

蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导的氧化还原动态

刘福平, 陈丽璇

(福建省亚热带植物研究所, 福建省亚热带植物生理生化重点公共实验室, 厦门 361006)

摘 要: 离体培养蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)类原球茎切块诱导胚性愈伤组织, 在培养第 11~18 d 时出现胚性细胞, 第 25~32 d 观察到幼嫩的球形胚。在培养第 0~11 d, 外植体 $\cdot\text{OH}$ 相对含量波动不大, O_2^- 生成速率持续提高并达到高峰, H_2O_2 水平明显提高, 抗氧化能力在低位波动, 推测外植体可能经受较强的氧化胁迫, 以利细胞脱分化和获得胚性潜能。此外, 此期间 SOD 活性持续提高, POD 和 CAT 活性达到一个高峰。在愈伤组织诱导全过程中, 总抗氧化能力、DPPH 自由基清除率、 H_2O_2 水平基本上都持续提高, 与 SOD 活性均极显著正相关, SOD 是影响培养物清除自由基能力和提高抗氧化水平的主要因素。综合分析实验结果表明, 在蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导过程中, SOD、 O_2^- 和 H_2O_2 起到关键的作用。

关键词: 蝴蝶兰; 胚性愈伤组织; 抗氧化能力; 活性氧; 抗氧化酶

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2010)06-0737-07

Redox Dynamics During Embryogenic Callus Induction of *Phalaenopsis* spp.

LIU Fu-Ping, CHEN Li-Xuan

(Fujian Institute of Subtropical Botany, Fujian Key Laboratory of Physiology and Biochemistry for Subtropical Plants, Xiamen 361006, China)

Abstract: Embryogenic callus was induced from protocorm-like body (PLB) dice of *Phalaenopsis* spp. Embryonic cells occurred on the 11th-18th day of culture, and young globular-shaped embryoids appeared on the 25th-32th day. For the first 11 days, the relative content of $\cdot\text{OH}$ in cultures undulated slightly, O_2^- production rate increased continuously and achieved its highest value, and H_2O_2 content increased significantly, meanwhile total antioxidative capability remained low. The results suggested that oxidative stress on explants was relatively high, which was advantageous to cell dedifferentiation and acquisition of embryogenic potential. In addition, SOD activity in the cultures showed an increasing tendency, and POD and CAT activities reached a peak. During the whole callus induction period, total antioxidative capability, DPPH scavenging capacity, and the H_2O_2 content generally continued to increase, and each showed a very significant positive correlation with SOD activity. Results indicated that SOD was the main factor that affected scavenging radical capability and increasing antioxidation of cultures. Comprehensive analysis of the experimental results suggested that SOD, O_2^- , and H_2O_2 played important roles during the induction of embryogenic callus from *Phalaenopsis* spp. explants.

Key words: *Phalaenopsis* spp.; Embryogenic callus; Antioxidative capability; ROS; Antioxidase

植物离体培养的形态发生与组织细胞的氧化还原系统密切相关。逆境条件决定或促进植物体细胞分化胚性细胞^[1-3], 即体细胞胚的分化需要较

高水平的氧化胁迫^[3-6], 抗氧化酶活性在胚性细胞分化过程中具有特异性变化^[3,5-8], 所以体细胞胚胎发生与组织抗氧化能力有关。St Clair 等^[9]

收稿日期: 2010-05-04, 修回日期: 2010-06-14。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C0410040, 2009J01079)。

作者简介: 刘福平(1963-), 男, 副研究员, 主要从事植物生理学研究(E-mail: fpliu5334@sina.com)。

概括指出超氧化物歧化酶(SOD)、超氧阴离子(O_2^-)和 H_2O_2 有关系,决定着细胞分化。近年来,植物体细胞胚发生的抗氧化代谢动态有较多报道,但主要是进行胚性愈伤组织与非胚性愈伤组织之间的比较,以及体细胞胚发育过程的观测^[5-8, 10-13],胚性愈伤组织诱导过程的氧化还原动态报道所见较少。

兰科植物离体培养所诱导的类原球茎(PLB)是体细胞胚的表现形式已经得到普遍认可,目前有关兰科植物组织培养的生理学研究主要集中在脱分化、再分化条件及形态观察方面。对组培过程中培养物的生理生化特性分析,有助于了解胚性细胞分化、发育的基础背景。兰科植物胚性愈伤组织是诱导类原球茎的基础,胚性愈伤组织形成过程抗氧化代谢动态目前仅见在文心兰(*Oncidium* 'Gower Ramsey')^[14]和蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)^[15]有所报道。本实验中笔者结合蝴蝶兰胚性愈伤组织形成的显微观察,通过探讨培养物抗氧化能力、活性氧及抗氧化酶活性变化及相互之间的关系,以期对蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导期间氧化还原代谢有较全面的了解。

1 材料与方法

1.1 胚性愈伤组织诱导方法

以蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)品种 YZ45 继代类原球茎为外植体。培养基为: 1/2MS + 6-BA 5.0 mg/L + CW(椰子汁)20%(V/V)+蔗糖 2%(W/W)。每粒类原球茎切成 3~5 个小块,每瓶放置 25~35 块,每种处理 5 瓶以上,培养温度 24~26℃,光照强度 1500 lx 左右,12 h/d。培养 1 个月得愈伤组织,随后发育成类原球茎,取样进行组织细胞学观察。在诱导愈伤组织的第 0、4、11、18、25、32 d 时取培养物,分析抗氧化能力、活性氧水平和抗氧化酶活性指标。

1.2 诱导期间培养物的组织细胞学观察

培养物常规石蜡切片,铁矾-苏木精染色,Zeiss 显微镜观察并拍照。

1.3 诱导期间培养物的抗氧化能力测定

1.3.1 总抗氧化能力

采用总抗氧化能力测试盒(南京建成生物工程研究所提供,其原理是植物样品能使 Fe^{3+} 还原

成 Fe^{2+} , Fe^{2+} 可与菲啉类物质形成稳定的有色螯合物)。定义在 37℃ 时,每克鲜样每分钟使反应体系的吸光度(OD)值增加 0.01 为一个总抗氧化能力单位,总抗氧化能力单位为 $U \cdot \min^{-1} \cdot g^{-1}FW$ 。

1.3.2 DPPH 自由基清除率

按照彭长连等的方法^[16],培养物以少量 50% 乙醇研磨,10000 g 4℃ 下离心 20 min 后,取上清液测定单位质量培养物对 DPPH 的清除率。

1.4 诱导期间培养物的活性氧水平测定

1.4.1 羟自由基($\cdot OH$)相对含量

参照 Popham 等^[17]和徐向荣等^[18]的方法稍加修改,培养物加入以 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)配制的 47 mmol/L 二甲亚砷溶液,冰浴研磨,10000 g 4℃ 下离心 20 min,取上清液用 HCl 调节 pH 至 2.5,加入 15 mmol/L 坚牢蓝 BB 盐,暗中显色 20 min,再加入吡啶使其颜色稳定,然后加入甲苯:正丁醇(3:1)混合液,充分混合,移弃下层相,将上层相用经正丁醇饱和的水冲洗,移去下层相,再将上清液于 420 nm 处测定吸光度。以单位时间每克鲜重在 420 nm 处的光密度的变化为单位,即 $\Delta A_{420} \cdot \min^{-1} \cdot g^{-1}FW$ 。

1.4.2 超氧阴离子(O_2^-)生成速率

参照汤章成的方法^[19],同时做 NO_2^- 标准曲线,得标准曲线 $y = 49.337x + 1.0788$ ($R^2 = 0.9958$),样品检测结果以 $mmol \cdot \min^{-1} \cdot g^{-1}FW$ 表示。

1.4.3 H_2O_2 含量

培养物加入预冷的丙酮及少许活性炭(样品鲜重的 20%),冰浴研磨,10000 g 4℃ 下离心 15 min; 其他同沈文飏等的方法^[20],结果以 $\mu mol \cdot g^{-1}FW$ 表示。同时做 H_2O_2 标准曲线(H_2O_2 用标准 0.1 mmol/L $K_2Cr_2O_7$ 标定),得 $y = 1484.1x - 0.6592$ ($R^2 = 0.997$)。

1.5 诱导期间培养物的抗氧化酶活性测定

1.5.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性

以 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)(含 0.1 mmol/L EDTA、4% PVP, pH 7.8)冰浴研磨,10000 g 4℃ 下离心 20 min,取上清液测定酶活性,参照汤章成的方法^[19]。

1.5.2 过氧化物酶(POD)活性

以 0.1 mol/L PBS 液(pH 7.0)冰浴研磨,5000 g 4℃ 下离心、定容,用愈创木酚显色法测定^[21]。

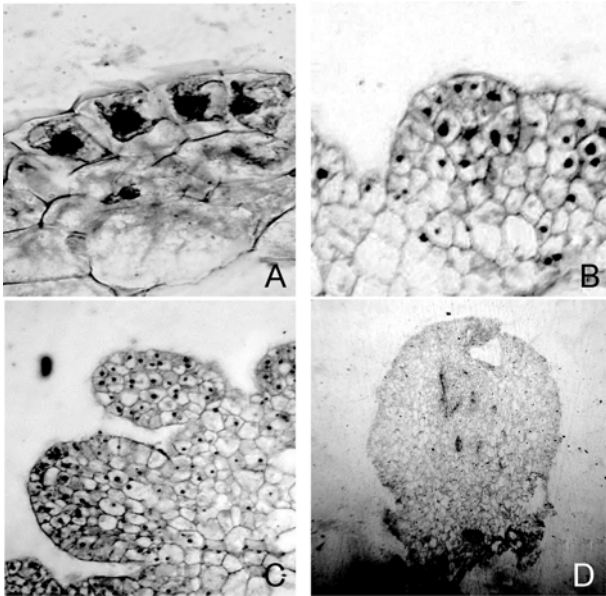
1.5.3 过氧化氢酶(CAT)活性

酶提取方法同 POD 提取方法(见 1.5.2), 只是 PBS 液 pH 为 7.4, 活力测定采用碘量法^[21]。

2 结果与分析

2.1 诱导期间培养物的组织细胞学观察结果

蝴蝶兰类原球茎切块外植体培养第 11 d 时明显膨大, 第 11 d 和第 18 d 的切片可观察到胚性母细胞, 细胞质浓, 核明显较大(图 1: A), 表明胚性母细胞主要在第 11~18 d 期间发生。随着胚性细胞的分裂, 在培养物表面凸出胚性细胞团(图 1: B), 第 25~32 d 形成愈伤组织, 表面粗糙, 显微观察显示为幼嫩的球形胚(图 1: C), 在原培养基中球形胚逐渐长大, 于培养的第 3 个月形成成熟的类原球茎(成熟胚, 见图 1: D)。



A. 胚性细胞(诱导第 11 d); B. 胚性细胞团从外植体表面凸起(诱导第 18 d); C. 幼嫩球形胚(诱导第 32 d); D. 成熟胚(培养 3 个月)
A. Embryonic cells (11th day of induction); B. Embryonic cell cluster protruding from the surface of explant (18th day of induction); C. Young globular-shaped embryoids (32th day of induction); D. Mature embryo (cultured for 3 months)

图 1 蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导的细胞学观察

Fig. 1 Cytological observation of embryogenic callus induction of *Phalaenopsis* spp.

2.2 诱导期间培养物的抗氧化能力与活性氧水平的关系

蝴蝶兰愈伤组织诱导期间总抗氧化能力在培

养的前 11 d 波动不大(图 2), 在第 4 d 最高, 比初始培养提高 37%, (相对第 11 d 后的急剧升高)总抗氧化能力处于相对较低的水平。 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 和 H_2O_2 是组织的主要活性氧, 其变化动态见图 3, 诱导初期 $\cdot\text{OH}$ 相对含量波动不大, 第 11 d 比初始培养减少 23%, O_2^- 生成速率从一开始就迅速加快, 第 11 d 的速率比初始培养增加 87% 并达到高峰, H_2O_2 含量也提高了 155%, 所以, 诱导前 11 d 的结果可能是培养物组织经受较强的氧化胁迫, 而这个时候正是外植体细胞脱分化, 胚性母细胞形成的启动时期。培养第 18 d 到第 32 d, $\cdot\text{OH}$ 相对含量稍有提高, O_2^- 生成速率明显回落, H_2O_2 含量有所提高, 但总抗氧化能力指标处在高位, 即胚性细胞进一步分裂至形成胚性愈伤组织时的氧化胁迫并不像诱导初期启动胚性细胞形成时那样明显。

2.3 诱导期间培养物的抗氧化能力与抗氧化酶活性的关系

愈伤组织诱导期间 SOD、POD 和 CAT 3 种抗

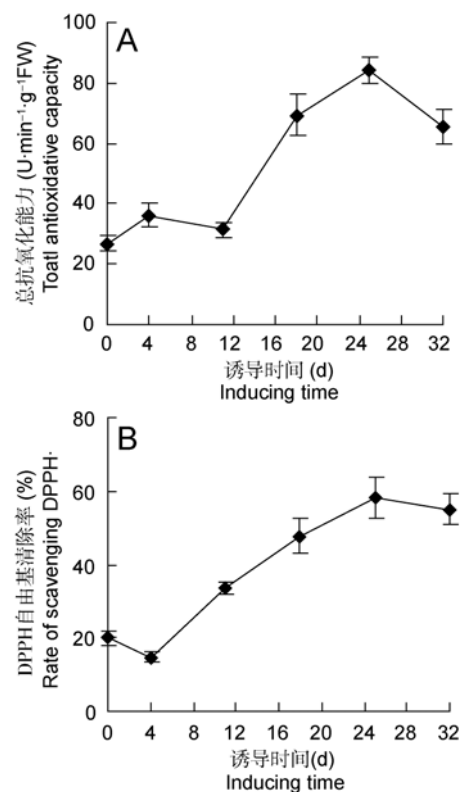


图 2 蝴蝶兰愈伤组织诱导期间的总抗氧化能力(A)、DPPH 自由基清除能力(B)动态

Fig. 2 Dynamic changes in total antioxidative capacity (A) and DPPH· scavenging capacity (B) during callus induction of *Phalaenopsis* spp.

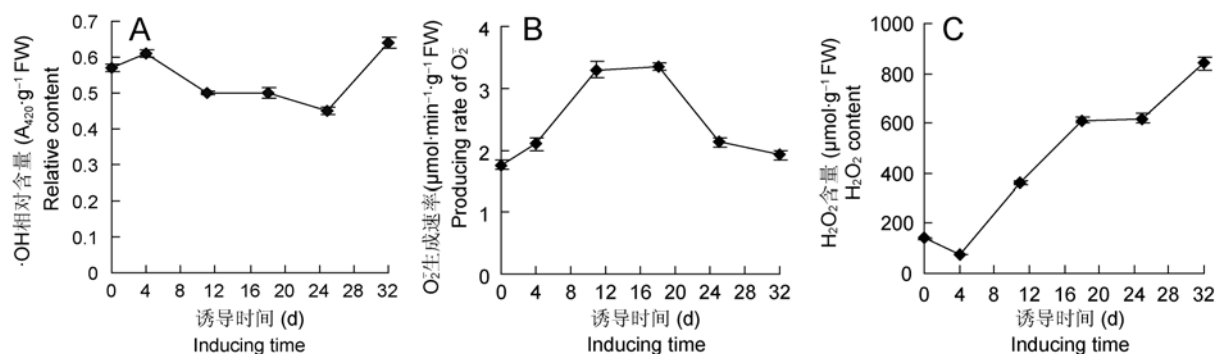


图 3 蝴蝶兰愈伤组织诱导期间·OH 相对含量(A)、O₂⁻生成速率(B)和 H₂O₂ 含量(C)动态

Fig. 3 Dynamic changes in relative content of ·OH (A) producing rate of O₂⁻ (B) and H₂O₂ content (C) during callus induction of *Phalaenopsis* spp.

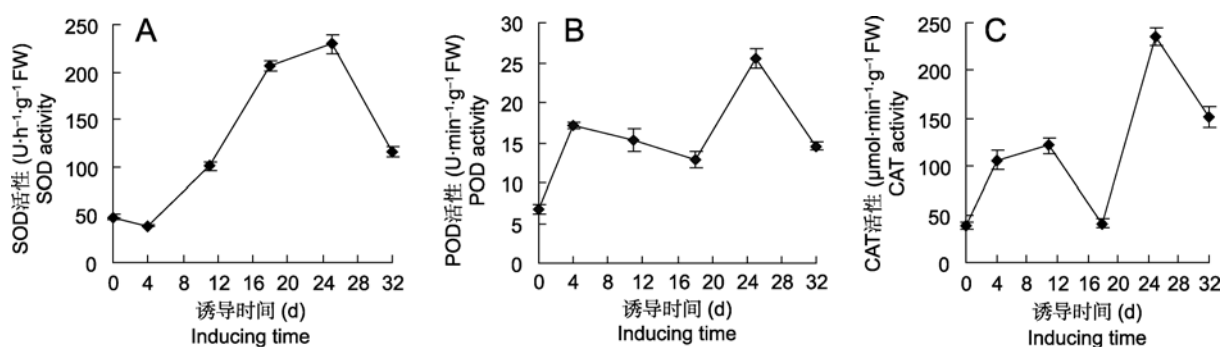


图 4 蝴蝶兰愈伤组织诱导期间的 SOD 活性 (A)、POD 活性(B)和 CAT 活性(C)动态

Fig. 4 Dynamic changes in SOD activity (A) POD activity (B) and CAT activity (C) during callus induction of *Phalaenopsis* spp.

氧化酶的活性动态见图 4。通过相关性分析比较它们对总抗氧化能力影响的相对重要性, SOD、POD 和 CAT 活性与总抗氧化能力的偏相关系数分别是 0.7955、0.023 和 0.265, 只有 SOD 活性与总抗氧化能力偏相关系数大于 $r_{0.01}$ 临界值 (0.706), 即两者相关性达极显著水平, POD 和 CAT 活性与总抗氧化能力偏相关系数均小于 $r_{0.05}$ 临界值 (0.615), 即相关不显著。所以在愈伤组织诱导期间, 上述 3 种抗氧化酶中只有 SOD 对组织的总抗氧化能力起到了重要作用。

此外, 3 种抗氧化酶中只有 SOD 行使消除自由基作用, 诱导期间 SOD 活性与 DPPH 自由基清除率的相关系数为 0.838, 大于 $r_{0.01}$ 临界值 (0.590), 即两者呈极显著相关, SOD 以 O₂⁻ 为底物, 可以认为培养物清除自由基的能力主要表现为 SOD 对 O₂⁻ 的清除。

2.4 诱导期间培养物抗氧化酶活性与 H₂O₂ 含量的关系

愈伤组织诱导期间 SOD、POD、CAT 活性与内源 H₂O₂ 水平变化关系, 3 种酶活性与 H₂O₂ 水平的偏相关系数依次为 0.799、-0.612 和 0.618, SOD 活力与 H₂O₂ 水平偏相关系数大于临界值 ($r_{0.01}=0.706$), 即诱导期间培养物 SOD 活性与 H₂O₂ 水平的相关性达极显著水平, POD 活性与 H₂O₂ 水平的偏相关系数绝对值小于临界值 ($r_{0.05}=0.615$), 相关不显著, CAT 活性与 H₂O₂ 水平呈正相关。从图 3: C 和图 4: A 可看出, 在诱导第 0~25 d 中, SOD 活性与 H₂O₂ 含量变化走势基本相同, 第 25~32 d, SOD 活力下降, 但 H₂O₂ 水平上升, 可能与此时(在第 25 d 后)的 POD、CAT 活性急剧下降(图 4: B、C)从而减少了底物(H₂O₂)的消耗有关。

3 讨论

3.1 胚性细胞诱导期间氧化胁迫水平变化

氧化胁迫可改变植物细胞分化状态, 烟草在胁迫条件下可以提高细胞增殖、分化基因以及与氧化胁迫有关的基因表达^[23]。植物组培培养基中加入的各种激素或附加物多为富含氧化原化合物(oxidant compound), 更加重了培养细胞的氧化胁迫, 从而产生更多活性氧^[24], 植物的离体培养是一种很强的非生物胁迫^[25], 已经有多实验解释了氧化胁迫在植物离体形态发生(包括体细胞胚发生)中的作用^[4-6, 26], Konieczny等^[3]认为渗透胁迫下生成的活性氧, 直接影响酶活性、膜性质和DNA结构而改变细胞的氧化还原系统和主要代谢途径, 决定了向日葵(*Helianthus annuus*)胚轴的体细胞胚发生。活性氧可能介导了氧化胁迫与植物细胞分化及离体再生^[3, 6, 10]。反之, 培养基附加抗氧化剂谷胱甘肽、 α -生育酚、抗坏血酸抑制唐菖蒲(*Gladiolus hybridus*)体细胞胚发生^[10], 抗氧化剂也抑制野生胡萝卜体细胞胚发生^[27]。

以上研究几乎都是检测抗氧化酶活性和活性氧消长来推测培养物所经受的氧化胁迫变化, 再如Dey和Kar^[28]以水稻胚为外植体, 认为在胚性愈伤组织诱导初期, SOD和CAT活性迅速降低意味着由于活性氧清除机制的减弱, 组织的氧化态有提高的趋势。张超等^[14]在培养文心兰外植体经历愈伤组织到原球茎分化全过程中, 通过分析POD、CAT、SOD活性变化, 推测在兰科植物原球茎发生的细胞分化过程中, 必然受到氧化胁迫的影响。本实验结合培养物总抗氧化能力和活性氧变化动态, 可以较为直接地了解培养物所经受的氧化胁迫程度。本实验结果表明, 蝴蝶兰愈伤组织诱导的前11 d, 培养物组织经受较强的氧化胁迫, 而这个时候正是外植体细胞脱分化、胚性母细胞形成的启动时期。体细胞胚的分化需要较高水平的氧化胁迫, 因为较高水平的氧化胁迫能诱导体细胞胚发生的相关基因表达, 从而诱导、促进细胞分化^[24]。本实验愈伤组织诱导的第11 d到第32 d, 总抗氧化能力指标急剧升至高位, 三种活性氧水平各有消长, 所以, 相对来说, 胚性细胞的进一步分裂并不需要较强的氧化胁迫。

3.2 诱导期间培养物的抗氧化酶活性变化

本实验结果表明, 在蝴蝶兰外植体诱导至形成胚性愈伤组织过程中, SOD酶活性基本上呈“N”形上升, POD、CAT活性都呈“M”形上升。在胚性母细胞开始出现的第11 d, POD、CAT活性均升至第一个高峰, 随后下降至低谷, 只有SOD活性继续提高, 这可能与保证组织内积累充分的内源 H_2O_2 作为诱导组织获得胚性的信号分子有关。

张超等^[14]的研究表明, 文心兰从茎尖外植体到愈伤组织形成过程中, SOD活性逐渐升高并达到高峰, 认为SOD对茎尖脱分化及原球茎形成早期具有促进作用, POD活性在外植体膨大期急剧升高并达峰值, 被认为与茎尖细胞脱分化有着密切的关系, CAT活性在愈伤组织期达到峰值, 表明对愈伤组织形成有促进作用。Cui等^[4]的研究表明, 只有SOD活性升高对枸杞(*Lycium barbarum*)愈伤组织分化出胚性细胞以及早期胚胎发育有促进作用, 此期间POD和CAT的活性迅速降低, 二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDC)强烈抑制SOD活性, 体胚发生频率也降低, 抑制CAT活性则对体胚发生频率没有影响, 类似的, 唐菖蒲叶外植体诱导胚性愈伤组织SOD活性逐渐增高, CAT和POX(过氧化物酶)活性在整个体细胞胚诱导过程都呈逐步下降趋势^[10]。詹园凤等^[29]的研究表明, POD在促进大蒜(*Allium sativum*)叶基外植体的脱分化和胚性细胞的前期发育中起主导作用, SOD和CAT在体细胞胚的发育中起主导作用。最近, 王克臣等^[30]诱导亚麻(*Linum usitatissimum*)两个品种胚性愈伤组织过程中, 初始愈伤组织因生长旺盛而SOD活性最低, POD活性在初始愈伤组织和胚性愈伤组织都较高, 认为它在胚性愈伤组织的形成和发展中起到了重要的调控作用。

以上前人对数种植物诱导体胚培养的各个阶段的研究结果表明, SOD、POD和CAT活性的消长关系不尽相同, 有的甚至相反, 这可能是不同植物的体胚发生过程中抗氧化系统的协调方式不同所致^[29], 即在不同的植物(外植体)中, 不同的胚性愈伤组织诱导阶段, 3种抗氧化酶分别或交替主导清除活性氧的作用, 使氧化系统维持在适宜的水平, 保证了细胞的正常分裂和分化。

3.3 诱导期间培养物抗氧化酶活性与 H_2O_2 水平的关系

内源 H_2O_2 水平是细胞各种抗氧化酶作用的结果, 关于植物胚性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。冰草 (*Mesembryanthemum crystallinum*) 初始愈伤组织有较高的总 SOD 活性和较低的 CAT 活性, 所以初始愈伤组织 H_2O_2 含量很高, 以保证在转入胚性愈伤组织培养基时有较高的再生潜力^[5]。Cui 等^[4]的检测表明, 继代愈伤组织在形成胚性细胞时伴随 H_2O_2 含量的增高, 将继代愈伤组织转入含一定浓度外源 H_2O_2 的分化培养基时, 明显提高了体细胞胚的发生频率。Gupta 和 Datta^[10]报道培养基附加 H_2O_2 可提高唐菖蒲体细胞胚发生频率。笔者也发现培养基中添加 H_2O_2 可替代部分外源激素诱导蝴蝶兰胚性愈伤组织^[15]。

H_2O_2 是 SOD 的催化产物, POD、CAT 则以 H_2O_2 为反应底物。愈伤组织诱导期间 SOD 和 POD(尤其是前者)活性是影响培养物 H_2O_2 内源水平的主要因素, 而 CAT 活性与 H_2O_2 水平呈正相关, 即诱导期间 H_2O_2 水平提高伴随 CAT 活性提高, 由于 CAT 以 H_2O_2 为底物, 该酶在抑制细胞内 H_2O_2 过度积累是否起积极作用仍不得而知。

3.4 诱导期间培养物的抗氧化酶活性与抗氧化能力的关系

SOD、POD、CAT 是细胞中的主要抗氧化酶, 相关性分析表明, 培养物清除自由基的能力主要来自 SOD 对 O_2^- 的清除, 同样, 相关性分析也表明只有 SOD 是影响组织总抗氧化能力的主要因素(其实, 自由基的清除是抗氧化能力的重要组成部分)。从以上推测可见, 蝴蝶兰愈伤组织诱导期间培养物的抗氧化能力主要来自对 O_2^- 的清除。

本实验通过探讨蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导期间培养物抗氧化能力、活性氧及抗氧化酶活性变化, 分析它们的相互关系, 进而对诱导期间的氧化还原动态有较全面的了解。蝴蝶兰外植体细胞脱分化及胚性母细胞形成的启动时期, O_2^- 生成速率的迅速提高和 H_2O_2 (活性相对较低的活性氧)水平提高可能是组织氧化胁迫水平升高的主要因素。笔者已经报道在蝴蝶兰愈伤组织诱导期间, 内源 H_2O_2 含量变化趋势与 DNA 甲基化水平呈极显著

负相关, 在诱导培养基中外源 H_2O_2 可部分替代生长调节剂起作用, 而添加 H_2O_2 淬灭剂二甲基硫脲降低了愈伤组织诱导率, H_2O_2 可能是诱导胚性愈伤组织的信号分子之一^[15]。本实验表明蝴蝶兰愈伤组织诱导期间 SOD 活性对 H_2O_2 水平变化起主导作用, SOD 也是影响组织的抗氧化能力的主要因素, 而抗氧化能力可能主要来自于对 O_2^- 的清除。所以, 植物细胞在离体培养过程中, 超氧化物歧化酶、超氧阴离子与 H_2O_2 的相互关系决定着细胞的分化。

参考文献:

- [1] Zimmerman J L, Apuya N, Darwish K, O'Carroll C. Novel regulation of heat shock genes during carrot somatic embryo development[J]. *The Plant Cell*, 1989, 1: 1137–1146.
- [2] Hao Y J, Deng X X. Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of citrus callus[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(6): 673–677.
- [3] Konieczny R, Libik M, Tuleja M, Niewiadomska E, Misalski Z. Oxidative events during *in vitro* regeneration of sunflower[J]. *Acta Physiol Plant*, 2008, 30: 71–79.
- [4] Cui K R, Xing G S, Liu X M, Xing G M, Wang Y F. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L[J]. *Plant Sci*, 1999, 146(1): 9–16.
- [5] Libik M, Konieczny R, Pater B, Slesak I, Misalski Z. Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H_2O_2 content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 834–841.
- [6] Zhang S G, Han S Y, Yang W H, Wei H L, Zhang M, Qi L W. Changes in H_2O_2 content and antioxidant enzyme gene expression during the somatic embryogenesis of *Larix leptolepis*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2010, 100: 21–29.
- [7] 刘明志, 陈勤, 刘希. 洋桔梗体细胞胚性愈伤组织诱导过程中超氧化物歧化酶和酯酶变化[J]. 广西植物, 2008, 28(2): 247–250.
- [8] 熊丹, 陈发菊, 梁宏伟, 王玉兵, 李晓玲. 香果树体细胞胚胎发生过程中 4 种同工酶的研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(10): 2011–2016.
- [9] St Clair D K, Oberley T D, Muse K E, St Clair W H. Expression of manganese superoxide dismutase

- promotes cellular differentiation[J]. *Free Rad Biol Med*, 1994, 16: 275–282.
- [10] Gupta S D, Datta S. Antioxidant enzyme activities during *in vitro* morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidant on plant regeneration[J]. *Biol Plant*, 2003/2004, 47: 179–183.
- [11] Shohael A M, Ali M B, Hahn E J, Paek K Y. Glutathione metabolism and antioxidant responses during *Eleutherococcus senticosus* somatic embryo development in a bioreactor [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 89:121–129.
- [12] 张建瑛, 杨玲, 沈海龙. 花楸体细胞胚发生过程中抗氧化酶活性的变化 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 264–268.
- [13] 李茜, 张存旭, 秦萍. 白皮松胚性和非胚性愈伤组织生理生化特性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(8): 151–155, 160.
- [14] 张超, 王广东. 文心兰原球茎形态发生与可溶性物质及抗氧化酶的关系 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(8): 1607–1613.
- [15] 刘福平, 陈淳, 许传俊. 过氧化氢与蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导[J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1339–1344.
- [16] 彭长连, 陈少薇, 林植芳, 林桂珠. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 658–661.
- [17] Popham P L, Novacky A. Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction[J]. *Plant Physiol*, 1991, 96(4): 1157–1160.
- [18] 徐向荣, 王文华, 李华斌. 比色法测定 Fenton 反应产生的羟自由基及其应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(1): 67–69.
- [19] 汤章成. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 308–309, 314–315.
- [20] 沈文飏, 叶茂炳, 徐朗莱, 张荣铎. 小麦旗叶自然衰老过程中清除活性氧能力的变化[J]. 植物学报, 1997, 39(7): 634–640.
- [21] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990: 154–155, 210–212.
- [22] Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen M A K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 1991–2001.
- [23] 邱立友, 李富欣, 祖朝龙, 马称心, 杨超, 冯云, 刘国顺, 赵会杰. 皖南不同类型土壤植烟成熟期烟叶的基因差异表达和显微结构的比较 [J]. 作物学报, 2009, 35(4): 749–754.
- [24] 崔凯荣, 戴若兰. 植物体细胞胚发生的分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 99, 100–101, 121.
- [25] Phillips R L, Kaeppler S M, Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls[J]. *PNAS*, 1994, 91: 5222–5226.
- [26] Papadakis A K, Siminis C I, Roubelakis–Angelakis K A. Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126: 434–444.
- [27] Earnshaw B A, Johnson M A. Control of wild carrot somatic embryo development by antioxidants[J]. *Plant Physiol*, 1987, 85: 273–286.
- [28] Dey S K, Kar M. Antioxidant efficiency during callus initiation from mature rice embryo[J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36(4): 543–549.
- [29] 詹园凤, 吴震, 金潇潇, 王广东. 大蒜体细胞胚胎发生过程中抗氧化酶活性变化及某些生理特征[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1799–1802.
- [30] 王克臣, 冷超, 李明. 亚麻形态发生的生理生化特性[J]. 中国农学通报, 2010, 26(12): 30–34.

(责任编辑: 张 平)