

转金属硫蛋白基因 (MT_1) 烟草耐 NaCl 胁迫能力

周博如, 王 雷, 吴丽丽, 姜廷波*

(东北林业大学, 林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: 为明确柽柳 (*Tamarix* sp.) 金属硫蛋白 (MT_1) 基因过量表达对提高植物耐 NaCl 能力的作用, 对转 MT_1 烟草进行分子检测和生理特性分析, 结果表明具有卡那霉素抗性的转基因植株经 RT-PCR Southern 杂交均表现为阳性, 说明外源 MT_1 基因已整合到烟草基因组, 并且得到了表达。金属硫蛋白基因的过量表达提高了转基因烟草植株的耐 NaCl 能力, 表现为在含有 150 mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上, 转基因植株的株高和鲜重均明显优于非转基因株系; 在生理性状上表现为转基因植株丙二醛 (MDA) 含量明显低于非转基因株系, 而超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性比非转基因株系明显增加。

关键词: 烟草; 柽柳; 金属硫蛋白; 耐盐; 转基因

Characterization of transgenic tobacco overexpressing metallothionein gene (MT_1) on NaCl stress

ZHOU Boru, WANG Lei, WU Lili, JIANG Tingbo*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Saline-alkali stress is one of the important environmental factors that affect plant growth and development. Due to the development of irrigated agriculture and fertilizer misuse, soil salinization and secondary salinization have become main constraints for sustainable development of agricultural production. Metallothionein genes, which can be induced by environmental stresses such as saline-alkali, are resilience-related genes. Metallothionein genes are the most abundantly expressed in *Tamarix* sp. under the NaHCO_3 stress. We studied the relationship of a metallothionein gene (MT_1) overexpression in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and plant tolerance to NaCl stress. The cDNA fragment encoding metallothionein was directionally cloned into the *Xba*-*Sac* I GUS cassette in the pBI121 binary vector. The *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter/-nopal synthase terminator system and kanamycin resistant gene *NPT II* (neomycin phosphotransferase II) were used for these constitutive expression systems. The plasmid was then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* (strain EHA105) by electroporation. Tobacco primary transformants were produced by leaf disc transformation. We then performed molecular detection and physiological analysis of the transgenic tobacco plants. Results have shown that the transgenic plants with ampicillin resistance have a positive band in RT-PCR Southern hybridization analysis, indicating that MT_1 gene is integrated into the tobacco genome, and this gene expresses under the control of the 35S promoter. Compared to the non-transgenic tobacco plants of the same stage (control) challenged with 150 mmol/L and 300 mmol/L of NaCl in MS media, the transgenic plants showed significant increases in plant height and fresh weight over 50%. In addition, transgenic tobacco plants had higher SOD and POD activity, but lower MDA accumulation than the control. These results demonstrate that exogenous metallothionein expression increases the capability of active oxygen cleaning up. Therefore, transgenic tobacco plants can increase tobacco tolerance to NaCl stress.

7 基金项目: 黑龙江省重大科技攻关资助项目 (GA09B201-4); 国家重点基础研究发展计划资助项目 (2009CB125906)

收稿日期: 2009-10-09; 修订日期: 2010-03-22

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tbjiang@yahoo.com

Key Words: tobacco; *Tamarix* sp.; methallothionein; salt-tolerance; genetic transformation

盐碱胁迫是影响植物生长发育的重要胁迫因素之一,由于灌溉农业的发展和化肥使用不当,土壤盐碱化和次生盐碱化现象进一步加剧,已经成为灌溉农业可持续发展的制约因素。当前,研究植物耐盐碱胁迫的分子机制,寻找提高植物耐盐碱的方法成为生命科学研究热点之一。植物金属硫蛋白(MTs)是一类富含半胱氨酸(Cys)、具有金属结合能力的低分子量蛋白质,在小麦、拟南芥、大豆、番茄及羊茅等植物中陆续发现和克隆了编码该类蛋白质的基因^[1-5]。金属离子、损伤、病毒侵染、热击等都可以诱导植物体内金属硫蛋白基因的表达及金属硫蛋白的积累^[6]。转 *MT* 基因植物增强了耐 Cd、Pb、Zn 等重金属离子胁迫的能力^[7-8]。柽柳是抗干旱、耐盐碱能力极强的沙漠植物,在 NaHCO₃ 胁迫下表达量最多的基因是金属硫蛋白基因^[9]。为明确金属硫蛋白基因过量表达对提高植物耐 NaCl 胁迫能力的作用,本研究利用农杆菌介导法将来自柽柳的金属硫蛋白基因(*MT*₁)转入烟草,并对其耐 NaCl 能力和抗性生理进行了分析,为利用金属硫蛋白基因改良植物新品种提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

柽柳(*Tamarix* sp.)金属硫蛋白基因(*MT*₁)由本实验室根据前期研究获得的 cDNA 序列(GenBank 登陆号:AB298390)克隆获得。将柽柳(*Tamarix* sp.)金属硫蛋白基因(*MT*₁)插入到植物表达载体 pBI121,取代花椰菜病毒 35S 启动子下游的 *gus* 基因。利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法,将 *MT*₁ 导入到烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR-1)基因组。以非转基因株系 SR-1 为对照,选择 4 个对卡那霉素抗性呈 3:1 分离、PCR 和 PCR-Southern 检测为阳性的转基因株系 T-1、T-2、T-3、T-4 为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 PCR-Southern 分析

用 Trizol Reagent(Invitrogen)提取烟草总 RNA^[10]。根据 *MT*₁ 的 cDNA 序列设计引物 ccatgtcgggcaagtgcg 和 gctgctcagtttcagtga,用于 RT-PCR 反应。用 One step RNA PCR Kit(Takara,大连)进行 RT-PCR 扩增,反应体系为:总 1 μg,10 μmol/L 的正向和反向引物各 1 μL,RNA 酶抑制剂 20U,10 × Buffer 2 μL,25mmol/L 的 MgCl₂ 4 μL,10 mmol/L 的 dNTP 2 μL,MAV 反转录酶 2 U。反应条件:反转录反应,50℃ 30 min,预变性 94℃ 2 min,94℃ 30 s,48℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;延伸 72℃ 7 min。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳分离后转至尼龙膜上,用上述进行 RT-PCR 的引物及 PCR DIG 探针合成试剂盒(Roche 公司)标记相应的 cDNA 为探针,按照 Engler-Blum^[11] 描述的方法进行 Southern 杂交,检测尼龙膜上的 PCR 产物。

1.2.2 转基因烟草耐 NaCl 胁迫分析

将转基因烟草株系播种到含 100 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上,非转基因烟草播种到不含卡那霉素的 MS 培养基上,在(26 ± 1)℃,16 h 光照/8 h 黑暗条件下生长。1 个月后转基因烟草种苗表现出抗感分离,将转基因种苗中的抗卡那霉素植株和对照植株移栽到含 150 mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上,每个株系 6 株重复。移栽 2 个月后测量植株的株高和鲜重。

1.2.3 转基因烟草 SOD、POD 活性及叶绿素和 MDA 含量的测定

采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定 SOD 活性^[12],用愈创木酚法测定 POD 活性^[13],用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量^[14]。利用 SPAD-502 叶绿素仪(Minolta,Japan)测定叶绿素的相对含量。

2 结果分析

2.1 转基因烟草的 RT-PCR 和 PCR-Southern 检测

对 4 个卡那霉素抗性株系的 T₁ 代植株及非转基因植株进行 RT-PCR 检测结果表明(图 1),卡那霉素抗性植株均扩增出与目的片段大小一致的产物,而阴性对照的非转基因植株则无类似的 PCR 产物出现。为进一步明确扩增产物是否为目的基因片段,将电泳分离的 PCR 产物通过 Southern 印记转移到尼龙膜上,进行 PCR-

Southern 杂交,结果表明 PCR 扩增得到的特异片段的确是目的基因的扩增产物,证明外源基因已整合到烟草基因组中,并通过种子遗传到了下一代。

2.2 转基因烟草耐 NaCl 胁迫分析

将转基因株系 T₁-1—T₁-4 的种子在含卡那霉素的 MS 培养基选择培养 1 个月后,与在普通 MS 培养基中生长的非转基因幼苗一起移栽到含 NaCl 150mmol/L 和 300 mmol/L 的 MS 培养基上。生长 2 个月后,测量植株的鲜重和株高。比较转基因烟草和非转基因烟草的鲜重和株高发现,转基因烟草和非转基因烟草在 NaCl 胁迫下的生长发育均受到明显的抑制,但转基因烟草的生长明显好于非转基因烟草(图 2)。在 NaCl 150mmol/L 条件下转基因烟草株高和鲜重分别比对照高 67.8%—89.3% 和 14.3%—46.8%,在 NaCl 300mmol/L 条件下转基因烟草株高和鲜重分别比对照高 51.6%—76.6% 和 50.9%—133.7%,差异达到了极显著水平($P < 0.01$)。

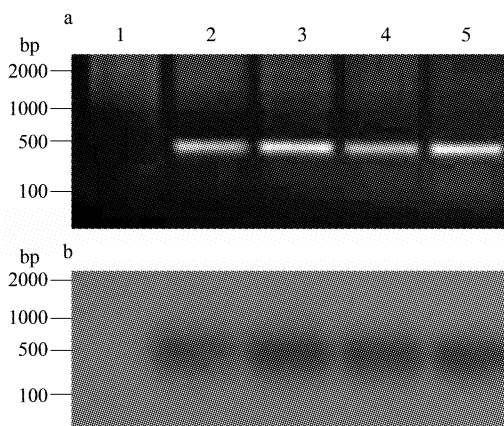


图 1 转基因烟草的 RT-PCR (a) 和 PCR-Southern (b) 杂交检测
Fig. 1 RT-PCR (a) and Southern blot analysis (b) of transgenic tobacco plants

1, 非转基因对照; 2—5, 分别为转基因株系 T₁-1、T₁-2、T₁-3 和 T₁-4

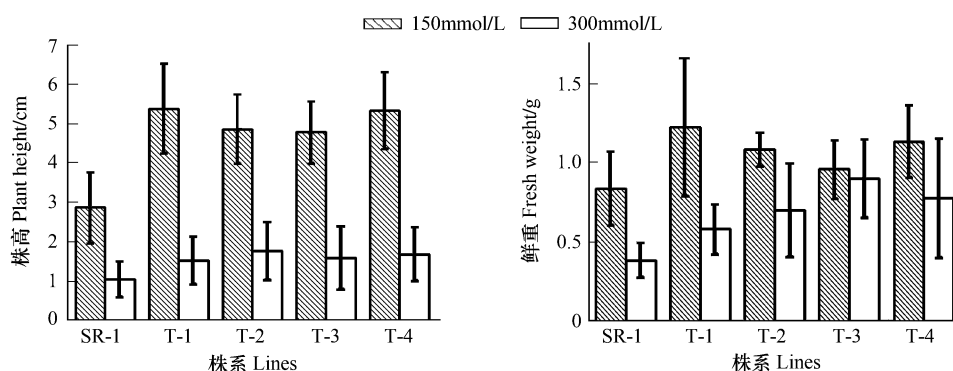


图 2 转基因植株与非转基因植株株高和鲜重的比较

Fig. 2 Comparison of plant height and fresh weight between transgenic tobacco and non-transformants

1, 非转基因对照; 2—5, 分别为转基因株系 T₁-1、T₁-2、T₁-3 和 T₁-4

2.3 转基因烟草叶绿素含量、MDA 含量、SOD 活性和 POD 活性变化

叶绿素含量可以反映植物进行光合作用、合成碳水化合物的潜力,也是衡量植物在盐胁迫下耐盐性的重要生理指标之一。比较非转基因烟草在 150mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 下的叶绿素含量可以发现,生长在 150mmol/L NaCl 培养基中烟草叶绿素含量比生长在 300 mmol/L NaCl 培养基中烟草的叶绿素含量高 2.4 倍(图 3)。比较在相同 NaCl 浓度培养基中生长的转基因烟草和非转基因烟草的叶绿素含量,可以发现转基因烟草叶绿素含量与非转基因之间无明显差异,但具有增加的趋势,这种趋势在 300 mmol/L NaCl 条件下较 150mmol/L NaCl 条件更为明显,并且差异达到了显著水平($P < 0.05$)。

在干旱和盐害等逆境条件下,植物细胞中的活性氧可诱导脂质中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,造成生物膜的破坏^[15]。脂质过氧化作用的最终产物之一是丙二醛(malondialdehyde, MDA),其含量可作为细胞膜脂质过氧化作用强弱和质膜被破坏程度的指标^[16]。比较在 150mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 培养基中生长各烟草株系 MDA 含量变化可以发现,转 MT₁ 基因烟草株系 MDA 含量明显低于非转基因株系(图 4)。说明金属硫蛋白大量表达可以降低植物膜脂的过氧化作用,保护植物的细胞膜系统。

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 在植物抗氧化胁迫中具有清除氧自由基、维持活性氧代谢平衡的功能,是防止质膜过氧化,保护膜系统的关键酶^[17-18]。比较在 150mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 培养基中生长的各烟草株系 SOD 和 POD 活性(图 5),可以发现 NaCl 对 SOD 有明显的诱导作用,SOD 活性随 NaCl 浓度的增加而增加;而 NaCl 对 POD 有明显的抑制作用,其活性随 NaCl 浓度的增加而降低。但在相同 NaCl 浓度的培养基上,转基因烟草株系的 SOD 和 POD 活性均比非转基因株系明显提高,差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$; 图 5)。说明 MT 基因的大量表达提高了转基因烟草细胞内 SOD 和 POD 活性,增强了转基因烟草清除活性氧的能力。

3 讨论

盐胁迫可对植物产生多种伤害:包括渗透胁迫、离子胁迫和氧化胁迫等。植物耐盐应答包括诱导相容性物质的生成、调节离子的吸收、改变光合作途径、水分子通道蛋白及抗氧化防御系统^[19-20]。转 P5CSF 129A 基因冰草提高了脯氨酸的合成和积累能力,使转基因植株耐盐能力明显增强^[21]。郭岩等^[22]利用甜菜碱醛脱氢酶 (BADH) 基因转化水稻,提高了转基因水稻的耐盐性能。董云洲和王雪艳^[23]将肌醇甲基转移酶 (Imtl) 基因导入烟草,转基因植株的耐盐能力明显提高,株高、单株鲜重、生长势等指标具有显著优势。由此可以看出植物抗盐胁迫的响应是一种综合的多方面的生理反应,也反映出植物耐盐性是多基因共同作用的结果。本研究基于金属硫蛋白基因是柞柳对逆境胁迫的重要应答基因,盐胁迫下诱导表达量最多的基因是金属硫蛋白 (MT) 基因^[9]。说明金属硫蛋白的富集在提高柞柳耐盐胁迫能力方面起着重要作用。植物金属硫蛋白中丰富的巯基可能具有重要抗氧化作用,对植物的光合系统和抗氧化系统起到了保护作用。

植物在逆境胁迫条件下会产生大量的活性氧,可导致生物膜中脂质的过氧化或脱脂化,特别是对胁迫条件敏感的磷脂和脂肪酸受损,破坏生物膜上酶的空间结构及生物膜的通透性,致使细胞死亡^[15,24-25]。植物中的 SOD 和 POD 等多种抗氧化的酶类和抗氧化化合物可以清除植物体内的活性氧,植物在逆境条件下受伤害的程度及植物对逆境的抵抗能力与其体内的 SOD、POD 活性有关,其活性越高,植物的抗逆性越强^[26]。转柞柳金属硫蛋白基因株系在 NaCl 胁迫下的生长情况及有关抗氧化酶活性明显好于非转基因植株,说明转基因株系的抗氧化系统明显优于对照株系。Strogonov 等^[27]以几种非盐生植物为材料研究表明,盐分胁迫可以显著增加叶绿素含量。还有研究认为盐胁迫可使叶绿素含量降低^[28-30]。本研究表明,在 NaCl 胁迫条件下,NaCl 浓度越高烟草的叶绿素含量越低。而在相同 NaCl 浓度胁迫下,柞柳金属硫蛋白基因过量表达可使叶绿

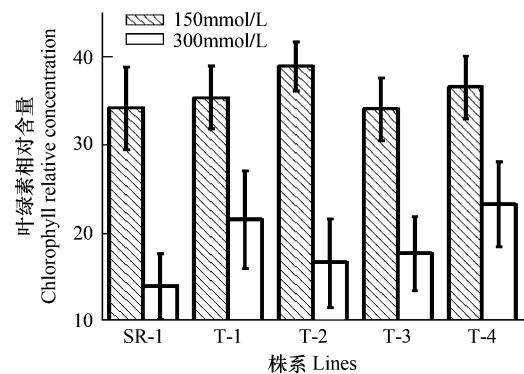


图3 转基因烟草株系与非转基因烟草株系间叶绿素含量的比较
Fig. 3 Comparison of chlorophyll concentration among transgenic tobacco lines and non-transformants

1, 非转基因对照; 2—5, 分别为转基因株系 T₁-1、T₁-2、T₁-3 和 T₁-4

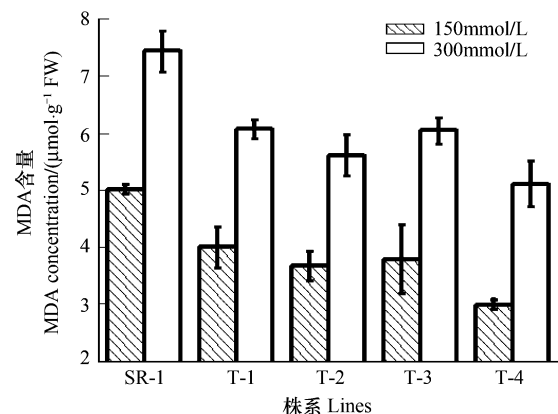


图4 转基因烟草株系与非转基因烟草株系间 MDA 含量的比较
Fig. 4 Comparison of MDA concentration among transgenic tobacco lines and non-transformants

1, 非转基因对照; 2—5, 分别为转基因株系 T₁-1、T₁-2、T₁-3 和 T₁-4

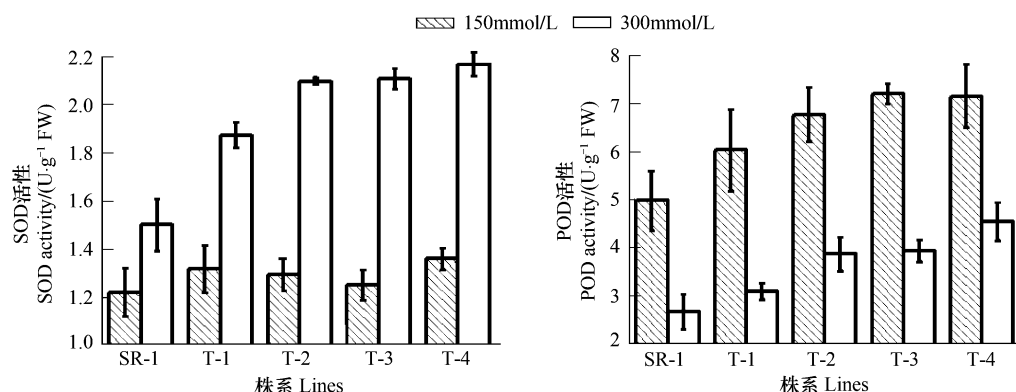


图5 转基因株系与非转基因株系间 SOD 和 POD 活性比较

Fig. 5 Comparison of SOD and POD activity among transgenic tobacco lines and non-transformants

1, 非转基因对照; 2—5, 分别为转基因株系 T₁-1、T₁-2、T₁-3 和 T₁-4

素含量一定程度的增加。说明柃柳金属硫蛋白基因在植物中大量表达可明显提高植物的叶绿素含量。柃柳金属硫蛋白基因在烟草中表达提高了烟草的耐盐性能,但高盐胁迫对植物生长发育的影响是非常复杂的。盐生植物之所以能在长期干旱和盐渍的环境中正常生长,是多种耐盐机制综合作用的结果。金属硫蛋白增强了烟草耐盐胁迫的能力也可能与烟草植株自身抗性机制的协同作用有关。对转基因烟草生理代谢、细胞结构和根系形态发生的深入研究,将有助于揭示金属硫蛋白积累在植物中的作用及其与烟草植株耐盐的关系。

References:

- [1] Lane B, Kajoika R, Kennedy T. The wheat-germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochemistry and Cell Biology*, 1987, 65: 1001-1005.
- [2] Kawashima I, Inokuchi Y, Chino M, Kimura M, Shimizu N. Isolation of a gene for a metallothionein protein from soybean. *Plant and Cell Physiology*, 1991, 32: 913-916.
- [3] Murphy A, Zhou J, Goldsbrough P B, Taiz L. Purification and immunological identification of metallothionein 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 1997, 113: 1293-1301.
- [4] Giritch A, Ganai M, Stephan U W, Baumlein H. Structure, expression and chromosomal localization of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37: 701-714.
- [5] Ma M, Lau P S, Jia Y T, Tsang W K, Lam S K S, Tam N F Y, Wong Y S. The isolation and characterization of type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Science*, 2003, 164: 51-60.
- [6] Jiang X Y, Zhao K F. Mechanism of heavy metal injury and resistance of plants. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, 7 (1): 92-99.
- [7] de Borne F D, Elmayan T, de Roton C, de Hys L, Tepfer M. Cadmium partitioning in transgenic tobacco plants expressing a mammalian metallothionein gene. *Molecular Breeding*, 1998, 4: 83-90.
- [8] Li W, Zhang J, Zhang X Y, Shan L, Ru B G. Pb Tolerance and accumulation of petunia transformed by metallothionein recombinant $\alpha\alpha$ gene. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28(3): 405-409.
- [9] Wang Y C, Yang C P, Liu G F, Jiang J, Wu J H. Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of *Tamarix androssowii*. *Plant Science*, 2006, 170: 28-36.
- [10] Chomczynski N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159
- [11] Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Müller G A. Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Analytical Biochemistry*, 1993, 210(2): 235-244.
- [12] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I: Occurrence in higher plant. *Plant Physiology*, 1977, 59: 309-314
- [13] Mead J F. Free radical mechanism of lipid damage, a consequence for cellular membranes//Proyoy W A ed. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press, 1976: 185-210

- [14] Hao J J, Liu Y J. Plant Physiology Experimental Technique. Shenyang: Liaoning Agricultural Science and Technology Press, 2001: 71-73, 144-145, 180-181.
- [15] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). The Journal of Biological Chemistry, 1969, 244: 6049-6055
- [16] Fridovich I. Superoxide dismutase. Annual Review of Biochemistry, 1975, 44: 147-159.
- [17] Chris B, Marc V H, Dirk I. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83.
- [18] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase. Annual Review of Biochemistry, 1995, 64: 97-112.
- [19] Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell, 1995, 7: 1099-1111
- [20] Glenn E P, Brown J J. Salt tolerance and crop potential of halophytes. Critical Reviews in Plant Sciences, 1999, 18 (2): 227-255
- [21] Xu C B, Mi F G, Wang Y. Research on salt-tolerance of wheatgrass transformed by P5CS gene. Acta Agrestia Sinica, 2006, 14(1): 21-23.
- [22] Guo Y, Zhang L, Xiao G, Cao S Y, Gu D M, Tian W Z, Chen S Y. Production and salt-tolerant research of transgenic rice with betaine aldehyde dehydrogenase gene. Science in China Series C, 1997, 27: 151-155.
- [23] Dong Y Z, Wang X Y. Salt tolerance and genetic analysis of trans-lmt1-genic tobacco. Journal of Agricultural Biotechnology, 2008, 8(1): 253-255
- [24] Attipalli R R, Kolluru V C, Munusamy V. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 2004, 161(11): 1189-1202
- [25] Munne-Bosch S, Penuelas J. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. Plant Science, 2004, 166(4): 1105-1110.
- [26] Shen Z G, Shen Q R, Guan H Y, Wang Z Y, Shen K. NaCl stress on the relationship between nitrogen nutrition and barley seedling growth and ion balance. Journal of Nanjing Agricultural University, 1994, 17(1): 22-26.
- [27] Strogonov B P. Structure and Function of Plant Cell in Saline Habitats. New York: Halsted Press, 1973: 78-83
- [28] Du Z J, Zai H, Pan Z Y. Change of photosynthetic capability and pigment content of apple rootstocks under salt-stress. Journal of Fruit Science, 2001, 18(4): 200-203.
- [29] Yu J H, Yang X L, Xu Y Z, Li J. Effect of salt stress on photosynthesis characteristics in grafted and own-rooted cucumber seedlings. Plant Nutrition and Fertilizing Science, 2004, 10(5): 554-556.
- [30] Qian Q Q, Wei C Q, Zhu Z J, Li J. Response of photosynthetic apparatus in the seedlings of different cucumber cultivars to salt stress. Bulletin of Science and Technology, 2004, 20 (5): 459-463.

参考文献:

- [6] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 92-99.
- [8] 李伟, 张竞, 张晓钰, 单龙, 茹炳根. 转金属硫蛋白 $\alpha\alpha$ 突变体基因的矮牵牛对铅的抗性及其积累的研究. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28 (3): 405-409.
- [14] 郝建军, 刘延吉. 植物生理学实验技术. 沈阳: 辽宁农业科学技术出版社, 2001: 71-73, 144-145, 180-181.
- [21] 徐春波, 米福贵, 王勇. 转基因冰草植株耐盐性研究. 草地学报, 2006, 14(1): 21-23.
- [22] 郭岩, 张莉, 肖岗, 曹守云, 谷冬梅, 田文忠, 陈受宜. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究. 中国科学(C辑), 1997, 27: 151-155.
- [23] 董云洲, 王雪艳. 转肌醇甲基转移酶基因烟草的耐盐性及其遗传分析. 农业生物技术学报, 2000, 8(1): 253-255
- [26] 沈振国, 沈其荣, 管红英, 王震宇, 沈康. NaCl 胁迫下氮素营养与大麦幼苗生长和离子平衡的关系. 南京农业大学学报, 1994, 17(1): 22-26.
- [28] 杜中军, 翟衡, 潘志勇, 等. 盐胁迫下苹果砧木光合能力及光合色素的变化. 果树学报, 2001, 18(4): 200-203.
- [29] 郁继华, 杨秀玲, 许耀照, 张国斌. NaCl 胁迫对黄瓜自根苗和嫁接苗光合速率的影响. 植物营养与肥料科学, 2004, 10(5): 554-556.
- [30] 钱琼秋, 魏国强, 朱祝军, 李娟. 不同品种黄瓜幼苗光合机构对盐胁迫的响应. 科技通报, 2004, 20 (5): 459-463.