

# 同步辐射共聚焦X射线荧光微探针技术 在生物原位研究中的应用

林晓胜<sup>1,2,3</sup> 张丽丽<sup>1,3</sup> 何燕<sup>3</sup> 郑怡<sup>3</sup> 闫帅<sup>3</sup> 李爱国<sup>1,3</sup>

1(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2(中国科学院大学 北京 100049)

3(中国科学院上海高等研究院 上海 201210)

**摘要** 同步辐射共聚焦X射线荧光微探针技术(Synchrotron Radiation confocal micro X-ray Fluorescence, confocal  $\mu$ -SRXRF)是一种具有深度分辨的三维元素分析方法,可以原位获得样品不同深度的化学元素信息,广泛应用于生命和环境原位研究领域。在上海同步辐射光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF)硬X射线微聚焦及应用光束线站(BL15U1)搭建了共聚焦 $\mu$ -SRXRF的实验装置和低温原位装置,并应用于生物样品体内化学元素分析。利用该装置对拟南芥种子和保持在低温环境中的大型蚤进行了原位荧光成像分析,无需切片及干燥过程直接获得了化学元素在样品体内的空间分布特征,并与常规 $\mu$ -SRXRF获得的结果进行对比。实验结果表明:共聚焦 $\mu$ -SRXRF可直接对生物样品体内的化学元素进行有效测量,同时联合低温原位装置可以扩展对热敏感的生物样品的化学元素分析,为生命和环境等研究领域提供强有力的原位表征技术。

**关键词** 同步辐射, 共聚焦X射线荧光微探针技术, 低温原位装置

中图分类号 TL99

DOI: 10.11889/j.0253-3219.2021.hjs.44.080101

## Application of synchrotron radiation confocal micro X-ray fluorescence technique in the *in-situ* study of biology

LIN Xiaosheng<sup>1,2,3</sup> ZHANG Lili<sup>1,3</sup> HE Yan<sup>3</sup> ZHENG Yi<sup>3</sup> YAN Shuai<sup>3</sup> LI Aiguo<sup>1,3</sup>

1(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

2(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

3(Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China)

**Abstract** [Background] Synchrotron radiation confocal micro X-ray fluorescence (confocal  $\mu$ -SRXRF) micro-probe is a three dimensional analytical method for detecting chemical elements with depth resolution. It can be used to obtain the chemical element information at different depths of samples *in situ*, which is suitable in the fields of life and environmental sciences. [Purpose] This study aims to apply the confocal  $\mu$ -SRXRF device and *in-situ* cryogenic device, developed at the hard X-ray micro-focusing beamline (BL15U1) of Shanghai Synchrotron Radiation Facility (SSRF), to analyze the *in vivo* chemical elemental imaging of biological samples. [Methods] Confocal  $\mu$ -SRXRF was based on K-B mirrors and polycapillary X-ray optics. The foci of the polycapillary X-ray optics and the incident X-

国家自然科学基金(No.11605276、No.U1732127、No.11805258)资助

第一作者: 林晓胜, 男, 1992年出生, 2016年毕业于南华大学, 现为博士研究生, 专业领域为核技术及应用专业

通信作者: 李爱国, E-mail: liaiguo@sinap.ac.cn; 张丽丽, E-mail: zhanglili@sinap.ac.cn

收稿日期: 2021-05-14, 修回日期: 2021-06-04

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.11605276, No.U1732127, No.11805258)

First author: LIN Xiaosheng, male, born in 1992, graduated from University of South China in 2016, doctoral student, focusing on the application of synchrotron radiation

Corresponding author: LI Aiguo, E-mail: liaiguo@sinap.ac.cn; ZHANG Lili, E-mail: zhanglili@sinap.ac.cn

Received date: 2021-05-14, revised date: 2021-06-04

ray beam were coincident by continuous scanning and position modification. The confocal  $\mu$ -SRXRF was used for *in-situ* XRF imaging analysis of Arabidopsis thaliana seeds and Daphnia magna, and compared with that of conventional  $\mu$ -SRXRF. The confocal volume was submerged at different depths within the samples to obtain the depth-dependent information. In addition, an *in-situ* cryogenic device was used to keep Daphnia magna under the cryogenic environment. **[Results]** The spatial distributions of chemical elements for *in vivo* biological samples were directly obtained by confocal  $\mu$ -SRXRF, without slicing or drying. The specific distribution of chemical elements in plant tissues or organs is more accurately obtained while the absorption and distribution characteristics of chemical elements in organisms are observed more carefully. **[Conclusions]** Confocal  $\mu$ -SRXRF can be used to directly and effectively analyze the spatial distribution of chemical elements within biological samples. Meanwhile, it can be expanded to analyze the heat-sensitive biological samples and chemical elements by equipping with *in-situ* cryogenic device, providing a powerful *in-situ* characterization technique for the life and environment research.

**Key words** Synchrotron radiation, Confocal micro X-ray fluorescence technique, *In-situ* cryogenic device

基于同步辐射光源的X射线荧光微探针技术(Synchrotron Radiation micro X-ray Fluorescence,  $\mu$ -SRXRF)由于其高探测灵敏度、对样品的低损伤性、可分析厚样品以及可在大气和水环境下测量等优点,为研究生物样品的化学元素分布及化学态变化提供了强大的技术支持,在生物及环境等研究领域得到了广泛的应用<sup>[1-6]</sup>。然而,在常规 $\mu$ -SRXRF实验中,由于探测器方向上没有任何限制,在入射光路径上不同深度的样品发射出的X射线荧光(X-ray Fluorescence, XRF)都可被探测器接收,因此探测到的XRF图像不具有深度分辨信息。为获得深度方向的信息,通常需要对样品进行切片后再扫描,而切片制样过程可能破坏样品的真实结构。共聚焦 $\mu$ -SRXRF是一种具有深度分辨的三维元素分析方法<sup>[7-13]</sup>,其原理最先由Gibson和Kumakhov在1992年提出<sup>[14]</sup>。当入射X射线的焦点与置于探测器前端的毛细管光学元件的焦点重叠时(即共聚焦状态),只有焦点重叠区域的样品发射的XRF信号才能够满足全反射条件被探测器探测接收,以此来选择性地采集不同深度的XRF信号。因此共聚焦 $\mu$ -SRXRF在生物原位研究中具有广阔的应用前景。

此外,对于含水量较多的生物样品,这些样品在实验前期的脱水及干燥过程中很可能会导致其离子成分的丢失或结构的收缩、变形甚至崩解等问题<sup>[15-17]</sup>,不能完整反映样品的真实信息。在 $\mu$ -SRXRF实验过程中,由于长时间受到高通量X射线的照射,生物样品内大量积累的热量可能会破坏其形态和结构。为获得可信的结果,越来越多的研究人员希望无需复杂的制样过程就可获得生物样品中感兴趣元素的二维/三维分布和成像信息,并希望能在 $\mu$ -SRXRF实验中能够保持低温检测环境,可直接对热敏感的含水生物样品进行检测。国外如欧洲同步辐射光源(European Synchrotron Radiation

Facility, ESRF)的ID16A<sup>[18]</sup>、美国先进光源(Advanced Photon Source, APS)的21-ID-D<sup>[19-20]</sup>和德国PETRA III的P06<sup>[21]</sup>等X射线荧光微探针光束线站都已经发展了针对生物和环境样品的低温X射线荧光微探针技术。因此,在上海同步辐射光源(Shanghai Synchrotron Radiation Facility, SSRF)硬X射线微聚焦及应用光束线站(BL15U1)发展共聚焦 $\mu$ -SRXRF及低温原位检测技术非常必要,可以扩展BL15U1线站的检测分析能力,满足生物和环境等用户对于原位研究的需求,提高其研究结果的可信度。

## 1 共聚焦X射线荧光微探针技术实验装置及低温原位装置

在上海同步辐射光源BL15U1线站搭建了共聚焦 $\mu$ -SRXRF的实验装置及低温原位装置,其示意图及装置实物图如图1和图2所示。

BL15U1线站采用平面波荡器(IV-undulator)作为辐射光源,同时采用双晶单色器( $\Delta E/E \approx 10^{-4}$ )对同步辐射光进行单色化,光子能量范围为3.5~22.5 keV。X射线经过超环面镜和K-B聚焦镜两级聚焦后,在样品处的光斑大小约为 $5.6 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ ( $H \times V$ )。采用日本OKEN公司的S-1329A1型电离室和S-1196A1型电离室分别监测入射光和透射光的强度,由日本Hitachi High-Tech Science America公司的Vortex®-90EX硅漂移探测器(Silicon Drift Detector, SDD)和美国XIA公司的多道分析器组合的探测系统采集测试样品的XRF信号。为了减少瑞利散射(Rayleigh scattering)和康普顿散射(Compton scattering)背底,探测系统与入射光路径呈 $90^\circ$ 放置。样品与入射光路径呈 $45^\circ$ 放置,采用德国Allied Vision公司的光学显微镜实时观察样品的位置。

为限制SDD探测器的接收范围,将美国XOS公司的多毛细管光学元件(Polycapillary X-ray optics)固定在SDD探测器前端。多毛细管光学元件的焦点距离为2.5 mm,在17.4 keV处的焦点尺寸 $< 10 \mu\text{m}$  (Full Width at Half Maximum, FWHM),在8.0 keV处的传输效率为3.1%。通过不断地调节SDD探测器的位置,使多毛细管光学元件的焦点与K-B聚焦镜的焦点重叠,达到共聚焦的状态。在共聚焦状态下,探测系统接收到的XRF信号是来自共聚焦体积元内的信号。保持共聚焦体积元的位置不变,样品以 $10 \mu\text{m}$ 的步长沿着光学显微镜视野的深

度方向连续移动。当SDD探测器从无到有探测到样品的XRF信号时,即认为共聚焦体积元到达样品表面。继续沿着光学显微镜视野的深度方向移动样品,使共聚焦体积元在样品内部不同深度移动,得到不同深度的化学元素信息。后期数据处理过程中,通过重构多个不同深度的元素分布图像,就可以实现三维空间元素分布的分析。

此外,为了在共聚焦 $\mu\text{-SRXRF}$ 实验中能够保持低温检测环境,采用英国Oxford Cryosystems公司的液氮低温系统(Cryostream 800, 77 K)保持生物样品在大气中处于低温冷冻状态。

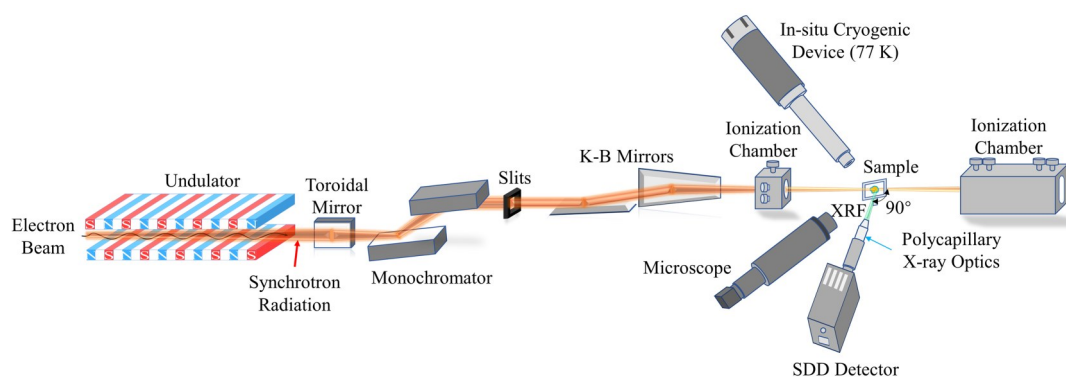


图1 同步辐射共聚焦X射线荧光微探针装置和低温原位装置的示意图  
Fig.1 The schematic of confocal  $\mu\text{-SRXRF}$  setup and *in-situ* cryogenic device at BL15U1 of the SSRF

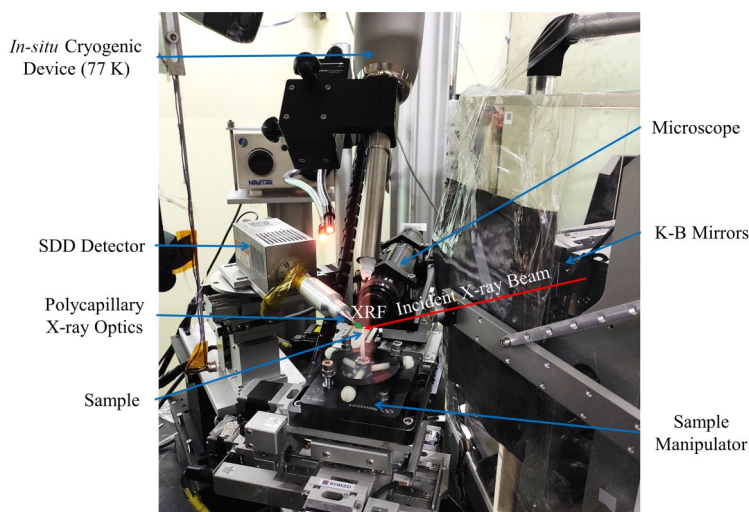


图2 同步辐射共聚焦X射线荧光微探针实验装置和低温原位装置的实物图  
Fig.2 Physical picture of confocal  $\mu\text{-SRXRF}$  and *in-situ* cryogenic device at BL15U1 of the SSRF

## 2 共聚焦X射线荧光微探针技术在生物原位研究中的应用

拟南芥(*Arabidopsis Thaliana*)是研究物种自然变异和进化的模式植物,在植物科学研究中占据重要地位。图3(b)是利用常规 $\mu\text{-SRXRF}$ 对拟南芥种子(图3(a))进行原位XRF扫描成像的结果。由于

X射线是从样品表面 $45^\circ$ 方向入射的,因此XRF分布图像与图3(a)所示的光学显微镜照片不能完全重合。此外,在入射光路径上不同深度的样品发射出的XRF信号都被探测器接收,因此该XRF分布图像不具有深度分辨信息。尽管图3(b)中Fe的分布显示与整个种子胚胎的维管束有关,但其他化学元素的空间分布细节严重地重叠了。此外,在不使用切



片操作的情况下,种子厚度的不均匀性会导致常规 $\mu$ -SRXRF获得的XRF分布图像失真。图3(c)是利用共聚焦 $\mu$ -SRXRF对该拟南芥种子进行原位XRF扫描成像的结果,共聚焦体积元在距离拟南芥种子表面约100  $\mu$ m深度处扫描。如图3(c)所示,Ca、Cu和Sr在整个种子胚胎中均有分布,并在种皮中积累更高的水平。Ca的分布与Schnell Ramos等<sup>[22]</sup>采用粒子诱导X射线荧光分析(Particle-Induced X-ray Emission, PIXE)测得的拟南芥种子切片结果类似,而Mn和Fe在整个种子中分布并不均匀。这种特异性的聚集可能与其特定的结构有关。Mn可在线粒

体中聚集<sup>[23]</sup>,因此发芽过程中能量需求大的组织或器官中可能会聚集更多的Mn。Fe的分布显示了胚根、下胚轴和一分子叶的维管束。Zn均匀地分布在种子胚胎中。Mn、Fe和Zn的分布图与Kim等<sup>[24]</sup>的研究结果类似。Ca、Zn和Sr的结果显示了种子内部存在供种子生长发育的空间。实验结果表明:利用共聚焦 $\mu$ -SRXRF可以在不切片的情况下直接获得化学元素在拟南芥种子内部的空间分布特征,更加准确地观察化学元素在植物体组织或器官中的特异性分布状况。

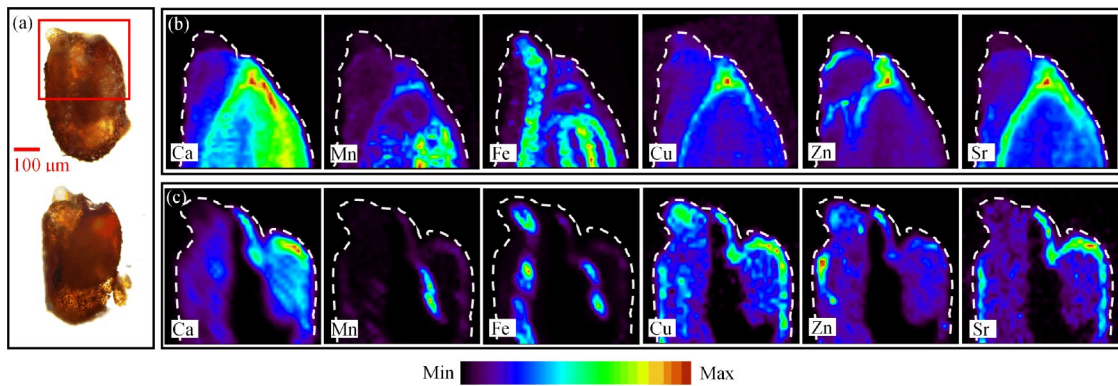


图3 拟南芥种子的光学显微镜照片(a)、常规 $\mu$ -SRXRF成像结果(b)和共聚焦 $\mu$ -SRXRF成像结果(c)  
Fig.3 Optical microscopic image of *Arabidopsis thaliana* seed (a), the XRF imaging results of *Arabidopsis thaliana* seed by conventional  $\mu$ -SRXRF (b) and confocal  $\mu$ -SRXRF (c)

大型蚤(*Daphnia Magna*)是国际公认的标准实验生物,广泛地用于水生生物毒理试验,也是评估纳米材料水生生物毒性的模式生物之一。图4(a)是利用常规 $\mu$ -SRXRF联合低温原位装置对暴露在纳米 $\text{TiO}_2$ 和As(V)中的大型蚤进行原位XRF扫描成像的

结果。实验过程中采用低温原位装置保持含水量较高的大型蚤处于低温检测环境以减少热量对大型蚤组织和结构的破坏。在常规 $\mu$ -SRXRF实验中,由于探测器方向上没有任何限制,大型蚤体表和体内发射的XRF信号都被探测器接收,因此图4(a)的结果

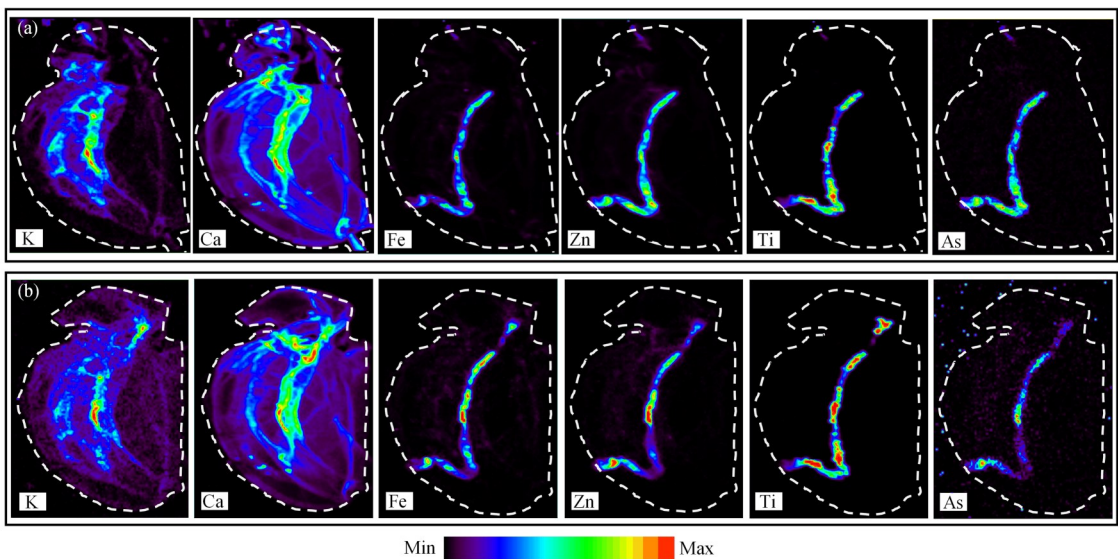


图4 常规 $\mu$ -SRXRF (a)和共聚焦 $\mu$ -SRXRF (b)联合低温原位装置对大型蚤进行XRF成像的结果  
Fig.4 The XRF imaging results of *Daphnia magna* by conventional  $\mu$ -SRXRF (a) and confocal  $\mu$ -SRXRF (b) equipped with *in-situ* cryogenic device

不具有深度分辨信息。虽然Fe、Zn、Ti和As的信号显示了这些化学元素主要富集在大型蚤的肠道中，但无法确定As(V)是否进入大型蚤体内。图4(b)是共聚焦 $\mu$ -SRXRF联合低温原位装置对暴露在纳米TiO<sub>2</sub>和As(V)中的大型蚤进行原位XRF扫描成像的结果，共聚焦体积元在距离大型蚤表面约150  $\mu$ m深度处扫描。如图4(b)所示，K的信号清晰地展现了K<sup>+</sup>在大型蚤体内的分布。Ca的信号清晰地展现了大型蚤体内钙化骨骼的形貌，其主要与碳酸盐和磷酸盐物质有关<sup>[25-26]</sup>。Fe和Zn的信号主要富集在大型蚤的肠道中，主要来源于由含有柠檬酸铁铵和七水硫酸锌的BG11培养基培养的食物(绿藻)。Ti的信号几乎全部聚集在肠道中，个别较强的Ti信号可能是大型蚤捕食到发生团聚的纳米TiO<sub>2</sub>颗粒。As的信号表明了除了吸附在大型蚤甲壳表面的As(V)外，在体内的组织或器官也累积了少量的As(V)。As作为一种需要严格防控的有毒物质，可能通过吸附于纳米TiO<sub>2</sub>后经肠道进入生物体内，对大型蚤产生不利的影响。实验结果表明：利用共聚焦 $\mu$ -SRXRF联合低温原位装置可以在无需脱水干燥过程直接获得化学元素在大型蚤体内的空间分布特征，不仅避免表面吸附或沾污引起的假性结果问题，且可以更加细致地观察到化学元素在生物体内部的吸收和分布特征。

### 3 结语

本工作在上海同步辐射光源硬X射线微聚焦及应用光束线站(BL15U1)搭建了共聚焦X射线荧光微探针实验装置。利用共聚焦 $\mu$ -SRXRF对拟南芥种子进行了原位XRF成像分析，直接获得了化学元素在拟南芥种子内部的空间分布特征，更加准确地探索化学元素在植物体组织/器官中的特异性分布状况。同时，还搭建了低温原位装置，利用共聚焦 $\mu$ -SRXRF联合低温原位装置对暴露在纳米TiO<sub>2</sub>和As(V)中的大型蚤进行了低温环境下的原位XRF成像分析，直接获得了化学元素在大型蚤体内的空间分布特征，不仅避免表面吸附或沾污引起的假性结果问题，且可以更加细致地观察到化学元素在生物体内部的吸收和分布特征。

该装置的空间分辨率由入射X射线的光斑大小和多毛细管光学元件的焦点大小决定。今后可通过缩小光斑和采用更小焦点尺寸的毛细管光学元件来进一步提高空间分辨率。该装置后续还可结合X射线近边吸收精细结构(X-ray Absorption Near Edge Structure, XANES)实现低温共聚焦XANES方法，获得化学元素在生物体内部的化学态变化，表征

化学元素在生物体内部的转化和代谢过程。因此，利用共聚焦 $\mu$ -SRXRF可无需切片及干燥过程直接获得化学元素在生物体内的真实分布信息，同时联合低温原位装置可以扩展对热敏感的生物样品和元素的分析，更深入地了解化学元素对生物体的影响与作用，为生命和环境等研究领域提供强有力的原位表征技术。

### 参考文献

- 1 Paunesku T, Rajh T, Wiederrecht G, *et al.* Biology of TiO<sub>2</sub>-oligonucleotide nanocomposites[J]. *Nature Materials*, 2003, **2**(5): 343-346. DOI: 10.1038/nmat875.
- 2 Wagner D, Maser J, Lai B, *et al.* Elemental analysis of mycobacterium avium-, mycobacterium tuberculosis-, and mycobacterium smegmatis-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system[J]. *Journal of Immunology*, 2005, **174**(3): 1491 - 1500. DOI: 10.4049/jimmunol.174.3.1491.
- 3 Young L W, Westcott N D, Attenkofer K, *et al.* A high-throughput determination of metal concentrations in whole intact Arabidopsis thaliana seeds using synchrotron-based X-ray fluorescence spectroscopy[J]. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2006, **13**(4): 304 - 313. DOI: 10.1107/S0909049506019571.
- 4 Young L, Westcott N, Christensen C, *et al.* Inferring the geometry of fourth-period metallic elements in Arabidopsis thaliana seeds using synchrotron-based multi-angle X-ray fluorescence mapping[J]. *Annals of Botany*, 2007, **100**(6): 1357-1365. DOI: 10.1093/aob/mcm205.
- 5 Fahmi C J. Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2007, **11**(2): 121-127. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.02.039.
- 6 Bohic S, Cotte M, Salomé M, *et al.* Biomedical applications of the ESRF synchrotron-based microspectroscopy platform[J]. *Journal of Structural Biology*, 2012, **177**(2): 248 - 258. DOI: 10.1016/j.jsb.2011.12.006.
- 7 Janssens K, Proost K, Falkenberg G. Confocal microscopic X-ray fluorescence at the HASYLAB microfocuss beamline: characteristics and possibilities[J]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2004, **59**(10): 1637-1645. DOI: 10.1016/j.sab.2004.07.025.
- 8 Vince L, Vekemans B, Brenker F E, *et al.* Three-

- dimensional trace element analysis by confocal X-ray microfluorescence imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, **76**(22): 6786–6791. DOI: 10.1021/ac049274l.
- 9 Woll A R, Mass J, Bisulca C, *et al.* Development of confocal X-ray fluorescence (XRF) microscopy at the Cornell high energy synchrotron source[J]. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 2006, **83**(2): 235–238. DOI: 10.1007/s00339-006-3513-4.
- 10 Sun T, Ding X, Liu Z, *et al.* Characterization of a confocal three-dimensional micro X-ray fluorescence facility based on polycapillary X-ray optics and Kirkpatrick-Baez mirrors[J]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2008, **63**(1): 76–80. DOI: 10.1016/j.sab.2007.11.003.
- 11 Perez R D, Sánchez H J, Perez C A, *et al.* Latest developments and opportunities for 3D analysis of biological samples by confocal  $\mu$ -XRF[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2010, **79**(2): 195 – 200. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2009.04.034.
- 12 Schoonjans T, Silversmit G, Vekemans B, *et al.* Fundamental parameter based quantification algorithm for confocal nano-X-ray fluorescence analysis[J]. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, 2012, **67**: 32–42. DOI: 10.1016/j.sab.2011.12.006.
- 13 资明, 魏向军, 于海生, 等. 用同步辐射共聚焦X射线方法研究古代彩绘样品的层状结构[J]. *核技术*, 2015, **38**(6): 060101. DOI: 10.11889/j.0253-3219.2015.hjs.38.060101.
- ZI Ming, WEI Xiangjun, YU Haisheng, *et al.* Stratified structure in ancient paints studied by synchrotron confocal micro-X-ray method[J]. *Nuclear Techniques*, 2015, **38**(6): 060101. DOI: 10.11889/j.0253-3219.2015.hjs.38.060101.
- 14 Gibson W M, Kumakhov M A. Applications of X-ray and neutron capillary optics[J]. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 1993. DOI: 10.1117/12.140473.
- 15 O'Toole E, Wray G, Kremer J, *et al.* High voltage cryomicroscopy of human blood platelets[J]. *Journal of Structural Biology*, 1993, **110**(1): 55–66. DOI: 10.1006/JSBI.1993.1004.
- 16 Williams S, Zhang X, Jacobsen C, *et al.* Measurements of wet metaphase chromosomes in the scanning transmission X-ray microscope[J]. *Journal of Microscopy*, 1993, **170**(2): 155 – 165. DOI: 10.1111/J.1365-2818.1993.TB03335.X.
- 17 Beveridge T J. Bacterial cell wall structure and implications for interactions with metal ions and minerals [J]. *Journal of Nuclear & Radiochemical Sciences*, 2005, **6**(1): 7–10. DOI: 10.14494/JNRS2000.6.7.
- 18 Da Silva J C, Pacurenu A, Yang Y, *et al.* High-energy cryo X-ray nanoimaging at the ID16A beamline of ESRF[C]. *Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series*, 2017. DOI: 10.1117/12.2275739.
- 19 Chen S, Deng J, Yuan Y, *et al.* The Bionanoprobe: hard X-ray fluorescence nanoprobe with cryogenic capabilities [J]. *Journal of Synchrotron Radiation*, 2014, **21**: 66–75. DOI: 10.1107/S1600577513029676.
- 20 Chen S, Paunesku T, Yuan Y, *et al.* 2D/3D cryo X-ray fluorescence imaging at the bionanoprobe at the advanced photon source[C]. *AIP Publishing LLC*, 2016. DOI: 10.1063/1.4937522.
- 21 Rumancev C, Vopel T, Stuhr S, *et al.* Micro X-ray fluorescence analysis of trace element distribution in frozen hydrated HeLa cells at the P06 beamline at Petra III [J]. *Biointerphases*, 2021, **16**(1): 011004. DOI: 10.1116/6.0000593.
- 22 Schnell Ramos M, Khodja H, Mary V, *et al.* Using  $\mu$ PIXE for quantitative mapping of metal concentration in *Arabidopsis thaliana* seeds[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, **4**: 168. DOI: 10.3389/fpls.2013.00168.
- 23 Scandalios J G. Molecular genetics of superoxide dismutases in plants[J]. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 1997, **34**: 527 – 568. DOI: 10.1101/087969502.34.527.
- 24 Kim S A, Punshon T, Lanzirrotti A, *et al.* Localization of iron in *Arabidopsis* seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1[J]. *Science*, 2006, **314**(5803): 1295 – 1298. DOI: 10.1126/science.1132563.
- 25 Alstad N E, Skardal L, Hessen D O. The effect of calcium concentration on the calcification of *Daphnia magna*[J]. *Limnology and Oceanography*, 1999, **44**(8): 2011–2017. DOI: 10.4319/LO.1999.44.8.2011.
- 26 Wærvågen S B, Rukke N A, Hessen D O. Calcium content of crustacean zooplankton and its potential role in species distribution[J]. *Freshwater Biology*, 2002, **47**(10): 1866–1878. DOI: 10.1046/J.1365-2427.2002.00934.X.