

外源铁蛋白基因 *NtFer1* 对粳稻生理影响的研究

唐鑫华^{1,2}, 张磊¹, 姜廷波¹, 杨传平¹, 高红秀², 邹德堂^{2*}

(1. 东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学农学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 [目的] 验证铁蛋白基因的功能, 提高转基因粳稻的含铁量和转基因粳稻对盐胁迫和生物胁迫的抗性。[方法] 利用农杆菌介导法将烟草铁蛋白基因 *NtFer1* 导入粳稻基因组。[结果] 对 T₀、T₁ 代卡那霉素抗性植株 PCR、Southern 杂交、Northern 杂交和 RT-PCR 检测分析表明, 外源基因已整合到粳稻基因组中, 并能够稳定遗传表达。转基因粳稻超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和叶绿素相对含量高于对照, 丙二醛(MDA)含量低于对照, 其根、叶片和糙米中铁含量均高于对照。接种稻瘟病菌后转基因植株叶瘟指数低于对照。[结论] 转入外源铁蛋白基因 *NtFer1* 能够提高粳稻的含铁量和转基因粳稻对盐胁迫和生物胁迫的抗性。

关键词 铁蛋白; 转基因; 粳稻; 稻瘟病

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)23-07718-05

Research of Exogenous Ferritin Gene *NtFer1* on Physiological Effects of Japonica

TANG Xin-hua, ZOU De-tang et al (State Key Laboratory of Genetics and Tree Breeding, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040; College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract [Objective] The aim was to verify function of exogenous ferritin gene *NtFer1*, improve the iron content of and resistance to salt stress and stress of transgenic japonica rice. [Method] *NtFer1* gene was transformed into japonica genome by agrobacterium-mediated to investigate its function in plant. [Result] The PCR, Southern blot, Northern blot and RT-PCR tests showed that the exogenous gene had been integrated into the genome and could express in T₀, T₁ generation. The SOD activity and MDA content of transgenic japonica were less than the control, while CAT activity and chlorophyll content were more than the control, iron content in the root, leaves and brown rice of transgenic ones were more than the control. Leaf blast index of transgenic ones was less than the control. [Conclusion] Exogenous ferritin gene *NtFer1* could improve the iron content of and resistance to salt stress and stress of transgenic japonica rice.

Key words Ferritin; Transgenic; Japonica; Rice blast

铁蛋白(Ferritin)广泛存在于生物体中,是由24个同源或异源亚基组成的450 kD复合体,由1个球形蛋白质外壳包裹,铁离子能够在这种复合体中浓缩,每个铁蛋白分子可以储藏0~4 500个可溶的、无毒的、可利用的铁离子,是迄今唯一能够调控铁离子从固相转到液相的蛋白^[1-5]。铁蛋白的一个主要作用是储存铁离子,作为植物体光合作物和固氮的铁源;另一个主要作用是作为胁迫反应蛋白,促进过剩铁离子的储藏^[6-8]。

铁是植物生长发育所必需的元素之一。植物缺铁叶绿素含量减少、叶片黄化,导致植物出现失绿症^[9-10];铁过量时会导致氧化胁迫,催化Fenton反应生成强氧化性的羟自由基,可导致细胞死亡。研究表明将豌豆铁蛋白基因转入水稻,转基因水稻的叶片与非转基因水稻相比对氧化胁迫的耐受能力有不同程度的增强^[11];将大豆铁蛋白基因转入烟草中,转基因烟草的生长量明显高于非转基因烟草株系,叶片中铁含量提高2~3倍,根中铁还原酶提高2倍以上,通过铁贮存能力的提高对除草剂造成的氧化胁迫抗性也有增强^[12];将紫花苜蓿铁蛋白基因转入烟草,获得的转基因烟草对除草剂百草枯引起的氧化胁迫抗性增强^[13]。笔者利用农杆菌介导法将烟草铁蛋白基因转入粳稻中,以验证铁蛋白基因的功能,提高转基因粳稻的含铁量和转基因粳稻对盐胁迫和生物胁迫的抗性。

1 材料与方法

1.1 材料 试验使用的粳稻品种为松粳6(Songjing6),烟草铁蛋白基因 *NtFer1* (GenBank 登录号: AB083924) 由东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室前期研究获得。烟草铁蛋白 *NtFer1* 基因 cDNA 编码区全长 756 bp, 编码 251 氨基酸。

1.2 方法

1.2.1 载体构建与农杆菌培养。 将获得的烟草铁蛋白基因 *NtFer1* cDNA 片段插入植物表达载体 *PBI121* 中替代 GUS 基因,启动子为 CaMV35S,终止子为 NOS,具有卡那霉素抗性,用冻融法将测序确认后的质粒导入农杆菌 EHA105 中。

将含有 *NtFer1* 载体的农杆菌涂布于 LB 固体培养基上(卡那霉素 Km 50 mg/L、利福平 Rif 50 mg/L),27 °C 暗培养至菌斑清晰可见,挑取菌斑至 LB 培养液(Km 50 mg/L、Rif 50 mg/L),27 °C、160 r/min,培养 12~16 h,取 500 μl 上述培养液加入 100 ml YEB 液体培养基中待 OD 值在 0.4~0.5 时,侵染备用。

1.2.2 粳稻转化。 将松粳6的成熟种子脱去外壳,经 75% 乙醇 1 min、HgCl₂ 和 5% NaClO 20 min 消毒处理后无菌水冲洗干净,播入愈伤诱导培养基;14 d 后剥离愈伤组织至愈伤继代培养基;10 d 后转入预培养基,25 °C 暗培养 4 d。

在超净工作台内将愈伤组织浸没于农杆菌 EHA105 菌液中 30 min,并每隔 5 min 晃动 1 次,取出愈伤组织吸干表面菌液于共培养基中,20 °C 暗培养 3 d。经过筛选、分化和生根培养后,将获得的小苗移入气候箱营养液培养,收获种子。将转基因植株的 T₁ 代播种于 MS 培养基(Km 120 mg/L + Fe²⁺ 300 μmol/L),进一步研究生理特性等。

基金项目 国家科技支撑项目(2011BAD16B11);“十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD35B02-01)。

作者简介 唐鑫华(1982-),男,黑龙江佳木斯人,实验师,在读博士,从事水稻遗传育种研究。*通讯作者,教授,博士生导师,从事水稻遗传育种研究。

收稿日期 2014-07-04

愈伤诱导: NMB + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L 6-BA + 1 g/L CH + 600 mg/L L-脯氨酸 + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖, pH 5.8; 愈伤继代: NMB + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 1 g/L CH + 600 mg/L L-脯氨酸 + 7.5 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖, pH 5.8; 预培养和共培养基: NMB + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 1 g/L CH + 600 mg/L L-脯氨酸 + 120 mg/L AS + 7.5 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖, pH 5.8; 筛选培养基 1: NMB + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 1 g/L CH + 600 mg/L L-脯氨酸 + 50 mg/L Km + 500 mg/L Cef + 7.5 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖, pH 5.8; 筛选培养基 2: NMB + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 1 g/L CH + 600 mg/L L-脯氨酸 + 120 mg/L Km + 300 mg/L Cef + 7.5 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖, pH 5.8; 分化培养基: NMB + 2 mg/L 6-BA + 1 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 1 g/L CH + 600 mg/L L-脯氨酸 + 120 mg/L Km + 300 mg/L Cef + 7 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖, pH 5.6; 生根培养基: 1/2 MS + 300 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} + 0.2 mg/L NAA + 120 mg/L Km + 200 mg/L Cef + 6 g/L 琼脂, pH 5.4; 壮苗培养液 1: MS + 300 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} , pH 5.2; 壮苗培养液 2: Ms(N \times 1.5) + 300 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} , pH 5.2。

1.2.3 T_0 代转基因梗稻分子检测。用试剂盒(原平皓, HF224)提取植株叶片总 DNA。应用 Primer Premier 5.0 设计特异引物, *NtFer1-F* (5'-CCA CTA TCC TTC GCA AGA CCC TTC C-3') 和 *NtFer1-R* (5'-CAT CGC AAG ACC GGC AAC AGG ATT C-3'), PCR 反应体积 20 μl , 反应体系: 模板 0.5 μg , 100 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.1 μl , 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.0 μl , 2.5 mmol/L dNTP 2 μl , 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ *Taq* 0.2 μl 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 1% 凝胶电泳分离成像。用 DIG 标记探针试剂盒(Roche)标记烟草铁蛋白基因 *NtFer1* cDNA 为探针, 参照《分子克隆实验指南》方法进行 Southern 杂交。

用 Trizol 法提取叶片总 RNA, 取 30 μg 总 RNA 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 经 1% 甲醛变性胶电泳分离后转移至尼龙膜上 Northern 杂交, 方法同 Southern 杂交。

1.2.4 T_1 代转基因梗稻分子检测分析。用 Trizol 法提取叶片和根部总 RNA, 参照试剂盒(Toyobo, Japan)说明书反转录成 cDNA, 以水稻 *Actin1* 基因为内参基因, 外源基因特异引物为: *NtFer1-RT-F* (5'-AGG AGT TGA TGC TTG TAC CC-3') 和 *NtFer1-RT-R* (5'-TTC TCA GCG TGC TCT CTT TC-3'), 内参基因特异引物为: *Actin1-RT-F* (5'-ATC CTT GTA TGC TAG CGG TCG A-3') 和 *Actin1-RT-R* (5'-ATC CAA CCG GAG GAT AGC ATG-3')。扩增反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 42 个循环; 熔解程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 94 \sim 60 $^{\circ}\text{C}$ 台阶温度 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。PCR 检测同“1.2.3”。

1.2.5 T_1 代转基因梗稻生理指标和叶绿素相对含量测定。经卡那霉素筛选在壮苗培养液 1 中生长 60 d 后测量植株上部鲜活叶片生理指标等。超氧化物歧化酶(SOD)活性用氮蓝四唑光化学还原法测定, 过氧化物酶(POD)活性用愈创木酚法测定, 过氧化氢酶(CAT)活性用紫外吸收法测定, 丙二醛(MDA)含量用硫代巴比妥酸比色法测定, 叶绿素相对含量

利用 SPAD502 叶绿素仪(美能达, Japan)测定。

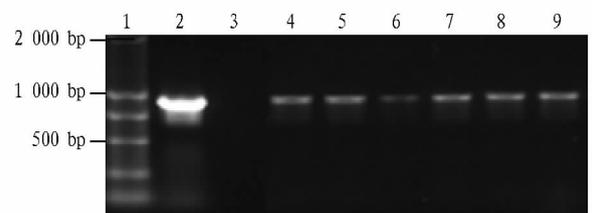
1.2.6 T_1 代转基因梗稻 Fe、Zn 含量测定。根据 Fe、Zn 标准绘制标准曲线, 湿式消解 - 原子吸收法(原子吸收分光光度计 Z-2000, Japan)测定叶片、根和糙米中 Fe、Zn 含量, 重复 3 次, 并计算样品加标回收率。

1.2.7 T_1 代转基因梗稻稻瘟病抗性分析。采集黑龙江省水稻主产区 2010 ~ 2012 年稻瘟病样本, 分离 62 个单孢菌株高粱培养基培养, 待生成大量分生孢子时将菌体悬浮液调成浓度 2×10^5 孢子/ml, 每个菌株悬浮液取 10 ml 加入 0.02% Tween20 混匀, 喷雾器均匀喷洒三叶一心幼苗, 27 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 90%, 暗培养 24 h, 然后保持 27 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 90%, 光照 12 h/d, 8、10 和 12 d 调查叶瘟级别, 叶瘟级别按国际水稻所稻瘟病抗性评价分级标准, 根据病情指数公式计算病情指数^[14-15], 计算公式如下:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum \text{各级发病数} \times \text{相应级数}}{\text{调查总数} \times \text{最高级数}} \times 100$$

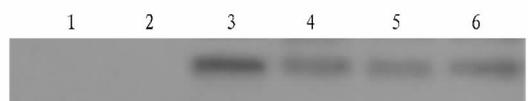
2 结果与分析

2.1 T_0 代转基因梗稻的分子检测 为了从分子水平上证明烟草铁蛋白 *NtFer1* 基因 cDNA 是否整合到松梗 6 基因组中, 对卡那霉素抗性植株进行 PCR 检测, 结果表明卡那霉素抗性植株和阳性对照质粒均在 750 bp 处扩增出目的条带, 而阴性对照的非转基因植株则无扩增条带出现(图 1), 初步证明外源基因整合到松梗 6 基因组中。从扩增出目的条带的转基因植株中选出 3 株长势较好的植株, 进行 Southern blot 检测, 转基因株系均能与探针杂交出条带(图 2), 进一步证明外源基因已整合到松梗 6 基因组中; 分离总 RNA 进行 Northern blot 检测, 分析表明在转基因植株中均检测到了相应的外源基因 *NtFer1* 表达的 mRNA 信号(图 3), 说明外源基因 *NtFer1* 已在转录水平表达。



注: 1. Marker 2000; 2. 阳性对照; 3. 非转基因对照; 4 ~ 9. 转基因植株。

图 1 T_0 代转基因植株 PCR 电泳图谱



注: 1. Marker 2000; 2. 非转基因对照; 3. 阳性对照; 4 ~ 6. 转基因植株。

图 2 T_0 代转基因植株 Southern 杂交

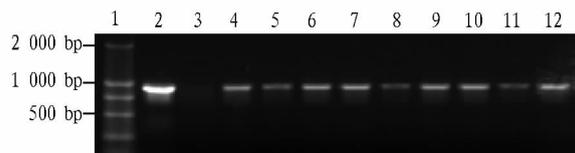
2.2 T_1 代转基因梗稻分子检测 T_1 代转基因梗稻 Nt1、Nt2 和 Nt3 3 个株系 PCR 检测, 结果表明卡那霉素抗性植株和阳性对照质粒均在 750 bp 处扩增出目的条带, 而非转基因对照植株则无扩增条带出现(图 4), 证明外源基因在转基因植株



注:1. 非转基因对照;2~4. 转基因植株。

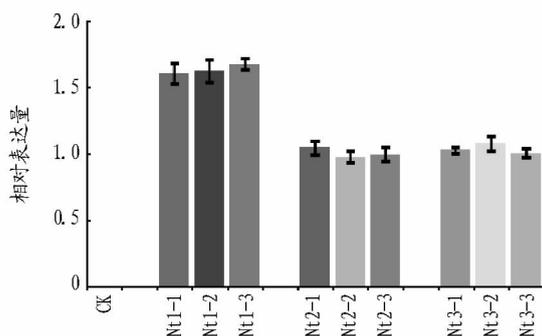
图3 T₀代转基因植株 Northern 杂交

中稳定遗传;RT-PCR 检测表明,烟草铁蛋白 *NtFer1* 基因在 Nt1、Nt2 和 Nt3 3 个株系均有表达,且相同株系植株相对表达量无显著差异,而非转基因对照株系则无表达(图5)。



注:1. Marker2000;2. 阳性对照;3. 非转基因对照;4~6. 转基因株系 Nt1;7~9. 转基因株系 Nt2;10~12. 转基因株系 Nt3。

图4 T₁代转基因植株 PCR 电泳图谱



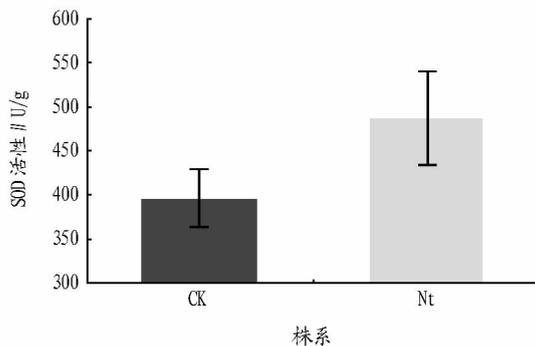
注:CK. 非转基因对照;Nt1、Nt2、Nt3. 转基因株系。

图5 RT-PCR 检测分析

2.3 T₁代转基因粳稻生理指标和叶绿素相对含量分析 SOD、CAT 和 POD 在植物抗氧化胁迫中具有清除氧自由基和维持活性氧代谢平衡的功能,具有防止质膜过氧化的功能^[16-19]。植物器官衰老或在逆境下遭受伤害,往往发生膜脂过氧化作用,MDA 是膜脂过氧化的最终分解产物,其含量可以反映植物遭受逆境伤害的程度。在转基因株系中 SOD 活性、CAT 活性显著高于非转基因对照 22.9%、12.2% (图6、7),POD 活性亦高于对照,但差异不显著。转基因株系 MDA 含量低于对照 11.3%,且差异显著(图8)。上述差异表明,转入的外源铁蛋白基因 *NtFer1* 的表达能够提高转基因植株的抗氧化酶活性从而降低或抑制质膜过氧化水平。

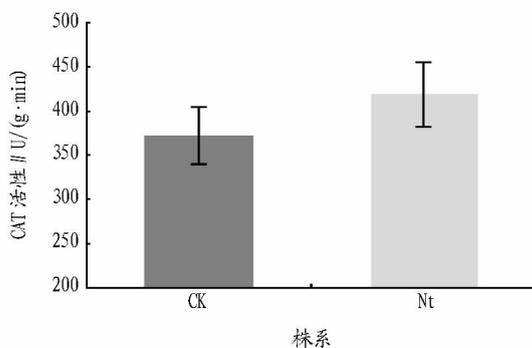
叶绿素是绿色植物进行光合作用的基础物质,是植物叶片的主要光合色素,研究表明^[20-22],叶片叶绿素含量与叶绿素仪所测定的 SPAD 值有良好的一致性。叶绿素相对含量转基因株系高于对照 15.6%,且差异显著(图9)。

2.4 T₁代转基因粳稻 Fe、Zn 含量 Fe、Zn 标准曲线(图10)、加标回收率和相对标准偏差(表1)符合试验要求。转基因植株根部 Fe 含量高于非转基因对照 11.0%,叶片 Fe 含量高于对照 32.6%,糙米 Fe 含量高于对照 18.7%(图11)。在转基因和非转基因对照植株根部 Fe-Zn 含量呈显著正相关;而叶片和糙米中 Fe-Zn 含量呈显著负相关,转基因植株



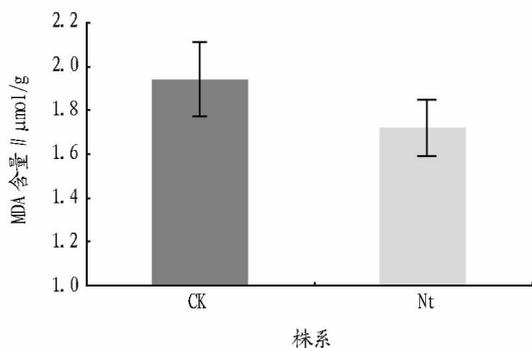
注:CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

图6 SOD 活性



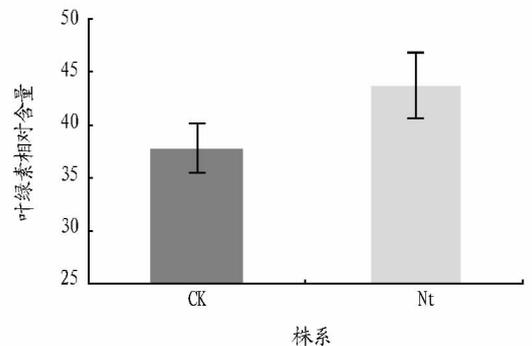
注:CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

图7 CAT 活性



注:CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

图8 MDA 含量



注:CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

图9 叶绿素相对含量

的 Fe-Zn 负相关系数低于对照(表2)。表明转入外源铁蛋白基因能够提高转基因植株组织和器官中 Fe 含量,同时降低

Fe-Zn 拮抗程度,有利于营养元素的吸收与利用。

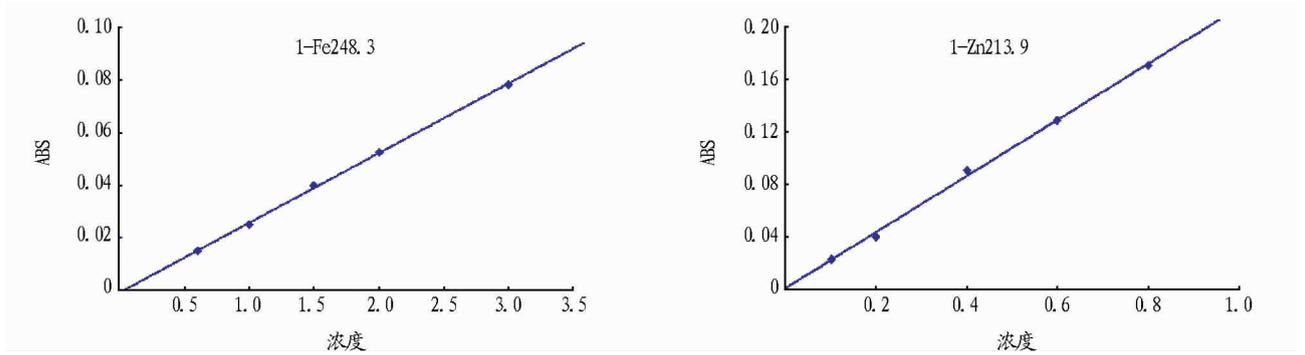
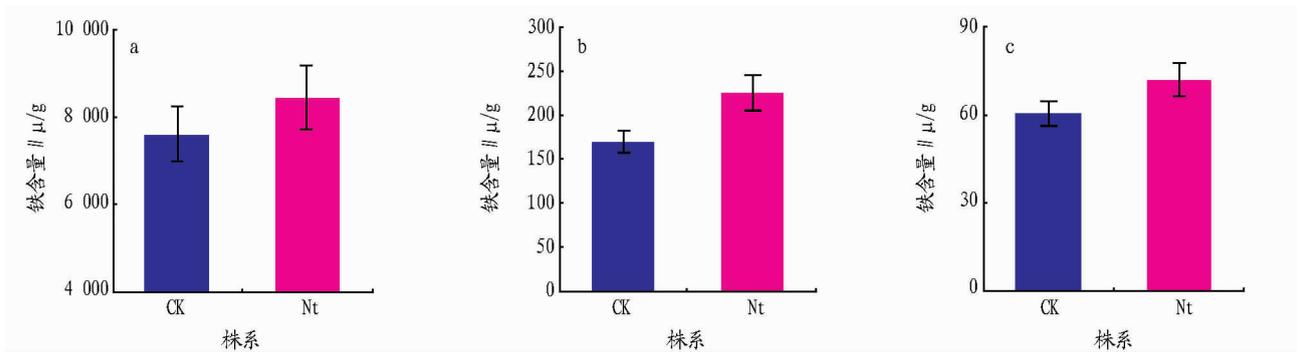


图 10 Fe、Zn 标准曲线

元素	回收率	RSD
Fe	94.3 ~ 97.6	2.13
Zn	94.7 ~ 98.3	1.78

株系	根	Fe-Zn 含量关系	
		叶片	糙米
CK	0.243 *	-0.759 *	-0.81 *
Nt	0.583 *	-0.338 *	-0.720 *



注:a. 根部;b. 叶片;c. 糙米;CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

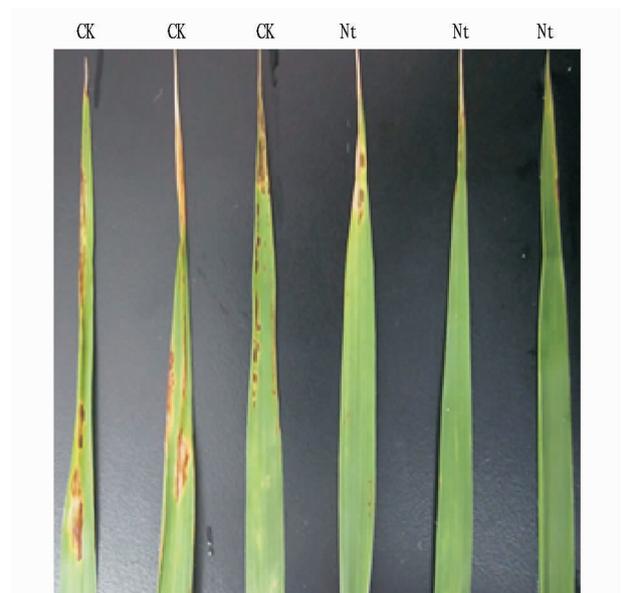
图 11 铁含量

2.5 稻瘟病抗性分析 转基因植株的叶片在 8、10 和 12 d 稻瘟病病斑数量少于非转基因对照,面积小于非转基因对照(图 12),叶瘟病情指数低于非转基因对照 14.4% ~ 15.9% 且差异显著(图 13)。

3 结论与讨论

通过对转基因植株和对照的比较分析,表明转入外源铁蛋白基因 *NtFer1* 能够提高粳稻的根、叶片和糙米中铁离子含量,同时提高了转基因植株 SOD、CAT 活性和叶绿素相对含量,MDA 含量则相反,能够抑制稻瘟病菌对叶片的伤害。

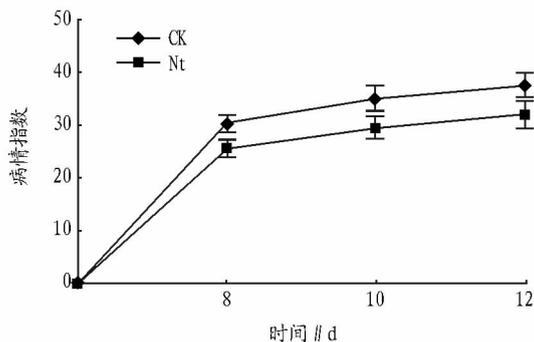
转入外源铁蛋白基因 *NtFer1* 通过提高铁蛋白的表达量,从而增加植物体内组织和器官贮藏铁离子的能力,增加了铁含量。过氧化氢酶(CAT)是以铁卟啉为辅基的结合酶;叶绿素的合成必须有铁的存在,铁是合成叶绿素中卟啉环的前体物质^[23]。叶片铁含量的增加可以促进 CAT 和叶绿素的合成。Zn 是 SOD 辅基的一种组成成分,在 Fe 过量的情况下 Fe-Zn 呈负相关,而转基因植株的负相关系数低于对照,其 Zn 含量高于对照,故转基因植株 SOD 活性高于对照。SOD 和 CAT 活性的提高,加速了植物体内 O_2^- 、 H_2O_2 、 $HO\cdot$ 的分解清除能力,降低质膜氧化作用,抑制 MDA 含量上升。铁蛋



注:CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

图 12 叶片病情比较

白作为一种胁迫反应蛋白,当叶片受到稻瘟病菌侵染铁蛋



注:CK. 非转基因对照;Nt. 转基因植株。

图13 叶片病情指数

白释放出贮藏的铁离子,产生 Fenton 反应生成具有强氧化力的羟自由基($\cdot\text{OH}$)以达到抑制病菌生长的目的^[7,24],有助于提高作物抗性从而增加产量。

在该试验中转基因植株和对照根部铁含量高于叶片的30~40倍,高于糙米的80~120倍,根部能够吸收和聚集大量的铁离子保障对其他组织和器官的供给,但叶片和糙米的铁含量远低于根部,其原因可能有三方面:一是粳稻对铁离子的转运能力不高造成;二是植株其他组织和器官自身调节和保护机制避免过量铁离子的富集对其毒害;三是受组织和器官中铁离子贮藏能力限制。虽然转入的外源铁蛋白基因 *NtFer1* 能够提高植株铁离子的贮藏能力,但这种提高程度依然受到植物体固有的机能制约和调控。

参考文献

- [1] HARRISON S C, AROSIO P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996, 1275: 161-203.
- [2] FERREIRA F, BUCCHINI D, MARTIN M E, et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(30): 21-24.
- [3] MARSCHNER H. 高等植物的矿质营养[M]. 曹一平, 陆景陵, 等, 译. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 308.
- [4] CLARKSON T, SANDERSON J. Sites of absorption and translocation of iron in barley roots, Tracer and microautoradiograph studies [J]. *Plant Physiol*, 1978, 61: 731-736.

- [5] CHANEY R L, BROWN J C, TIFFIN L O. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans [J]. *Plant Physiol*, 1972, 50: 208-213.
- [6] HARRISON P M, AROSIO P. The Ferritin: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275: 161-203.
- [7] JIANG T B. Isolation and Expression Pattern Analysis of Two Ferritin Genes in Tobacco [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(4): 477-486.
- [8] JIANG T B, DING B J, LI F J, et al. Differential expression of endogenous ferritin genes and iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing soybean ferritin gene [J]. *Acta Gene Sin*, 2006, 33: 1120-1126.
- [9] ZHOU H J, KORCAK R F, WERGIN W P. Cellular ultrastructure and net photosynthesis of apple seedlings, under iron stress [J]. *J Plant Nutr*, 1984, 7(6): 911-928.
- [10] 郭世伟, 邹春琴, 江荣凤, 等. 提高植物体内铁再利用效率的研究现状及进展 [J]. *中国农业大学学报*, 2000, 5(3): 80-86.
- [11] 叶霞, 黄晓德, 陶建敏, 等. 转基因苹果组培苗铁蛋白基因在转录水平上的表达 [J]. *果树学报*, 2006, 23(4): 491-494.
- [12] VAN WUYTSWINKEL O, VANSUYT G, GRIGNON N, et al. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin [J]. *The Plant Journal*, 1999, 17(1): 93-97.
- [13] DEAK M, HORVATH G V, DAVLETOV A S. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens [J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(2): 192-196.
- [14] 张俊华, 孙洪利, 刘杨大川, 等. 黑龙江省稻瘟病菌生理小种鉴定 [J]. *植物保护*, 2009, 35(3): 137-140.
- [15] 宋成艳. 黑龙江省水稻新品种(系)抗稻瘟病性鉴定及利用 [J]. *植物保护*, 2011, 37(4): 142-145.
- [16] 马旭俊, 朱大海. 植物超氧化物歧化酶(SOD)的研究进展 [J]. *遗传*, 2003, 25(2): 225-231.
- [17] 蒋选利, 李振波, 康振生. 过氧化物酶与植物抗病性研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2001, 29(6): 124-129.
- [18] 刘冰, 梁娟娟. 生物过氧化氢酶研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2005(5): 223-232.
- [19] 龚双姣, 马陶武, 姜业芳, 等. 镉胁迫下3种藜类植物抗氧化酶活性变化的比较研究 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(9): 1765-1771.
- [20] 薛香, 吴玉娥. 小麦叶片叶绿素含量测定及其与 SPAD 值的关系 [J]. *湖北农业科学*, 2010(11): 2701-2704.
- [21] 艾天成, 李方敏, 周治安. 作物叶片叶绿素含量与 SPAD 值相关性研究 [J]. *湖北农学院学报*, 2000(1): 6-8.
- [22] 王娟, 韩登武, 任岗, 等. SPAD 值与棉花叶绿素和含氮量关系的研究 [J]. *新疆农业科学*, 2006, 43(3): 167-170.
- [23] 刘群良. 生物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 18.
- [24] THEIL E C. Ferritin structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms [J]. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 289-315.

(上接第7701页)

- [3] 陈维伦, 郭车红. 枸杞叶片愈伤组织的诱导及植株再生 [J]. *植物生理学报*, 1980(6): 40-41.
- [4] 牛德水, 邵启全, 王莉. 枸杞下胚轴、茎段和幼嫩子房的愈伤组织及其植株再生 [J]. *科学通报*, 1985(4): 96-98.
- [5] 牛德水, 邵启全, 秦金山, 等. 枸杞细胞系的建立及单细胞培养再生植株 [J]. *遗传*, 1983, 5(6): 24-26.
- [6] CAO Y L, LUO Q, ZHANG X Y. Effects of Different Culture Conditions on Vitrification of *Lycium barbarum* L. Plantlets in Tissue Culture [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(2): 30-32, 115.
- [7] 张新宁, 沈效东, 王锦秀. 枸杞四倍体同二倍体杂交育种的形态分析及解决方法 [J]. *宁夏农林科技*, 1992(1): 30-32.
- [8] 王莉, 陈素萍, 秦金山, 等. 枸杞胚乳植株的诱导和它的倍性水平 [J]. *植物学报*, 1985, 12(6): 440-444.
- [9] 樊映汉, 臧淑英, 赵敬, 等. 两种枸杞植物花药培养单倍体的诱导 [M]//白寿宁. 宁夏枸杞研究. 银川: 宁夏人民出版社, 1998: 89-92.
- [10] 钟生元, 王燕, 王锦秀. 无籽枸杞选育初报 [J]. *宁夏农林科技*, 1993(3): 15-17.
- [11] 张国柱, 王仓山. 植物体细胞胚发生的同步控制 [J]. *兰州大学学报: 自然科学版*, 1994, 30(4): 88-91.
- [12] RATUSHNGAK Y, RINDS V A, PIVEN N. Regeneration of *Lycium barba-*

- rum* L. plants from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts [J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 9(2): 84-87.
- [13] 冯连杰. 工厂化育苗好处多 [N]. *山东科技报*, 2008-07-01.
- [14] 蔡能. 改善植物大规模组织培养条件的研究进展 [J]. *植物学通报*, 2003, 20(6): 745-751.
- [15] KOZAI T, KOYAMA Y, WATANABE I. Multiplication of potato plantlets in vitro with sugar free medium under high photosynthetic photon flux [J]. *Acta Hort*, 1988, 230: 121-127.
- [16] 徐志刚, 丁为民, 崔瑾, 等. 组培室补光光源应用分析与评价 [J]. *农业机械学报*, 2001, 32(5): 62-64.
- [17] 梁称福. 植物组织培养研究进展与应用概况 [J]. *经济林研究*, 2005, 23(4): 99-105.
- [18] 廖晴, 玛尔哈巴, 沙红, 等. 枸杞优选优株快繁体系的建立及优质种苗繁殖技术研究 [J]. *新疆农业科学*, 2011, 48(1): 35-38.
- [19] 王立英, 李健, 王锦秀, 等. 无籽枸杞新品种“99-3”工厂化生产快繁技术研究 [J]. *宁夏科技*, 2001(4): 35.
- [20] 赵有生, 于海业. 国外工厂化育苗现状及启示 [J]. *世界农业*, 2009(12): 47-48.
- [21] 唐晓杰, 孙萍, 马德宝. 枸杞组织培养快速繁殖技术 [J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2011, 1(2): 204-207.