

水稻幼苗根细胞质膜和液泡膜微囊 Ca^{2+} -ATP 酶的特性

王精明¹ 李洪清² 李美茹^{3,*}

¹惠州学院理学系, 惠州 516015; ²华南师范大学生命科学学院, 广州 510631; ³中国科学院华南植物研究所, 广州 510650

摘要 水稻幼苗根质膜和液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶对 ATP 的 K_m 值分别为 7.1 和 4.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 反应的最适 pH 分别为 8.0 和 7.0。两者活性均受 Na_3VO_4 和曙红 B (EB) 抑制; CPZ 抑制质膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性, 但促进液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性。30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 浸种和 CaCl_2 浸种结合低温锻炼预处理, 均可提高此酶的活性和冷稳定性。

关键词 Ca^{2+} -ATP 酶; 质膜; 液泡膜; 水稻幼苗

Characteristics of Ca^{2+} -ATPase of Plasma Membrane and Tonoplast Membrane Vesicles from Roots of Rice Seedlings

WANG Jing-Ming¹, LI Hong-Qing², LI Mei-Ru^{3,*}

¹Department of Natural Science, Huizhou College, Huizhou 516015; ²College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631; ³South China Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650

Abstract Plasma and tonoplast membrane-enriched vesicles were prepared from rice seedling root by Dextran T70 gradient centrifugation. Ca^{2+} -ATPase of both vesicles were identified. The K_m values for ATP of Ca^{2+} -ATPase of plasma membrane and tonoplast membrane vesicles are 7.1 and 4.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively, and the optimum pH values of the two vesicles were 8.0 and 7.0, respectively. The enzyme activities of both vesicles were inhibited by Na_3VO_4 and erythrosin B (EB). The activity from plasma membrane was inhibited by chlorpromazine (CPZ), but the activity from tonoplast membrane was promoted by CPZ. However, the enzyme activities and its cold stability of both vesicles were improved by rice seed-submerged in CaCl_2 treatment or seedling-cold-hardened treatment following seed-submerged in CaCl_2 treatment.

Key words Ca^{2+} -ATPase; plasma membrane; tonoplast membrane; rice seedlings

维持细胞胞质中低水平的 Ca^{2+} 稳态对细胞的正常生理代谢活动有重要作用, 而存在于细胞器膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶对由于受刺激而升高的胞质 Ca^{2+} 浓度, 在其完成信息传递后迅速回落到静息态水平时起调控作用。质膜和液泡膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶分别将胞质中 Ca^{2+} 运往细胞外或液泡中, 因此, 研究此酶的特性有重要意义。近年来, 人们虽对 Ca^{2+} -ATP 酶的分子生物学特性有了初步了解, 但有关此酶的结构、功能、活性的调控机制还不清楚^[1]。已有实验证明 Ca^{2+} -ATP 酶对逆境 (如: 盐、铝、冷胁迫等) 有应答功能^[2~5]。为了阐明 Ca^{2+} -ATP 酶在逆境应答中的机制, 必须了解影响此酶活性的因子。本文探讨水稻幼苗根质膜和液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶及其在氯化钙浸种提高幼苗抗寒性过程中的活性变化特性。

材料与方 法

选用抗冷力较强的水稻 (*Oryza sativa*) 品种“特三矮二”为材料^[6]。分别以蒸馏水和 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 浸种 24 h 后, 用湿纱布包裹置于恒温箱 (28℃) 中催芽 2 d, 再将种子分别排列在放有蛭石的培养皿中, 置于恒温箱内 (28℃) 生长 24 h, 取出放在 (28±1)℃、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下生长 8 d。将两组幼苗分别分为两部分: 一部分置于光强为 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、14℃的培养箱中锻炼 3 d; 另一部分继续置于培养架上生长。3 d 后, 将全部幼苗取出置于 1℃、光强为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强下生长 8 d。

收稿 2003-04-07 修定 2003-09-16

资助 国家自然科学基金项目 (30170667)。

* 通讯作者 (E-mail: limr@scib.ac.cn, Tel: 020-37252590)。

$\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的培养箱内进行冷胁迫处理, 2 d后取出置培养架上让幼苗恢复生长。在冷锻炼后和冷胁迫后采样测定。

质膜和液泡膜制备按文献7方法。取一定量的根, 按1:2比例加入缓冲液 ($0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT、 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Mes, pH 7.8) 匀浆。浆液用2层纱布过滤后, 以 $13\ 000 \times g$ 离心10 min; 取上清液再以 $80\ 000 \times g$ 离心30 min; 将沉淀物悬浮在含有 $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Mes (pH 7.5) 的悬浮液中; 取悬浮液, 铺在装有5 mL 6%与4 mL 12% (重量比)的Dextran T70的液泡上(梯度溶液用悬浮液配制), 以 $105\ 000 \times g$ 离心2 h; 取6%与12% Dextran T70界面颗粒为原生质膜微囊, 0%与6% Dextran T70界面处的沉淀颗粒为液泡膜微囊, 样品贮于 -20°C 下备用。以上操作均在 4°C 下进行。

测定质膜 Ca^{2+} -ATP酶活性时, 取0.5 mL含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Mes (pH 6.5)、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaN_3 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 、0.01% (体积比) Triton X-100、 $20 \mu\text{g}$ 膜蛋白的反应液, 用ATP启动反应, 37°C 下反应30 min后, 以0.5 mL 10%TCA终止反应。按Lin和Morales^[8]的方法测定 Ca^{2+} -ATP酶水解ATP后所释放的无机磷的量。

测定液泡膜 Ca^{2+} -ATP酶活性时, 取0.5 mL含 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-Mes (pH 6.0)、 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ 、 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_3VO_3 、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaNO_3 、0.01% (体积比) Triton X-100、 $20 \mu\text{g}$ 膜蛋白的反应液。其它反应过程与上述测质膜 Ca^{2+} -ATP酶活性相同。

蛋白质含量测定按Bradford^[9]的方法。

根质膜和液泡膜微囊制剂纯度的鉴定见前文^[3]。

实验结果

1 水稻幼苗根细胞质膜 Ca^{2+} -ATP酶的动力学特征

各种阳离子对膜微囊ATP酶的激活能力顺序是: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (图1)。向反应系统加入 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 时表现的酶活性称为 Ca^{2+} -ATP酶或 Mg^{2+} -ATP酶活性。通过Lineweaver-Burk作图,

Ca^{2+} -ATP酶对ATP的 K_m 值比 Mg^{2+} -ATP酶的大, 两者分别为 7.1 和 $5.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 这两种酶反应的最适pH值也不一样, 前者为8.0, 后者为6.5。前者与后者一样也受 Na_3VO_4 抑制, 曙红B (erythrosin B, EB) 对其也有抑制作用, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯丙嗪 (CPZ) 对该酶的抑制作用较小; 而后者不受EB和CPZ的抑制 (图2)。

向反应系统加入 Ca^{2+} 时, 水解ATP的酶活性

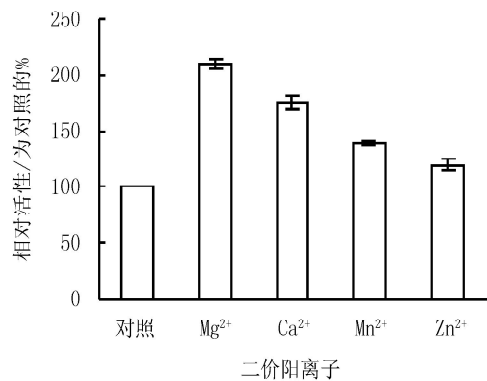


图1 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对水稻幼苗根细胞质膜ATP酶活性的影响

Fig. 1 Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) on the activity of ATPase of plasma membrane from roots of rice seedlings

以不加任何二价阳离子而呈现的ATP酶水解活性为对照 [$0.088 \mu\text{mol} (\text{Pi}) \cdot \text{mg}^{-1} (\text{蛋白}) \cdot \text{min}^{-1}$]

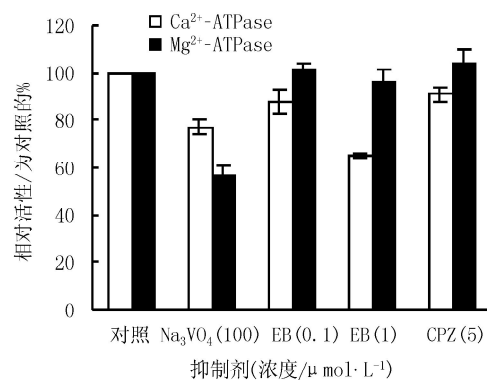


图2 各种抑制剂对水稻幼苗根细胞质膜 Ca^{2+} -ATP酶和 Mg^{2+} -ATP酶活性的影响

Fig. 2 Effects of inhibitors on the activities of Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of plasma membrane from roots of rice seedlings

对照的 Ca^{2+} -ATP酶和 Mg^{2+} -ATP酶活性分别为: 0.158 和 $0.218 \mu\text{mol} (\text{Pi}) \cdot \text{mg}^{-1} (\text{蛋白}) \cdot \text{min}^{-1}$ 。

随 Ca^{2+} 浓度增加而增加,当 Ca^{2+} 浓度达到 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶活性最大,这时再提高 Ca^{2+} 浓度,酶活性反而下降(图3)。反应系统中加入 Mg^{2+} 时,酶活性随 Mg^{2+} 浓度增加而升高,说明反应系统中的 Mg^{2+} 水平影响 Ca^{2+} -ATP酶活性;测 Mg^{2+} -ATP酶活,则随着 Ca^{2+} 浓度增加而下降,说明 Ca^{2+} 对 Mg^{2+} -ATP酶活性亦有影响(图4)。

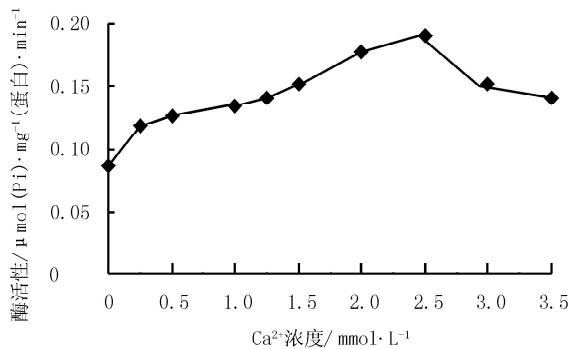


图3 水稻幼苗根质膜 Ca^{2+} -ATP酶对 Ca^{2+} 的依赖性
Fig.3 Ca^{2+} concentration dependence of Ca^{2+} -ATPase of plasma membrane from roots of rice seedlings

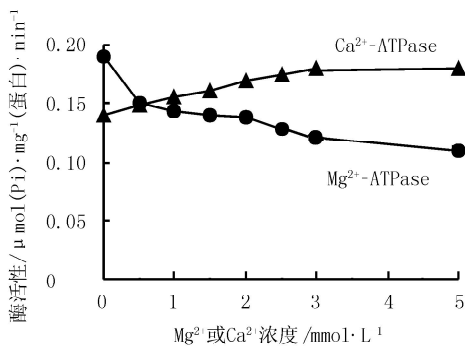


图4 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 对水稻幼苗根质膜 Ca^{2+} -ATP酶和 Mg^{2+} -ATP酶活性的影响

Fig.4 Effects of Mg^{2+} or Ca^{2+} on the activities of Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase of plasma membrane from roots of rice seedlings respectively

2 水稻幼苗根细胞液泡膜 Ca^{2+} -ATP酶的动力学特征
反应系统中分别加入的二价阳离子激活酶的能力大小依序为 $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (图5)。 Ca^{2+} -ATP酶活性明显高于 Mg^{2+} -ATP酶活性, Ca^{2+} -ATP酶的 K_m 值为 $4.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而 Mg^{2+} -ATP酶的为 $7.6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,这与质膜微囊表现得不一样。

当 Ca^{2+} 浓度达到 $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶活性达到最大, Ca^{2+} 浓度再提高时,酶活性反而下降(图6),这与质膜微囊的结果一致。测定 Ca^{2+} -ATP酶和 Mg^{2+} -ATP酶时,分别加 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 后,前者抑制 Ca^{2+} -ATP酶活性,且随反应系统中 Mg^{2+} 浓度的增加而下降;测定 Mg^{2+} -ATP酶活性,加入低浓度的 Ca^{2+} 时,酶活性下降,但当加入浓度大于 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, Mg^{2+} -ATP酶活性有回升趋势。说明反应系统中 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 水平影响着ATP酶的活性(图7)。 Ca^{2+} -ATP酶的最适pH值为7.0, Mg^{2+} -ATP酶为6.0,这与质膜微囊不同。

液泡膜微囊的 Ca^{2+} -ATP酶活受 Na_3VO_4 抑制,受EB抑制的程度比质膜更严重,而CPZ则有促进作用。这与质膜微囊不同。 Mg^{2+} -ATP酶

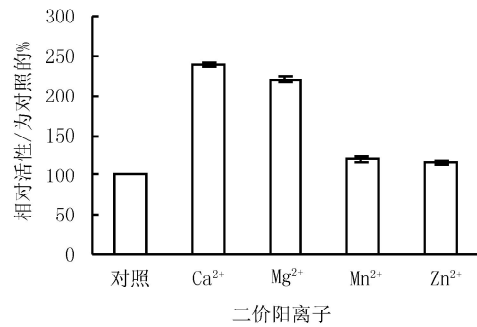


图5 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} ($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对水稻幼苗根细胞液泡膜ATP酶活性的影响
Fig.5 Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} ($2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the activity of ATPase of tonoplast membrane from roots of rice seedlings

以不加任何二价阳离子而呈现的ATP酶水解活性为对照 [$0.178 \text{ }\mu\text{mol (Pi)}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$]。

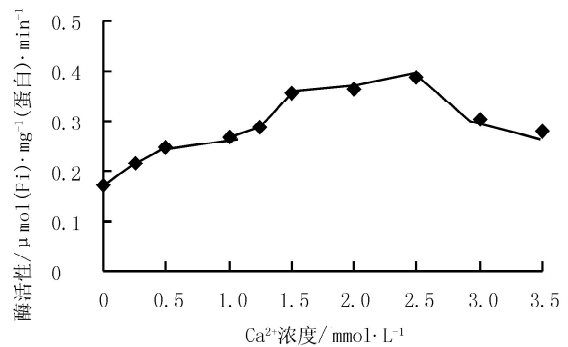


图6 水稻幼苗根液泡膜 Ca^{2+} -ATP酶对 Ca^{2+} 的依赖性
Fig.6 Ca^{2+} concentration dependence of Ca^{2+} -ATPase of tonoplast membrane from roots of rice seedlings

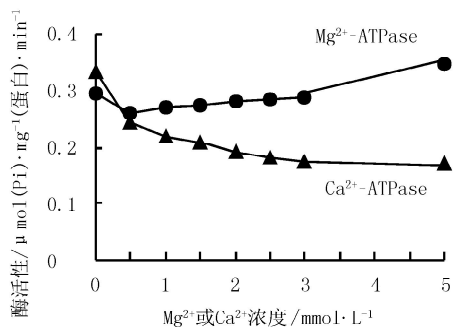


图7 Mg²⁺或Ca²⁺对水稻幼苗根液泡膜Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶活性的影响

Fig. 7 Effects of Mg²⁺ or Ca²⁺ on the activities of Ca²⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase of tonoplast membrane from roots of rice seedlings respectively

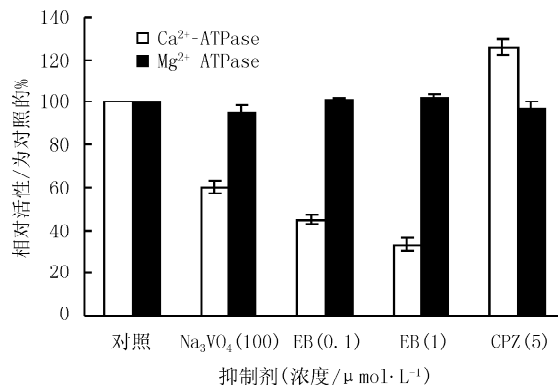


图8 各种抑制剂对水稻幼苗根细胞液泡膜Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶活性的影响

Fig. 8 Effects of inhibitors on the activities of Ca²⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase of tonoplast membrane from roots of rice seedlings

对照的Ca²⁺-ATP酶和Mg²⁺-ATP酶活分别为: 0.430和0.192 μmol (Pi)·mg⁻¹ (蛋白)·min⁻¹。

活不受Na₃VO₄、EB、CPZ的影响(图8)。

3 CaCl₂浸种对质膜和液泡膜Ca²⁺-ATP酶活性的影响

冷胁迫降低质膜和液泡膜Ca²⁺-ATP酶活性^[3]。图9表明, CaCl₂浸种的Ca²⁺-ATP酶活性明显提高, 冷胁迫后, 仍高于未浸种的。CaCl₂浸种结合低温锻炼也表现出CaCl₂浸种的相同效果, 在冷胁迫后, 该酶活性甚至高于冷胁迫前的水平。

讨 论

据报道, 植物细胞质膜和液泡膜Ca²⁺-ATP酶均为PM型Ca²⁺-ATP酶, 其活性可为钙调节蛋白(calmodulin, CaM)和酸性磷脂激活, 对EB高度敏感, 低于1 μmol·L⁻¹的EB可完全抑制其活性^[1]。本文结果表明, 液泡膜上的Ca²⁺-ATP酶对EB的敏

感性高于质膜上的, 但1 μmol·L⁻¹的EB并不能完全抑制此酶的活性(图2、8)。这可能与我们的实验所用的材料和膜制剂与前人不同有关。质膜和液泡膜H⁺-ATP酶对EB敏感性低, 其活性受抑制程度大于85%时, EB浓度则远高于100 μmol·L⁻¹。据此可以认为, 对低浓度EB的敏感性是Ca²⁺-ATP酶区别于H⁺-ATP酶的重要标志^[1]。在本文采用的EB浓度范围(0.1~1.0 μmol·L⁻¹)内, 质膜Ca²⁺-ATP酶活性有抑制作用, 而对液泡膜上的则反而略有激活作用(图2、8), 其原因尚不清楚。Ca²⁺和Mg²⁺会影响膜微囊的Ca²⁺-ATP酶活性(图4、7), 计算膜微囊Ca²⁺-ATP酶活性时, 应考虑内源Mg²⁺或Ca²⁺引起

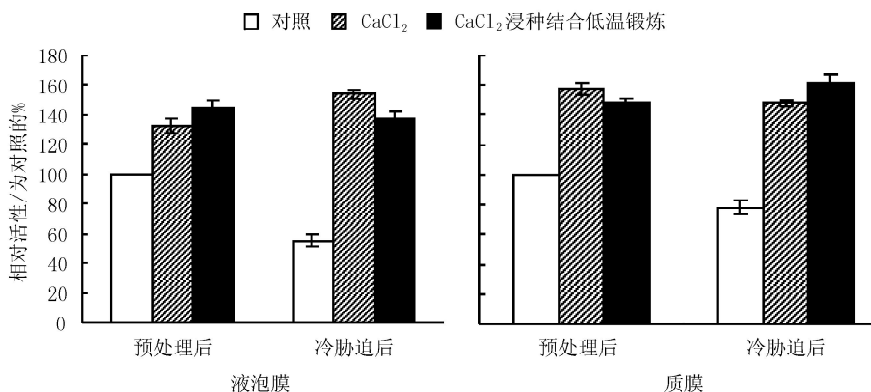


图9 CaCl₂浸种和CaCl₂浸种结合低温锻炼对水稻幼苗根液泡膜和质膜Ca²⁺-ATP酶活性的影响

Fig. 9 Effects of CaCl₂ treatment and CaCl₂ treatment combined with cold-hardening on the activities of Ca²⁺-ATPase of tonoplast and plasma membrane from roots of rice seedlings

ATP 酶的水解问题。通常认为 Ca^{2+} -ATP 酶的最适 pH 是 7.0~7.5。但我们的实验表明, 水稻幼苗根质膜 Ca^{2+} -ATP 酶的最适 pH 与液泡膜的不一样, 前者为 8.0, 后者为 7.0。液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶对 Ca^{2+} 的亲性和大于质膜, 前者对 ATP 的 K_m 为 $4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 后者为 $7.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 都远大于大麦根质膜^[2]。

大麦根质膜上存在两种 Ca^{2+} 转运机制: 一种是 Ca^{2+} -ATP 酶驱动的不需要 Mg^{2+} 的高 Ca^{2+} 亲和系统; 另一种是需 Mg^{2+} 的低 Ca^{2+} 亲和系统, 是 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 反向传递系统^[2]。两者在盐胁迫中不同: Ca^{2+} -ATP 酶驱动的初级 Ca^{2+} 转运系统可能与胁迫信号的传递有关, 而次级 Ca^{2+} 转运系统则可能起信号传递之后将剩余 Ca^{2+} 运出胞外的功能。长时间盐胁迫下两系统 Ca^{2+} 转运能力的降低则是一种伤害反应^[2]。王红等^[10]用细胞化学方法研究低温胁迫后细胞中 Ca^{2+} 分布时, 发现 Ca^{2+} 主要分布在质膜内侧、胞质和胞核中, 随着胁迫时间的延长, Ca^{2+} 沉淀加重。他们的实验还表明, 施用抗寒剂的黄瓜幼苗在低温胁迫后, 其胞质中 Ca^{2+} 分布可基本恢复到冷胁迫前的状态, 但未经抗寒剂处理的细胞中 Ca^{2+} 沉淀继续加重。我们采用相同的方法在水稻幼苗材料中也证明冷胁迫的 Ca^{2+} 沉积于胞质和胞核中, 此种现象可一直维持到恢复期。由此我们认为, 这可能是导致幼苗死亡的重要原因。我们未发表的资料表明, 如采用有利于提高幼苗抗冷力, 如盐、冷和氯化钙进行浸种处理, 冷胁迫后胞质中 Ca^{2+} 分布可恢复到冷胁迫前的状态。由此我们推测, 存在于细胞质膜和液泡膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶可能是将胞质中的 Ca^{2+} 外运到胞外或液泡钙库中, 起降低胞质中 Ca^{2+} 浓度的作用。Jian 等^[4]报道, 在低温下不抗寒植物的质膜和核膜中 Ca^{2+} -ATP 酶失活, 胞质内和核内 Ca^{2+} 的增加不能被泵回胞外或钙库, 因而, 导致细胞死亡。所以可以认为, 维持质膜或液泡上的 Ca^{2+} -ATP 酶的正常活性是维持细胞活力的保障。我们在前文^[3]中报道, 盐、冷预处理均有激活和提高质膜、液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶的冷稳定性的作用, 这对胞质中 Ca^{2+} 水平恢复到静息状水平是有利的。 Ca^{2+} 预处理可以增强植物对许多非生物逆

境的适应性, 减轻逆境对植物所造成的伤害, 如增强对冷害、高温、干旱、盐害等逆境因子的抵御能力等^[11]。本文结果表明, CaCl_2 浸种处理有提高水稻质膜和液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性的作用(图 9)。这可能与 CaCl_2 浸种提高细胞中可溶性 Ca^{2+} 含量^[11], 激活 Ca^{2+} -ATP 酶活性有关。低温锻炼提高幼苗的抗寒力的效应可为 EGTA 和 CPZ 抑制^[3]。这说明, CaCl_2 浸种结合低温锻炼处理之所以更能提高质膜和液泡膜 Ca^{2+} -ATP 酶活性, 可能与低温锻炼启动钙信使系统的作用有关, 也与提高细胞抗氧化能力和稳定冷胁迫下细胞质膜和其它细胞器膜的完整性有关^[3, 11, 12]。

参考文献

- 1 何龙飞, 王爱勤, 沈振国等. 高等植物细胞的 Ca^{2+} -ATP 酶. 广西农业生物科学, 2000, 19 (1): 64~67
- 2 郝鲁宁, 余叔文. 大麦根细胞质膜 Ca^{2+} 转运系统对盐胁迫的反应. 植物生理学报, 1993, 19: 275~284
- 3 曾韶西, 李美茹. 冷和盐预处理提高水稻幼苗抗寒性期间细胞 Ca^{2+} -ATP 酶活性的变化. 植物学报, 1999, 41 (2): 156~160
- 4 Jian LC, Li JH, Chen WP et al. Cytochemical localization of calcium and Ca^{2+} -ATPase activity under chilling stress: a comparative study between the chilling-sensitive maize and the chilling-insensitive winter wheat. Plant Cell Physiol, 1999, 40: 1061~1071
- 5 张芬琴, 沈振国, 刘友良. 铝和铝+钙对小麦幼苗根尖质膜、液泡膜微囊 ATP 酶和膜流动性的影响. 植物生理学报, 2000, 26 (2): 105~110
- 6 李美茹, 刘鸿先, 王以柔等. 水稻幼苗冷锻炼过程中钙的效应. 植物学报, 1996, 38 (9): 735~742
- 7 焦新之, 李琳, 倪晋山. 花生幼苗下胚轴质膜氧化还原系统. 植物生理学报, 1992, 18: 63~69
- 8 Lin TI, Morales MF. Application of a one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: the actomyosin ATPase system. Anal Biochem, 1977, 77: 10~17
- 9 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 248~254
- 10 王红, 简令成, 张举仁. 低温胁迫下水稻幼叶细胞内 Ca^{2+} 水平的变化. 植物学报, 1994, 36 (8): 587~591
- 11 李美茹, 刘鸿先, 王以柔等. 钙对水稻幼苗抗冷力的影响. 植物生理学报, 1996, 22 (4): 379~384
- 12 李美茹, 刘鸿先, 王以柔. 低温下水稻幼苗叶片细胞膜膜脂过氧化和膜磷脂脱酯化反应. 广西植物, 1998, 18 (2): 173~176