

外源抗氧化剂对春石斛类原球茎超低温保存的影响

狄玮, 贾梦雪, 刘燕*

花卉种质创新与分子育种北京市重点实验室, 国家花卉工程技术研究中心, 城乡生态环境北京实验室, 北京林业大学园林学院, 北京100083

摘要: 为探讨外源抗氧化剂对春石斛类原球茎(PLBs)超低温保存中氧化应激的缓解效应, 以春石斛‘红梦幻’ PLBs为试材, 在玻璃化法超低温保存程序的不同环节导入3种不同浓度外源抗氧化剂, 检测其对PLBs冻后存活率的影响, 在此基础上分析最佳抗氧化剂介入实验体系中氧化应激相关指标的变化。结果显示, 在装载、PVS2处理和去装载时导入不同浓度的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)对PLBs冻后存活率影响差异大, 均以去装载时导入效果最好。其中SOD导入最佳浓度为 $600 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 存活率提高了5.76%, 但对氧化应激相关指标均无显著影响。CAT导入最佳浓度为 $400 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 存活率提高了33.49%, 显著降低过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)含量, 提高抗坏血酸(AsA)含量。在预培养、装载、PVS2处理和去装载时导入不同浓度的AsA均可提高PLBs冻后存活率, 以去装载时导入效果最好, 最佳浓度为 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 存活率提高了14.34%, 显著降低了超氧阴离子(O_2^-)产生速率和MDA含量, 提高了SOD活性。结果表明, 3种外源抗氧化剂对PLBs冻后存活率相对提高效果依次为 $\text{CAT}>\text{AsA}>\text{SOD}$ 。

关键词: 春石斛; 类原球茎; 存活率; 抗氧化剂; 氧化应激

Effects of Exogenous Antioxidants on Cryopreservation of Protocorm-Like Bodies of *Dendrobium nobile*

DI Wei, JIA Meng-Xue, LIU Yan*

College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing Key Laboratory of Ornamental Plants Germplasm Innovation & Molecular Breeding, National Engineering Research Center for Floriculture, Beijing Laboratory of Urban and Rural Ecological Environment, Beijing 100083, China

Abstract: The aim was to explore the alleviating effects of oxidative stress in cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium nobile* by importing exogenous antioxidants. PLBs of *Dendrobium nobile* ‘Hamana Lake Dream’ were used as materials for cryopreservation by vitrification, in which were added three kinds of different concentrations of exogenous antioxidants to investigate the effects on the survival rates, the best antioxidants-applied experiment systems were established respectively to research the changes of oxidative stress related indexes. The results showed that the impact on survival rates of cryopreserved PLBs were suffered a big difference by adding different concentrations of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) to the loading, PVS2-treated and unloading stage. However, both for adding in the unloading stage were the best, In this stage, adding $600 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ SOD had the best effects, improved the survival rates of 5.76%, but all oxidative stress related indexes did not make a big difference. Adding $400 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ CAT had the best effects, improved the survival rates of 33.49%, the contents of hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonaldehyde (MDA) decreased, and the contents of ascorbic acid (AsA) increased significantly. Adding different concentrations of AsA in the preculture, loading, PVS2-treated and unloading stages all could improve survival rates of cryopreserved PLBs. The best concentrations was $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ in the unloading stage, improved the survival rates of 14.34%, the contents of O_2^- (superoxide anion) production rate and MDA decreased significantly, and the activity of SOD increased significantly. The results indicated that the effects of three kinds of exogenous antioxidants on survival rates of cryopreserved PLBs were $\text{CAT}>\text{AsA}>\text{SOD}$ in order.

Key words: *Dendrobium nobile*; PLBs; survival rates; antioxidants; oxidative stress

超低温保存是一种长期、稳定、低成本保存种质资源的重要手段, 已用于众多植物的成功保存, 但仍有部分种质冻后无法成活或存活率较低,

收稿 2015-06-19 修定 2015-09-06

资助 国家自然科学基金(31370693)。

* 通讯作者(E-mail: chblyan@163.com; Tel: 010-62336062)。

其原因是保存过程中低温、脱水、冷冻-解冻等逆境对植物造成了一系列胁迫和损伤(陈晓玲等2013)。其中氧化损伤被证明是影响超低温保存效果的重要原因之一(Tatone等2010)。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指具有较高化学反应活性的氧的几种代谢产物,包括 O_2^- 、羟自由基($\cdot OH$)、 H_2O_2 等,研究表明逆境下ROS过度产生与抗氧化防御机制减弱之间的失衡是引起的脂质、蛋白质和核酸等大分子物质氧化损伤根本原因(Mittler等2004; 徐瑾等2013)。因此施用外源抗氧化剂以保护机体免受氧化伤害在超低温保存中得到了一定的发展。在植物超低温保存中,非酶类抗氧化剂如外源抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)和维生素E、硫酸锌、甜菜碱、谷胱甘肽、聚乙烯吡咯烷酮等均有效提高了部分种质的冻后存活率和再生率(Uchendu等2010a, 2010b)。而酶类抗氧化剂,如过氧化氢酶(catalase, CAT)(Fernández-Santos等2009)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Thuwanut等2010)等在人类或动物精子的超低温保存中被证明可有效降低ROS生成量,减少氧化应激的发生,提高精子活力,但在植物材料的超低温保存中未见报道。本研究以春石斛‘红梦幻’ PLBs为试材,在玻璃化超低温保存程序的几个关键环节导入不同浓度酶类和非酶类抗氧化剂,探讨外源抗氧化剂对春石斛超低温保存PLBs冻后存活率的影响,进一步分析其对氧化应激的缓解效应,为抗氧化剂在超低温保存中的应用提供依据。

材料与方法

1 试验材料

供试品种为春石斛‘红梦幻’(*Dendrobium nobile* Lindl. ‘Hamana Lake Dream’)。PLBs由高2~3 cm的组培苗茎尖在 $1/2MS+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ TDZ}+2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白的培养基诱导获得,并于 $1/2MS+2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白的培养基中进行继代培养,诱导和继代均在 $(23\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$,光照强度 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的条件下进行,每4周继代一次(贾梦雪等2013),取生长旺盛的PLBs用于超低温保存试验。

2 试验处理

试验采用前期筛选出的春石斛最佳玻璃化超

低温保存程序,步骤如下:(1)预培养:取直径2~3 mm PLBs接种于 $1/2MS+0.3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的固体培养基,4 $^\circ\text{C}$ 黑暗条件下冷锻炼2 d;(2)装载:将预培养后的PLBs放入含装载溶液[$2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙三醇+ $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH=5.8]的PCR管中,室温处理40 min;(3)PVS2处理:0 $^\circ\text{C}$ 下,PVS2溶液[30% (W/V)丙三醇+15% (W/V)乙二醇+15% (W/V)二甲基亚砷+ $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH=5.8]处理40 min;(4)冻存:更换PVS2溶液,将装有PVS2溶液和材料的PCR管迅速投入液氮,冻存至少1 h;(5)解冻:37 $^\circ\text{C}$ 水浴中迅速化冻40 s;(6)去装载:去装载溶液[$1/2MS+1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH=5.8]室温下震荡洗涤PLBs 2次,每次10 min;(7)再生培养:PLBs用无菌滤纸吸干洗涤液,接入 $1/2MS+2.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白+ $3.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭的固体培养基,黑暗培养7 d,弱光(光照强度约为 $3.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)培养3周,正常光(光照强度约为 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)下继续培养,室温(23 ± 2) $^\circ\text{C}$,光照时间 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

分别设置外源SOD浓度(购于美国Sigma公司)为200、400、600和800 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,外源CAT浓度(购于美国Sigma公司)为50、100、200和400 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 导入超低温保存程序中的装载、PVS2处理和去装载环节;设置外源AsA浓度(购于北京欣经科生物技术有限公司)为0.1、0.2、0.4和0.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 导入超低温保存程序的预培养、装载、PVS2处理和去装载环节,均以不导入抗氧化剂为对照,统计超低温保存后的存活率,以探究外源抗氧化剂的作用。

通过筛选3种外源抗氧化剂在超低温保存程序中导入的最佳环节和浓度,设置不导入外源抗氧化剂(对照),及外源SOD、CAT、AsA在最佳环节以最适浓度导入的超低温保存程序共4个处理,测定其氧化应激相关指标,以探究外源抗氧化剂对超低温保存中氧化应激发生的缓解效应。

3 试验方法

3.1 PLBs存活率的测定

采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法(Towill和Mazur 1975)检测PLBs存活率,取去装载后的10个2~3 mm PLBs,加入0.8% TTC:0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液=2:1 (V:V)的混合液,室温静置18 h,在485 nm波长下测定吸光度值,每个处理重复3次。PLBs存活率=(处理后PLBs的TTC吸光度值/未处理PLBs的TTC吸光度值) $\times 100\%$ 。

3.2 ROS及氧化应激相关指标

H₂O₂含量采用碘量法(Velikova等2000)测定; O₂⁻产生速率采用脒氨氧化法(王爱国和罗广华1990)测定; MDA采用硫代巴比妥酸法(Heath和Packer 1968)测定; SOD采用氮蓝四唑光还原法测定(李合生2000); CAT采用紫外分光光度计法(Monnet等2006)测定; AsA采用还原铁法(Kampfenkel等1995)测定, 每个处理重复3次。

4 数据处理与分析

采用Microsoft Excel 2010进行数据处理, SPSS Statistics 18.0软件进行方差分析(Duncan新复极差法)。

实验结果

1 外源抗氧化剂对春石斛PLBs玻璃化法超低温保存后存活率的影响

1.1 外源SOD导入对PLBs冻后存活率的影响

在春石斛PLBs超低温保存的装载、PVS2处理和去装载环节分别导入4个浓度的外源SOD。存活率结果(图1)可见, 导入的环节和浓度对PLBs冻后存活率影响差异较大, 在PVS2处理和去装载时导入效果总体好于装载环节, 且在PVS2处理时导入存活率均有提高。装载时导入浓度为100、400和600 U·mL⁻¹时, PLBs存活率较对照均显著降低, 而导入浓度为200 U·mL⁻¹时差异不显著。PVS2处理时导入浓度为100 U·mL⁻¹时, PLBs存活率较对照显著提高4.4%, 其他处理均有提高但差异不显著。

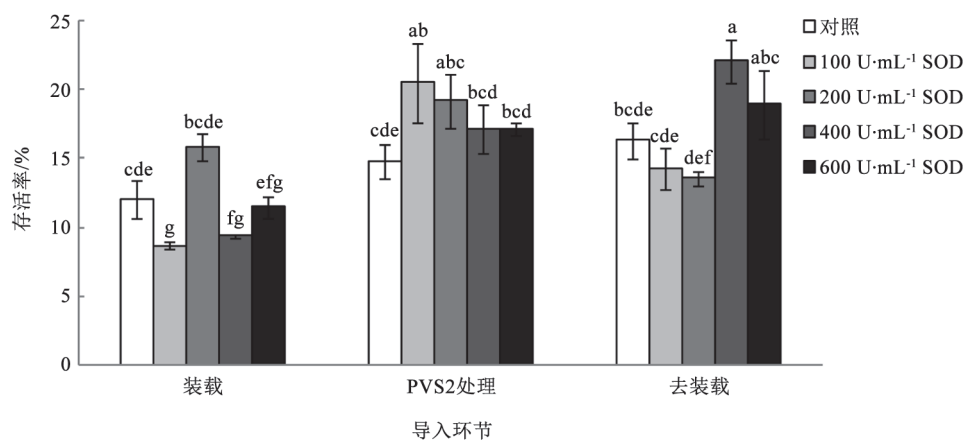


图1 在超低温保存不同环节导入外源SOD对PLBs冻后存活率的影响

Fig.1 Effects of exogenous SOD in different stages of cryopreservation on survival rates of cryopreserved PLBs
不同小写字母表示不同处理间在0.05水平存在显著性差异; 下图同此。

著。去装载时导入浓度为400 U·mL⁻¹时, PLBs存活率较对照显著提高5.76%, 且达到最高值(22.09%), 其他处理稍有提高或降低但差异均不显著。因此, 在PVS2处理时导入100 U·mL⁻¹和去装载时导入400 U·mL⁻¹的外源SOD可能起到一定抗氧化保护作用, 提高了PLBs冻后存活率, 但提高幅度均较小。

1.2 外源CAT导入对PLBs冻后存活率的影响

在春石斛PLBs超低温保存的装载、PVS2处理和去装载环节分别导入4个浓度的外源CAT。存活率结果(图2)可见, 在装载和PVS2处理时导入不同浓度的CAT, 除PVS2处理浓度为400 U·mL⁻¹外, PLBs存活率较对照均无显著提高。在去装载时导入200和400 U·mL⁻¹的CAT, PLBs存活率较对照分别显著提高5.77%和33.49%, 最高存活率达50.76%。因此, 在去装载时导入较高浓度的外源CAT可有效发挥抗氧化保护作用, 大幅提高PLBs冻后存活率(导入浓度大于400 U·mL⁻¹时较400 U·mL⁻¹时的冻后存活率差异不显著, 数据未列出)。

1.3 外源AsA导入对PLBs冻后存活率的影响

在春石斛PLBs超低温保存的预培养、装载、PVS2处理和去装载环节分别导入4个浓度的外源AsA。存活率结果(图3)可见, 在预培养、装载、PVS2处理和去装载时导入不同浓度AsA均可提高PLBs冻后存活率, 但在去装载时导入效果最佳, 预培养和装载时次之, PVS2处理时效果最差。预培养环节导入浓度为0.2、0.4和0.6 mmol·L⁻¹时, PLBs存活率较对照分别显著提高6.80%、11.97%和

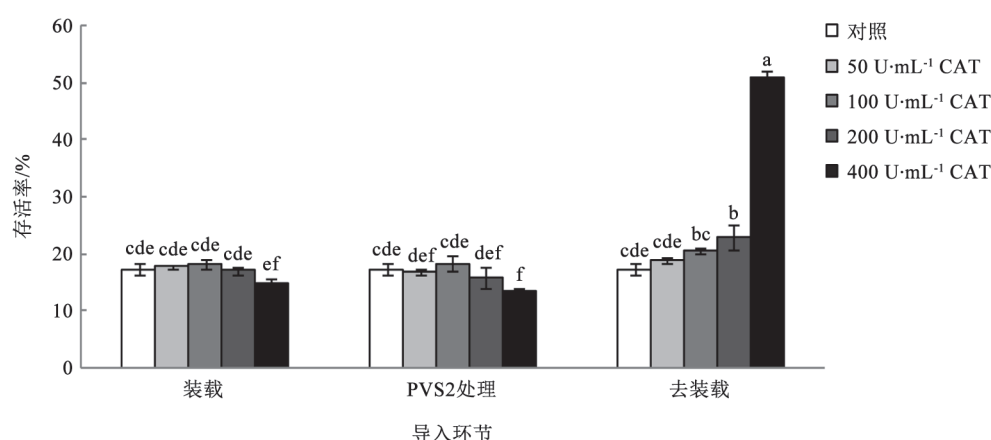


图2 在超低温保存不同环节导入外源CAT对PLBs冻后存活率的影响

Fig.2 Effects of exogenous CAT in different stages of cryopreservation on survival rates of cryopreserved PLBs

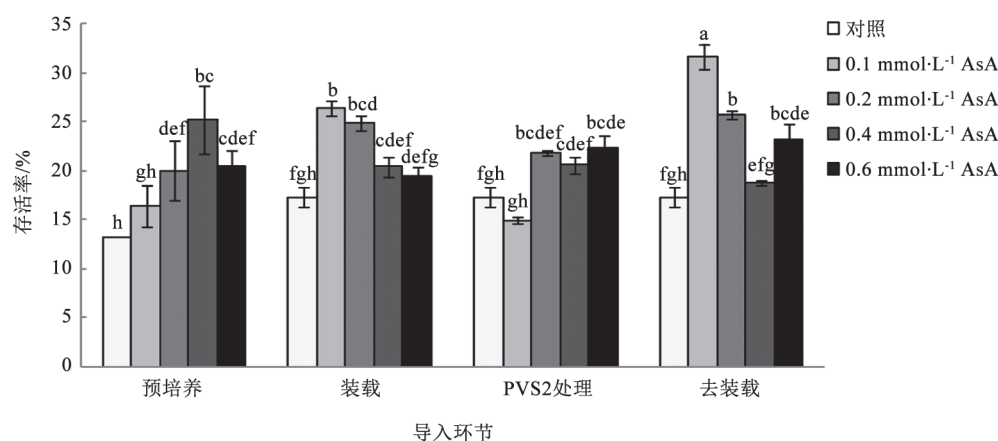


图3 在超低温保存不同环节导入外源AsA对PLBs冻后存活率的影响

Fig.3 Effects of exogenous AsA in different stages of cryopreservation on survival rates of cryopreserved PLBs

7.22%。装载环节导入浓度为0.1和0.2 mmol·L⁻¹时, PLBs存活率较对照分别显著提高9.08%和7.55%, 其他处理差异不显著。PVS2处理环节导入浓度为0.6 mmol·L⁻¹时, PLBs存活率较对照显著提高5.13%, 其他处理差异不显著。去装载环节导入浓度为0.1、0.2和0.6 mmol·L⁻¹时, PLBs存活率较对照分别显著提高14.34%、7.79%和5.91%, 且浓度为0.1 mmol·L⁻¹时, 达到最高值(31.61%)。因此, 在玻璃化超低温保存的各环节导入外源AsA均可发挥抗氧化保护作用, 并不同程度提高PLBs冻后存活率。

2 外源抗氧化剂对春石斛PLBs玻璃化法超低温保存中氧化应激的影响

2.1 导入外源抗氧化剂对ROS与MDA的影响

ROS中的O₂⁻主要参与启动膜脂过氧化和膜脂脱脂作用, 从而破坏膜结构; H₂O₂不是自由基, 但

是由于具有强氧化性, 也是可以造成氧毒害的ROS之一。MDA作为膜脂过氧化的最终分解产物, 其含量的高低一定程度上可代表膜受损伤的程度(李晶等2000)。

由前部分研究结果可知, 3种外源抗氧化剂均在去装载时导入效果最好, 采用最佳效果的浓度, 即600 U·mL⁻¹ SOD、400 U·mL⁻¹ CAT和0.1 mmol·L⁻¹ AsA, 探究其对超低温保存中ROS与MDA的影响。结果(图4)可见, 与对照相比, 去装载时导入SOD时, PLBs的O₂⁻产生速率、H₂O₂及MDA含量均无显著变化; 导入CAT时, PLBs的O₂⁻产生速率无显著变化, H₂O₂及MDA含量均显著降低; 导入AsA时, PLBs的O₂⁻产生速率和MDA含量均显著降低, H₂O₂含量无显著变化。可以看出, 去装载时导入CAT和AsA均可降低膜脂过氧化的程度, 但两者分

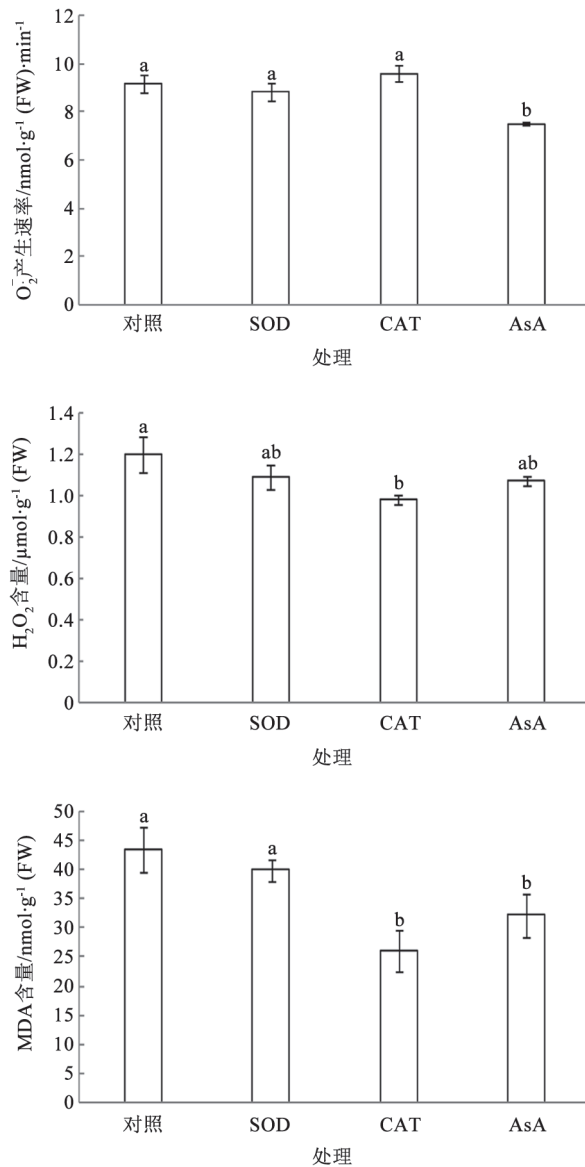


图4 去装载时导入最佳浓度的不同抗氧化剂对 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量及MDA含量的影响

Fig.4 Effects of optimum concentration of different antioxidants on O_2^- generation rate, H_2O_2 and MDA contents in the unloading stage

对照: 不导入外源抗氧化剂; SOD: 导入 $600 U \cdot mL^{-1}$ 外源SOD; CAT: 导入 $400 U \cdot mL^{-1}$ 外源CAT; AsA: 导入 $0.1 mmol \cdot L^{-1}$ 外源AsA。下图同此。

别是通过减少 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率而起作用的; 导入外源SOD对氧化伤害未起到显著的保护作用。

2.2 导入外源抗氧化剂对抗氧化酶与非酶物质的影响

植物体内ROS的清除主要包括酶促和非酶促两条途径, 其中抗氧化酶类SOD和CAT及非酶类抗

氧化物AsA在抵御ROS伤害中发挥着重要的作用(李秀等2014)。在去装载时分别导入3种最佳浓度的抗氧化剂, 测定其对超低温保存中抗氧化酶与非酶物质的影响。结果(图5)可见, 与对照相比, 去装载时导入SOD显著提高体内SOD的活性, 对CAT活性和AsA含量均无显著影响; 导入CAT时显著提高体内CAT活性和AsA含量, SOD活性无显著变化; 导入AsA显著提高SOD活性和体内AsA含量, 对CAT活性无影响。可以看出, 导入SOD只提高体内

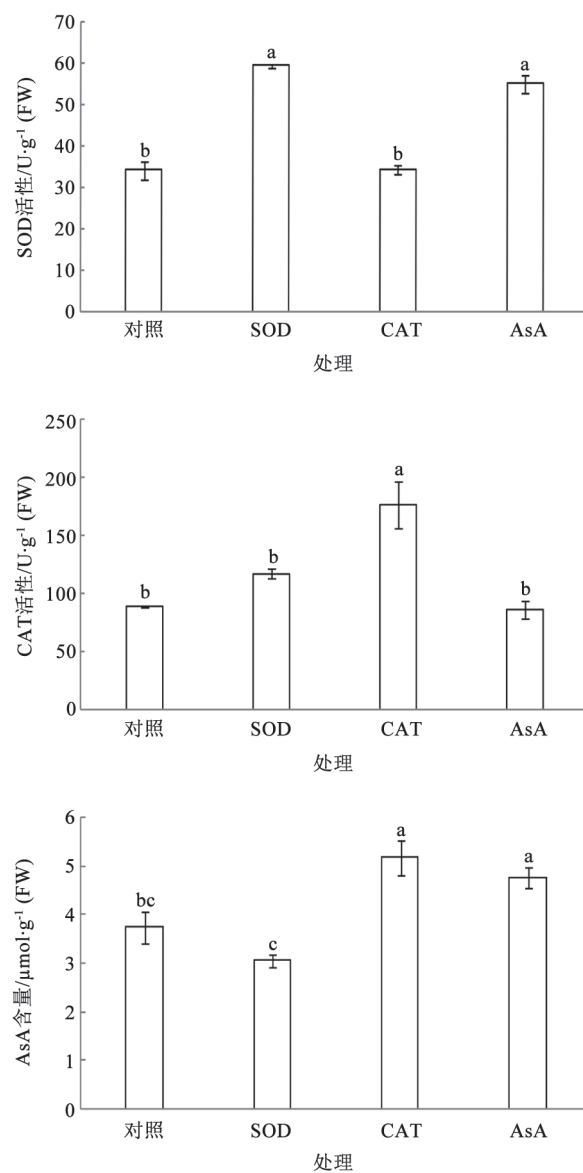


图5 去装载时导入最佳浓度的不同抗氧化剂对SOD、CAT和AsA影响

Fig.5 Effects of the optimum concentrations of different antioxidants on SOD, CAT and AsA in the unloading stage

SOD的活性, 而导入CAT和AsA不仅可提高体内同类物质的活性或含量, 还可分别促进AsA和SOD的提高。

讨 论

逆境下ROS过量产生时, 细胞处于生理应激状态, 自身的抗氧化系统如SOD、CAT、POD等酶类以及AsA、GSH等非酶类会协同作用抵抗ROS可能带来的伤害, 但当细胞抗氧化能力不足以清除过量ROS时, 就会阻碍细胞正常的生理进程, 导致持久伤害。这就启发研究者们通过导入外源抗氧化剂以防御氧化伤害, 在人类和动物精液、胚胎和卵母细胞的超低温保存中导入外源SOD和CAT对维持细胞活力, 抑制氧化应激的作用已经得到证实(Luz等2011)。外源AsA也广泛用于动植物超低温保存中, 可减轻膜脂过氧化发生, 保护膜的完整性(Almeida等2014)。本研究结果也显示, 外源SOD、CAT和AsA 3种抗氧化剂在春石斛‘红梦幻’ PLBs超低温保存中起到了提高冻后存活率的效果, 且均在去装载时导入效果最佳, 这与前期实验得到的在解冻-去装载阶段ROS过量产生与抗氧化系统下降导致了氧化应激发生的结果相吻合, 说明外源抗氧化剂在去装载时可能抑制了ROS造成的氧化伤害。3种外源抗氧化剂对春石斛PLBs冻后存活率的相对提高效果依次为: CAT>AsA>SOD, 认为高浓度CAT对抑制氧化应激的发生更有效, 这与Shohael等(2006)的研究结果相似。

进一步通过ROS、MDA和抗氧化系统综合分析3种抗氧化剂缓解氧化应激发生的可能机制。SOD作为酶促清除系统的第一道防线, 主要负责歧化 O_2 生成 H_2O_2 , 在抗氧化酶类中处于核心地位(Calatayud和Barreno 2001)。去装载环节导入 $600 U \cdot mL^{-1}$ SOD时, PLBs存活率仅提高了5.76%, 且只显著提高了体内SOD本身的活性, 对氧化应激其他指标均未产生显著影响, 这与前人研究结果不一致(Thuwanut等2010), 可能是外源SOD不能有效地参与到细胞的氧化还原反应中。CAT是植物体内清除 H_2O_2 的主要酶类之一(Hernández等2001)。去装载时导入 $400 U \cdot mL^{-1}$ CAT显著降低了 H_2O_2 和MDA的含量, 对 O_2 产生速率无显著影响, 表明外源CAT特异性地清除了 H_2O_2 , 减轻膜脂过氧化程度,

极大提高冻后存活率。此外, Mukherjee和Choudhuri (1983)提出抗氧化剂可调节受胁迫组织中内源 H_2O_2 和AsA水平, 从而提高植物耐受性, 本研究也发现外源CAT会导致AsA含量的升高, 说明CAT除抑制 H_2O_2 的氧化伤害, 还可维持AsA调节氧化还原平衡的能力, 两者共同参与 H_2O_2 的清除过程。AsA在生物体中可直接同ROS反应, 将其还原; 还可作为酶的底物在ROS清除中发挥重要作用(许丙军等2006)。去装载时导入 $0.1 mmol \cdot L^{-1}$ AsA显著降低了 O_2 产生速率, 减轻了膜脂过氧化程度, 但是对冻后存活率提高效果较外源CAT稍差, 可能是外源AsA对 H_2O_2 的清除作用较小, 一定程度上说明了 H_2O_2 比 O_2 更容易引起膜脂过氧化发生, 但 O_2 存在时, H_2O_2 可能反应生成活性更高的 $\cdot OH$, 对细胞造成更严重的损伤(Poobathy等2013)。此外, 外源AsA也引起了SOD活性升高, 可能是 O_2 产生速率下降的原因之一, 这种现象在其他外源AsA导入实验中也有发现(马文涛等2002; 郑启伟等2006), 但是其机理目前还不清楚。

综上所述, 在春石斛‘红梦幻’ PLBs玻璃化法超低温保存中的导入不同浓度SOD、CAT和AsA可不同程度地影响冻后存活率, 但均在去装载时导入效果最好, 最佳导入浓度分别为 $600 U \cdot mL^{-1}$ 、 $400 U \cdot mL^{-1}$ 和 $0.1 mmol \cdot L^{-1}$, 且对春石斛PLBs冻后存活率提高效果依次为: CAT>AsA>SOD。在去装载时导入 $400 U \cdot mL^{-1}$ CAT和 $0.1 mmol \cdot L^{-1}$ AsA可提高体内抗氧化酶或非酶等物质的含量, 并分别抑制 H_2O_2 和 O_2 的产生, 减轻膜脂过氧化程度, 提高PLBs冻后存活率。

参考文献

- 陈晓玲, 张金梅, 辛霞, 黄斌, 卢新雄(2013). 植物种质资源超低温保存现状及其研究进展. 植物遗传资源学报, 14 (3): 414-427
- 贾梦雪, 徐瑾, 叶香娟, 刘芊, 王喆, 刘燕(2013). 春石斛优良品种‘森禾2006’组培快繁体系的建立. 植物生理学报, 49 (12): 1363-1367
- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 167-169
- 李晶, 阎秀峰, 祖元刚(2000). 低温胁迫下红松幼苗活性氧的产生及保护酶的变化. 植物学报, 42 (2): 148-152
- 李秀, 巩彪, 徐坤(2014). 外源NO对高温胁迫下姜叶片活性氧代谢的影响. 园艺学报, 41 (2): 277-284
- 马文涛, 杨来启, 杨喜民, 王晓峰, 李淑艳, 张彦, 吴兴曲, 刘光雄(2002). 维生素C对应激大鼠脑内超氧化物歧化酶含量的影

- 响. 中国心理卫生杂志, 16 (12): 809~810
- 王爱国, 罗广华(1990). 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 6: 55~57
- 许丙军, 施国新, 徐勤松, 王学, 赵娟, 胡金朝(2006). 外源抗坏血酸对镉胁迫下黑藻抗氧化系统的保护作用. 应用生态学报, 17 (9): 1768~1770
- 徐瑾, 刘芊, 李秉玲, 刘燕(2013). 超低温保存中的氧化应激和细胞凋亡. 中国细胞生物学学报, 35 (4): 543~548
- 郑启伟, 王效科, 谢居清, 冯兆忠, 冯宗炜, 倪雄伟, 欧阳志云(2006). 外源抗坏血酸对臭氧胁迫下水稻叶片膜保护系统的影响. 生态学报, 26 (4): 1131~1137
- Almeida RD, Zervoudakis LKH, Duarte Junior MF, Zervoudakis JT, Nichi M, Senra e Silva LE, Tsuneda PP, Wingert FM, Fraga ALCR, Lemos APG et al (2013). Oxidative stress and membrane integrity of cryopreserved spermatozoa with vitamin C. *Reprod Fert Develop*, 26 (1): 226
- Calatayud A, Barreno E (2001). Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environ Pollut*, 115 (2): 283~289
- Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Garde JJ, Martínez-Pastor F (2009). Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *Int J Androl*, 32 (4): 353~359
- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125 (1): 189~198
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barcelóand AR, Sevilla F (2001). Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol*, 127 (3): 817~831
- Kampfenkel K, Montagu MV, Inze D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem*, 225 (1): 165~167
- Luz HKM, Wanderley LS, Faustino LR, da Silva CMG, de Figueiredo JR, Rodrigues A (2011). Role of antioxidants agents in germ cells and embryos cryopreservation. *Acta Sci Vet*, 39 (2): 956
- Towill LE, Mazur P (1975). Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Can J Bot*, 53 (11): 1097~1102
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Plant Sci*, 9 (10): 490~498
- Monnet F, Bordas F, Deluchat V, Baudu M (2006). Toxicity of copper excess on the lichen *Dermatocarpon luridum*: antioxidant enzyme activities. *Chemosphere*, 65 (10): 1806~1813
- Mukherjee SP, Choudhuri MA (1983). Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plant*, 58 (2): 166~170
- Poobathy R, Sinniah UR, Xavier R, Subramaniam S (2013). Catalase and superoxide dismutase activities and the total protein content of protocorm-like bodies of *Dendrobium Sonia-28* subjected to vitrification. *Appl Biochem Biotech*, 170 (5): 1066~1079
- Shohael AM, Chakrabarty D, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY (2006). Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus sessiliflorus* in response to sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochem*, 41 (3): 512~518
- Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini PG (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol*, 26 (8): 563~567
- Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, Bergqvist AS, Söderquist L, Axné E (2010). Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology*, 73 (8): 1076~1087
- Uchendu EE, Leonard SW, Traber MG, Reed BM (2010a). Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Rep*, 29 (1): 25~35
- Uchendu EE, Muminova M, Gupta S, Reed BM (2010b). Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. *In Vitro Cell Dev-Pl. Plant*, 46 (4): 386~393
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants - protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci*, 151 (1): 59~66