

# 缺硼对四季萝卜矿质元素吸收及叶片 pH 值的影响

从心黎<sup>1</sup>, 黄绵佳<sup>1,\*</sup>, 江行玉<sup>2,\*</sup>, 李新国<sup>1</sup>, 周开兵<sup>1</sup>, 钟曼茜<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>海南大学园艺园林学院, 海口 570228; <sup>2</sup>海南大学农学院, 海口 570228)

**摘要:** 为揭示缺硼影响矿质元素吸收的机理, 以四季萝卜为试验材料, 通过设置营养液缺硼 (不含硼元素)、正常供硼 (含硼  $46.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 两个处理, 测定缺硼处理 21 d 时肉质根、新叶和老叶等部位硼含量及 Fe、Cu 等矿质元素的含量; 并利用甲苯胺蓝-O (TBO) 染色叶片切片, 观察叶片酸度的变化。结果表明, 缺硼使四季萝卜肉质根和叶片细胞壁的结合硼含量显著下降, 而 Fe、Mn、Zn、Cu 含量显著增加。缺硼还造成叶片 pH 值下降, 嗜碱性颗粒减少。因此, 缺硼可能通过影响细胞壁稳定性, 导致叶片的结构和成分发生改变, 使叶片 pH 值下降, 从而促进了对其它矿质元素的吸收。

**关键词:** 四季萝卜; 硼; 叶片 pH; 矿质元素

**中图分类号:** S 631.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2015) 04-0785-06

## Effects of Boron Deficiency on the Uptake of Mineral Elements and pH Value of Leaves in Cherry Radish

CONG Xin-li<sup>1</sup>, HUANG Mian-jia<sup>1,\*</sup>, JIANG Xing-yu<sup>2,\*</sup>, LI Xin-guo<sup>1</sup>, ZHOU Kai-bing<sup>1</sup>, and ZHONG Man-xi<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture and Gardening, Hainan University, Haikou 570228, China; <sup>2</sup>College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** To investigate the effect of boron (B) deficiency on the uptake of some nutrient elements. In this paper, cherry radishes (*Raphanus sativus* L. var. *radiculus* Pers) was grown in water containing 0 or  $46.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  boric acid to study the contents of boron and other main mineral elements in the fleshy root, young and old leaves, using HPLC method. The leaves were cut and stained by toluidine blue-O (TBO) and the anatomic structures were observed under light microscopes. We found that total boron, soluble boron, and cell wall binding boron decreased dramatically in all parts of the cherry radish grown in boron-lack condition, while the contents of Fe, Mn, Zn, Cu increased significantly. Boron deficiency also decreased the pH values and basophilic granules in leaves. These suggest that irregular cell walls as a result of B deficiency severely affect the structure and components of leaves, and the decreased pH of leaves can induce the absorption of other mineral elements.

**Key words:** cherry radish; boron; pH of leaf; mineral element

**收稿日期:** 2015-01-06; **修回日期:** 2015-03-23

**基金项目:** 海南大学中西部计划学科建设项目 (ZXBH-KK008); 海南省产学研一体化专项 (CXY20130029); 海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室开放基金项目 (2012hckled-12)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hmj886@163.com; jiangxingyu2002@yahoo.com)

硼(B)元素在维持植物细胞壁的结构与功能方面具有重要作用(Loomis & Durst, 1992; O'Neill et al., 2004)。缺硼会阻碍根的伸长,抑制叶片的扩展,影响作物的生殖生长(Dell & Huang, 1997; Goldbach et al., 2001);也会影响植物水分的吸收、运输和散失(Wimmer & Eichert, 2013),导致烟草细胞积累更多的活性氧类(ROS)和脂质过氧化物(Koshiba et al., 2009)。关于缺硼影响其它矿质元素的吸收方面有不少研究报道,如缺硼导致红三叶草地上和地下部分的K、Ca、Cu等的含量提高(马文奇等, 1989),导致桑树新叶中Fe、Mn、Cu、Zn的含量增加(Tewari et al., 2009),导致萝卜贮藏根中的P、K、Mg、Mn等的含量增加(Singh et al., 2012),但关于植物缺硼为什么会影响其它矿质元素含量变化的报道并不多见。

四季萝卜(*Raphanus sativus* L. var. *radiculus* Pers),又称樱桃萝卜,对缺硼比较敏感,缺硼会影响其生长,导致品质下降。土壤中的硼可溶性较高,很容易随水流失,多雨的地区,例如海南岛缺硼较为严重,这在很大程度上限制了四季萝卜及其它萝卜在海南大规模的生产与推广。

试验中采用Hoagland和无硼Arnon营养液,并用高效液相色谱仪(HPLC)法测定四季萝卜各部位硼含量,研究在营养液培养条件下缺硼处理对P、K、Ca、Mg、Fe、Cu、Zn、Mn等吸收的影响,并把叶片的酸度变化和矿质元素的吸收结合起来,探讨缺硼影响四季萝卜矿质元素吸收的机理,为探讨缺硼影响植物矿质元素吸收的生理机制提供一定借鉴,为四季萝卜大规模的生产与推广奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 with 处理

以日本的‘赤丸二十日大根’四季萝卜(*Raphanus sativus* L. var. *radiculus* Pers)为材料,于2012年5月和10月在日本京都大学植物营养学实验室的温室中进行。

将种子播种在装有蛭石的盆中于温室中催芽,10 d后幼苗转到完全营养液(Matoh et al., 2001)中通气培养,每5 d换1次营养液。14 d后选取长势一致的萝卜幼苗转入3 L容器中,在温室中进行缺硼处理,每3 d更换1次营养液,每个处理重复3次。营养液用蒸馏水配制,缺硼组中营养液的含硼量是0,对照组中营养液的含硼量是 $46.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

根据预备试验,缺硼处理10 d幼苗有初步的缺硼症状但不明显,21 d时,缺硼症状明显。故本试验中于缺硼处理21 d后取样、拍照。用锋利的剃须刀片把叶片切成小块,用于制作半薄切片(李兵等, 2011),然后染色进行叶片酸度的观察。

用蒸馏水彻底冲洗整个植株以避免外源矿质元素对试验结果的干扰,用吸水纸将水分吸干,按新叶(新生第1~3片叶)、老叶(其它叶片)和肉质根分别取样并放在不同纸袋中,恒温干燥箱中70 °C烘干48 h,用植物粉碎机磨成粉末,进行矿质元素的测定。

### 1.2 叶片酸度的观察

叶片酸度的观察采用甲苯胺蓝-O(TBO)染色法。切成小块的叶片进行GA-O<sub>3</sub>O<sub>4</sub>双固定、乙醇逐级脱水、环氧树脂包埋、修样。在超薄切片机(Reichert-Jung, 日本)上用玻璃刀切成1 μm厚的半薄切片,用白金线圈从水中捞取切片置于载玻片上,50 °C恒温烤片机上加热烘干,滴加0.01% TBO溶液,加热5 min,用蒸馏水洗净多余染液,烘干后盖上盖玻片于光学显微镜(Olympus DP70, 日本)下观察。

叶片 pH 值的测定是把叶片磨碎, 用 pH 计测定其 pH 值。

1.3 矿质元素的测定

细胞壁结合硼的提取参考 Matoh 等 (2001) 的方法, 硼含量的测定采用 HPLC 法 (Matoh et al., 1997)。硼的转运系数 = 上部叶硼含量/下部叶硼含量 (潘媛, 2010)。

其它矿质元素磷、钾、钙、镁、铁、锰、铜、锌的含量测定参考林业行业标准 LY/T-1270-1999。数据、图表处理在 Excel 2007 下进行, 数据采用 SAS 程序 ANOVA 过程进行处理间差异显著性测验, 多重比较分析采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 缺硼对四季萝卜硼吸收的影响

表 1 显示, 新叶、老叶和肉质根总硼含量分别下降 95.13%、87.5%和 69.8%; 可溶性硼含量分别下降 96.5%、94.3%和 89.6%; 细胞壁结合硼含量分别下降 90.5%、57.2%和 49.0%。可溶性硼含量下降的百分比高于细胞壁结合硼, 新叶中各种形态的硼含量下降最大, 其次是老叶和肉质根。可能是因为植物体内原来吸收的可溶性硼供给了新生组织, 结合在新生组织细胞的细胞壁上满足其生长的需要, 但是随着缺硼胁迫时间的延长, 已经没有足够的可溶性硼供给新生组织的细胞壁, 硼是不易移动的元素, 不易从老叶中转运到新叶中, 导致新生组织中硼含量下降。

表 1 缺硼对四季萝卜硼含量的影响  
Table 1 Effect of boron deficiency on the boron content of cherry radish

部位 Site	处理 Treatment	总硼含量/ (μg · g <sup>-1</sup> DW) Total B content	可溶性硼含量/ (μg · g <sup>-1</sup> DW) Soluble B content	细胞壁硼含量/ (μg · g <sup>-1</sup> DW) Cell wall B conotent
新叶 New leaf	对照 Control	57.75*	44.14*	13.61*
	缺硼 B deficiency	2.81	1.52	1.29
老叶 Old leaf	对照 Control	95.12*	77.55*	17.57*
	缺硼 B deficiency	11.94	4.41	7.53
肉质根 Fleshy root	对照 Control	29.03*	14.83*	14.20*
	缺硼 B deficiency	8.78	1.52	7.24

注: \*表示处理与对照间差异显著  $P < 0.05$ 。下同。  
Note: \* means there are significantly different between control and treatment at the level of  $P < 0.05$ . The same below.

缺硼导致硼的转运系数下降, 缺硼时肉质根向老叶的硼转运系数是 1.36, 与对照 (3.28) 相比, 下降了 58.5%, 缺硼处理的老叶向新叶的硼转运系数更低, 只有 0.24, 与对照 (90.61) 相比, 下降了 60.7%, 说明在缺硼情况下, 根部吸收的硼大部分被根固定, 难于运往地上部。

2.2 缺硼对四季萝卜矿质元素含量的影响

表 2 显示, 缺硼导致新叶和老叶中 Fe、Mn、Zn 和 Cu 的含量显著增加, 但对叶片中 P、K、Ca、Mg 的含量影响不大, 缺硼时新叶的 Fe 含量是对照的近 2 倍, 老叶中的 Fe 含量是对照的近 1.8 倍。缺硼使肉质根中 Ca、Mn、Mg 的含量显著增加, 对其它元素的含量影响不大。

结果表明缺硼时除了硼含量极显著降低外, 并不会明显导致其它元素的吸收量减少, 反而增加其它元素的含量。

表 2 缺硼对四季萝卜矿质元素含量的影响

Table 2 Effect of boron deficiency on the content of mineral nutrition of cherry radish

部位 Site	处理 Treatment	P/%	K/%	Ca/%	Mg/%	Fe/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	Cu/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	Mn/ (mg · kg <sup>-1</sup> )	Zn/ (mg · kg <sup>-1</sup> )
新叶 New leaf	对照 Control	0.66	2.98	1.90	0.42	247.23	26.11	144.04	31.61
	缺硼 B deficiency	0.70	3.75	1.55	0.41	472.57*	32.35*	192.52*	42.42*
老叶 Old leaf	对照 Control	0.69	3.50	2.69	0.52	61.88	21.40	223.47	24.23
	缺硼 B deficiency	0.65	3.93	2.80	0.62	108.73*	21.93	304.88*	30.12*
肉质根 Fleshy root	对照 Control	0.69	5.37	0.55	0.19	189.90	22.61	57.84	64.45
	缺硼 B deficiency	0.79	5.33	0.76*	0.23	177.81	21.43	89.92*	79.86

## 2.3 缺硼对四季萝卜叶片酸度的影响

经 TBO 染色法测试, 供硼对照处理的叶肉细胞被染成深蓝色 (图 1, A), 而且叶肉细胞中可以观察到较多的嗜碱性颗粒 (黑色箭头所示), 缺硼处理的叶肉细胞被染成灰蓝色 (图 1, B), 说明缺硼处理使叶片的碱性降低, 酸性增加。

用 pH 计测得磨碎叶片的 pH 值, 供硼正常的叶片为 pH 6.18, 缺硼处理后叶片为 pH 5.75, 缺硼叶片的 pH 极显著下降, 这个结果与 TBO 染色的结果一致。

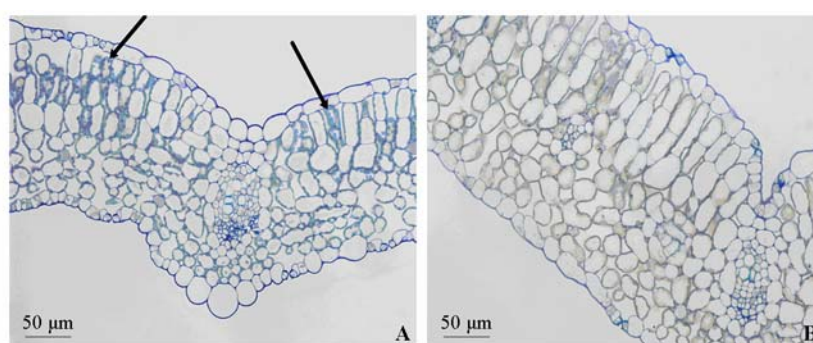


图 1 TBO 染色对供硼 (A) 和缺硼处理 (B) 四季萝卜叶片显微结构的呈色

箭头指示嗜碱性颗粒。

Fig. 1 Microstructure of leaf stained by TBO of cherry radish treated with B suppletion (A) and B deficiency (B)

Arrows means the basophilic granules.

## 3 讨论

B 是维管植物必需的微量元素, 大多数植物不能对 B 有效的重新转运, 因此植物的整个生命周期需要持续不断的供硼 (Shorrocks, 1997)。本试验中缺硼处理极显著降低了四季萝卜各组织中的硼含量, 影响了硼的转运。植物需要的大部分矿质元素都是来自根从土壤中的吸收, 地上部和根是统一协调的整体, 只有植物内部的环境稳定, 各种矿质营养元素的吸收、运输、储存和行使功能才能协调地进行, 植物对某一种矿质元素丰缺的敏感性, 与元素之间的比例有很大关系。缺硼对四季萝卜中各部分 P、K 含量的影响不显著, 肉质根对 Ca 的吸收显著增加 1.4 倍, 对 Mg 的吸收显著增加 1.2 倍, 可能缺硼会改变细胞壁的性质, 使 Ca、Mg 在细胞壁果胶中的结合位点增加, 从而提高 Ca、Mg 含量 (Teasdale & Richards, 1990; O'Neill et al., 1996; Kobayashi et al., 1999; 王火焰, 1999)。缺硼导致叶片中 Fe、Mn、Zn、Cu 的含量显著增加, 结果与报道的莴苣 (王艳玲和张树清,

2003)、桑树新叶 (Tewari et al., 2009) 等植物材料的研究结果一致。

关于缺硼影响其它矿质元素含量的机理, 硼、钙之间的关系报道较多 (Koshiba et al., 2010; Quiles-Pando et al., 2013; Agustín González-Fontes et al., 2014)。关于缺硼导致 Fe、Mn、Zn、Cu 等其它矿质元素含量的增加, 马文奇等 (1989) 认为缺硼导致的红三叶草植株养分浓度的增高并不代表其吸收矿质元素的速度加快, 而是因为缺硼对干物质增长速度的影响超过其对养分积累速度的影响而引起的“浓缩效应”; 王艳玲和张树清 (2003) 认为缺硼导致莴笋植株部分矿质元素含量增加是因为莴苣植株的生物量降低而导致的矿质元素富集现象; 另外更多的研究集中在缺硼导致矿质元素含量的变化和其它生理变化之间的关系方面 (胡华锋 等, 2008; Tewari et al., 2009; Singh et al., 2012)。

外界溶液 pH 对矿物质吸收有影响, B、Fe、Mn、Zn、Cu 在酸性条件下溶解度增加 (潘瑞炽, 2012), 缺硼是否通过影响四季萝卜叶片酸度变化而影响其对 Fe、Mn、Zn、Cu 的吸收目前为止还没有见到相关报道。本研究中通过 TBO 染色和 pH 计测定研究缺硼对四季萝卜叶片酸度的影响。TBO 是一种人工合成的常用多色性碱性染料, 可使组织和细胞的不同成分染成不同的颜色, 而且所显示的颜色随溶液 pH 值的不同也有所变化 (张仲鸣 等, 1997; 刘冬娟 等, 2004)。张仲鸣等 (1997) 关于甲苯胺蓝 - O 对未脱蜡植物组织切片的染色结果显示: 蛋白质及含蛋白质的混合物被染成蓝色或蓝紫色; 胼胝质、多糖不被着色。多糖颗粒外层被 TBO 染成蓝色的一圈物质被鉴定为蛋白质。图 1 表示, 缺硼处理的叶肉细胞被染成灰蓝色, 对照处理的叶肉细胞被染成深蓝色, 而且对照组的叶肉细胞中嗜碱性颗粒较多。本结果为缺硼处理的叶片 pH 由 6.18 极显著下降到 5.75。说明缺硼使四季萝卜叶片的碱性降低, 酸性增加。由于 B、Fe、Mn、Zn、Cu 在酸性条件下溶解度增加, 所以叶片酸度的增加有利于几种元素的吸收, 但是由于营养液中缺少 B 元素, 所以无法吸收更多的 B。本文首次报道了缺硼导致叶片酸化与 Fe、Mn、Zn、Cu 吸收增加的关系。

在所有的植物细胞中, 保持 pH 值稳定是必要的 (Schumacher, 2014), 缺硼会导致四季萝卜叶肉细胞内嗜碱性颗粒减少, 叶片酸化。但是缺硼是怎样导致叶片酸化的, 缺硼导致叶片酸化的机理是什么有待于进一步研究。这对研究硼的营养机理及指导生产实践具有重要意义。

## References

- Dell B, Huang L. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil*, 193: 103 - 120.
- Goldbach H E, Yu Q, Wingender R, Schulz M, Wimmer M, Findelee P. 2001. Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164: 173 - 181.
- González-Fontes A, Navarro-Gochicoa M T, Camacho-Cristóbal J J, Herrera-Rodríguez M B, Quiles-Pando C, Rexach J. 2014. Is Ca involved in the signal transduction pathway of boron deficiency? New hypotheses for sensing boron deprivation. *Plant Science*, 217 - 218: 135 - 139.
- Hu Hua-feng, Jie Xiao-lei, Liu Shi-liang, Hua Dang-ling, Liu Fang, Ma Chuang. 2008. Effect of Mn and B on herbage yield and mineral element content of alfalfa. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 14 (6): 1165 - 1169. (in Chinese)
- 胡华锋, 介晓磊, 刘世亮, 化党领, 刘 芳, 马 闯. 2008. 锰、硼对紫花苜蓿草产量和矿质元素含量的影响. *植物营养与肥料学报*, 14 (6): 1165 - 1169.
- Kobayashi M, Nakagawa H, Asaka T, Matoh T. 1999. Boraterhamnolacturonan II bonding reinforced by  $\text{Ca}^{2+}$  retains pectic polysaccharides in higher-plant cell walls. *Plant Physiology*, 119: 199 - 203.
- Koshiba T, Kobayashi M, Ishihara A, Matoh T. 2010. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. VI. Calcium is involved in early responses to boron deprivation. *Plant and Cell Physiology*, 51: 323 - 327.
- Koshiba T, Kobayashi M, Matoh T. 2009. Boron nutrition of tobacco BY-2 cells. V. Oxidative damage is the major cause of cell death induced by boron deprivation. *Plant and Cell Physiology*, 50: 26 - 36.
- Li Bing, Li Deng-di, Zhang Jie, Huang Geng-qing, Li Xue-bao. 2011. Modification of resin semithin section staining method in plant tissues. *Plant*

- Physiology Journal, 47 (12): 1207 – 1212. (in Chinese)
- 李 兵, 李登弟, 张 杰, 黄耿青, 李学宝. 2011. 植物树脂半薄切片染色方法的改进. 植物生理学报, 47 (12): 1207 – 1212.
- Liu Dong-juan, Zhu Su-wen, Li Yan-jie. 2004. Application of borax toluidine blue dye solution on staining of the semi section. Journal of China Medical University, 33 (1): 33. (in Chinese)
- 刘冬娟, 祝素文, 李艳杰. 2004. 硼砂甲苯胺蓝染液在半薄切片染色上的应用. 中国医科大学学报, 33 (1): 33.
- Loomis W D, Durst R W. 1992. Chemistry and biology of boron. Biofactors, 3: 229 – 239.
- Ma Wen-qi, Liu Wu-ding, Pi Mei-mei. 1989. The influence of boron on nutrient uptake in red clover (*Trifolium pretense* L.) . Journal of Huazhong Agricultural University, 8 (3): 236 – 241. (in Chinese)
- 马文奇, 刘武定, 皮美美. 1989. 土壤不同供硼水平对红三叶草吸收其它营养元素的影响. 华中农业大学学报, 8 (3): 236 – 241.
- Matoh T, Akaike R, Kobayashi M. 1997. A sensitive and convenient assay for boron in plant using chromotropic acid and HPLC. Plant and Soil, 192: 115 – 118.
- Matoh T, Takasaki M, Matsuda A, Hara Y, Kobayashi M. 2001. Increased supply of boron to Swiss Chard plants did not affect the level of boron in a cell wall-bound form: A possible application of the diagnosis of B nutrition of plants. Soil Science and Plant Nutrition, 47 (4): 779 – 784.
- O'Neill M A, Warrenfeltz D, Kates K, Pellerin P, Doco T, Darvill A G, Albersheim P. 1996. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. The Journal of Biological Chemistry, 271: 22923 – 22930.
- O'Neill M A, Ishii T, Albersheim P, Darvill A G. 2004. Rhamnogalacturonan II : Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. Annual Review of Plant Biology, 55: 109 – 139.
- Pan Yuan. 2010. Study on the relationship between boron efficiency and cell wall constituents of *Brassica napus* [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 潘 媛. 2010. 不同油菜品种硼吸收利用差异与细胞壁组分关系的研究 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Pan Rui-chi . 2012. Plant physiology. 7th ed. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 潘瑞炽. 2012. 植物生理学. 7 版. 北京: 高等教育出版社.
- Quiles-Pando C, Rexach J, Navarro-Gochicoa M T, Camacho-Cristóbal J J, Herrera-Rodríguez M B, González-Fontes A. 2013. Boron deficiency increases the levels of cytosolic  $Ca^{2+}$  and expression of  $Ca^{2+}$ -related genes in *Arabidopsis thaliana* roots. Plant Physiology and Biochemistry, 65: 55 – 60.
- Schumacher K. 2014. pH in the plant endomembrane system – an import and export business. Plant Biology, 22: 71 – 76.
- Shorrocks V M. 1997. The occurrence and correction of boron deficiency. Plant Soil, 193: 121 – 148.
- Singh D P, Beloy J, McInerney J K, Day L . 2012. Impact of boron, calcium and genetic factors on vitamin C, carotenoids, phenolic acids, anthocyanins and antioxidant capacity of carrots (*Daucus carota*) . Food Chemistry, 132 (3): 1161 – 1170.
- Teasdale R D, Richards D K. 1990. Boron deficiency in cultured pine cells. Quantitative studies of the interaction with Ca and Mg. Plant Physiology, 93: 1071 – 1077.
- Tewari R K, Kumar P, Sharma P N. 2009. Morphology and oxidative physiology of boron-deficient mulberry plants. Tree Physiology, 30 (1): 68 – 77.
- Wang Huo-yan. 1999. Study on the mechanism of boron-calcium interaction in rape cultivars (*Brassica napus* L.) with different boron efficiency [Ph. D. Dissertation] . Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 王火焰. 1999. 不同硼效率甘蓝型油菜品种硼钙相互作用机理研究 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang Yan-ling, Zhang Shu-qing. 2003. Study on the influence of magnesium, manganese molybdenum boron supply levels on plant mineral elements content in the body and biological yield of lettuce. Gansu Agricultural Science and Technology, (3): 42 – 44. ( in Chinese)
- 王艳玲, 张树清. 2003. 镁锰硼钼供应水平对莴苣植株体内矿质元素含量及生物学产量的影响研究. 甘肃农业科技, (3): 42 – 44.
- Wimmer M A, Eichert T. 2013. Review: Mechanisms for boron deficiency-mediated changes in plant water relations. Plant Science, 203 – 204: 25 – 32.
- Zhang Zhong-ming, Cui Ke-ming, Fan Yong-jun. 1997. Staining plant material section with toluidine blue O before removal of paraffin. Chinese Bulletin of Botany, 14 (2): 58 – 60. (in Chinese)
- 张仲鸣, 崔克明, 樊拥军. 1997. 甲苯胺蓝 - O 对未脱蜡植物组织切片的染色. 植物学通报, 14 (2): 58 – 60 .