

## 水花生愈伤组织对 $Pb^{2+}$ 胁迫的响应\*

王娟, 施国新\*\*, 张乐乐, 康宜宁, 徐小颖, 丁春霞  
(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210046)

**摘要:** 利用组织培养技术培养水花生愈伤组织并以此为实验材料, 研究不同浓度(0, 0.2, 0.4, 0.8 和 1.6 mmol/L)的  $Pb^{2+}$  对水花生愈伤组织光合色素和可溶性蛋白含量、活性氧水平、抗氧化酶活性(CAT、SOD 和 POD)以及细胞亚显微结构产生的胁迫影响。结果表明, 随着  $Pb^{2+}$  浓度的增加, 水花生愈伤组织光合色素和可溶性蛋白含量逐渐下降; 超氧阴离子和过氧化氢含量呈上升趋势, 丙二醛含量表现为先升后降; 超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性同样呈现先升后降趋势, 过氧化氢酶活性则为逐渐下降的趋势; 电镜观察发现,  $Pb^{2+}$  胁迫对愈伤组织细胞的叶绿体、线粒体和细胞核造成不同程度的损伤, 0.8 - 1.6 mmol/L 浓度对超微结构产生致命性的毒害。  $Pb^{2+}$  破坏了水花生愈伤组织进行正常生长代谢所必需的生理和结构基础, 且打乱了代谢平衡, 最终导致愈伤组织的死亡。

**关键词:** 愈伤组织; 水花生;  $Pb^{2+}$  胁迫; 抗氧化酶; 超微结构

## Response of callus of *Alternanthera philoxeroides* to $Pb^{2+}$ stress

WANG Juan, SHI Guoxin, ZHANG Lele, KANG Yining, XU Xiaoying & DING Chunxia  
(College of Life Science, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210046, P. R. China)

**Abstract:** Callus of *Alternanthera philoxeroides* was cultured by tissue culture technique, which was used as experimental material. This paper studied the toxic effects of  $Pb^{2+}$  gradient concentrations (0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mmol/L) on the contents of photosynthetic pigments and soluble protein, the level of active oxygen, activities of antioxidase (CAT, SOD and POD) and changes of ultrastructure in callus of *Alternanthera philoxeroides*. The results indicated that, with the increasing of  $Pb^{2+}$  concentration, the contents of photosynthetic pigments and soluble protein decreased gradually. The contents of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  increased gradually, while the content of MDA increased at first and then decreased. The changes of SOD and POD activities were the same as MDA, but CAT activity decreased gradually. Transmission electron microscopy observation showed that the chloroplast, mitochondria and nucleus suffered serious damages under  $Pb^{2+}$  stress, and the concentration of 0.8 - 1.6 mmol/L generated the fateful poisons to ultrastructure. It was concluded that  $Pb^{2+}$  stress induced not only destruction of physiological function and structural foundation of *Alternanthera philoxeroides* callus, but also the disorder of physiological metabolism, which led to the death of the callus at last.

**Keywords:** Callus; *Alternanthera philoxeroides*;  $Pb^{2+}$  stress; antioxidase; ultrastructure

随着工农业生产的快速发展和三废的不合理排放, 重金属污染对生态系统的影响日益严重并引起国内外的普遍关注。其中铅对于动植物的代谢和生存是非必须元素, 但却是危害最大的重金属之一, 可导致卟啉代谢紊乱。因此, 经多条途径释放到环境中的铅, 在土壤中富集, 被植物的根系吸收, 从而对植物体的生长发育、生理代谢和形态结构等造成明显的毒害, 而且大量的铅能通过食物链的富集危害人类健康<sup>[1-2]</sup>。

目前, 国内外对  $Pb^{2+}$  毒害的研究对象多为自然生长的植物, 主要研究了  $Pb^{2+}$  对植物体生长发育过程和植物生理过程的影响<sup>[3-4]</sup>, 也有少量文献涉及  $Pb^{2+}$  对植物基因和氨基酸的影响<sup>[5]</sup>。然而, 利用水生植物愈伤组织进行重金属胁迫的研究还未见详细的报道。鉴于此, 本文将分布广泛的挺水植物水花生进行愈伤组织培养, 克

\* 国家自然科学基金项目(30870139)资助。2010-03-15 收稿; 2010-04-28 收修改稿。王娟, 女, 1985年生, 硕士研究生; E-mail: wangjuan.1013@163.com.

\*\* 通讯作者; E-mail: gxshi@nynu.edu.cn.

服了光照、温度、水分及植物生长发育在自然状态下的不可控制性,使实验数据更具重复性和科学性。

本文研究了不同浓度  $Pb^{2+}$  毒害下水花生愈伤组织的生理生化指标变化和细胞超微结构的损害情况,旨在从不同角度全面揭示  $Pb^{2+}$  对水花生愈伤组织的毒害机理,以期为植物的重金属胁迫及抗性原理增加可靠的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

水花生 (*Alternanthera philoxeroides*) 又名空心莲子草、喜旱莲子草,为苋科莲子草属多年生宿根草本植物。具有繁殖能力强、生物量大、抗逆性强、根系发达等特点<sup>[6]</sup>。实验用水花生采自南京师范大学生命科学学院水生生物培育池。以水花生茎段诱导产生的愈伤组织为研究对象。

### 1.2 研究方法

1.2.1 愈伤组织培养 选取幼嫩的水花生茎段作为外植体,用肥皂水浸泡后自来水流动冲洗干净,然后依次经过 70% 酒精 30s、5% 次氯酸钠 10min 和 0.1% 升汞 10min 消毒,无菌水清洗 6 次后接种于添加 6-BA (3.0mg/L) + NAA (0.2mg/L) 的 1/2 MS 培养基中,放入 Forma 3744 控光、控温、控湿全封闭大型培养箱(英国产)中培养愈伤组织。培养箱温度为 25℃,每天光照 16h,光照强度为 1200 - 1500lx<sup>[7-8]</sup>。

1.2.2 愈伤组织铅胁迫处理 选取生长状况一致的致密型水花生愈伤组织置于含 0、0.2、0.4、0.8 和 1.6mmol/L  $Pb(NO_3)_2$  (以纯  $Pb^{2+}$  计) 的蒸馏水中,整个毒害实验都在全封闭培养箱中完成,条件同培养愈伤组织时一致。第 7d 愈伤组织出现毒害梯度现象,取相同部位的愈伤组织块,去离子水洗净、揩干,进行生理指标测定,同时取材进行电镜观察。实验重复 3 次。

1.2.3 生理指标测定 光合色素含量按 Lichtenthaler<sup>[9]</sup> 的方法测定;超氧阴离子 ( $O_2^-$ ) 含量用羟胺氧化反应法<sup>[10]</sup> 测定;过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 含量按一般分光光度法,用  $H_2O_2$  试剂盒测定(南京建成生物工程研究所);丙二醛 (MDA) 含量采用李合生<sup>[11]</sup> 的方法测定;过氧化氢酶 (CAT) 活性测定采用钼酸盐法<sup>[12]</sup>;超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定采用 NBT 光还原法<sup>[13]</sup>;过氧化物酶 (POD) 活性测定采用愈创木酚方法<sup>[14]</sup>;可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法<sup>[15]</sup> 测定。

1.2.4 超微结构观察 在处理第 7d,取不同浓度  $Pb^{2+}$  梯度中相同部位的愈伤组织块,洗净,切成 1mm<sup>3</sup> 大小的样块,置于 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,丙酮系列脱水,Epon812 浸透包埋,LEICA 超薄切片机钻石刀切片,切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后,于 Hitachi H-7650 型透射电镜(日本)下观察并拍照。

### 1.3 统计分析

实验结果为 3 次实验的平均值,试验原始数据的处理和制图采用 Excel 软件完成。将各生理指标与处理浓度作相关性分析,其中  $P \geq 0.05$  为无显著相关; $P < 0.05$  为显著相关; $P < 0.01$  为极显著相关。

## 2 结果与分析

### 2.1 $Pb^{2+}$ 对水花生愈伤组织光合色素含量的影响

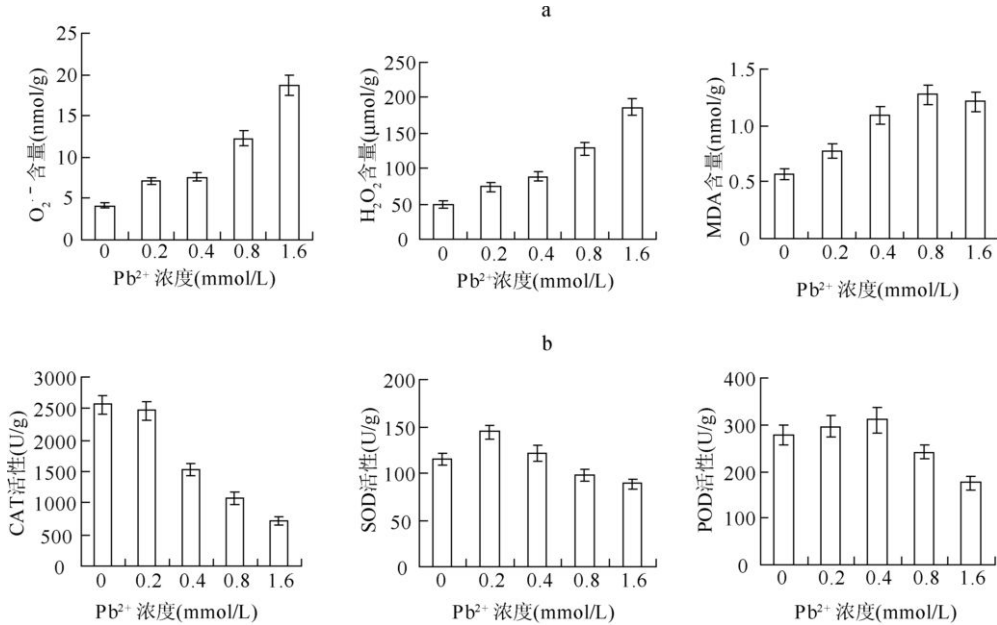
植物光合色素包括叶绿素和类胡萝卜素,随  $Pb^{2+}$  浓度的升高,叶绿素 a (Chl. a) 和类胡萝卜素 (Car) 含量逐渐下降,且在 1.6mmol/L 时分别为对照的 23.00% 和 23.81%;而叶绿素 b (Chl. b) 和总叶绿素 (Chl) 含量是先升后降,在 0.2mmol/L 时达到最大值,分别为对照的 168.57% 和 102.27%,从 0.4mmol/L 浓度开始下降且数值均低于对照;差异分析表明,Chl. a、Chl 和 Car 都为极显著负相关 ( $r_{Chl.a} = -0.9850$ ,  $r_{Chl} = -0.9661$ ,  $r_{Car} = -0.9527$ ;  $P < 0.01$ ), 而 Chl. b 无显著相关性。Chl. a/Chl. b 和 Car/Chl 总体呈下降趋势,二者在各浓度  $Pb^{2+}$  时的数值均低于对照,且均无显著相关性(表 1)。

### 2.2 $Pb^{2+}$ 对水花生愈伤组织 $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 及 MDA 含量的影响

$Pb^{2+}$  胁迫下  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  含量均逐步上升,在 1.6mmol/L 时分别为对照的 4.52 倍和 3.79 倍;而 MDA 含量变化呈先升后降趋势,在 0.8mmol/L 时达到峰值,为对照的 2.23 倍,然后有所下降,但数值仍高于对照(图 1a)。差异分析表明,三者的变化与  $Pb^{2+}$  处理浓度间均达到极显著正相关 ( $r_{O_2^-} = 0.9537$ ,  $r_{H_2O_2} = 0.9681$ ,  $r_{MDA} = 0.9347$ ;  $P < 0.01$ )。

表1  $Pb^{2+}$  胁迫下水花生愈伤组织光合色素含量Tab.1 Photosynthetic pigments contents in callus of *A. philoxeroides* under  $Pb^{2+}$  stress

$Pb^{2+}$ 浓度(mmol/L)	Chl(mg/g)	Chl. a(mg/g)	Chl. b(mg/g)	Car(mg/g)	Chl. a/Chl. b	Car/Chl
0	0.132 ± 0.0073	0.100 ± 0.007	0.035 ± 0.0021	0.021 ± 0.0013	2.979 ± 0.171	0.157 ± 0.010
0.2	0.135 ± 0.0086	0.075 ± 0.005	0.059 ± 0.0030	0.014 ± 0.0011	1.259 ± 0.077	0.106 ± 0.007
0.4	0.095 ± 0.0059	0.065 ± 0.004	0.029 ± 0.0015	0.008 ± 0.0007	2.292 ± 0.124	0.089 ± 0.006
0.8	0.073 ± 0.0052	0.051 ± 0.002	0.023 ± 0.0013	0.007 ± 0.0006	2.241 ± 0.110	0.102 ± 0.007
1.6	0.037 ± 0.0027	0.023 ± 0.002	0.014 ± 0.0007	0.005 ± 0.0004	1.655 ± 0.090	0.127 ± 0.009

图1  $Pb^{2+}$  对水花生愈伤组织  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、MDA 含量(a)以及 CAT、SOD、POD(b)活性的影响Fig.1 Effects of  $Pb^{2+}$  on  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$ 、MDA content(a) and CAT, SOD, POD(b) activity in callus of *A. philoxeroides*

### 2.3 $Pb^{2+}$ 对水花生愈伤组织保护酶系统活性的影响

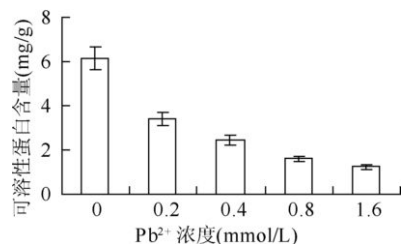
水花生愈伤组织内的3种保护酶(CAT、SOD和POD)活性在 $Pb^{2+}$ 胁迫下的反应不同。随着 $Pb^{2+}$ 浓度的升高,CAT活性表现出显著下降趋势,在1.6mmol/L时降为对照的28.05%,差异分析表明,CAT活性与 $Pb^{2+}$ 浓度间达到极显著负相关( $r = -0.9755, P < 0.01$ );而SOD和POD活性均为先升后降,其中SOD活性在0.2mmol/L时达到最大值,比对照增加了25.75%,然后逐渐下降,1.6mmol/L时比对照减少了22.73%;POD活性在0.4mmol/L时达到峰值,比对照增加了11.64%,之后逐步下降,至1.6mmol/L时,其活性低于对照(图1b),差异分析表明,SOD和POD活性与 $Pb^{2+}$ 浓度均无显著相关性。

### 2.4 $Pb^{2+}$ 对水花生愈伤组织可溶性蛋白含量的影响

随着 $Pb^{2+}$ 处理浓度的增高,水花生愈伤组织可溶性蛋白含量呈下降趋势。在0.2mmol/L时蛋白含量开始显著下降,比对照下降了45.30%,然后下降缓慢,达到1.6mmol/L时比对照下降了80.12%(图2)。差异分析表明,可溶性蛋白含量与 $Pb^{2+}$ 浓度间达到极显著负相关( $r = -0.9336, P < 0.01$ )。

### 2.5 $Pb^{2+}$ 对水花生愈伤组织细胞超微结构的损伤

① 正常愈伤组织细胞中的叶绿体呈长椭圆形,基粒类囊体

图2  $Pb^{2+}$  对水花生愈伤组织可溶性蛋白含量的影响Fig.2 Effect of  $Pb^{2+}$  on soluble protein content in callus of *A. philoxeroides*

片层垛叠规则和基质片层连成整体,与叶绿体的长轴平行(图 3a);0.2mmol/L  $Pb^{2+}$  处理时,基粒类囊体开始膨胀(图 3b);经 0.4mmol/L  $Pb^{2+}$  处理后,基粒类囊体片层松散解体,基粒排列紊乱(图 3c);1.6mmol/L  $Pb^{2+}$  处理时,基粒与基质类囊体数目明显减少,趋于空泡状(图 3d). ② 正常愈伤组织内的线粒体为椭圆形,嵴突分布均匀,间质浓密(图 3e);0.4mmol/L  $Pb^{2+}$  处理后,嵴突排列无序,出现空泡化现象(图 3f). ③ 正常细胞核核膜清晰,染色质分布均匀,核仁完整且边缘清晰与核质界限分明(图 3g);0.8mmol/L  $Pb^{2+}$  处理后,核膜破裂,染色质与核质几乎消失,核仁膨胀且由中心开始解体(图 3h).

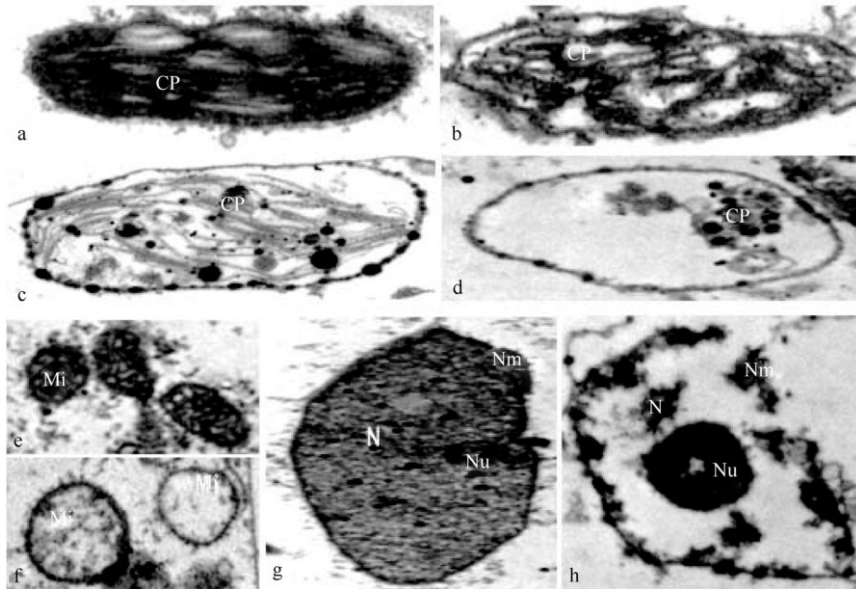


图 3  $Pb^{2+}$  胁迫下水花生愈伤组织细胞超微结构(CP:叶绿体(chloroplast);Mi:线粒体(mitochondria); N:细胞核(nucleus);Nu:核仁(nucleolus);Nm:核膜(nuclear membrane))

(a) 对照叶绿体  $\times 3000$ ; (b) 0.2mmol/L  $Pb^{2+}$  处理,基粒类囊体开始膨胀  $\times 3000$ ; (c) 0.4mmol/L  $Pb^{2+}$  处理,基粒类囊体片层松散解体  $\times 5000$ ; (d) 1.6mmol/L  $Pb^{2+}$  处理,基粒与基质类囊体数目明显减少,趋于空泡状  $\times 2000$ ; (e) 对照线粒体  $\times 2000$ ; (f) 0.4mmol/L  $Pb^{2+}$  处理,嵴突排列无序,出现空泡化现象  $\times 2000$ ; (g) 对照细胞核  $\times 700$ ; (h) 0.8mmol/L  $Pb^{2+}$  处理后,核膜破裂,染色质与核质几乎消失,核仁膨胀且由中心开始解体  $\times 2000$

Fig. 3 Ultrastructure of callus of *A. philoxeroides* under  $Pb^{2+}$  stress

(a) Chloroplast in control callus cell  $\times 3000$ ; (b) Swollen thylakoids treated with 0.2mmol/L  $Pb^{2+}$   $\times 3000$ ; (c) Loose grana thylakoid treated with 0.4mmol/L  $Pb^{2+}$   $\times 5000$ ; (d) Decreasing grana thylakoid treated with 1.6mmol/L  $Pb^{2+}$   $\times 2000$ ; (e) Mitochondria in control callus cell  $\times 2000$ ; (f) Callus cells treated with 0.4mmol/L  $Pb^{2+}$ , showing vacuolization of mitochondria  $\times 2000$ ; (g) nucleus in control callus cell  $\times 700$ ; (h) Callus cells treated with 0.8mmol/L  $Pb^{2+}$ , showing disappear of chromatin, breakdown of nuclear envelope and disintegrate of nucleolus  $\times 2000$

### 3 讨论

叶绿素含量和叶绿素 a/b 值是反映光合器官生理状况的重要指标. 类胡萝卜素既是光合色素,又是细胞内源抗氧化剂,一方面吸收光能并传递到反应中心,补偿由于叶绿素减少而引起的光合作用下降,另一方面还能吸收剩余能量,猝灭活性氧,防止膜质过氧化<sup>[16]</sup>. 本实验中,叶绿素含量总体呈下降趋势,原因可能有两点: $Pb^{2+}$  抑制了叶绿素合成所必需的原叶绿素酸酯还原酶(Protochlorophyllide reductase)的活性和影响氨基-g-酮戊酸(Aminolaevulini acid)的生物合成<sup>[17]</sup>;  $Pb^{2+}$  在细胞内局部积累过多,与叶绿体中蛋白质上的-SH基结合,或取代其中的  $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  等,破坏了叶绿体的结构和功能. 其中叶绿素 a 逐渐减少,而叶绿素

b 在 0.2mmol/L 时含量迅速增加,然后持续下降,说明可能叶绿素 a 不及叶绿素 b 稳定,更易分解破坏<sup>[18]</sup>. 也有研究认为:叶绿素 a/b 值代表类囊体垛叠程度,比值越小,说明类囊体垛叠程度越小,光抑制也越强<sup>[19]</sup>. 正如  $Pb^{2+}$  胁迫下叶绿体超微结构表明,基粒类囊体片层排列松散紊乱,数目逐渐减少,光合能力也就逐渐减弱. Car/Chl 比值先降后升,说明 Car 比 Chl 对  $Pb^{2+}$  浓度不敏感. Car/Chl 值的增大即类胡萝卜素的相对含量增加,有利于光能捕获复合体 II 的稳定<sup>[20]</sup>. 植物愈伤组织叶绿素含量和光合强度降低,可能是重金属对其毒害的普遍现象.

重金属胁迫植物的另一个重要表现就是导致  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  等大量积累. 研究认为  $O_2^-$  伤害植物的机理之一是参与启动膜脂过氧化或膜脂脱酯作用,从而破坏膜结构. 而 MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一,其含量是反映膜脂过氧化作用的强弱和质膜受破坏程度的重要指标<sup>[21]</sup>. 实验结果表明,  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  含量随着  $Pb^{2+}$  胁迫浓度的加大而急剧升高,这与愈伤组织体内清除活性氧的能力减弱是一致的,进而促使 MDA 含量的增加,膜的完整性被破坏,0.8mmol/L 时细胞核核膜破裂也从超微结构方面证实了这点. MDA 作为过氧化产物,它能与蛋白质、核酸、氨基酸等活性物质交联,形成不溶性的化合物(脂褐素)沉积<sup>[22]</sup>,这也间接地表明可溶性蛋白含量的减少可能不仅是由于  $Pb^{2+}$  抑制合成蛋白的酶活性,还与 MDA 含量增加有关,从而干扰细胞内正常的生命活动.

CAT、SOD 和 POD 是愈伤组织内酶促抗氧化系统的主要抗氧化酶. SOD 能歧化  $O_2^-$  为  $O_2$  和  $H_2O_2$ , 而 CAT 和 POD 则催化  $H_2O_2$  形成  $H_2O$ , 只有三者协调一致,才能使活性氧自由基维持在较低的水平<sup>[20]</sup>, 保证愈伤组织的正常生长和代谢. 本实验中,在  $Pb^{2+}$  胁迫下 CAT 活性首先受到抑制,呈持续下降趋势,说明 CAT 首先受到毒害刺激,对  $Pb^{2+}$  胁迫的阈值较低. 而 SOD 和 POD 活性为先升后降,二者活性均在  $Pb^{2+}$  浓度为 0.8mmol/L 时开始下降,且数值低于对照,表明低浓度  $Pb^{2+}$  胁迫诱导了抗氧化酶活性升高,在一定程度上减轻了自由基对膜的伤害,但随着  $Pb^{2+}$  浓度继续增高,超过了防御反应的限度,酶活性开始下降,造成保护酶系统的平衡被打破,功能紊乱,清除活性氧的能力减弱,更加速了  $O_2^-$  等大量积累,引起细胞膜结构损伤和生理代谢紊乱.

疏松型和致密型愈伤组织细胞的超微结构特征有所不同:疏松型愈伤组织细胞中细胞器退化,除了细胞核、液泡清晰可见外,其它细胞器数量较少,且能观察到一些亲银颗粒,可能是由于成熟组织在细胞脱分化过程中,叶绿体退化而形成的小体;而在致密型愈伤组织细胞内含有多种细胞器,且数量较多<sup>[23]</sup>. 因此在实验过程中取致密型愈伤组织进行超微结构观察. 电镜观察结果表明,随着  $Pb^{2+}$  毒害浓度的升高,叶绿体的基粒与基质类囊体逐渐膨胀,排列松散紊乱,最后呈现空泡状;线粒体受  $Pb^{2+}$  毒害后,嵴突排列无序,出现空泡化现象;一般情况下植物细胞核受毒害后表现为核仁先消失<sup>[24]</sup>,而在本实验中细胞核的损伤有所不同,先出现核内染色质与核质几乎消失,核膜破裂,最后核仁膨胀再由中心逐渐解体,这表明细胞器受损伤的情况在不同植物有多种形式.  $Pb^{2+}$  胁迫下水花生愈伤组织的叶绿体、线粒体和细胞核都呈现出内容物消失,趋向于空泡化,这种结构损伤更加剧了水花生愈伤组织的生理代谢失调.

由于水生植物内生菌较多,在愈伤组织培养过程中易染菌,因此消毒方法还有待改进. 总之,  $Pb^{2+}$  对水花生愈伤组织的毒害从一系列生理生化指标和细胞结构两个方面综合体现,使愈伤组织的生理代谢失调并最终死亡.

#### 4 参考文献

- [1] Muhittin D, Saadet DS, Ugur C. Effect of lead toxicity on aquatic macrophyte *Elodea canadensis* Michx. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2009, **83**: 249-254.
- [2] 张义贤, 李晓科. 镉、铅及其复合污染对大麦幼苗部分生理指标的影响. *植物研究*, 2008, **28**(1): 43-53.
- [3] Angelova V, Ivanova R, Delibaltova V *et al.* Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 2004, **19**: 197-205.
- [4] Devriese M, Tsakaloudi V, Garbayo I *et al.* Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, **39**: 443-448.
- [5] Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *Journal of Biotechnology*, 2000, **81**: 45-53.

- [ 6 ] 吴传兵. 不同 pH 值和重金属浓度对水花生生根的影响. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5695-5696, 5709.
- [ 7 ] 袁 燕, 生吉萍, 王捍东等. 水花生愈伤组织的诱导及根的分化. 水生生物学报, 2004, 28(6): 622-628.
- [ 8 ] Rajarskarank MB Kei. Endogenous growth regulators in leaves and tissue culture of *Pennisetum Purpureum scuum*. *Plant Physiology*, 1987, 130: 13-25.
- [ 9 ] Lichtenthaler HK. Chlorophyll sandcarotenoids : pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 1987, 148: 350-382.
- [ 10 ] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, 6: 55-57.
- [ 11 ] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2003: 164-165.
- [ 12 ] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbatespecific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 867-880.
- [ 13 ] Beyer WF, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem*, 1987, 161: 559-566.
- [ 14 ] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2003: 67-69, 268-269.
- [ 15 ] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248-254.
- [ 16 ] Willekens H, Camp WV, Monmtagu MV *et al*. Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet-B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology*, 1994, 106: 1007-1014.
- [ 17 ] Brumel Kamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296(5567): 550-553.
- [ 18 ] 伍泽堂. 超氧自由基与叶片衰老时叶绿素破坏的关系. 植物生理学通讯, 1991, 27(4): 277-279.
- [ 19 ] Maslenkora LT. Adaptation to salinity as monitored by PSII oxygen evolving reaction in barley thylakoids. *J Plant Physiol*, 1993, 142: 629-634.
- [ 20 ] 计汪栋, 施国新, 杨海燕等. 铜胁迫对竹叶眼子菜叶片生理指标和超微结构的影响. 应用生态学报, 2007, 18(12): 2727-2732.
- [ 21 ] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sci*, 2002, 7(1): 405-410.
- [ 22 ] 徐勤松, 施国新, 杜开和. 锌胁迫下水车前叶细胞自由基过氧化损伤与超微结构变化之间关系的研究. 植物学通报, 2001, 18(5): 597-604.
- [ 23 ] 杨 涛, 陈德海, 吴荔萍. 安祖花组织培养及其细胞和叶绿体发育过程的电镜观察. 亚热带植物通讯, 1998, 27(1): 1-7.
- [ 24 ] 施国新, 杜开和, 解凯彬等. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究. 植物学报, 2000, 42(4): 373-378.