

过氧化氢与蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导

刘福平*, 陈 淳, 许传俊

(福建省亚热带植物研究所, 福建厦门 361006)

摘 要: 从蝴蝶兰类原球茎切块诱导胚性愈伤组织, 诱导期间培养物 DNA 甲基化程度持续下降, 与 H₂O₂ 含量变化呈极显著负相关。在降低 6-BA 浓度的培养基中添加 H₂O₂ 可提高愈伤组织诱导率, 在诱导培养基中添加 H₂O₂ 淬灭剂二甲基硫脲降低了愈伤组织诱导率, H₂O₂ 可能是诱导胚性愈伤组织的信号分子之一。愈伤组织诱导期间 SOD 活性对 H₂O₂ 水平变化起主导作用。

关键词: 蝴蝶兰; 胚性愈伤组织; H₂O₂; DNA 甲基化; 抗氧化酶

中图分类号: S 682.31; Q 943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 09-1339-06

H₂O₂ and Embryogenic Callus Induction of *Phalaenopsis* spp

LU Fu-ping*, CHEN Chun, and XU Chuan-jun

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen, Fujian 361006, China)

Abstract: Embryogenic callus was induced from PLB (protocorm-like body) cubes of *Phalaenopsis* spp. During callus induction, DNA methylation levels in cultures declined continuously and had a very significant negative correlation with the change of H₂O₂ content. Supplemented H₂O₂ in the medium containing lower concentration of growth regulator (6-BA), the induction rate of callus increased, and this indicated that exogenous H₂O₂ could be used to replace part of growth regulator for embryogenic callus induction. The induction rate of embryogenic callus decreased when supplemented dimethylthiourea, a quencher of H₂O₂, in culture medium. H₂O₂ was possibly a signal molecule that mediated the induction of embryogenic callus. In callus induction period, SOD activity played an important role in the change of H₂O₂ content in cultures.

Key words: *Phalaenopsis* spp.; embryogenic callus; H₂O₂; DNA methylation; antioxidants

有研究表明, 植物的愈伤组织诱导与其 H₂O₂ 水平有关, 邹华文等 (2005) 报道在诱导魔芋 (*Amorphophallus albus*) 的愈伤组织过程中, 催化积累 H₂O₂ 的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性一直处于较高水平, 而催化分解 H₂O₂ 的过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性都较低, 推测适当高水平的 H₂O₂ 可以诱导愈伤组织的发生; 田敏等 (2004) 和禹艳红等 (2005) 报道愈伤组织的诱导或分化都伴随内源 H₂O₂ 水平的提高。枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 胚性愈伤组织的内源 H₂O₂ 含量也远远高于继代愈伤组织, 而将继代愈伤组织转入含一定浓度外源 H₂O₂ 的分化培养基时, 体细胞胚发生频率明显提高 (Cui et al., 1999)。胚性细胞的形成过程也是细胞分化的过程, H₂O₂ 有可能通过细胞信号传递系统影响基因调控表达, 从而诱导胚性细胞的形成 (崔凯荣和戴若兰, 2000)。

兰科植物离体培养所诱导的类原球茎 (PLBs) 是体细胞胚的表现形式, 在蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* spp.) 叶和 PLB 诱导的愈伤组织中观察到了胚性细胞 (刘福平和陈移亮, 2007; 吕晓辉等, 2007)。

作者分析诱导蝴蝶兰愈伤组织期间培养物活性氧变化与 DNA 甲基化水平的关系, 以外源 H₂O₂ 部

收稿日期: 2009 - 05 - 18; 修回日期: 2009 - 07 - 27

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (C0410040)

* E-mail: fpliu5334@sina.com

分替代生长调节剂诱导胚性愈伤组织, 了解 H_2O_2 淬灭剂对愈伤组织诱导的影响, 并就培养物 H_2O_2 代谢的生化基础进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 胚性愈伤组织诱导及其活性氧水平和 DNA 甲基化测定

试验于 2006—2007 年在福建省亚热带植物研究所进行。选用的浅紫红色大花蝴蝶兰 YZ45 取自本所组培室。以初代 PLB 切块诱导出的 PLBs (刘福平等, 2007) 为材料。培养基为 1/2 MS (大量元素) + $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 20% 椰汁 + 2% 蔗糖, 每粒 PLB 切成 3~5 约 1.5 mm 的小块, 每瓶放置 25~35 块, 每处理 5 瓶以上, 培养温度 24~26 $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 1 500 lx 左右, 12 h \cdot d $^{-1}$ 。在诱导 0、4、11、18、25、32 d 取培养物分析活性氧水平、DNA 甲基化水平、抗氧化酶活性等指标, 重复 3 次。

羟自由基 ($OH\cdot$) 相对含量的测定参照 Popham 和 Novacky (1991) 及徐向荣等 (1999) 的方法稍修改。培养物 $OH\cdot$ 相对含量以每克鲜样反应后在 420 nm 处的光吸收值表示。

超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 生成速率参照汤章成 (1999) 的方法测定, 以 $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ FW 表示。

培养物加入预冷的丙酮及样品鲜样质量 20% 的活性炭, 冰浴研磨, 4 10 000 \times g 离心 15 min, 参考沈文飏等 (1997) 的方法测定 H_2O_2 含量, 结果以 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ FW 表示。

DNA 提取采用 CTAB 法, 分别在 280、260 和 230 nm 比色, $A_{260}/A_{280} = \pm 1.8$, $A_{260}/A_{230} > 2.0$, 进行 DNA 纯度测定。DNA 水解及甲基化水平测定参照贾峰等 (2007) 的方法, 在风干的 DNA 中加入 70% 高氯酸 50 μL , 于沸水浴中水解 1 h, 然后用 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KOH 调至 pH 3~4, 形成沉淀后于 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液, 经 0.45 μm 微孔滤膜加压过滤, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下注入 HPLC (东芝 T2000P) 的 Hypersil BDS C18 柱 (200 mm \times 4.0 mm, 5 μm , 大连伊利特分析仪器有限公司提供) 分离, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相由甲醇、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊烷磺酸钠、三乙胺按体积比 6 90 0.2 配成, pH 4.0, 流速 0.5 mL \cdot min $^{-1}$ 。胞嘧啶 (C) 及 5-甲基胞嘧啶 (5mC) 购自 SIGMA 公司, 检测波长 273 nm, 根据样品 DNA 水解产物中 C 和 5mC 的洗脱峰面积, 计算样品中 C 和 5mC 的克分子数, DNA 甲基化水平 (%) = $5\text{mC} / (\text{C} + 5\text{mC}) \times 100$ 。

1.2 外源 H_2O_2 对胚性愈伤组织的诱导试

在已高压消毒的培养基 1/2 MS + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + 20% 椰子汁 + 2% 蔗糖中加入 H_2O_2 溶液, 使培养基所含 H_2O_2 终浓度分别为 50、100、200、400、800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 以不加 H_2O_2 的为对照, 接入 PLB 切块, 培养条件同 1.1, 一个月后计算愈伤组织诱导率。

1.3 二甲基硫脲对胚性愈伤组织的诱导试验

H_2O_2 淬灭剂二甲基硫脲 (DMTU) 溶液经过滤灭菌加入已高压消毒的诱导培养基 (同 1.1) 中, 使培养基所含 DMTU 终浓度分别是 0 (对照)、0.1、0.2、1.0、5.0、10.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 接入 PLB 切块, 培养条件同 1.1, 一个月后计算愈伤组织诱导率。

1.4 H_2O_2 代谢相关抗氧化酶活力测定

以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 液 (含 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、4% PVP, pH 7.8) 冰浴研磨培养物, 4 10 000 \times g 离心 20 min, 取上清液测定酶超氧化物歧化酶 (SOD) 活性 (汤章成, 1999)。

以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 液 (pH 7.0) 冰浴研磨培养物, 4 5 000 \times g 离心, 定容, 愈创木酚显色法测定过氧化物酶 (POD) 活性 (张志良, 1990)。

采用碘量法测定过氧化氢酶 (CAT) 活性, 酶提取方法同 POD, PBS 液 pH 7.4 (张志良, 1990)。

参照李惠华和赖钟雄 (2006) 及汤章成 (1999) 方法, 培养物研磨后离心 (4 15 000 \times g 15

min), 吸取上清粗酶液, 加入反应液, 测 290 nm 吸光值, 随后加入 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 启动反应, 40 s 内每 10 s 连续记录吸光值的变化, 测定抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性, 室温下每 min 氧化 $1 \mu\text{mol}$ 抗坏血酸的酶量为一个酶活性单位 (U)。

2 结果与分析

2.1 活性氧水平与基因组 DNA 甲基化程度的关系

在胚性愈伤组织形成过程中, 培养物 DNA 甲基化程度持续下降, 即去甲基化程度持续升高 (表 1)。由于所分析的 3 种活性氧在细胞中是否都对 DNA 甲基化产生效应仍不清楚, 求它们各自与 DNA 甲基化程度的密切程度分别计算简单相关系数和偏相关系数。 O_2^- 产生速率与 DNA 甲基化程度的简单相关系数和偏相关系数分别为 -0.339 和 -0.379 , $\text{OH} \cdot$ 相对含量与 DNA 甲基化程度的两个相关系数分别为 0.173 和 0.083 , 均不显著。内源 H_2O_2 含量在诱导初始下降, 第 4 天后才持续升高, 与 DNA 甲基化程度变化相反, 两者简单相关系数为 -0.781 , 偏相关系数为 -0.790 , 绝对值均大于临界值 ($r_{0.01} = 0.590$ 和 $r_{0.01} = 0.737$), 即培养物 H_2O_2 含量与 DNA 甲基化程度的相关性达极显著水平。可见, 相对其他两种活性氧变化, H_2O_2 与基因组 DNA 去甲基化程度有较明显关系。

表 1 诱导期间培养物活性氧、DNA 甲基化程度以及相关酶活性的变化
Table 1 Change of ROS indexes and DNA methylation level in cultures during induction period

诱导时间 / d Inducing time	DNA 甲基化程度 / % DNA methylation level	O_2^- 产生速率 /($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) Producing rate of O_2^-	$\text{OH} \cdot$ 相对含量 /($A_{420} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) Relative content of $\text{OH} \cdot$	H_2O_2 含量 /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$) H_2O_2 content
0	20.70 \pm 1.51 aA	1.76 \pm 0.08 cCD	0.57 \pm 0.011 cC	142.0 \pm 3.12 dD
4	11.39 \pm 0.58 bB	2.09 \pm 0.10 bB	0.61 \pm 0.009 bB	75.3 \pm 1.20 eE
11	8.55 \pm 0.58 cC	3.30 \pm 0.14 aA	0.50 \pm 0.004 dD	362.2 \pm 9.62 cC
18	7.84 \pm 0.68 cCD	3.34 \pm 0.06 aA	0.50 \pm 0.013 dD	612.4 \pm 11.04 bB
25	6.45 \pm 0.28 dDE	2.12 \pm 0.08 bB	0.45 \pm 0.012 eE	619.0 \pm 21.06 bB
32	4.51 \pm 0.17 eE	1.92 \pm 0.08 cBC	0.64 \pm 0.014 aA	839.3 \pm 26.51 aA

注: 数据按邓肯氏新复极差测验, 不同大写和小写字母分别表示 $=0.01$ 和 $=0.05$ 水平下差异显著性。

Note: Data were analyzed by Duncan's multiple new range test and the different capital and small letters indicate significant differences at $=0.01$ and $=0.05$ levels, respectively.

2.2 外源 H_2O_2 和二甲基硫脲对胚性愈伤组织诱导的影响

为了了解外源 H_2O_2 对胚性愈伤组织诱导的效应, 把诱导培养基中的 6-BA 浓度从 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (最适浓度) 调低到 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 并加入外源 H_2O_2 , 当 H_2O_2 浓度达 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导率提高到 59%, 与对照 (48%) 差异达到极显著水平 (表 2), 说明外源 H_2O_2 可部分替代 6-BA 诱导蝴蝶兰愈

表 2 外源 H_2O_2 和二甲基硫脲对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of exogenous H_2O_2 and DM TU on callus induction rate

6-BA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	H_2O_2 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导率 / % Induction rate	6-BA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	DMTU /($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	诱导率 / % Induction rate
2.0	0 (对照 Control)	48 \pm 4.0	5.0	0 (对照 Control)	82 \pm 5.8
2.0	50	54 \pm 3.1	5.0	0.1	73 \pm 6.2*
2.0	100	59 \pm 5.8**	5.0	0.2	59 \pm 4.7**
2.0	200	57 \pm 5.7*	5.0	1.0	51 \pm 2.8**
2.0	400	47 \pm 4.9	5.0	5.0	30 \pm 3.8**
2.0	800	41 \pm 4.9*	5.0	10.0	7 \pm 3.8**

注: 数据按 Dunnett 最小显著差数 (DLSD) 测验法, ** 和 * 分别表示 $=0.01$ 和 $=0.05$ 水平下差异显著性。

Note: Data were analyzed with Dunnett method (DLSD), ** and * indicate different significance at $=0.01$ and $=0.05$ levels, respectively.

伤组织, 但 H_2O_2 浓度过高则抑制了愈伤组织的诱导。在 6-BA 浓度为 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中添加 H_2O_2 淬灭剂 DM TU, 愈伤组织诱导率显著降低, 而且诱导出的愈伤组织较小, 说明 DM TU 消除培养物的内源 H_2O_2 , 可降低愈伤组织诱导率。

2.3 H_2O_2 代谢的生物化学基础

在本试验的诱导过程中, SOD、POD、CAT、APX 等 4 种抗氧化酶活力与内源 H_2O_2 水平变化关系见表 3。

由表 3 可以看出诱导 0~25 d, SOD 活性与 H_2O_2 含量变化趋势基本相同, 25~32 d, SOD 活性下降, 但 H_2O_2 上升, 可能与 POD、CAT 活性急剧下降, 减少了底物 (H_2O_2) 消耗有关。通过求偏相关系数的方法比较 4 种酶对 H_2O_2 水平影响的相对重要性。SOD、POD、CAT、APX 活性与 H_2O_2 水平的偏相关系数分别为 0.606、-0.682、0.740 和 0.769, SOD 活性和 POD 活性分别与 H_2O_2 水平呈正、负相关, 符合这两种酶的主要催化功能。CAT 和 APX 以 H_2O_2 为底物, 但它们的偏相关系数均为正值, 与 CAT、APX 的主要催化功能相反, 说明在愈伤组织诱导期间 CAT、APX 活性对 H_2O_2 水平的效应很小。为避免 CAT、APX 活性数据对其他酶与 H_2O_2 水平关系统计分析的干扰, 首先淘汰偏相关系数较大的 APX 活性数据, 对剩余 4 组数据进行分析, 得 CAT 活性与 H_2O_2 水平的偏相关系数为 0.618, 仍呈正相关, 再淘汰 CAT 活性数据, 就 SOD 活性、POD 活性分别与 H_2O_2 水平求偏相关系数, 分别得 0.674 和 -0.189, SOD 活力与 H_2O_2 水平偏相关系数大于临界值 ($r_{0.01} = 0.662$), 即诱导期间培养物 SOD 活性与 H_2O_2 水平的相关性达极显著水平, POD 活性与 H_2O_2 水平则相关不显著。

表 3 诱导期间培养物 H_2O_2 含量变化与 SOD、POD、CAT 和 APX 活性的关系

Table 3 Correlations between H_2O_2 content and SOD, POD, CAT, APX activity in cultures during induction period

诱导时间 / d Inducing time	H_2O_2 /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	超氧化物歧化酶 SOD /($\text{U} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	过氧化物酶 POD /($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	过氧化氢酶 CAT /($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)	抗坏血酸酶 APX /($\text{A}260 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)
0	142.0 \pm 3.12 dD	46.24 \pm 0.95 eE	6.7 \pm 0.58 eE	38.01 \pm 3.34 eE	3.17 \pm 0.08 eD
4	75.3 \pm 1.20 eE	38.18 \pm 0.98 eE	17.1 \pm 0.42 bB	105.96 \pm 9.96 dD	4.44 \pm 0.18 dD
11	362.2 \pm 9.62 cC	101.06 \pm 4.70 dD	15.3 \pm 1.34 cC	121.58 \pm 8.54 cC	10.88 \pm 0.97 bBC
18	612.4 \pm 11.04 bB	207.04 \pm 5.61 bB	12.8 \pm 1.06 dD	40.66 \pm 4.12 eE	13.13 \pm 0.97 aA
25	619.0 \pm 21.06 bB	229.70 \pm 9.83 aA	25.6 \pm 1.22 aA	235.73 \pm 9.46 aA	9.35 \pm 0.18 cC
32	839.3 \pm 26.51 aA	116.06 \pm 4.96 cC	14.5 \pm 0.52 cC	152.09 \pm 10.70 bB	11.93 \pm 0.50 bAB

注: 数据按邓肯氏新复极差测验, 不同大写和小写字母分别表示 $\alpha = 0.01$ 和 $\alpha = 0.05$ 水平下差异显著性。

Note: Data were analyzed by Duncan's multiple new range test and the different capital and small letters indicate significant differences at $\alpha = 0.01$ and $\alpha = 0.05$ levels, respectively.

3 讨论

DNA 甲基化是表观遗传修饰的主要方式, 在生物的细胞分化和生长发育中起着重要的调节作用。目前植物体细胞胚发生与细胞 DNA 甲基化程度关系的研究较少。Okkels (1988) 和 Heman (1991) 指出体细胞去甲基化处理可获得胚性。Hao 和 Deng (2002) 对纽荷尔脐橙 (*Citrus sinensis*) 研究发现, 具有体细胞胚发生能力的愈伤组织的甲基化水平较失去体细胞胚发生能力的低。崔凯荣和戴若兰 (2000) 认为, 细胞 DNA 甲基化程度降低, 胚性相关基因表达, 胚性细胞形成, 体细胞胚发生并进一步发育。本试验发现在胚性愈伤组织的形成过程中, 培养物 DNA 甲基化程度单边下行, 即去甲基化程度持续升高, 显然, 蝴蝶兰胚性愈伤组织的形成过程是一个减少遗传修饰, 消除基因沉默的过程。

相对超氧负离子和羟自由基相对含量指标, 胚性愈伤组织诱导期间 H_2O_2 水平与 DNA 甲基化程度明显相关。总的说来内源 H_2O_2 水平与 DNA 甲基化程度变化趋势基本相反, 达到极显著负相关, 但在

接种诱导的前 4 天 H_2O_2 含量稍微下降, 即与 DNA 甲基化程度变化趋势相同。禹艳红等 (2005) 用常规方法诱导烟草愈伤组织期间内源 H_2O_2 水平也是前期下降而后平稳上升。接种初期的 H_2O_2 水平下降可能与切割外植体造成机械损伤有关。降低诱导培养基中 6-BA 浓度, 添加一定浓度的外源 H_2O_2 可提高愈伤组织诱导率, 说明 H_2O_2 可替代部分外源生长调节物质的作用, 在诱导培养基添加 H_2O_2 淬灭剂 DMTU 降低了愈伤组织诱导率, 推测 H_2O_2 是诱导蝴蝶兰胚性愈伤组织的信号分子之一。

关于植物愈伤组织诱导期间培养物 H_2O_2 积累的代谢机制研究并不多。田敏等 (2004) 发现草莓愈伤组织 SOD 活性变化与 H_2O_2 含量变化基本一致。本试验中诱导的 0 ~ 25 d 培养物 SOD 活性与 H_2O_2 含量变化趋势也基本一致。Cui 等 (1999) 检测表明继代愈伤组织形成胚性细胞时伴随 H_2O_2 的含量的增高, 用 SOD 抑制剂二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DDC) 抑制了体细胞胚发生的频率, CAT 的抑制剂氨基三唑 (AT) 则不呈抑制效应, 说明 SOD 在诱导胚性愈伤组织中起关键作用。本试验发现, 整个诱导期间培养物 H_2O_2 水平与 SOD 酶活性呈极显著正相关, 与 POD 酶活性呈不显著负相关, CAT、APX 活性与 H_2O_2 水平呈正相关, 即 CAT、APX 活性的提高并不能导致培养物 H_2O_2 水平的下降, 这是由于 SOD 和 POD 活性 (尤其是前者) 在决定 H_2O_2 水平起主导作用, CAT、APX 酶的作用极小以致无法显现。但 CAT 与 APX 酶分解 H_2O_2 的作用是客观存在的, 诱导期间 H_2O_2 水平提高伴随 CAT、APX 酶活性提高, 这两种酶在抑制胞内 H_2O_2 过度积累是否起积极作用仍不得而知。

References

- Cui Kai-rong, Dai Ruo-lan. 2000. Molecular biology of plant somatic embryogenesis. Beijing: Science Press: 100 - 101, 121. (in Chinese)
崔凯荣, 戴若兰. 2000. 植物体细胞胚发生的分子生物学. 北京: 科学出版社: 100 - 101, 121.
- Cui Kai-rong, Xing Geng-sheng, Liu Xin-min, Xing Geng-mei, Wang Ya-fu. 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci*, 146 (1): 9 - 16.
- Hao Yu-jin, Deng Xiu-xin. 2002. Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of citrus callus. *Acta Botanica Sinica*, 44 (6): 673 - 677.
- Heman E.B. 1991. Recent advances in plant tissues culture, regeneration, micropropagation and media 1988 - 1991. Ethylene, DNA methylation and regeneration. *Agrotech Consultants Shrub Oak N Y*: 6 - 10.
- Jia Feng, Zhang Bian-li, Zhai Xiao-qiao, Liu Fei, Fan Guo-qiang, Huang Xiao-shu. 2007. The method to determine the global levels of DNA methylation in *Paulownia* leaves. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (3): 228 - 230. (in Chinese)
贾峰, 张变莉, 翟晓巧, 刘飞, 范国强, 黄晓书. 2007. 泡桐叶片总 DNA 甲基化水平测定方法. *中国农学通报*, 23 (3): 228 - 230.
- Li Hui-hua, Lai Zhong-xiong. 2006. The determination of APX activity in somatic embryogenesis of longan. *Subtropical Plant Science*, 35 (3): 9 - 11. (in Chinese)
李惠华, 赖钟雄. 2006. 龙眼体胚发生过程中抗坏血酸过氧化物酶活性的变化. *亚热带植物科学*, 35 (3): 9 - 11.
- Liu Fu-ping, Chen Yi-liang. 2007. Effect of cytokinin on induction and macromolecules metabolic kinesis of somatic embryogenesis in *Phalaenopsis* spp. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 22 (2): 162 - 166. (in Chinese)
刘福平, 陈移亮. 2007. 细胞分裂素对蝴蝶兰体细胞胚诱导及大分子代谢研究. *福建农业学报*, 22 (2): 162 - 166.
- Liu Fu-ping, Hong Li-ping, Zheng Ming-qiong. 2007. Effects of 6-BA, 2, 4-D on PLB explants induction from *Phalaenopsis*. *Acta Agriculture Jiangxi*, 19 (8): 69 - 71. (in Chinese)
刘福平, 洪丽萍, 郑明琼. 2007. 6-BA、2, 4-D 诱导蝴蝶兰类原球茎外植体的研究. *江西农业学报*, 19 (8): 69 - 71.
- Lü Xiao-hui, Huang Xiang-nan, Guo Xiao-hui, Su Xian-ni, Zang Xin. 2007. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Journal of Anhui Agri Sci*, 35 (25): 8068 - 8070. (in Chinese)
吕晓辉, 黄象男, 郭晓慧, 宿显瑞, 臧新. 2007. 蝴蝶兰愈伤组织诱导和体细胞胚胎发生的研究. *安徽农业科学*, 35 (25): 8068 - 8070.
- Okkels F T. 1988. A theory explaining formation of somatic embryogenesis cells by auxin induced of DNA methylation. *Physiol Plant*, 73: 11A.
- Popham P.L., Novacky A. 1991. Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Phy-*

- siol, 96 (4): 1157 - 1160.
- Shen Wen-biao, Ye Mao-bing, Xu Lang-lai, Zhang Rong-xian 1997. Changes of ability of scavenging active oxygen during natural senescence of wheat flag leaves. *Acta Botanica Sinica*, 39 (7): 634 - 640. (in Chinese)
- 沈文彪, 叶茂炳, 徐朗来, 张荣铄. 1997. 小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化. *植物学报*, 39 (7): 634 - 640.
- Tang Zhang-cheng 1999. *Modern experimental manual of plant physiology*. Beijing: Science Press: 308 - 309, 314 - 315, 316. (in Chinese)
- 汤章成. 1999. *现代植物生理学实验指南*. 北京: 科学出版社: 308 - 309, 314 - 315, 316.
- Tian Min, Zhu Mu-yuan, Li Ji-yuan 2004. The ultraweak biophoton emission and ROS in the callus culture of strawberry. *Acta Laser Biology Sinica*, 13 (5): 329 - 333. (in Chinese)
- 田敏, 朱睦元, 李纪元. 2004. 草莓愈伤组织的超弱发光及活性氧代谢变化的研究. *激光生物学报*, 13 (5): 329 - 333.
- Xu Xiang-rong, Wang Wen-hua, Li Hua-bin 1999. Determination of hydroxyl radicals in Fenton reaction by colorimetric assay and its application. *Prog Biochem Biophys*, 26 (1): 67 - 69. (in Chinese)
- 徐向荣, 王文华, 李华斌. 1999. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基及其应用. *生物化学与生物物理进展*, 26 (1): 67 - 69.
- Yu Yan-hong, Xu Qu-yi, Bin Jin-hua 2005. Effect of methyl jasmonate on the active oxygen production and related enzyme activities in tobacco calli. *Journal Tropical and Subtropical Botany*, 13 (3): 239 - 245. (in Chinese)
- 禹艳红, 徐曲毅, 宾金华. 2005. 茉莉酸甲酯对烟草愈伤组织一些活性氧生成和相关酶活性的影响. *热带亚热带植物学报*, 13 (3): 239 - 245.
- Zhang Zhi-liang 1990. *The experimental guide for plant physiology* 2nd. Beijing: Higher Education Press: 154 - 155, 210 - 212. (in Chinese)
- 张志良. 1990. *植物生理学实验指导*. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社: 154 - 155, 210 - 212.
- Zou hua-wen, Zhang Zai-jun, Zhang Zi-hai 2005. The changes of active oxygen during the period of callus induction in *Amorphophallus albusi*. *Liaoning Agri Sci*, (3): 28 - 30. (in Chinese)
- 邹华文, 张再君, 张自海. 2005. 魔芋愈伤组织诱导过程中活性氧的动态变化. *辽宁农业科学*, (3): 28 - 30.

期刊征订

欢迎订阅 《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学方面的学术期刊。前身可追溯到 1919 年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果，为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》为月刊，2010 年 208 页/期，定价：50 元/册，全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅，刊号：ISSN 0496-3490，CN 11-1809/S，邮发代号：82-336。也可向编辑部直接订购。

编辑部地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号中国农科院作物所《作物学报》编辑部（邮编 100081）

联系电话：010 - 82108548；传真：010 - 82105793；E-mail: xzbw@chinajournal.net.cn

网址：http: www.chinacrops.org/zwxw/ (向读者免费提供最新录用、下期、当期及过刊全文，有在线投稿、在线审稿、在线查询等功能。)