

研究报告

Research Report

Co 胁迫下紫花苜蓿 *HPT* 基因的表达调控研究

刘绵学 伏毅 王艳 谢艳 黄敏*

四川省原子能研究院生物技术研究所, 辐照保藏四川省重点实验室, 成都, 601010

* 通讯作者, minhuang@siae.cn

摘要 钴(Co)胁迫会对植物产生多种毒害作用。为研究其植物毒性作用机理,需构建 Co 胁迫条件下紫花苜蓿的实时荧光定量 PCR 反应体系。研究选取了 6 个持家基因(*actin2*, *GAPDH*, *UBI*, *18S*, *MSC27*, *EFl- α*)作为备选内参基因,以紫花苜蓿植株为实验材料,检测 Co 胁迫条件下备选内参基因的表达稳定性。通过 RefFinder 和 geNorm 软件分析,确定 Co 胁迫下紫花苜蓿最佳内参基因组合为 *actin2* 和 *18S*。将四种根际促生菌分别接种紫花苜蓿,并使用 100 mg/L CoCl₂ 对接种后植株进行处理,使用筛选内参引物检测生育酚合成关键基因尿黑酸叶绿醇转移酶(*HPT*)的转录水平。研究结果显示 Co 胁迫可使 *HPT* 基因转录水平发生显著下调,根际促生菌铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 1401 可降低 Co 胁迫对苜蓿植株的毒害作用,接种该菌株植株的 *HPT* 基因相对表达水平为对照样本的 6.63 倍,植株株高和生物量分别达到对照样本的 140.86% 和 193.62%。根据测试样本中 *HPT* 基因转录水平与植株 Co 耐受能力的变化趋势,推测紫花苜蓿的 Co 耐受能力增强与生育酚的合成途径调控或存在紧密联系。

关键词 紫花苜蓿, 内参基因筛选, 钴胁迫, *HPT* 基因

Study on *HPT* Gene Expression Regulation of *Medicago sativa* under Cobalt Stress

Liu Mianxue Fu Yi Wang Yan Xie Yan Huang Min*

Department of Biotechnology, Sichuan Institute of Atomic Energy, Irradiation Preservation Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu, 601010

* Corresponding author, minhuang@siae.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.013.002713

Abstract Cobalt stress could lead in several toxic effects for plants. In order to investigate the mechanism of Cobalt toxicity, six candidate housekeeper genes were selected to set up the real time PCR test system. We choose the *Medicago sativa* as plant material and analysis the expression stability of these candidate genes. *18S* and *actin2* were selected as optimized refer genes according to the analysis results of RefFinder and geNorm software. *Medicago sativa* were infected respectively with 4 plant growth-promoting bacteria, and then half of plants were treated with 100 mg/L CoCl₂ solution. Transcription level of *HPT* gene was analyzed at 60 d after seeds germination. Analysis results indicated that cobalt stress could significantly decrease the transcription level of *HPT*, but plant growth-promoting bacteria could relieve toxic effects of cobalt, that enhancement of Cobalt tolerance is quite possible through the biosynthesis process of plant tocopherol.

Keywords *Medicago sativa*, Evaluation of reference genes, Cobalt stress, *HPT* gene

钴(Cobalt, Co)是一种过渡金属元素,是多种生物酶系统中的激活因子或组成元件(Paustenbach et al., 2013),同时也是根瘤菌、自生固氮菌以及蓝藻细菌生长的必要条件(Riley and Dilworth, 1985)。中国大部

分土壤中 Co 含量为 5~40 mg/kg,平均的 Co 含量背景值为 11.6 mg/kg(魏复盛等, 1991)部分地区土壤中超过背景含量的 Co 是造成重金属污染的原因之一。生长基质中微量的 Co 可刺激海藻及高等植物生长,

基金项目 本研究由四川省科技厅科技支撑计划项目(2012FZ0078, 2015SZ0209)资助

高浓度的 Co 对植物存在毒害作用,主要表现为:(1)地上部分生物量降低(Talukder, 1994; Chatterjee and Chatterjee, 2000; Keeling et al., 2003; Li et al., 2009)、叶片脱落、叶脉脱色、型叶绿素的合成受到抑制(Kapustka et al., 2006; Sree et al., 2015)、叶片生长提前关闭以及影响植物根系生长(Ghodake et al., 2011)。(2)影响植物代谢关键生物酶活性(Talukder, 1994; Chatterjee and Chatterjee, 2000; Sree et al., 2015)。(3)影响植物细胞内氧化还原内稳态、抗氧化酶活性(Chatterjee and Chatterjee, 2000)。如何降低重金属 Co 对植物的毒害作用,已成为近年来的研究热点。

本研究中考察了根际促生菌(plant growth-promoting bacteria, PGPB)的接种对钴胁迫下紫花苜蓿生长的影响。PGPB 可以在环境胁迫条件下通过多种方式促进植物生长(Farwell et al., 2007; Glick et al., 2001; 赵丽红等, 2008; Buysens et al., 1996; Hao et al., 2010)。在促进植物生长的同时, PGPB 可提升植物对 Co 胁迫的耐受能力,如赵丽红等(2008)克隆 *IaaM* 基因(IAA 合成途径中的色氨酸单加氧酶)和 ACC 脱氨酶基因,并通过转基因操作转化进入矮牵牛,可在 126 $\mu\text{mol/L}$ Co 胁迫下保证转基因植株的生根,以及在 168 $\mu\text{mol/L}$ Co 胁迫下保证转基因植株地上部分的生长。虽然已经获得多种根际促生菌微生物可提升植物重金属耐受性的正向结果(Ma et al., 2011),但其作用机制的揭示尚需更多研究结果。

研究中选择的紫花苜蓿尿黑酸叶绿醇转移酶(*HPT*)基因,编码生育酚合成途径限速关键酶—尿黑酸植基转移酶,在苜蓿生育酚合成途径中负责将植基二磷酸(PDP)底物转化为 2-甲基-6-植基苯醌(MPBQ),进而生成生育酚的前体,是生育酚合成途径 5 种关键酶之一(Penna and Pogson, 2006)。有报道在大豆和拟南芥的转基因试验中,转入 *HPT* 基因后,种子中生育酚的分别提升至 1.4 倍和 1.8 倍(Savidge et al., 2002; Collakova, 2003; Karunanandaa et al., 2005),拟南芥叶片中的生育酚含量达到了对照植株的 4.4 倍(Savidge et al., 2002; Collakova, 2003; Karunanandaa et al., 2005)。由于生育酚在植物生理生化反应中承担了抗氧化和光合保护的功能(Welch, 2003),有报道生菜材料在多种胁迫条件之下,如强光、干旱、低温及脱落酸等激素诱导之下 *HPT* 基因转录表达均显著提高。如 2011 年任薇薇博士论文报道使用农杆菌渗入法进行 *HPT* 基因瞬时表达后, *HPT* 基因上调至对照的 12.47 倍。将 *HPT* 基因作为研究目标,目的在于考察紫花苜蓿生育酚合成途径在 Co 胁迫条件

下及根际促生菌接种后,是否同样具有明显的调控趋势。目前根际促生菌-紫花苜蓿形成的共生体系在土壤重金属修复中具有广泛的应用。研究可初步揭示促生菌提升植物耐受能力的作用机制,对促生菌的筛选和对土壤重金属生物修复,具有重要的理论意义。

1 结果与分析

1.1 Co 胁迫对紫花苜蓿的毒害作用分析

萌发 60 d 后采集紫花苜蓿,发现在接种促生菌的植株根部形成根瘤组织,而对照植株根部无根瘤出现,显示促生菌在植物中已正常接种。根据植物材料株高与生物量统计结果(图 1),在没有 CoCl_2 条件下,根际促生菌的接种并未对株高和生物量产生明显影响,而在 100 mg/L 的 CoCl_2 溶液处理后,不同菌株处理的植株之间在株高和生物量上出现了明显差异:(1)部分植株株高和生物量均出现明显降低。CK 植株平均株高为 18.66 cm,处理后降低至 13.36 cm;降幅最大的为接种 *Sinorhizobium meliloti* 菌株的植株,平均株高从 19.51 cm 降至 12.30 cm。在生物量上,CK 植株生物量均值在胁迫前为 0.356 g,胁迫后降为 0.204 g,降幅最大是接种 *Sinorhizobium meliloti* 菌株的植株,生物量均值在处理前为 0.349 g,处理后降为 0.119 g,降幅高于 CK 植株。(2)相比 CK 植株,接种 *Pseudomonas aeruginosa* 1401 和 *Pseudomonas maltophilia* 1402 菌株植株的株高和生物量下降幅度更小。其中接种 *Pseudomonas aeruginosa* 1401 的植株,在 Co 胁迫后,平均株高分别为 18.82 cm,生物量均值分别为 0.395 g,生长状况明显优于同样胁迫条件下的 CK 植株,已与未胁迫的 CK 植株无明显差异。数据显示促生菌 *Pseudomonas aeruginosa* 1401 的接种可降低 Co 对紫花苜蓿的毒害作用,相对于 CK 植株,分别株高和生物量提高了 40.87%和 93.63%。

1.2 模板来源及浓度检测

研究中使用的植物 cDNA 模板处理方法(表 1),所有模板均为反转录体系稀释 10 倍获得,微量检测后发现浓度均位于 5~10 mg/mL 之间,PCR 模板符合实验要求。

1.3 引物扩增效率及特异性检测

备选内参基因 Real time PCR 溶解曲线显示只有单一主峰,凝胶电泳检测 PCR 扩增产物结果显示:只有特异性扩增条带,无其它杂带,且片段大小

与目的条带一致,说明所设计引物特异性良好。通过效率检测发现引物扩增效率均在 90%~110%之间,相关系数均大于 0.99(表 2),设计引物符合实验要求。

1.4 备选内参引物的平均表达水平

对备选内参基因进行比较 Ct 值法发现,备选基因中 *18S* 的 Ct 值范围最低,其次为 *actin2* 基因。观

察发现 *GAPDH* 基因和 *UBI* 基因在 Co 胁迫环境中 Ct 值下降明显,显示出更低的表达水平。考虑到在 Co 胁迫下,植株内的氧化胁迫势能增加,必然对参与葡萄糖酵解途径等有氧代谢产生较大的影响,*GAPDH* 基因的表达将受到抑制;其次,Co 胁迫会带来细胞内多种蛋白酶活性的丧失,细胞代谢水平降低,因此参与泛素化修饰的 *UBI* 基因的表达也将受到影响。

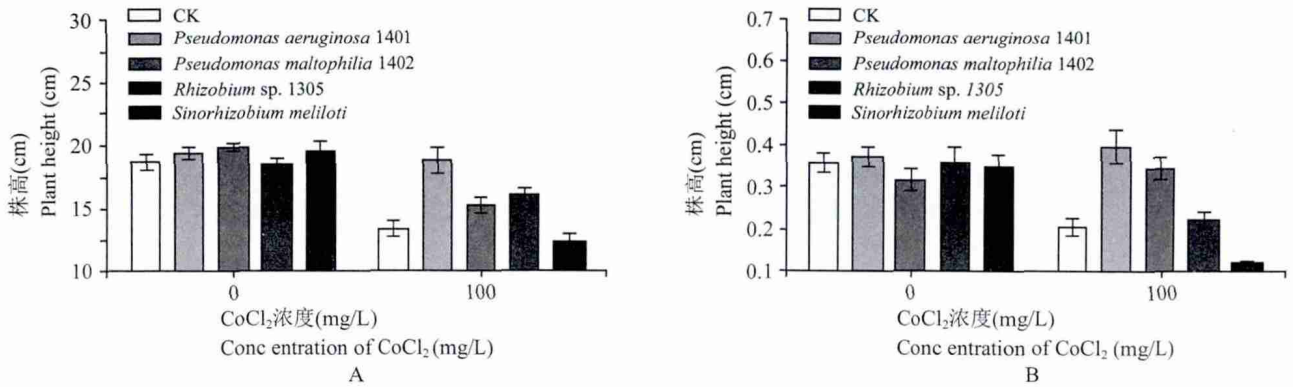


图 1 促生菌接种紫花苜蓿后植株 Co 耐受能力检测

Figure 1 Analysis of Co tolerance of plants infected with PGPB strains

表 1 植物 cDNA 模板浓度

Table 1 Concentration of plant cDNA templates

编号 NO.	CoCl ₂ 浓度(mg/L) Concentration of CoCl ₂ (mg/L)	宿主植物接种菌株 * Strain of infection *	cDNA 模板浓度(mg/mL) Concentration of cDNA (mg/mL)
1	0	无 No strain	7.91
2	100	无 No strain	6.44
3	0	草木樨中华根瘤菌 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	8.01
4	100	草木樨中华根瘤菌 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	7.42
5	0	根瘤菌属菌株 1305 <i>Rhizobium</i> sp. 1305	7.64
6	100	根瘤菌属菌株 1305 <i>Rhizobium</i> sp. 1305	7.95
7	0	铜绿假单胞菌 1401 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1401	8.83
8	100	铜绿假单胞菌 1401 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1401	9.34
9	0	嗜麦芽假单胞菌 1402 <i>Pseudomonas maltophilia</i> 1402	7.62
10	100	嗜麦芽假单胞菌 1402 <i>Pseudomonas maltophilia</i> 1402	7.92

注: * 本研究所保存的环境筛选菌株。

Note: * Environmental strains were screened and reserved in our institute

表 2 备选内参引物序列及其实时定量 RT-PCR 的扩增效率参数

Table 2 Primer sequence for candidate reference genes and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) amplification efficiency parameters

基因 Gene	GenBank 序列号 GenBank ACC. No.	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度(bp) Amplicon length (bp)	扩增效率(%)* E (%)*	相关系数 * R2 *
<i>actin2</i>	JQ028730.1	F: GATGCTGAGGATATTCAACCCC R: CCATGACACCAAGTATGACGAGG	133	106.2	0.994
<i>GAPDH</i>	XM003595990	F: TGGAAATCAATGGGAAGCAGG R: ATAGGTGAATCAGCAGATGGAGC	190	95.0	0.991
<i>UBI</i>	XM003595069	F: CTCCATTGCTGCTGCGTCTC R: CCACCCCGAAGTCGCTACAC	257	108.0	0.995
<i>18S</i>	KJ507198.1	F: TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTC R: CAATGATCCTTCCGCAGGTTTAC	252	105.2	0.990
<i>MSC27</i>	X63872	F: GTTGAAGTAGACATTGGTGCTAACG R: AGCTGAGTCATCAACACCCTCA	100	93.8	0.997
<i>EF-1α</i>	XM003618727	F: GCACGCTCTTCTTGCATTTACT R: GGGCTTGCTGTGGGTCTCTT	295	98.8	0.990

注: * 数据由 CFX-Manager3.1 软件的标准曲线计算模式获得

Note: * All results calculated by CFX-manager3.1 built-in formula

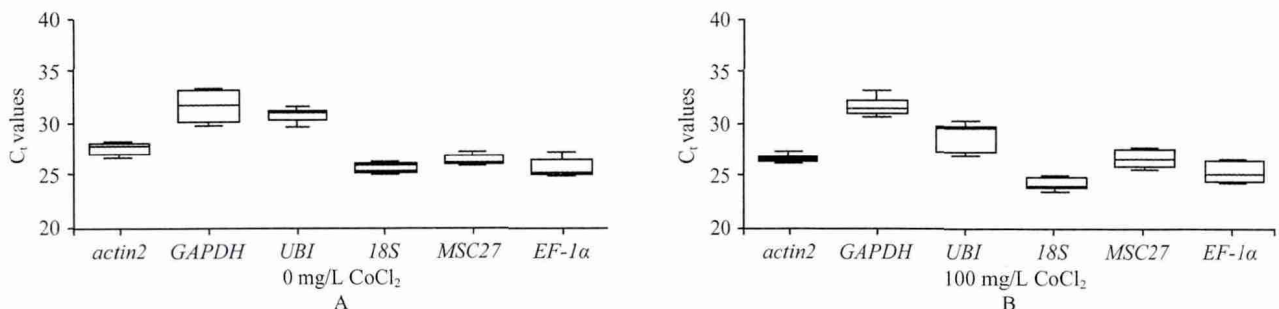


图 2 备选内参基因表达水平

注: A: 无钴样本检测结果; B: 100 mg/L CoCl₂ 处理样本检测结果

Figure 2 Expression level of candidate reference genes

Note: A: Samples with no Cobalt; B: Samples treated with 100 mg/L CoCl₂

备选内参基因的 Ct 值均集中在 25~35 之间(图 2)。

1.5 内参引物的软件筛选

使用在线分析内参引物工具 refFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>)对备选内参基因的表达稳定性进行分析。根据四种算法(Comparative ΔCt, BestKeeper, NormFinder 和 geNorm)的比较(图 3A~图 3D),最终筛选获得 Co 胁迫中内参基因表达稳定性的顺序:18S>actin2>UBI>MSC27>GAPDH>EF1-α(图 3E)。

使用 geNorm 软件分析,确定内参引物的数量(图 4)。检测标准为当 $V_{n+1} \leq 0.15$,则可使用 n 个引物组合进行定量检测。结果中发现顺序选择备选内参

基因的 V_{n+1} 均小于 0.15,综合考虑实验成本和操作,确定使用 2 对内参基因 18S 和 actin2。

1.6 HPT 基因表达调控分析

图 5 展示了 HPT 基因在接种 PGPB 前后的转录调控趋势。以 actin2 和 18S 为内参检测样本中尿黑酸植基转移酶编码基因(HPT)的表达水平。从结果中可知:(1)当 PGPB 接种紫花苜蓿后,植株的 HPT 转录水平有较大的提升,提升最高的是接种 *Rhizobium sp.*1305 的植株中 HPT 转录水平达到了 CK 植株的 13.91 倍。(2)紫花苜蓿处于 100 mg/L Co 胁迫时,CK 植株的 HPT 基因表达水平下降至对照的 27%。由于 HPT 基因编码生育酚合成途径关键限速酶,其转录

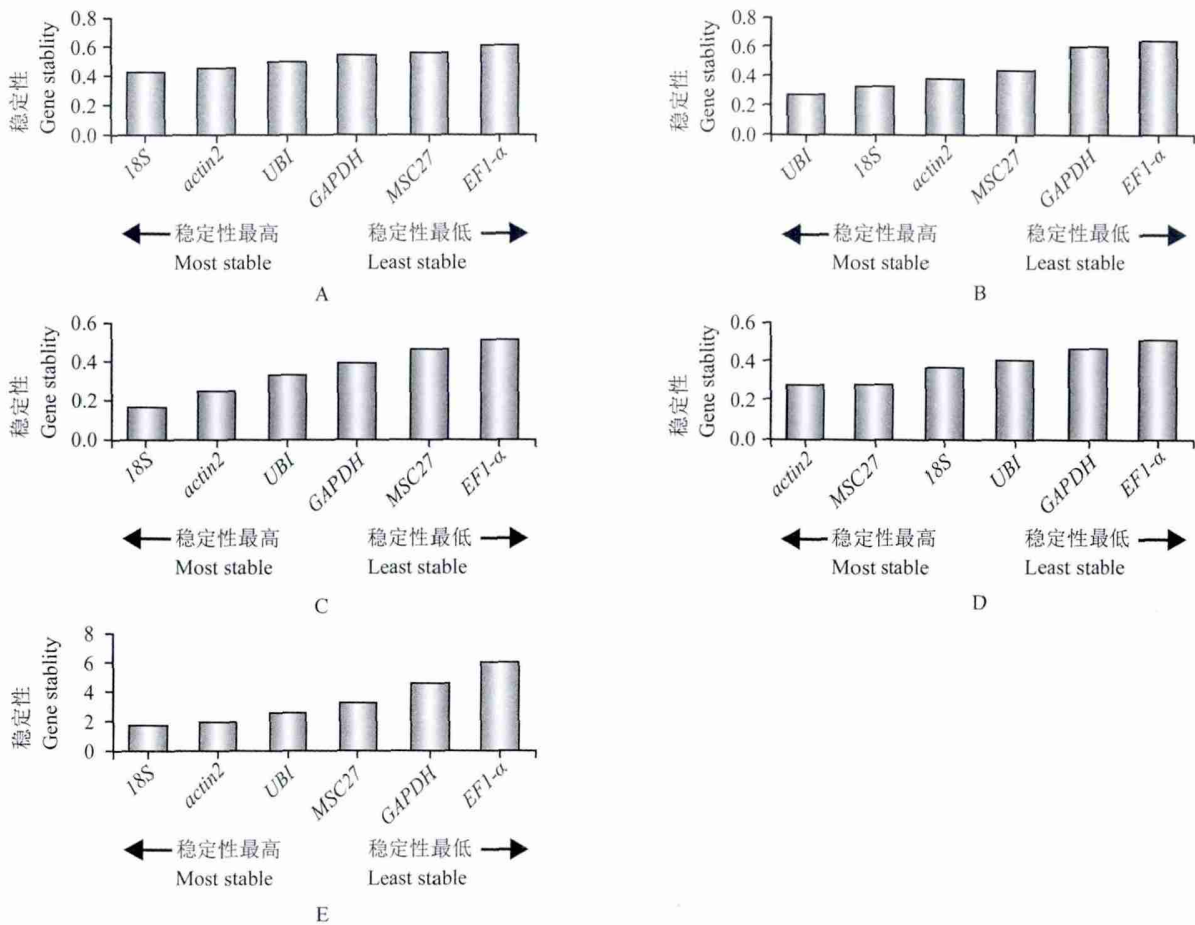


图3 refFinder 软件对备选内参引物的表达稳定性分析结果

注: A: Comparative ΔC_t 值法分析结果; B: BestKeeper 分析结果; C: NormFinder 分析结果; D: geNorm 分析结果; E: 引物稳定性综合分析结果

Figure 3 Analysis results of expression stability of candidate reference primers by refFinder software

Note: A: The result of comparative ΔC_t method; B: The analysis result of BestKeeper; C: The result of NormFinder; D: The analysis result of geNorm; E: The comprehensive results

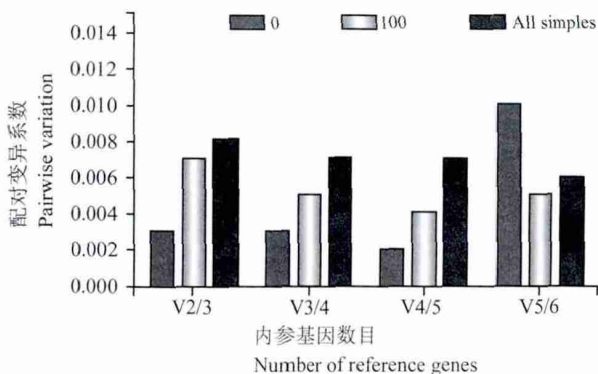


图4 备选内参引物数目分析结果

Figure 4 Analysis of the optimal number of candidate reference genes by geNorm

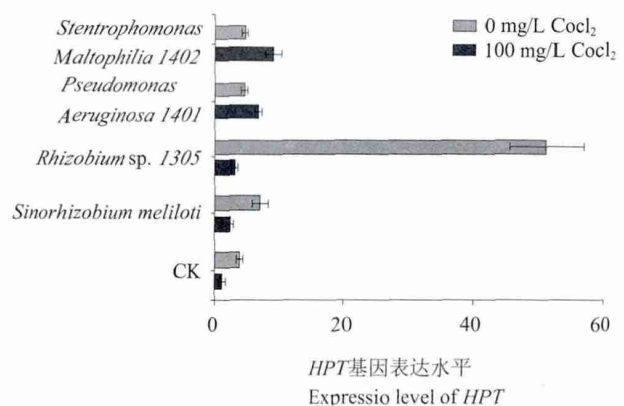


图5 紫花苜蓿 *HPT* 基因的表达水平

Figure 5 Analysis of expression level of *Alfalfa HPT* gene

水平的大幅度降低会导致植物生育酚合成量下降, 从而影响植物抵抗氧化胁迫的能力(Collakova and Della, 2001)。(3)接种 PGPB 后的植株, 其 *HPT* 基因的

转录水平在受 Co 胁迫后明显高于 CK 植株。其中接种 *Pseudomonas aeruginosa* 1401 和 *Stenotrophomonas maltophilia* 1402 的植株在 Co 胁迫条件下 *HPT* 基因

转录水平分别是同等条件下 CK 植株的 6.63 倍和 9.03 倍。

研究中对其他生育酚合成酶(*HPPD* 基因, *TC* 基因, γ -*TMT* 基因)的转录水平进行了分析,在 Co 胁迫后均呈现明显上调的趋势(数据未显示)。紫花苜蓿生育酚合成途径中仅 *HPT* 基因会因 Co 胁迫表达下调, *HPT* 基因有较大可能是 Co 对植物产生毒害作用的靶标分子。

2 讨论

Real time PCR 技术在植物关键调控基因表达研究中的应用广泛,为配合该技术的使用,需要筛选特定条件下合适内参基因。原因是不同环境中持家基因的表达水平差异极大(Pombo-Suarez et al., 2008; Infante et al., 2008),而且不同的金属元素胁迫下,持家基因的表达水平也不尽相同。已有报道分别在 Zn 胁迫条件和 Cu 胁迫条件下,天蓝苜蓿的内参基因选择各有差异(孙亚丽等, 2014; 张德辉等, 2015)。本研究中选择 6 个持家基因中,Co 胁迫下 *18S* 和 *actin2* 的内参稳定性较好,而对 *GPRDH* 等基因影响较大,说明 Co 毒性作用偏向于抑制细胞代谢过程,对核基因组和细胞骨架形成的影响较小。

联系 *HPT* 基因表达(图 5)与株高/生物量(图 1)的数据可发现:(1)在常规条件下,接种 PGPB 的植株与 CK 相比的 *HPT* 基因转录水平明显增大,接种 *Rhizobium* sp. 1305 菌株植物的 *HPT* 转录水平上调至 CK 植株的 13.91 倍,但株高与生物量都与 CK 持平。考虑到紫花苜蓿等高等植物对抗氧化胁迫至少具有两套体系—生物酶系统和非酶系统,生育酚只是非酶系统的作用成分之一。非胁迫环境下生育酚和抗氧化生物酶通过共同作用来维持植物机体环境的氧化还原内稳态,生育酚水平在植株维持氧化还原内稳态的过程中并非主导地位。同时,生育酚的合成也受到其底物络氨酸合成途径的影响,生育酚合成途径中单独 *HPT* 基因表达上调会受限于底物不足,生育酚合成量提升的幅度有限。(2)在 Co 胁迫环境中,CK 植株 *HPT* 基因表达水平的调控趋势和植物生长表现具有一致性。研究中在 Co 胁迫条件下, *HPT* 基因转录水平最高的三种植株样本,同时也是株高和生物量表现最优的前三位植株;反之, *HPT* 基因表达最低的植株,包括 CK 与 *Sinorhizobium meliloti* 接种植株,其株高和生物量均明显低于 *HPT* 基因高表达植株。由于 *HPT* 转录水平较

高的植株可合成更高水平的生育酚(Savidge et al., 2002; Collakova, 2003; Karunanandaa et al., 2005)。在对抗 Co 胁迫的过程中,这些植株可展现出更好的耐受性。

3 材料与方法

3.1 植物材料

供试材料为休眠级 8 级“游客南方型紫花苜蓿”,购自百绿集团。4 度春化后置于发泡椰糠砖(121℃灭菌 2 h)中萌发。萌发后第 3 天、第 5 天和第 7 天分别使用 1 mL 的 PGBP 菌液进行接种。分别使用 1/2 MS 培养基和含 Co 培养基(含 100 mg/L CoCl₂) 1/2 MS 进行培养。培养条件为照度 2 000 Lx,白天 24℃×14 h,夜间 20℃×10 h,湿度 50%。萌发后 60 d 采集植物材料,统计植株的株高和生物量,每种处理设 10 个生物学重复。

3.2 菌株材料

选取 4 种根际促生菌株接种苜蓿材料(表 1),菌株均为本研究所胁迫环境中筛选获得的植物促生菌株。

3.3 RNA 提取及 cDNA 的合成

植物萌发 30 d 后,采集植株地上组织液氮碾磨,使用 Bio-Rad 微量 RNA 提取试剂盒提取植株总 RNA,使用 iScript cDNA Synthesis Kit 合成,第一链 cDNA,操作均参照试剂盒说明。使用 Snapdrop100 仪器检测 cDNA 模板浓度。

3.4 引物设计与验证

选取 6 个持家基因(表 2)作为备选内参基因:(1) *actin2*, 编码细胞骨架结构蛋白;(2) *GAPDH*, 编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶;(3) *UBI*, 编码泛素连接酶;(4) *18S*, 编码核糖体蛋白;(5) *MSC27*, 参考 Kakar (2008) 的引物设计;(6) *EF1- α* , 编码真核延伸因子。使用 Prime Primer 5.0 进行引物设计,引物合成由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。

引物扩增效率及特异性分析参照张德辉等(2015)方法。检测仪器为 CFX 96™ Realtime System (Bio-Rad) 荧光定量 PCR 仪。PCR 体系 10 μ L,程序为 2× Sso-fast Premix 5 μ L,模板 0.2 μ L,引物各 0.5 μ L, ddH₂O 3.8 μ L,Real-time PCR 程序为 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 5 s, 50 个循环,65℃ 至 95℃,每隔 0.5℃ 溶解曲线分析。使用 CFX96 内置软件计算各引物标准

曲线的斜率和扩增效率 E。通过溶解曲线检测内参引物特异性。

3.5 内参引物的筛选

使用 Graphpad Prism6 对备选内参 Cycle threshold (Ct)值进行分析。备选内参引物表达稳定性分析参照张德辉等方法(Zhang et al., 2015)。检测 cDNA 模板(1~2)中备选内参基因的表达稳定性 PCR 体系和 PCR 程序与 3.4 相同,所有处理均设置 3 个重复。

3.6 HPT 基因表达调控分析

根据蒺藜状苜蓿尿黑酸叶绿醇转移酶编码基因(GenBank No.AY957391.2)序列设计引物,正向引物 HPT702F 5'-AGGGACGGCTTATTCCATCA-3',反向引物 HPT988R :5'-AATACCCGCTTCTGACCTAAC-3'。以筛选内参基因为参照,按照 3.4 中方法进行反应,检测表 1 中 cDNA 模板(1~10) HPT 基因的相对表达水平。

作者贡献

刘绵学、伏毅是本研究的实验设计和实验研究的执行人;王艳和谢艳参与了研究中的植物栽培工作,黄敏指导了论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由四川省科技厅科技支撑计划项目(2012FZ0078, 2015SZ0209)资助。

参考文献

- Buysen S., Heungens K., Poppe J., and Hofte, 1996, Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (3): 865-871
- Chatterjee J., and Chatterjee C., 2000, Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower, *Environ Pollut*, 109: 69-74
- Collakova E., 2003, The Role of Homogentisate Phyltyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress, *Plant Physiol.*, 133: 930-940
- Collakova E., and Della P.D., 2001, Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 127

- Della P.D., and Pogson B.J., 2006, Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids, *Annual Review of Plant Biology*, 57: 711-738
- Farwell A.J., Vesely S., Nero V., Rodriguez H., McCormack K., Shah S., Dixon G.D., and Glick B.R., 2007, Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site, *Environmental Pollution*, 147: 540-545
- Ghodake G., Seo Y.D., and Lee D.S., 2011, Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*, *J. Hazard Mater*, 186: 952-955
- Glick B.R., Penrose D.M., and Ma W., 2001, Bacterial promotion of plant growth, *Biotechnol Adv.*, 19: 135-138
- Hao Y., Charles T.C., and Glick B.R., 2010, ACC deaminase increases the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation frequency of commercial canola cultivars, *Fems Microbiology Letters*, 307: 185-190
- Infante C., Matsuoka M.P., Asensio E., Canavate J.P., Reith M., and Manchado M., 2008, Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR, *BMC Molecular Biology*, 9: 28
- Kakar K., Wandrey M., Czechowski T., Gaertner T., Scheible W., Stitt M., Torres-Jerez I., Xiao Y., Redman J.C., Wu H.C., Cheung F., Town C.D., and Udvardi M.K., 2008, A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*, *Plant Methods*, 4: 232-234
- Kapustka L.A., Eskew D., and Yocum J.M., 2006, Plant toxicity testing to drive ecological soil screening levels for cobalt and nickel, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 865-874
- Karunanandaa B., Qi Q., Hao M., Baszis S.R., Jensen P.K., Wong Y.H.H., Jiang J., Venkatramesh M., Gruys K.J., Moshiri F., Beittenmiller D.P., Weiss J.D., and Valentin H. E., 2005, Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol, *Metabolic Engineering*, 7: 384-400
- Keeling S.M., Stewart R.B., Anderson C.W., and Robinson B.H., 2003, Nickel and cobalt phytoextraction by the hyperaccumulator *Berkheya coddii*: implications for polymetallic phytomining and phytoremediation, *Int. J. Phytoremediation*, 5: 235-244
- Li H.F., Gray C., Mico C., Zhao F.J., and McGrath S.P., 2009, Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils, *Chemosphere*, 75: 979-986
- Ma Y., Jiang W., Liu Q., Ryuko S., and Kuno T., 2011, Genome-wide screening for genes associated with FK506 sensitivity in fission yeast, *PLoS One*, 6(8): 1-10
- Paustenbach D.J., Tvermoes B.E., Unice K.M., Finley B.L., and Kerger B.D., 2013, A review of the health hazards posed by cobalt, *Critical Reviews in Toxicology*, 43: 316-362

- Pombo-Suarez M., Calaza M., Gomez-Reino J.J., and Gonzalez A., 2008, Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage, *BMC Molecular Biology*, 9: 17
- Riley I.T., and Dilworth M.J., 1985, Cobalt status and its effects on soil populations of *Rhizobium lupini*, rhizosphere colonization and nodule initiation, *Soil Biology and Biochemistry*, 17: 81-85
- Savidge B., Weiss J.D., Wong Y.H., Lassner M.W., Mitsky T.A., Shewmaker C.K., Post-Beittenmiller D., and Valentin H.E., 2002, Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 129: 321-332
- Sree K.S., Keresztes A., Mueller-Roeber B., Brandt R., Eberius M., Fischer W., and Appenroth K.J., 2015, Phytotoxicity of cobalt ions on the duckweed *Lemna minor*-Morphology, ion uptake, and starch accumulation, *Chemosphere*, 131: 149-156
- Talukder G., 1994, Effects of cobalt on plants, *The botanical Review*, 60(2): 149-181
- Wei F.S., Chen J.S., Wu Y.Y., and Zheng C.J., 1991, Study on the background contents on 61 elements of soils in China, *Huanjing Kexue (Environmental Science)*, 4: 12-20 (魏复盛, 陈静生, 吴燕玉, 郑春江, 1991, 中国土壤环境背景值研究, *环境科学*, 4: 12-20)
- Welch R., Medina J., Gullano G., Beyer P., and Von Lintig, 2003, Structural and functional characterization of the synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 216: 523-534
- Sun Y.L., Zhang D.H., Zhao L., Xia C.C., and Chou M.X., 2014, Reference gene selection for real-time quantitative PCR in black medic (*Medicago lupulina* L.) root tissue under copper stress, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 22(10): 1223-1231 (孙亚丽, 张德辉, 赵亮, 夏聪聪, 丑敏霞, 2014, 铜胁迫下天蓝苜蓿根组织实时定量 PCR 内参基因的选择, *农业生物技术学报*, 22(10): 1223-1231)
- Zhang D.H., Sun Y.L., Zhao L., and Chou M.X., Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in medicago lupulina under zinc stress (*China Environmental Science*), 35(3): 833-838 (张德辉, 孙亚丽, 赵亮, 丑敏霞, 2015, 天蓝苜蓿锌胁迫下实时定量 PCR 内参基因筛选, *中国环境科学*, 35(3): 833-838)
- Zhao L.H., Ke B., Zhao N., and Chen S.Y., 2008, Research of cobalt resistance in *petunia hybrida* by combining *iaaM* and *ACC* deaminase gene expression, *Wuhan Shengwu Gongcheng Xueyuan Xuebao (Journal of Wuhan Bioengineering Institute)*, 4(3): 128-132 (赵丽红, 柯滨, 赵娜, 陈士云, 2008, *iaaM* 和 *ACC* 脱氨基酶基因表达与矮牵牛抗钴效果, *武汉生物工程学院学报*, 4(3): 128-132)