

## 石竹玻璃化苗的水分及活性氧代谢变化

张静雪<sup>1</sup>, 高弘扬<sup>1</sup>, 辛学锐<sup>2</sup>, 夏秀英<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024; <sup>2</sup>大连好地农业有限公司, 辽宁大连116024

**摘要:**以正常及玻璃化石竹试管苗为材料, 研究玻璃化后试管苗水分及活性氧(ROS)代谢的变化。结果表明, 与正常试管苗相比, 玻璃化苗的自由水及质外体水含量显著增加, 束缚水及质外体气体含量显著降低, 叶片失水率显著下降; 玻璃化苗中丙二醛(MDA)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量及氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)产生速率显著高于正常苗, 组织化学染色结果证实玻璃化苗体内出现了ROS的明显积累; 玻璃化苗中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性及抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量均显著低于正常苗。说明玻璃化苗中水分及ROS代谢出现异常, 过多水分的积累及氧化平衡的破坏可能是石竹苗玻璃化发生及发展的主要原因。

**关键词:**石竹; 玻璃化; 质外体水分; 活性氧; 抗氧化酶

## Changes in Water and Reactive Oxygen Species Metabolism in Hyperhydric *Dianthus chinensis*

ZHANG Jing-Xue<sup>1</sup>, GAO Hong-Yang<sup>1</sup>, XIN Xue-Rui<sup>2</sup>, XIA Xiu-Ying<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China; <sup>2</sup>Dalian Haodi Agriculture Limited Company, Dalian, Liaoning 116024, China

**Abstract:** Using normal and hyperhydric shoots *in vitro* of *Dianthus chinensis* as materials, changes in water and reactive oxygen species (ROS) metabolism in hyperhydric shoots were investigated. The results showed that compared to the normal shoots, the hyperhydric shoots presented dramatic increase in the contents of free water and apoplastic water, however the contents of bound water and apoplastic gas in hyperhydric shoots were remarkably decreased. Moreover, in comparison with normal shoots, hyperhydric shoots showed higher contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), and the production rate of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Histochemical stain with diaminobenzidine (DAB) and nitroblue tetrazolium (NBT) confirmed the obvious accumulation of ROS in hyperhydric shoots. Furthermore, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), and the contents of ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH) were lower significantly than those in normal shoots. These results indicated that water and ROS metabolism were disordered in hyperhydric shoots, suggesting that excessive water accumulation and the damage of oxidative balance are the key factors in triggering and developing of hyperhydricity in *D. chinensis*.

**Key words:** *Dianthus chinensis*; hyperhydricity; apoplastic water; reactive oxygen species; antioxidase

石竹是石竹科石竹属多年生草本花卉植物, 是我国传统名花之一, 在世界各地广为栽培, 品种繁多, 深受人们喜爱。组织培养技术不但可以有效脱毒复壮、在短时间内生产大量优质种苗, 而且能保持植物优良种性, 是石竹繁育的主要方法。但石竹组织培养过程中经常发生玻璃化现象, 严重影响了快速繁殖的生产效率, 也限制了组织培养技术在石竹中的应用(程云清等2012)。

玻璃化是组织培养过程中特有的一种生理失调或生理病变, 在多种植物中均有报道(Chakrabarty等2006; Wu等2009; 陈兵先等2011)。玻璃化

常导致组培苗生根困难, 继代成活率低, 难以驯化移栽, 严重的玻璃化会导致植株死亡。研究表明, 培养条件、琼脂浓度、细胞分裂素、无机盐离子等均对玻璃化有影响(Ivanova和Van Staden 2009; 马晓菲等2013; 卢兴霞等2014)。通过改变光照、温度等培养条件以及在培养基中添加活性炭、硝酸银、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone,

收稿 2015-04-08 修定 2015-07-31

资助 国家级大学生创新创业训练计划项目(201410141351)。

\* 通讯作者(E-mail: xx47@dlut.edu.cn; Tel: 0411-84706356)。

PVP)、铁离子、镁离子等可以降低部分物种试管苗玻璃化的发生机率,或在一定程度上使已发生玻璃化的试管苗恢复正常(Yadav等2003; Mayor等2003; Wang等2007; 刘雪超等2011; 张天翔2013)。

为阐明玻璃化的发生规律及机制,人们从生理生化、解剖结构、亚显微结构等多个层面进行了大量的研究(Apóstolo和Llorente 2000; Saher等2004; Sreedhar等2009; Jausoro等2010),近年来人们逐渐认识到水分积累及氧化胁迫在玻璃化形成及发展中的关键作用。在多种植物中均发现玻璃化苗组织含水量、活性氧(reactive oxygen species, ROS)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量显著高于正常苗,抗氧化能力降低(Olmos等1997; Saher等2004; 吕敏等2014)的现象。Olmos和Hellín (1998)认为玻璃化苗细胞超微结构改变是由于水的过度积累和随后诱导的氧化应激的结果,玻璃化苗解剖学和形态学上的症状都是由于质外体水引起的二次事件。van den Dries等(2013)也证实质外体水分过度积累是组培苗玻璃化的主要因素。Tian等(2015)通过对大蒜玻璃化苗不同细胞组分中ROS及抗氧化系统的动态测定,认为质外体ROS爆发是大蒜苗玻璃化的重要因素。

研究玻璃化苗水分及ROS代谢的变化有助于理解玻璃化形成的机制。而目前相关研究多数集中于组织含水量、ROS产生速率及部分抗氧化酶活性的测定,缺乏对质外体水分和气体含量、叶片失水率及抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)-还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)循环等的相关研究。本文以石竹为材料,全面分析玻璃化试管苗水分及ROS代谢相关指标的变化,以期揭示水分及ROS在玻璃化苗形成及发展中的作用及机制奠定基础,并为玻璃化的防控及玻璃化苗的恢复提供参考。

## 材料与amp;方法

### 1 植物材料

实验材料为石竹(*Dianthus chinensis* L.)继代培养过程中同期出现的玻璃化试管苗及正常苗。培养基为MS+5.4 g·L<sup>-1</sup>琼脂+30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖, pH为5.6。培养室光照强度为30~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光照时间为16 h·d<sup>-1</sup>,温度为(25±2)℃。

### 2 水分代谢相关指标测定

组织自由水及束缚水含量的测定参考苍晶等(2013)书上的方法。叶片组织的质外体水含量通过低速离心方法测定(Terry和Bonner 1980)。从植株上取下叶片,迅速称鲜重(FW),置于离心机中4℃下3 000×g离心20 min,离心后马上再次称重,2次质量之差( $\Delta W$ )即为质外体水的质量。质外体水含量= $(\Delta W/FW) \times 100\%$ 。质外体气体含量用比重瓶法(Dalton等1997)测定,取下叶片,称FW,然后放入比重瓶,在比重瓶中倒满蒸馏水,塞上塞子,用滤纸擦干外表面的水,测量包括叶子在内的整个瓶子的质量,之后将瓶子放入真空中,直到叶片中的气体完全被水取代,叶片沉至瓶底,真空渗透结束后,再次用水将瓶子装满,擦干外表面,称重,2次称重差值记为 $\Delta W'$ 。质外体气体含量= $(\Delta W'/\rho_{H_2O})/FW \times 100\%$ ,其中, $\rho_{H_2O}$ 为1.0 g·cm<sup>-3</sup>。

参考Zhang等(2011)的方法测定叶片失水率。

### 3 ROS代谢相关指标测定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量, O<sub>2</sub>产生速率,氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)和GSH含量,过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性等的测定参考蔡庆生等(2013)书上的方法。过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定参照Knörzer等(1996)的方法。AsA和总抗坏血酸(T-AsA)含量测定采用高效液相色谱法(黄明2013),由于单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbic acid, MDHA)极不稳定,因此T-AsA含量减去AsA含量即认定为脱氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid, DHA)含量。

O<sub>2</sub>及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的可视化检测分别用氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)着色法及二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色法,具体方法参照Ramel等(2009)及Guan等(2000)。

### 4 其他生理生化指标测定

可溶性蛋白含量测定参考苍晶等(2013)书上的方法;叶绿素、可溶性糖、MDA含量及相对电导率测定参考蔡庆生等(2013)书上的方法。

### 5 数据分析

各项指标测定均设置3次重复,结果取平均值。试验数据采用Excel 2003和SPSS 16.0软件

进行统计与分析,用Duncan's新复极差法进行多重比较。

## 实验结果

### 1 石竹玻璃化苗组织中含水量和质外体气体含量及叶片失水率的变化

由表1显示,石竹玻璃化苗的总含水量(94.25%)

显著高于正常苗(89.70%),其中自由水含量比正常苗增高了21%,束缚水含量降低了18%。玻璃化苗的质外体水含量为18.04%,显著高于正常苗(2.39%),质外体气体含量为4.84%,仅为正常苗的10.6%。可见,玻璃化苗体内水分过度积累,积累的水分多以自由水的形式存在,质外体水分增多导致质外体空间气体减少。

表1 正常苗与玻璃化苗含水量及质外体气体含量的比较

Table 1 Comparison of water content and apoplastic air content between normal and hyperhydric shoots

	总含水量/%	自由水含量/%	束缚水含量/%	质外体水含量/%	质外体气体含量/%
正常苗	89.70±0.75 <sup>b</sup>	52.91±0.97 <sup>b</sup>	36.87±1.49 <sup>a</sup>	2.39±0.44 <sup>b</sup>	45.87±5.33 <sup>a</sup>
玻璃化苗	94.25±0.30 <sup>a</sup>	64.04±3.19 <sup>a</sup>	30.18±1.51 <sup>b</sup>	18.04±1.76 <sup>a</sup>	4.84±0.32 <sup>b</sup>

同一列内不同字母表示在0.05水平上差异显著。

图1显示,石竹玻璃化苗失水速率明显低于正常苗,说明玻璃化苗持水力强,失水慢,体内水分无法正常排出,造成水分平衡的破坏及水分的过度积累。

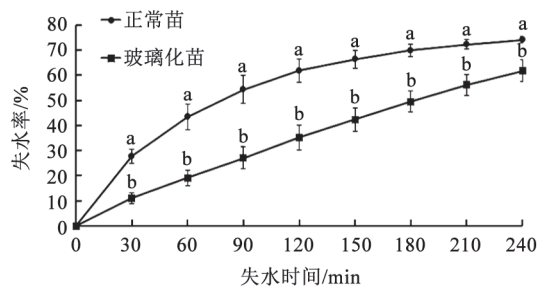


图1 正常苗和玻璃化苗失水率的变化

Fig.1 Changes in water loss rates in normal and hyperhydric shoots

同一组内不同字母表示在0.05水平上差异显著。

### 2 玻璃化苗中可溶性糖、可溶性蛋白及叶绿素含量的变化

由图2可见,石竹玻璃化植株的可溶性糖和可溶性蛋白及叶绿素含量均显著低于正常植株。相比于正常植株,玻璃化植株中可溶性糖含量降低了24.3%,可溶性蛋白含量降低了60.8%,叶绿素a含量降低了84.7%,叶绿素b含量降低了80.4%。

### 3 玻璃化苗ROS积累及MDA含量的变化

石竹玻璃化苗的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量、O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率、MDA含量及相对电导率均显著高于正常苗(表2),

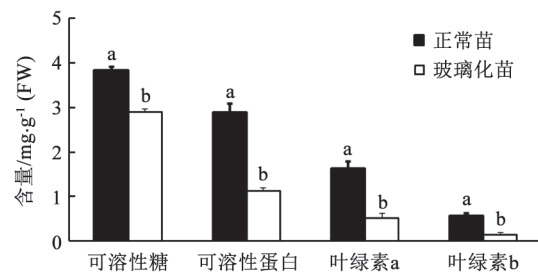


图2 正常苗和玻璃化苗中可溶性糖、可溶性蛋白、叶绿素含量的比较

Fig.2 Comparison of soluble sugar, soluble protein and chlorophyll contents in normal and hyperhydric shoots

同一组内不同字母表示在0.05水平上差异显著。

分别为正常苗的1.5、2.6、2.9、16.4倍,说明玻璃化苗ROS产生明显多于正常苗,细胞膜系统已受到破坏。

NBT和DAB染色能反映体内自由基和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累情况。NBT在O<sub>2</sub><sup>-</sup>的作用下还原生成不溶于水的蓝色二甲胂,可以检测植物体内ROS的积累;DAB能与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反应生成棕红色的多聚产物,可以检测H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累。图3显示,经NBT及DAB染色后,玻璃化苗颜色均明显深于正常苗,表明玻璃化苗体内O<sub>2</sub><sup>-</sup>及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>积累量均高于正常苗。

### 4 玻璃化苗抗氧化酶活性及抗氧化物质含量的变化

表3表明,玻璃化苗的SOD、CAT及APX活性显著低于正常苗,分别比正常苗降低了21.7%、63.1%及32.2%;玻璃化苗POD活性显著高于正常

表2 正常苗和玻璃化苗中ROS和MDA含量及相对电导率的比较

Table 2 Comparison of ROS and MDA contents and relative electrical conductivity in normal and hyperhydric shoots

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含量/ nmol·g <sup>-1</sup> (FW)	O <sub>2</sub> 产生速率/ μmol·g <sup>-1</sup> (FW)·min <sup>-1</sup>	MDA含量/ mg·g <sup>-1</sup> (FW)	相对电导率/%
正常苗	29.10±0.51 <sup>b</sup>	6.21±0.03 <sup>b</sup>	0.70±0.028 <sup>b</sup>	11.0±0.52 <sup>b</sup>
玻璃化苗	85.51±1.96 <sup>a</sup>	101.60±0.10 <sup>a</sup>	1.02±0.034 <sup>a</sup>	28.7±1.00 <sup>a</sup>

同一列内不同字母表示在0.05水平上差异显著。

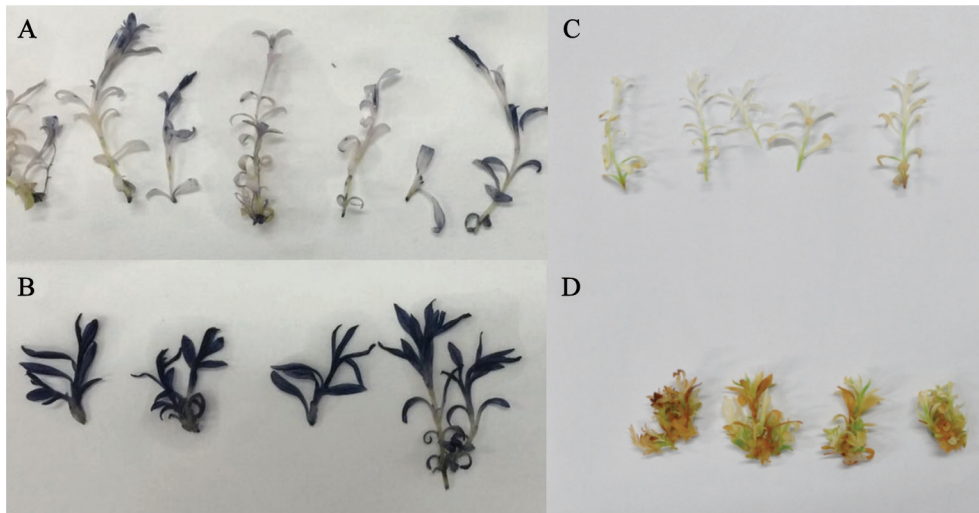


图3 正常苗和玻璃化苗的NBT及DAB组织化学染色

Fig.3 Histochemical stain of normal and hyperhydric shoots with NBT and DAB

A: 正常苗NBT染色; B: 玻璃化苗NBT染色; C: 正常苗DAB染色; D: 玻璃化苗DAB染色。

表3 正常苗和玻璃化苗中抗氧化酶活性的比较

Table 3 Comparison of antioxidant enzyme activities in normal and hyperhydric shoots

	POD/ U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> (蛋白)	SOD/ U·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> (蛋白)	CAT/ U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> (蛋白)	APX/ U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> (蛋白)
正常苗	10.2±0.85 <sup>b</sup>	135±3.05 <sup>a</sup>	213.6±11.3 <sup>a</sup>	1.46±0.17 <sup>a</sup>
玻璃化苗	14.8±0.49 <sup>a</sup>	105±4.13 <sup>b</sup>	95.0±19.2 <sup>b</sup>	0.99±0.16 <sup>b</sup>

同一列内不同字母表示在0.05水平上差异显著。

苗, 上升了45.1%。表明玻璃化苗抗氧化酶活性发生了改变, 使其ROS清除能力受到影响。

图4结果表明, 石竹玻璃化苗中抗氧化物质AsA、DHA及GSH含量均显著低于正常苗, 其中, AsA含量为正常苗的96.6%, DHA含量是正常苗的91.3%, GSH含量是正常苗的75.5%; 玻璃化苗的GSH/GSSG值为0.32, 显著低于正常苗(0.42)。说明玻璃化苗中抗氧化物质合成及再生能力下降。

## 讨 论

研究表明, 细胞及组织过度吸水, 尤其是质外体过度积累水分是玻璃化发生及发展的关键因素。Gribble等(1998)及van den Dries等(2013)分别在满天星和拟南芥的研究中发现, 水分在玻璃化苗质外体空间过度积累, 他们认为质外体积水会减少质外体空间的气体含量, 妨碍共质体与周围环境气体交换, 导致重要生理功能失调, 引起玻璃化症状。本研究中, 石竹玻璃化苗的一个主要特



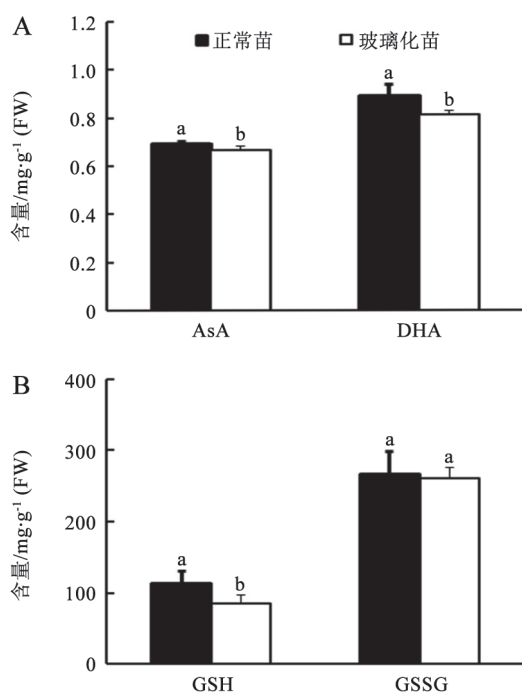


图4 玻璃化苗及正常苗中AsA (A)及GSH (B)含量的比较

Fig.4 Comparison of AsA (A) and GSH (B) contents in normal and hyperhydric shoots

同一组内不同字母表示在0.05水平上差异显著。

征是组织含水量及质外体水相对含量显著高于正常苗, 质外体气体含量及叶片失水率显著低于正常苗。这一方面表明玻璃化苗吸水及保水能力高于正常苗, 导致体内水分的过度积累; 另一方面也证实石竹玻璃化苗也存在质外体积水、气体含量减少现象。我们分析这可能也是石竹玻璃化发生的主要原因。

植物在逆境胁迫下常常积累ROS (Jaspers和Kangasjarvi 2010), 这些ROS具有“双重效应”: 一方面以第二信使的形式参与植物对胁迫信号的响应及转导; 另一方面, ROS的积累可对细胞造成氧化胁迫, 引发植物形态结构异常及生理机能紊乱 (O'Brien等2012; Suzuki等2012)。近年来, 逆境胁迫, 尤其是质外体水分积累引发的ROS爆发与玻璃化形成及发展的关系受到人们的关注。Sreedhar等(2009)、张琳等(2011)、Sen和Alikamanoglu (2013)及Tian等(2015)均报道了玻璃化苗体内ROS增加。Olmos和Hellin (1998)认为玻璃化苗解剖学和形态学上的症状都是由于质外体积水诱导的氧化应激引起。Asada (1999)和Rojas-Martinez等

(2010)认为质外体超度含水可引起组织缺氧, 干扰呼吸作用的电子传递, 进而引起氧化胁迫, 导致试管苗玻璃化。本研究发现, 伴随组织含水量及质外体水分含量的增加, 石竹玻璃化苗中O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量也显著上升, 组织化学染色结果证实玻璃化苗体内出现了ROS的积累。这些结果表明, ROS在石竹试管苗玻璃化发生及发展中扮演了重要角色。

细胞中ROS水平的高低是由其产生和清除系统共同决定的。植物在长期进化过程中形成了抗氧化防御系统用于清除ROS。在逆境条件下, 植物往往主动调动自身的抗氧化系统, 以维持植物体内ROS产生和清除的动态平衡, 保证逆境胁迫下正常的生理机能(Foyer和Noctor 2005)。目前已在多种植物中发现玻璃化苗抗氧化系统失调现象(Sa-her等2004; Sreedhar等2009; 刘雪超等2011)。Chakrabarty等(2006)认为ROS生成和抗氧化防御之间的不协调导致苹果试管苗的玻璃化。AsA及GSH是两种高丰度小分子抗氧化物质, 不仅可以通过AsA-GSH循环协同作用清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 也可单独作为抗氧化剂直接参与ROS的清除, 其还原型与氧化型含量的比值(AsA/DHA、GSH/GSSG)是反映植物体抗氧化活性的重要指标之一。本研究中, 玻璃化苗的AsA和GSH含量、GSH/GSSG比值显著低于正常苗, 抗氧化酶SOD、CAT、APX活性也显著低于正常苗, 说明玻璃化苗的ROS清除系统受损。

综合分析本研究结果, 我们认为石竹玻璃化的发生可能是因继代剪切或培养环境变化等引发的逆境而起, 某些植物体逆境信号感受系统或信号传递系统发生故障, 不能及时启动应激反应, 使得水分代谢及ROS代谢失调, 引起水分及ROS积累, 进而引起一些对ROS敏感的色素、蛋白及脂类物质的破坏, 导致玻璃化症状出现。玻璃化发生阶段可以通过改善培养条件及植株自身调节能力得到逆转, 若此时环境继续恶化, 或植株自身氧化平衡不能及时得到恢复, 则会造成膜系统、细胞器结构的破坏, 从而影响呼吸代谢、光合作用等机能, 进而加剧ROS自由基的产生及积累, 导致玻璃化的进一步发展, 症状加剧, 且难以逆转。因此, 在培养早期减少组培苗水分的吸收及积累, 提高

植株本身抗氧化能力及避免培养环境的剧烈变化可能是预防玻璃化发生及玻璃化苗恢复的关键。

### 参考文献

- 蔡庆生主编(2013). 植物生理学实验. 北京: 中国农业大学出版社
- 苍晶主编(2013). 植物生理学实验教程. 北京: 高等教育出版社
- 陈兵先, 黄宝灵, 吕成群, 杨来安, 陈文军, 任苓, 王劲松(2011). 植物组织培养试管苗玻璃化现象研究进展. 林业科技开发, 25 (1): 1~5
- 程云清, 刘剑锋, 刘春明, 邹振峰, 王淑范(2012). 中国石竹离体快繁与试管苗玻璃化研究. 广西植物, 32 (4): 531~535
- 黄明(2013). 刺梨高含量抗坏血酸积累的分子机理研究[博士论文]. 武汉: 华中农业大学
- 刘雪超, 齐红岩, 陈岩, 华利静(2011). AgNO<sub>3</sub>对网纹甜瓜试管苗糖代谢及抗氧化酶活性的响. 植物生理学报, 47 (3): 286~292
- 卢兴霞, 柴慈江, 张婷, 史燕山, 骆建霞(2014). 枸杞试管苗玻璃化影响因素的研究. 北方园艺, (18): 103~106
- 吕敏, 夏秀英, 徐品三, 李波, 郭照东(2014). 蓝莓玻璃化试管苗的显微结构及生理生化特性变化. 植物生理学报, 50 (4): 453~460
- 马晓菲, 张家菁, 于元杰(2013). 防风(*Saposhnikovia divaricata*)组织培养中的玻璃化现象研究. 分子植物育种, 11 (3): 421~430
- 张琳, 蒋芳玲, 熊超超, 孙萍萍, 靳慧卿, 田洁, 吴震(2011). 外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下大蒜试管苗活性氧代谢的变化及对AsA的响应. 园艺学报, 38 (9): 1707~1716
- 张天翔, 林宗铿, 蔡坤秀, 杨俊杰, 曹明华(2013). 芦笋组织培养中玻璃化苗逆转的初步研究. 中国农学通报, 29 (25): 93~96
- Apóstolo NM, Llorente BE (2000). Anatomy of normal and hyperhydric leaves and shoots of *in vitro* grown *Simmondsia chinensis* (Link) Schn. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 36 (4): 243~249
- Asada K (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol*, 50 (1): 601~639
- Chakrabarty D, Park SY, Ali MB, Shin S, Peak K (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol*, 26 (3): 377~388
- Dalton FN, Maggio A, Piccinni G (1997). Effect of root temperature on plant response functions for tomato: comparison of static and dynamic salinity stress indices. *Plant Soil*, 192 (2): 307~319
- Foyer CH, Noctor G (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ*, 28 (8): 1056~1071
- Gribble K, Tingle J, Sarafis V, Heaton A, Holford P (1998). Position of water in vitrified plants visualized by NMR imaging. *Protoplasma*, 201 (1~2): 110~114
- Guan L-M, Zhao J, Scandalios JG (2000). *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J*, 22 (2): 87~95
- Ivanova M, Van Staden J (2009). Nitrogen source, concentration, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Org*, 99 (2): 167~174
- Jaspers P, Kangasjarvi J (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant*, 138 (4): 405~413
- Jausoro V, Llorente BE, Apóstolo NM (2010). Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC) Mattos (Bignoniaceae). *Plant Cell Tiss Org*, 101 (2): 183~191
- Knörzer OC, Burner J, Boger P (1996). Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiol Plant*, 97 (2): 388~396
- Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R, Picardi LA (2003). Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell Tiss Org*, 72 (1): 99~103
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236 (3): 765~779
- Olmos E, Hellin E (1998). Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. *Sci Hortic*, 75 (1): 91~101
- Olmos E, Piqueras A, Martínez-Solano JR, Hellin E (1997). The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydric leaves of regenerated carnation plants. *Plant Sci*, 130 (1): 97~105
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G (2009). Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol*, 9 (1): 28~45
- Rojas-Martinez L, Visser RG, de Klerk GJM (2010). The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propag Ornament Plants*, 10 (4): 169~175
- Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol Plant*, 120 (1): 152~161
- Sen A, Alikamanoglu S (2013). Antioxidant enzyme activities, malondialdehyde, and total phenolic content of PEG-induced hyperhydric leaves in sugar beet tissue cultured. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 49 (4): 396~404
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Neelwarne B (2009). Hyperhydricity

- ty-related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). *J Plant Growth Regul*, 28 (1): 46~57
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 35 (2): 259~270
- Terry ME, Bonner BA (1980). An examination of centrifugation as a method of extracting an extracellular solution from peas, and its use for the study of indoleacetic acid-induced growth. *Plant Physiol*, 66 (2): 321~325
- Tian J, Jiang F, Wu Z (2015). The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org*, 120 (2): 571~584
- van den Dries N, Gianni S, Czerednik A, Krens FA, de Klerk GJM (2013). Flooding of the apoplast is a key factor in the development of hyperhydricity. *J Exp Bot*, 64 (16): 5221~5230
- Wang Y-L, Wang X-D, Zhao B, Wang Y-C (2007). Reduction of hyperhydricity in the culture of *Lepidium meyenii* shoots by the addition of rare earth elements. *Plant Growth Regul*, 52 (2): 151~159
- Wu Z, Chen L-J, Long Y-J (2009). Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 45 (4): 483~490
- Yadav MK, Gaur AK, Garg GK (2003). Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell Tiss Org*, 72 (2): 153~156
- Zhang L, Xiao S-S, Li W-Q, Feng W, Juan Li J, Wu Z-D, Gao X-W, Liu F-Q, Shao M (2011). Overexpression of a Harpin-encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance. *J Exp Bot*, 62 (12): 4229~4238