

铜胁迫对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化系统的影响*

王松华^{1**} 张 华² 何庆元¹

(¹安徽科技学院生命科学学院, 安徽蚌埠 233100; ²合肥工业大学生物与食品工程学院, 合肥 230009)

摘 要 采用 1/4 强度 Hoagland 营养液培养法研究了不同浓度 Cu 处理(0、10、30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4)对紫花苜蓿幼苗叶片生理生化特性的影响. 结果表明: 30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理使叶片中过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\text{OH} \cdot$)和丙二醛(MDA)含量升高; 随 Cu 浓度的增加, 愈创木酚过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽还原酶(GR)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性逐渐上升, 过氧化氢酶(CAT)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)的活性先上升后下降; 30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理增强 Fe-SOD 和酯酶(EST)的活性, 使叶片中谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量显著升高. $>10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu 处理下, 叶片中抗氧化系统清除活性氧的能力上升, 以防止叶片在 Cu 诱导的氧化胁迫下受到伤害.

关键词 紫花苜蓿 铜 抗氧化酶 酯酶

文章编号 1001-9332(2011)09-2285-06 **中图分类号** X171.5 **文献标识码** A

Effects of copper stress on *Medicago sativa* seedlings leaf antioxidative system. WANG Song-hua¹, ZHANG Hua², HE Qing-yuan¹ (¹College of Life Science, Anhui Science and Technology University, Bengbu 233100, Anhui, China; ²College of Biology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2011, 22(9): 2285-2290.

Abstract: This paper studied the effects of different concentration (0, 10, 30, 50, and 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) CuSO_4 on the leaf physiological and biochemical characteristics of *Medicago sativa* seedlings cultured with 1/4-strength Hoagland nutrient solution. In treatments 30, 50, and 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of CuSO_4 , the leaf H_2O_2 , $\text{OH} \cdot$, and MDA contents and Fe-SOD and EST activities increased, and GSH and AsA contents increased significantly. With increasing concentration Cu, the POD, GR, and APX activities increased gradually, and the CAT and G6PDH activities decreased after an initial increase. In treatments $>10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of Cu, the capacity of leaf antioxidative system in reactive oxygen species scavenging increased to prevent the injury from copper-induced oxidative stress.

Key words: *Medicago sativa*; copper; antioxidative enzyme; esterase.

随着全球经济的高速发展, 重金属土壤和水体污染已经成为一个全球性的问题^[1-2]. 土壤重金属(Cd、Cu、Zn 等)污染是影响我国农业可持续发展和生态环境质量的一个重要因素. 重金属容易被作物吸收, 不仅干扰作物的生长发育, 还能通过食物链危及人类健康^[3-5]. 因此, 研究重金属污染对作物的伤害机理, 是在污染条件下保护生物多样性、管理生物圈的理论基础, 也是保持农业生产的高产、优质、高效及安全的科学依据^[5]. Cu 是植物必需的微量元素

之一, 然而过量的 Cu 抑制植物光合作用、干扰细胞代谢和离子平衡. Cu 扩散到细胞核内则诱发 DNA 和蛋白质之间发生分子内和分子间交联, 以及 DNA 链重排、DNA 期外合成和甲基化异常等遗传毒害, 而且 Cu 胁迫还能诱导植物细胞产生大量活性氧, 引起膜脂过氧化, 膜透性增大, 细胞内容物大量外渗, 甚至发生细胞死亡^[5-6].

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为豆科苜蓿属多年生植物, 其生活史短、地上部和根系生物量大, 且能同时积累 Cd、Cu、Se 等多种重金属元素, 因而成为治理污染土壤的首选植物材料^[7-8]. 迄今, 紫花苜蓿对 Cu 诱导的氧化胁迫机制的研究在国内外鲜见报道^[7-8]. 本试验以紫花苜蓿阿尔冈金(Algonquin)为

* 安徽省自然科学研究重点项目(ZD200910)、安徽省自然科学基金项目(11040606M96, 11040606M85)和国家公益性行业科研专项(2011103005)资助.

** 通讯作者. E-mail: shwang70@yahoo.com.cn

2011-03-01 收稿, 2011-06-11 接受.

材料,研究了铜胁迫对紫花苜蓿幼苗叶片抗氧化系统的影响,旨在为铜污染土壤修复植物的利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及处理

紫花苜蓿品种阿尔冈金的种子在 5% NaClO 中消毒 10 min,去离子水冲洗,于 22 °C 培养箱内的塑料网上催芽培养 3 d. 选取长势一致的幼苗转至 1/4 强度 Hoagland 营养液中培养 4 d, pH 5.5±0.1. 用含 0 (CK)、10、30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuSO_4 的 1/4 强度 Hoagland 处理液培养,隔 1 d 更换一次处理液,每处理 3 个重复. 7 d 后,收集等量的各叶位叶片,液氮速冻,待用。

1.2 测定项目和方法

1.2.1 物质含量测定 参照 Wang 等^[9]的方法,测定紫花苜蓿幼苗的株高、生物量和铜含量,以及叶片中过氧化氢 (H_2O_2)、丙二醛 (MDA)、蛋白质、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和还原型抗坏血酸 (AsA). 参照 Liu 等^[10]的方法,测定 $\text{OH} \cdot$ 含量, $\text{OH} \cdot$ 产生速率用每克样品的吸光值表示。

1.2.2 酶活性测定 取 1 g 叶片,按 1:3 的比例加入酶提取液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.0 Tris-HCl 缓冲液,含 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AsA、1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇、1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 和 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2),研磨至匀浆,4 °C 冷冻离心 (10000×g, 30 min),取上清液作为谷胱甘肽还原酶 (GR) 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 待测酶液. 采用紫外分光光度法测定 GR^[11] 和 G6PDH 活性^[12]。

取 1 g 叶片,按 1:3 的比例加入酶提取液 [0.05 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.8 PBS,含 2% 聚乙烯吡咯烷酮和 5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇,抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 提取液包括 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ AsA],研磨至匀浆,4 °C 冷冻离心 (10000×g, 30 min),取上清液作为酯酶 (EST)、过氧化氢酶 (CAT)、APX、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 待测酶液. CAT、SOD、POD、APX 活性测定参照 Wang 等^[9]方法. POD 活力用 470 nm 吸光值的变化表示,消光系数为 26.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. CAT 活力用 A_{240} 的连续变化值表示,消光系数为 40.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. SOD 活力的测定以氮蓝四唑光化还原反应 50% 抑制率所需的酶量作为一个酶活力单位. APX 活性用 290 nm 吸收值的连续变化表示,消光系数为 2.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. 采用分光光度法测定 EST 活性^[13],用 490 nm

吸光值的变化表示. 在 pH 7.5, 30 °C 条件下,每分钟释放 1 μmol 萘酯所需的酶量定义为 1 个酶单位。

1.2.3 同工酶电泳 POD 同工酶采用联苯胺溶液染色^[14]. SOD 同工酶用磷酸缓冲液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.8, 内含 0.01% VB₂) 和 1% 氯化硝基四氮蓝唑 (NBT) 作为染色剂,在 4000 lx 下曝光 20 min^[14]. SOD 同工酶鉴定方法参考文献^[15],将相同的 3 块胶分别放入蒸馏水、5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 和氯仿乙醇 (1:3, V/V) 中浸泡 1 h 后用蒸馏水冲洗 2 次,再染色. CAT 同工酶电泳凝胶先用 H_2O_2 浸泡 20 min, 2% 铁氰化钾和 2% 氯化高铁染色 3~4 min. EST 同工酶电泳以醋酸- α -萘酯和醋酸- β -萘酯为底物,坚牢蓝为染料,酶带染成褐色和桃红色酶^[16]. APX、GR、G6PDH 染色方法参照 Anderson 等^[17]的方法. APX 电极缓冲液含 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ASA, GR 电泳分离胶含有 1% 淀粉, G6PDH 电泳分离胶加 0.5% 淀粉。

1.3 数据处理

采用 SPSS 10.0 软件进行数据统计,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Cu 处理对幼苗生长、抗氧化物质及 Cu、MDA 含量的影响

由表 1 可以看出,随 Cu 处理浓度的增大,紫花苜蓿幼苗地上部 Cu 含量逐渐增大 ($P < 0.05$); 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下,各项指标与对照无显著差异; 30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下,紫花苜蓿的株高和株生物量逐渐降低,叶片中的 H_2O_2 、 $\text{OH} \cdot$ 和 MDA 含量则逐渐升高。

2.2 不同浓度 Cu 处理对紫花苜蓿叶片中抗氧化酶活性的影响

由表 2 可以看出,随 Cu 处理浓度的增大,紫花苜蓿叶片中 SOD 活性无显著变化; CAT 和 G6PDH 活性呈先上升后下降的趋势, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下 CAT 活性达到峰值,此后逐渐下降, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理为对照的 64.5%, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下 G6PDH 活性达到峰值, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下比对照低 29.8%. POD、GR 和 APX 活性均随 Cu 处理浓度的增大而逐渐上升, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下分别为对照的 1.7、1.5 和 1.5 倍。

2.3 不同浓度 Cu 处理对紫花苜蓿叶片中抗氧化物酶同工酶的影响

由图 1 可以看出,GR 同工酶谱有 5 条酶带, Cu 处理诱导同工酶 GR-3、GR-4 和 GR-5 的表达,并且

表 1 不同浓度 Cu 处理下紫花苜蓿幼苗的株高、株生物量及 Cu、H₂O₂、OH· 和 MDA 含量Table 1 Shoot length, shoot biomass, and the contents of Cu, H₂O₂, OH· and MDA of *Medicago sativa* leaves in different Cu treatments (mean±SD)

Cu 处理 Cu treatment ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	株高 Shoot length (cm)	株生物量 Shoot biomass ($\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1} \text{FM}$)	Cu ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$)	H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	OH· ($\text{u} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)	MDA ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FM}$)
CK	6.8±0.4a	416.2±18.4a	23.9±2.6e	0.33±0.02c	147.2±14.1c	1.4±0.2d
10	6.0±0.4a	375.6±24.8a	49.6±5.8d	0.38±0.02c	176.2±23.2c	1.5±0.2d
30	5.1±0.2b	319.5±12.3b	111.1±9.6c	0.64±0.04b	219.5±9.4b	1.7±0.1c
50	4.6±0.2c	209.8±31.1c	309.2±12.3b	0.78±0.04a	240.8±11.2b	2.9±0.2b
100	2.1±0.4d	167.2±23.8d	342.6±15.9a	0.86±0.04a	268.4±16.7a	4.6±0.3a

同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicated significant difference among different treatments at 0.05 level.

表 2 不同浓度 Cu 处理下紫花苜蓿叶片中抗氧化酶的活性

Table 2 Activities of anti-oxidative enzymes of *Medicago sativa* leaves in different Cu treatments ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$)

Cu 处理 Cu treatment	SOD 活性 SOD activity	CAT 活性 CAT activity	POD 活性 POD activity	GR 活性 GR activity	APX 活性 APX activity	G6PDH 活性 G6PDH activity
CK	141.2±12.5a	30.4±1.4c	28.4±2.0d	3.1±0.2d	2.5±0.1c	9.4±0.4b
10	138.4±9.8a	41.6±2.1a	29.5±3.5d	3.5±0.2c	2.6±0.1c	11.2±0.3a
30	136.4±18.4a	35.7±2.4b	37.8±2.2c	3.7±0.4c	3.0±0.2b	11.6±0.3a
50	136.8±6.7a	37.2±1.3b	43.3±3.8b	4.2±0.3b	3.2±0.2b	10.8±0.5a
100	128.7±16.2a	19.6±1.5d	49.3±1.7a	4.5±0.3a	3.7±0.2a	6.6±0.2c

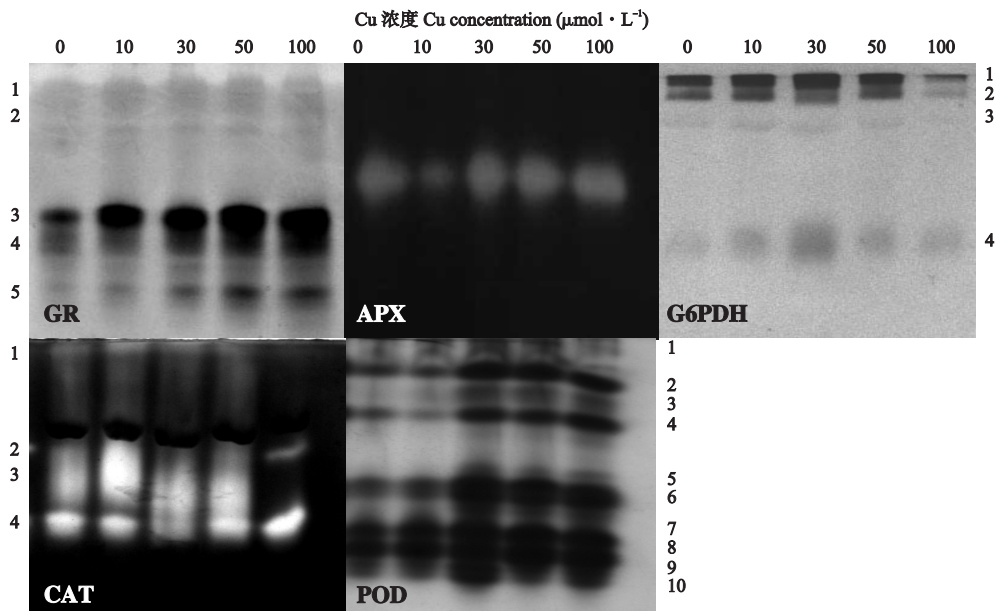


图 1 不同浓度 Cu 处理下紫花苜蓿叶片中 GR、APX、G6PDH、CAT 和 POD 同工酶

Fig. 1 Isoenzymes of GR, APX, G6PDH, CAT and POD in different Cu treatments.

随 Cu 浓度的增大而逐渐增强;APX 同工酶谱仅有一条酶带,随 Cu 浓度的增大,酶带的亮度逐渐增强;G6PDH 同工酶谱有 4 条酶带,与对照相比,除 G6PDH-3 外,其他酶带的亮度在 10、30 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下均增强,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理则显著抑制酶带 G6PDH-1 和 G6PDH-2 的表达;CAT 同工酶谱有 4 条酶带,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理诱导酶带 CAT-3 的表达最明显,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处

理则显著降低 CAT-1 和 CAT-3 的表达;POD 同工酶谱有 8 条酶带,30、50 和 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理诱导同工酶 POD-5 和 POD-7 的表达,同时增强酶带 2、3、4、6、8、9 和 10 的表达。

由图 2 可以看出,SOD 同工酶谱有 7 条酶带,其中,SOD-2 的亮度随 Cu 浓度的增大逐渐增强,其他酶带的亮度与对照无显著差异。SOD 的抑制剂鉴定结果表明,SOD-1 为 Mn-SOD,SOD-2 为 Fe-SOD,酶

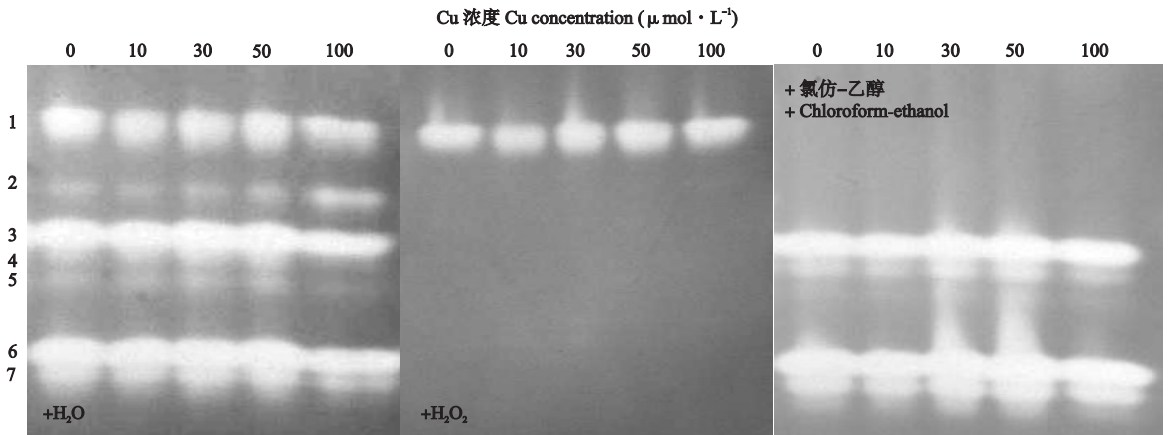


图2 SOD同工酶的鉴定

Fig. 2 Identification of SOD isoenzyme.

带3~7为Cu,Zn-SOD.

2.4 不同浓度Cu处理对紫花苜蓿叶片中酯酶(EST)活性及其同工酶的影响

与对照相比,30、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu处理显著提高了EST活性(图3A).由图3B可以看出,EST同工酶谱中,对照组存在褐色的酶带1、2、8和紫褐色的9.与对照相比,30、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu处理下,EST-8的表达减弱,EST-2的表达增强,并且诱导出5条新的酶带(EST-3、EST-4、EST-5、EST-6、EST-7),其中呈现桃红色的EST-3、EST-4、EST-5和EST-6的活性随着Cu浓度的增大逐渐增强.

2.5 不同浓度Cu处理对紫花苜蓿叶片中GSH和AsA含量的影响

由图4可以看出,与对照相比,10和30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu处理的紫花苜蓿叶片中GSH含量无显

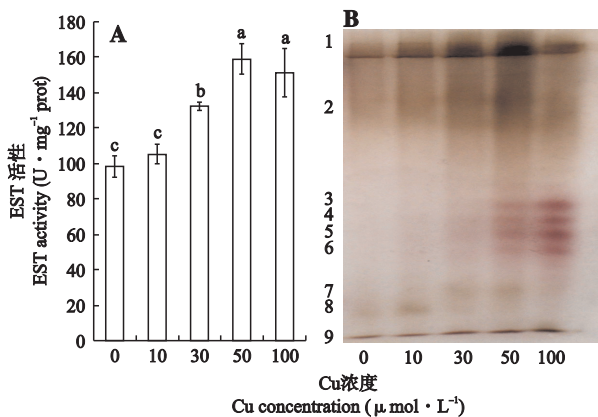


图3 不同浓度Cu处理下紫花苜蓿叶片中EST活性(A)及其同工酶(B)

Fig. 3 Activity of EST (A) and its isoenzyme (B) in different Cu treatments.

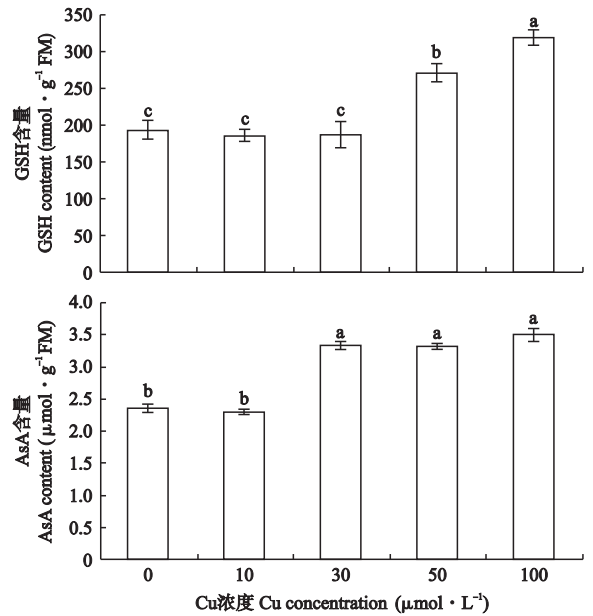


图4 不同浓度Cu处理下紫花苜蓿叶片中GSH和AsA的含量

Fig. 4 Contents of GSH and AsA in different Cu treatments.

著差异,50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu处理的GSH含量分别高40%和65%.30、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu处理下AsA含量均增加40%左右.

3 讨论

Cu是植物生长发育必需的微量元素之一,广泛参与植物的各种生物化学和生理过程^[18-19].然而,过量的Cu会对细胞产生毒害,甚至导致细胞死亡.Cu毒害主要通过直接或间接诱导产生的活性氧(ROS)攻击蛋白质、脂质等生物大分子,使其发生氧化或降解,导致生物膜透性增大、酶失活^[5].植物细胞在长期进化过程中形成了两套清除生物和非生物

胁迫诱导产生的过量 ROS 系统,即由 GSH、AsA 和硫辛酸^[20]等抗氧化剂组成的非酶系统,以及 SOD、POD、APX 和 CAT 等抗氧化酶组成的酶系统^[21-22]。

本研究中,30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下,随着 Cu 浓度的增大,Fe-SOD 活性逐渐升高(图 2),但 SOD 活性无显著变化,POD 和 APX 活性逐渐升高,CAT 活性则先上升后下降(表 2),这与菜豆(*Phaseolus vulgaris*)^[23]和印度芥菜(*Brassica juncea*)^[9]的研究结果一致。Cu 处理可以启动苜蓿叶片中抗氧化酶系统,但抗氧化酶不足以清除 Cu 诱导产生的 H_2O_2 和 O_2^- 。另外,Cu 的氧化还原性较强,可以导致 Haber-Weiss 和 Fenton 型反应的发生,使细胞中氧化性极强的 $\text{OH} \cdot$ 水平升高,从而诱导膜脂过氧化,产生大量 MDA(表 1),发生氧化胁迫。为了降低氧化程度以维持生存,苜蓿将光合作用产生的大量有机物和能量用于合成 POD、APX 等抗氧化酶。这可能是导致植株的株高和株生物量显著降低的原因之一。100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下,紫花苜蓿叶片中 CAT 活性与对照相比显著下降,其原因可能是:1) 高浓度 Cu 直接抑制 CAT 活性,或者抑制 CAT 酶基因的转录、翻译^[23];2) 细胞中高浓度 Cu 取代 CAT 酶血红素辅基中的 Fe,使 CAT 活性下降^[9];3) 细胞中高浓度 Cu 诱导产生了大量 O_2^- ,而此时 SOD 活性并未升高(表 2),导致细胞中 O_2^- 水平升高从而抑制 CAT 活性^[9]。

普遍存在于植物细胞质和叶绿体中的抗坏血酸-谷胱甘肽循环也是清除 H_2O_2 的重要途径,APX 和 GR 为该途径的关键酶,GSH 和 AsA 还原剂的再生主要由 G6PDH 催化产生的 NADPH 负责^[22]。有研究表明,在重金属 Cu 胁迫下,菜豆根系和叶片抗的坏血酸-谷胱甘肽循环清除 H_2O_2 能力升高^[23]。本研究中,30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下,紫花苜蓿叶片 APX 活性与对照相比显著升高,并消耗大量的 AsA 以清除 Cu 诱导产生的 H_2O_2 ;但此时 GSH 和 AsA 含量也显著升高,这可能与该浓度 Cu 处理下 G6PDH 和 GR 的活性较高有关(表 2)。100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理下,G6PDH 活性显著下降,而此时还原态 GSH 和 AsA 达到高值(图 4),其原因可能是:1) 此时细胞中抗氧化剂硫辛酸水平升高,氧化态和还原态硫辛酸均具有抗氧化能力,可供电子给氧化型的抗坏血酸和谷胱甘肽使之还原为 AsA^[20];2) 细胞中生物合成的 AsA 增加;3) 非 G6PDH 途径产生的 NADPH 增加。

EST 是生物体内催化羧酸酯类化合物水解与合

成的一类生命活动的基础代谢酶。植物大多数酯酶都对有机磷化合物敏感,属于 B 类的羧酸酯酶^[24]。植物 EST 具有水解并释放结合态植物激素(如水杨酸、茉莉酸、吲哚乙酸、赤霉素等)、调控天然产物的转化、加速细胞木质化和抗病解毒等功能。研究表明,2 ppm Cu 和 40 ppm Pb 抑制小麦叶片 EST 的表达,20 ppm Cr 则增强 EST 的表达^[25];一定浓度的 Cd 可诱导平菇、柱状田头菇等真菌菌丝 EST 同工酶的表达^[14,16]。本试验中,同工酶活性电泳中,以醋酸- α -萘酯为底物的酶带染成褐色,为 α -EST,以醋酸- β -萘酯为底物的酶带染成桃红色,为 β -EST。从图 3B 可以看出,对照组紫花苜蓿叶片中只存在 α -EST 同工酶,30、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理可以显著提高 α -EST 活性,而且可以诱导 β -EST 的表达, β -EST 的表达随 Cu 浓度的增大逐渐增强。由此可见, β -EST 为胁迫响应同工酶。目前,植物 β -EST 的生理功能尚未见报道,推测其作用可能是:1) 在 Cu 胁迫下通过提高 EST 的活性加速脂类化合物水解而增加细胞中有机酸的数量,以螯合更多的游离 Cu 离子,从而起到解 Cu 毒的作用^[16];2) 加速结合态的水杨酸、茉莉酸等植物激素的释放,使细胞中水杨酸、茉莉酸等水平升高,以增强植物抗逆性^[26-27]。

参考文献

- [1] Janas KM, Zielińska-Tomaszewska J, Rybaczek D, et al. The impact of copper ions on growth, lipid peroxidation, and phenolic compound accumulation and localization in lentil (*Lens culinaris* Medic.) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 2010, **167**: 270-276
- [2] Wang S-H (王松华), Yang Z-M (杨志敏), Lü B (吕波), et al. Response of *Brassica juncea* L. to copper-induced oxidative stress. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), 2004, **27**(1): 24-27 (in Chinese)
- [3] Chu L (储玲), Liu D-Y (刘登义), Wang Y-B (王友保), et al. Effect of copper pollution on seedling growth and activate oxygen metabolism of *Trifolium pratense*. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2004, **15**(1): 119-122 (in Chinese)
- [4] Sheldon AR, Menzies NW. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil*, 2005, **278**: 341-349
- [5] Sharma SS, Dietz KJ. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 2009, **14**: 43-50

- [6] Wang S-H (王松华), Yang Z-M (杨志敏), Xu L-L (徐朗莱). Mechanisms of copper toxicity and resistance of plants. *Ecology and Environment* (生态环境), 2003, **12**(3): 336–341 (in Chinese)
- [7] Peralta-Videa JR, de la Rosa G, Gonzalez JH, *et al.* Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advance in Environmental Resource*, 2004, **8**: 679–685
- [8] Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, Gonzalez E, *et al.* Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*, 2002, **119**: 291–301
- [9] Wang SH, Yang ZM, Yang H, *et al.* Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2004, **45**: 203–212
- [10] Liu YJ, Zhao ZG, Si J, *et al.* Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorisporea bungeana*. *Plant Growth Regulation*, 2009, **59**: 207–214
- [11] Knörzer OC, Durner J, Boger P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 1996, **97**: 388–396
- [12] Özer N, Bilgi C, Ögüs IH. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: Purification and kinetic properties. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, 2002, **34**: 253–262
- [13] Deising H, Nicholson RL, Haug M. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *The Plant Cell*, 1992, **4**: 1101–1111
- [14] Wang S-H (王松华), Zhang H (张 华), Cui Y-R (崔元戎), *et al.* Effects of cadmium stress on the antioxidative system in *Ganoderma lucidum* mycelia. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19**(6): 1355–1361 (in Chinese)
- [15] Luo G-H (罗广华), Wang A-G (王爱国), Fu A-G (付爱根). The location staining method for distinguishing different types of SOD. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 1996, **23**(4): 356–359 (in Chinese)
- [16] Wang S-H (王松华), Zhou Z-Y (周正义), Shen H-Q (沈厚琴), *et al.* Effect of cadmium on the growth and isozymes of *P. ostreatus* mycelia. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2006, **26**(5): 1616–1623 (in Chinese)
- [17] Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 1995, **109**: 1247–1257
- [18] Sudo E, Itouga M, Yoshida-Hatanaka K, *et al.* Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**: 3465–3474
- [19] Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, *et al.* Copper homeostasis. *New Phytologist*, 2009, **182**: 799–816
- [20] Sgherri C, Quartacci MF, Izzo R, *et al.* Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, **40**: 591–597
- [21] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, **7**: 405–410
- [22] Monnet F, Bordas F, Deluchat V, *et al.* Toxicity of copper excess on the lichen *Dermatocarpon luridum*: Antioxidant enzyme activities. *Chemosphere*, 2006, **65**: 1806–1813
- [23] Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, *et al.* Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 1999, **106**: 262–267
- [24] Gershtater MC, Edwards R. Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Science*, 2007, **173**: 579–588
- [25] Karataglis S, Symeonidis L, Moustakas M. Effect of toxic metals on the multiple forms of esterases of *Triticum aestivum* cv. Vergina. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1988, **160**: 106–112
- [26] Xiang CB, Oliver DJ. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, **10**: 1539–1550
- [27] Li T-L (李天来), Li M (李 淼), Sun Z-P (孙周平). Regulation effect of calcium and salicylic acid on defense enzyme activities in tomato leaves under sub-high temperature stress. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(3): 586–590 (in Chinese)

作者简介 王松华,男,1970年生,教授.主要从事植物生物化学和食用菌研究. E-mail: shwang70@yahoo.com.cn

责任编辑 孙 菊
