表达水平的影响

Fig. 5 Effect of 2,4-D on *MhBI-1* expression levels of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

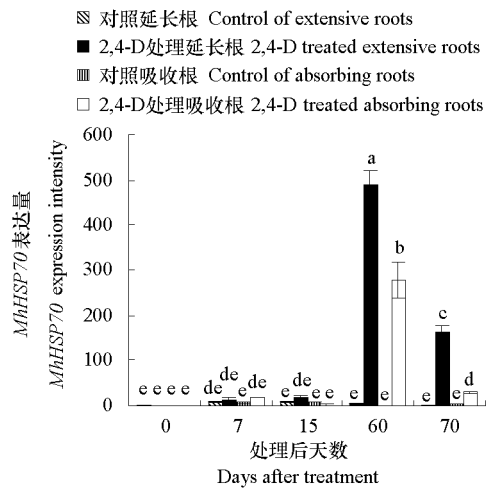


图 6 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根 *MhHSP70* 表达水平的影响

Fig. 6 Effect of 2,4-D on *MhHSP70* expression levels of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

2.5 新根中 *MhBAG* 对 2,4-D 处理的响应

在 2,4-D 处理早期 (7~15 d), 吸收根与延长根中 *MhBAG* 表达量均比对照低, 15 d 后逐渐升高; 吸收根中 *MhBAG* 表达峰值量出现在 60 d, 延长根中出现在 70 d; 在表达高峰时, 吸收根中 *MhBAG*

表达量为对照的 15.6 倍, 延长根中 *MhBAG* 表达量为对照的 29.1 倍 (图 7)。

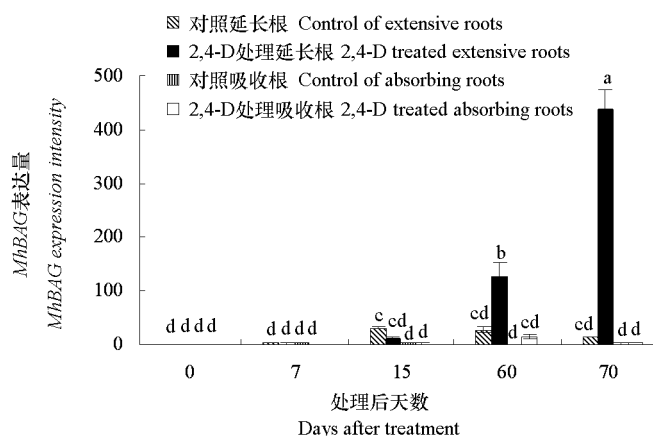


图 7 2,4-D 处理对平邑甜茶延长根和吸收根 *MhBAG* 表达水平的影响

Fig. 7 Effect of 2,4-D on *MhBAG* expression levels of *Malus hupehensis* extensive and absorbing roots

3 讨论

根系是植物的立地之本, 为适应根区不良环境, 苹果根系在胁迫下会出现细胞死亡及与死亡相关的一系列生理变化。比如, 在水分胁迫、盐胁迫和镉胁迫下, 根系细胞死亡量上升, ATP 含量和根系活力逐渐下降, 类 caspase3/7 活性升高等 (Ma et al., 2007; 马怀宇 等, 2010; Jiang et al., 2012), 而在高浓度 2,4-D 处理下, 根系也发生了同样变化, 这些变化与死亡相关基因的表达密切相关。已有研究表明, 拟南芥等植物在遭受机械伤害、病原侵染 (Sanchez et al., 2000) 和活性氧处理 (Kawai-Yamada et al., 2004; Kim et al., 2009) 等多种生物与非生物胁迫时, 均伴随有 *BI-1* 基因的表达上调 (Watanabe & Lam, 2006); *MhHSP70* 基因 (沈伟 等, 2012) 在胁迫下同样会表达上调。多种细胞存活因子都能促进 *BAG* 的表达, 超表达 *BAG* 基因能显著提高植物的抗逆性 (Townsend et al., 2003; Doukhanina et al., 2006), *BAG* 表达的下调与细胞死亡相关 (Sourisseau et al., 2001)。在本试验中, 在 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D 水溶液灌根处理后, 平邑甜茶抗凋亡基因 *MhBI-1* 与 *MhHSP70* 在新根中也出现了表达上调的现象, *MhBAG* 则是根系细胞死亡高峰时下调, 而后表达升高。

高浓度 2,4-D 会对根系造成胁迫伤害, 纵观 2,4-D 处理过程中新根中 *MhHSP70*、*MhBI-1* 和 *MhBAG* 的表达和根系细胞死亡量的变化, 可见抗凋亡基因表达高峰比细胞死亡量高峰出现的略晚, 在细胞死亡量从最高点逐渐下降时 (处理 15 d 后), 抗凋亡基因的表达才开始逐渐增强, 尤其是 *MhBAG* 基因。抗凋亡基因的高表达有利于减少细胞凋亡的发生, 在总体上必然会降低细胞的死亡量, 而抗凋亡基因的过量表达, 不仅能减少细胞死亡, 还能激活细胞增殖和存活信号分子 (Townsend et al., 2003; Doukhanina et al., 2006), 因此, 2,4-D 处理 15 d 后细胞死亡量的下降, 推测有抗凋亡基因表达增强的贡献。

根系的死亡与更新取决于根系细胞的死亡与再生。在根系发育过程中, 细胞的死亡与再生受基因控制, 抗凋亡基因的表达有利于细胞的存活和延长其所在器官的寿命 (Doukhanina et al., 2006; Watanabe & Lam, 2006)。比较 *MhHSP70*、*MhBI-1* 和 *MhBAG* 基因在延长根和吸收根中表达差别, 可见在表达高峰时, 它们表达量的升高倍数均是延长根明显高于吸收根, 说明延长根细胞比吸收根细胞有更强的抗凋亡能力, 而较强的抗凋亡能力有利于细胞和根系寿命的延长, 这恰与吸收根生命

周期短、延长根寿命长、吸收根比延长根更新速度快的现象(杨洪强和束怀瑞, 2007)相吻合。而且, 吸收根的根系活力与 ATP 含量以及细胞死亡量和 caspase3/7 活性均高于延长根, 这一结果也进一步验证了吸收根和延长根两者在生理特性上的差别。

虽然本研究中 *MhHSP70* 表达高峰在吸收根和延长根中基本同时到来, 但在 2,4-D 处理早期(7 d), 吸收根中 *MhHSP70* 表达量增高的倍数(为对照的 2.5 倍)明显高于延长根(1.1 倍), 而且, *MhBI-1* 和 *MhBAG* 的表达高峰在吸收根中比在延长根到来的早, 这表明吸收根抗凋亡基因对 2,4-D 的响应比延长根迅速; 同时, 在 2,4-D 处理早期, 吸收根细胞死亡量的上升倍数与根系活力的下降幅度均高于延长根, 这些说明吸收根对 2,4-D 的反应比延长根更敏感。

根系活力是根系细胞代谢强度的重要反映, ATP 是细胞正常代谢产生的能量载体。由本研究结果可知, 不仅吸收根的根系活力和 ATP 含量高于延长根, 而且在 2,4-D 处理过程中, 两种新根(吸收根和延长根)的根系活力与 ATP 含量的变化动态都非常相近, 同时, 这一变化动态与细胞死亡量的变化恰好相反, 说明根系活力、ATP、细胞死亡量三者密切相关, 它们都可在一定程度上反映根系的死亡与更新状态。

此外, 2,4-D 是清耕果园常用除草剂之一, 它在杀死杂草的同时常会对果树根系产生影响, 本研究从根系活力、ATP 含量、细胞死亡量和抗凋亡基因的表达等方面进一步证实了这一点。同时, 吸收根比延长根更容易受到 2,4-D 的伤害, 即使在延长根没有受到明显影响时, 吸收根也可能会出现大量死亡。而果树吸收养分主要依赖于众多的吸收根, 吸收根也是合成各种生长调节物质的器官之一, 吸收根的过量死亡必然会影响果树养分吸收以及整个树体的生长发育。因此, 在生产中要严格掌握 2,4-D 等除草剂的施用技术和施用量, 尽量避开在根系(尤其是吸收根等细根)集中区或根系大量形成的敏感时期使用, 防止 2,4-D 等除草剂在杀死杂草时伤及果树根系。

References

- Adams J M. 2003. Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development*, 17: 2481 - 2495.
- Antoine D, Valérie D, Nathalie M, Patrick G. 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 647 - 655.
- Boatright K M, Salvesen G S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (6): 725 - 731.
- Doukhanina E V, Chen S, van der Zalm E, Godzik A, Reed J, Martin B, Dickman M B. 2006. Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 18793 - 18801.
- Gaff D F, Okong'O-Ogola O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany*, 22: 757 - 758.
- Henke N, Lisak D A, Schneider L, Habicht J, Pergande M, Methner A. 2011. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium*, 50: 251 - 260.
- Jiang Qian-qian, Yang Hong-qiang, Sun Xiao-li, Li Qiang, Ran Kun, Zhang Xin-rong. 2012. Relationship between polyamines metabolism and cell death in roots of *Malus hupehensis* Rehd. under cadmium stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 11 (7): 1129 - 1136.
- Kawai-Yamada M, Ohmori Y, Uchimiya H. 2004. Dissection of *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *The Plant Cell*, 16: 21 - 32.
- Kim H R, Lee G H, Cho E Y, Chae S W, Ahn T, Chae H J. 2009. Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *Journal of Cell Science*, 122: 1126 - 1133.
- Livak J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.
- Ma Huai-yu, Lü De-guo, Yang Hong-qiang. 2010. Characteristics of mitochondria and cell death in roots of *Malus hupehensis* var. *pingyiensis* under NaCl stress. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 34 (12): 1448 - 1453. (in Chinese)

- 马怀宇, 吕德国, 杨洪强. 2010. NaCl 胁迫下平邑甜茶根系线粒体特性和细胞死亡特征. 植物生态学报, 34 (12): 1448 - 1453.
- Ma Huai-yu, Xiao Jing, Yang Hong-qiang. 2007. Study on root mitochondrial characteristics and root cell death of *Malus hupehensis* Rehd. under water stress. Acta Horticulturae Sinica, 34 (3): 549 - 554. (in Chinese)
- 马怀宇, 肖 静, 杨洪强. 2007. 水分胁迫下湖北海棠根系线粒体及细胞死亡特性研究. 园艺学报, 34 (3): 549 - 554.
- Pazmiño D M, Romero-Puertas M C, Sandalio L M. 2012. Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. Plant Signaling & Behavior, 7 (3): 425 - 427.
- Sanchez P, de Torres Zebala M, Grant M. 2000. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. The Plant Journal, 21: 393 - 399.
- Sharma D, Masison D C. 2009. Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. Protein Pept Lett, 16 (6): 571 - 581.
- Shen Wei, Yang Hong-qiang, Li Qiang, Ran Kun, Jiang Qian-qian, Sun Xiao-li, Zhang Wei-wei, Sui Jing. 2012. The character of *MhHSP70* from *Malus hupehensis* and its response to the stress of cadmium and osmosis. Acta Horticulturae Sinica, 39 (3): 417 - 424. (in Chinese)
- 沈 伟, 杨洪强, 李 强, 冉 昆, 姜倩倩, 孙晓莉, 张玮玮, 隋 静. 2012. 平邑甜茶 *MhHSP70* 的特征及其对镉和渗透胁迫的反应. 园艺学报, 39 (3): 417 - 424.
- Sourisseau T, Desbois C, Debure L, Bowtell D D, Cato A C, Schneikert J, Moyse E, Michel D. 2001. Alteration of the stability of Bag-1 protein in the control of olfactory neuronal apoptosis. Journal of Cell Science, 114 (7): 1409 - 1416.
- Steffens B, Sauter M. 2005. Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid. Plant Physiology, 139: 713 - 721.
- Townsend P A, Cutress R I, Sharp A, Brimmell M, Packham G. 2003. BAG-1: A multifunctional regulator of cell growth and survival. Biochimica et Biophysica Acta, 1603: 83 - 98.
- Townsend P A, Stephanou A, Packham G, Latchman D S. 2005. BAG-1: A multi-functional pro-survival molecule. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37: 251 - 259.
- Wang Wei-guang. 1985. ATP determination with the method of bioluminescence//Xue Ying-long. Experimental manual of plant physiology. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press. (in Chinese)
- 王维光. 1985. 生物发光法测定三磷酸腺苷 (ATP) // 薛应龙. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社.
- Watanabe N, Lam E. 2006. *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. The Plant Journal, 45: 884 - 894.
- Wu Xing-wei, Shan Zheng-jun, Kong De-yang, Xue Yun-han. 2009. Adsorption and leaching behavior of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soils. Journal of Agro-Environment Science, 28 (4): 691 - 695. (in Chinese)
- 吴星卫, 单正军, 孔德洋, 薛韵涵. 2009. 2,4 - 二氯苯氧基乙酸在土壤中的吸附淋溶特性. 农业环境科学学报, 28 (4): 691 - 695.
- Wu Xing-wei, Shan Zheng-jun, Xue Yun-han. 2011. Photolysis, hydrolysis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its degradation characteristics in soils. Journal of Anhui Agricultural Science, 39 (16): 9711 - 9713. (in Chinese)
- 吴星卫, 单正军, 薛韵涵. 2011. 2,4-D 水解、光解及在土壤中的降解特性研究. 安徽农业科学, 39 (16): 9711 - 9713.
- Yang Hong-qiang, Shu Huai-rui. 2007. Studys on apple roots. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 杨洪强, 束怀瑞. 2007. 苹果根系研究. 北京: 科学出版社.
- Zhao Shi-jie, Shi Guo-an, Dong Xin-chun. 2002. Chloride three phenyl tetrazole method for the determination of activity of root//Zhao Shi-jie. Techniques of Plant Physiological Experiment. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Press. (in Chinese)
- 赵世杰, 史国安, 董新纯. 2002. 氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法测定根系活力 // 赵世杰. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业科学技术出版社.