

## 铜对紫背浮萍的影响

李红敬<sup>1</sup>, 谢素霞<sup>1</sup>, 李天煜<sup>2\*</sup>

(1. 信阳师范学院生物系, 河南信阳 464000; 2. 武汉大学环境科学系, 湖北武昌 430072)

**摘要:** 利用紫萍(*Spirodela polyrhiza*)作材料, 在实验室条件下研究了增加铜对紫萍生长、光合作用色素含量、叶绿素 a 荧光的产生和植物体内铜累积的影响。结果表明, 环境中增加  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  d 的  $\text{Cu}^{2+}$  时即可显著地抑制紫萍的生长(用鲜重和干重表示), 随增加的铜的量加大, 对生长的抑制作用增加, 鲜重在  $8 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  时, 干重在  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  以上时出现负增长; 铜水平的升高可使叶绿素含量大幅下降, 但对类胡萝卜素的含量影响不大; 对叶绿素 a 荧光的产生也有影响, 短时间的处理(24 h 内)使  $F_0$  和  $F_m$  升高, 但  $F_v/F_m$  变化很小, 随着处理时间的延长和处理浓度的增加,  $F_0$  和  $F_m$  下降至很低水平, 特别是  $F_m$  下降更快, 以至  $F_v/F_m$  可能出现负值, 表明光合作用器官已受到破坏; 当铜处理水平增加时植物体内的铜含量水平也增加, 表明其对铜有一定的累积作用, 但因为高铜浓度水平下植物的生物量显著下降, 因而从植物修复的角度考虑, 在中等或微量铜污染的情况下, 才能选择适宜来源的紫萍用于进行铜污染环境的植物修复。

**关键词:** 紫萍; 铜; 叶绿素 a 荧光; 色素含量; 毒性评价; 植物修复

**中图分类号:** X171.5    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-3142(2003)04-0362-05

## Effects of enriched-copper on *Spirodela polyrhiza*

LI Hong-jing<sup>1</sup>, XIE Su-xia<sup>1</sup>, LI Tian-yu<sup>2\*</sup>

(1. Department of Biology, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China; 2. Department of Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** The effects of copper on growth, pigment content, chlorophyll a fluorescence and Cu accumulation in tissue of *Spirodela polyrhiza* were conducted. The results showed that copper could depress the growth adversely on both fresh weight and dry weight basis. And the fresh weight would be negative growth in medium of copper-added at  $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , the dry weight at  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; the content of chlorophyll decreased greatly, but not the carotenoid; to chlorophyll a fluorescence, in first 24 h, copper made the  $F_0$  and  $F_m$  bigger, but not  $F_v/F_m$ , then  $F_0$  and  $F_m$  reduced to very low, specially  $F_m$ , so as to  $F_v/F_m$  would be negative value, which demonstrated the photosynthesis apparatus had been damaged; copper content in tissue increased with the concentration of copper-added in medium, so the accumulation of copper happened. Because of biomass growth being very little at high copper concentration addition, so it is only available that using *Spirodela polyrhiza* to restore the environment polluted by low concentration copper.

**Key words:** *Spirodela polyrhiza*; copper; fluorescence of chlorophyll a; pigment content; phytotoxicity assessment; phytoremediation

铜是植物必需的微量元素之一, 是多种氧化酶活性的核心, 参与电子的接受与传递, 在植物体内的

氧化还原反应中起重要作用, 与叶绿素的形成以及碳水化合物、蛋白质的合成有密切关系, 还能提高植

收稿日期: 2003-03-25    修订日期: 2003-04-28

作者简介: 李红敬(1967-), 男, 河南新野人, 讲师, 生物学专业, 从事生物学教学和研究工作。\* 为通讯联系人

物的呼吸强度。但铜过量也会造成很多不利影响,如生长不良、主根不能伸长、褪绿,严重时甚至整株植物枯死(Flemming 和 Trevors,1989)。由于铜在地壳中为丰度较高的元素,并且随着经济的发展,对铜的需求量上升,导致铜的开采、冶炼、加工等生产活动以及肥料、杀生剂和排放污泥的使用等也有较大增加,人类这些活动无疑都会引起一些局部环境中铜水平的异常升高,甚至在个别地方造成铜污染,使水体也受到了直接或间接的影响。虽然研究结果已表明铜对哺乳动物是相对无毒性的,但对于水体中的各种生物来说,它们对铜的敏感性都很高,其对铜的耐性水平比哺乳动物低 10 到 1 000 倍,与生物的种类、形态、比表面积、呼吸速率等有密切关系,因此铜经常被用作水体的杀生剂以去除藻类、真菌和软体动物(Maksymiec,1997)。这可能会对很多其它水生生物的生存产生了严重的危害,还会对水生生态系统的结构造成破坏,甚至可能会使一些生态系统崩溃,使一些生物种类从该生境中消失。所以人类不仅要严格控制进入水体中的铜的总量,而且还需要研究各种水生生物对环境中铜含量水平升高的反应,以便于使用敏感的生物种类对水体中的铜水平进行生物监测和评价,以保证生境中的大多数生物种类的安全,并维护整个生态系统的完整安全;利用对铜有耐性的植物去修复被铜污染的水域,这些都成为具有重要意义的研究课题。即使在那些铜含量水平升高的水域,各种生物也不是发生着同样的反应,而是因其各自的特性而对变化了的环境发生着不同的反应。一些敏感的种类或生态型在浓度不太高时可能会在生长发育、生理生化及形态特征上有所反映,随着污染的加重则会因不适应而在该水域消失,那些具有耐性的种类或生态型不仅能够生存下来,有时还会扩大种群,占领空出的生态位,成为优势种群,甚至单优种群,致使群落简单,生态关系单一。也可能有个别对生境中铜水平的升高在表面上没有特殊反应的种类,它们要么可能是对铜具有超蓄积的能力,亦或是一些可以排斥铜进入体内的种类。这些种类在治理铜污染水体时就有极大的实用价值。总之,环境中铜含量水平的升高对植物起了一个筛选作用,会改变一个地区的植物组成和群落结构,对一个地区的生态系统及其功能产生较大影响。为我们进行深入研究既提出了挑战又提供了条件。

紫背浮萍(*Spirodela polyrhiza*),又称紫萍,属

于浮萍科、紫萍属,是一种结构简单的种子植物。该属及同科的浮萍属是在世界很多淡水水域都有分布的漂浮植物,植物体简单、小型化,仅由两部分组成:叶状体和根。叶状体片状,浮于水面,根悬垂于水中。以种子繁殖,但主要以叶状体的克隆生殖扩大种群,尤其是在每年的春、夏初及秋天生长极快,并以春末、夏初为生长高峰,几天即可加倍(库克,1990)。与浮萍属的植物相似,紫萍由于其分布广、生长快、个体小、易实验室培养而常成为生物监测和评价的供选植物种类,特别是在化学品的环境影响评价上进行了深入研究,并成为一些国家进行植物毒性评价和监测的一个必要项目(USEPA,1996; OECD,2002; Walbridge,1977; Lockhart 等,1989; Huebert 和 Shay,1993; Wang,1986),对保护环境质量有较大的帮助。

本研究利用实验室培养的方法,通过测定不同浓度下铜对紫萍生长、光合作用色素(叶绿素 a、b,类胡萝卜素)含量、叶绿素 a 荧光的影响及其铜在紫萍植物体内的累积作用,探讨了铜水平的升高对紫萍产生的效应,为了解其对水体中微量铜污染的去除能力,了解铜的生态效应及对铜进行生物评价、监测提供资料,也评价了其在水体铜污染植物修复中的价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验用的紫萍取自中国科学院武汉植物研究所内的池塘中。将取回的紫萍先用自来水冲洗几次,再用蒸馏水冲洗 3 次,置于 1/20 的 Hoagland 溶液中进行培养,待进行指数生长时,用于进行实验处理。

### 1.2 方 法

1.2.1 铜对紫萍生长的影响 在各装有 250 mL 1/20 Hoagland 溶液的塑料钵中,分别加有 0、0.1、1、2、4、8  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ,各有 5 个重复,每个钵中随机放入 5 个生长正常的紫萍个体(各有 3~4 个叶状体),放入前用吸水纸吸干表面水并称鲜重,另取大小相似的 5 个个体称鲜重后在 60  $^{\circ}\text{C}$  的干燥箱中烘 48 h 至衡重,称干重,利用鲜重与干重比推算每个钵中放入的个体的原始干重。在放入培养 120 h 后收获紫萍个体称鲜重、干重。培养过程中不更换培养液。

1.2.2 铜对光合作用色素含量的影响 在分别装有 1 000 mL 1/20 Hoagland 溶液的塑料盘中,分别加有 0、0.1、1、2、4、8  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$ ,每个钵中随机放入大约 3 g(鲜重)生长正常的紫萍个体(各有 3~4 个叶状体),分别在放入的当天及第六天,即在未染毒培养时和染毒培养 5 d 后,各钵中随机地取 0.5 g(鲜重),用丙酮溶液(体积比为丙酮:水:饱和氨溶液=80:19.5:0.5)在研钵中研磨提取色素。3 500  $\text{r min}^{-1}$  离心 5 min(LD25-Z,北京医用离心机厂),上清液用紫外分光光度计(UV-VIS spectrophotometer, TU-1901,北京普析通用有限责任公司)测定 663、664、647、645、480 nm 处的吸收值(A),色素含量按照 Schopfer(1989)的方法进行计算。其中在第 3 天更换 1 次培养液。

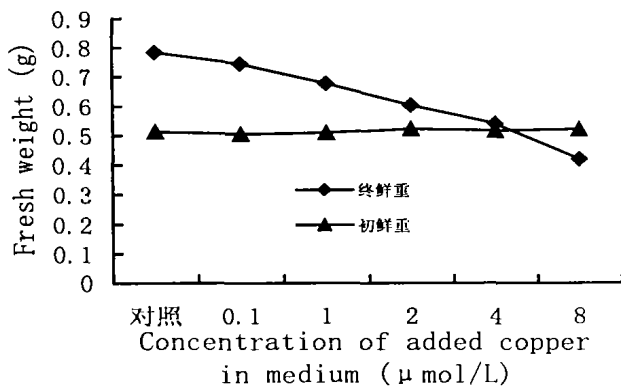


图 1 铜处理 5 d 紫萍鲜重的增长

Fig. 1 Growth of fresh weight exposed to copper-added medium for 5 days

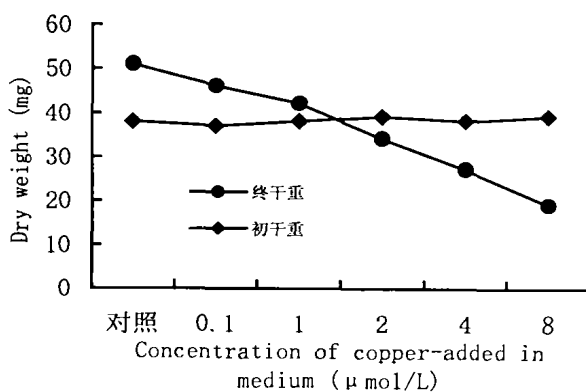


图 2 铜处理 5 d 紫萍干重的增长

Fig. 2 Growth of dry weight exposed to copper-added medium for 5 days

1.2.3 铜对叶绿素 a 荧光的影响 利用 Hansatech

公司(英国)生产的 FMS2 型脉冲调制式荧光测定仪,在上午 10 时,经 20 min 暗适应,测定非胁迫条件下的  $F_m, F_o$ , 计算  $F_v/F_m$ ; 然后利用实验 2 中的材料,分别在处理了 24、72 h 后进行测定铜胁迫条件下的  $F_m, F_o$ , 计算  $F_v/F_m$ 。

1.2.4 铜在植物体内的累积 染毒培养前取 0.5 g(鲜重)的植物体,利用湿法消化的方法,在原子吸收分光光度计上测定铜含量,作为植物体的含铜背景值。然后在分别另加有 0、0.1、1、2、4、8  $\mu\text{g/L}$  铜的 1/20 Hoagland 培养液中培养 120 h 后采用同样的方法测定植物体内的铜含量,比较其对铜的累积效果。培养过程中不更换培养液。每个培养钵(容量约 320 mL)中的培养液为 250 mL,放入的植物体约 0.5 g,每个浓度设 4 个重复。

## 2 结果

### 2.1 铜对紫萍生长的影响

正如图 1 和图 2 表明的那样,环境中铜水平的升高对紫萍的生长有显著抑制作用,不论是对鲜重还是干重都有这种趋势。

与鲜重相比,干重所显示的受铜抑制增长的浓度效应更为明显。干重在铜的增加浓度为 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  就已显示出负增长,但鲜重在增加的铜的浓度为 8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  才出现负增长。而当增加的铜的浓度为 0.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  时,不论是对干重或是鲜重上,增长量与对照相比下降的都很少。说明在这个浓度下,铜对紫萍所表现的是慢性作用。

### 2.2 铜对光合作用色素的作用

当环境中铜含量水平升高较少,例如每升仅增加 0.1  $\mu\text{mol}$  的铜,与对照组相似,经过 5 d 的培养,叶绿素 a、b 的含量都没有发生变化,说明在这个铜水平对光合色素含量还没有产生显著作用。如果增加的铜的浓度在 1  $\mu\text{mol/L}$  以上时,可以使叶绿素 a、b 的含量在处理前后发生很大变化,叶绿素 a、b 的含量与对照组相比减少了 30% 以上。特别是对于叶绿素 a,铜的作用更显著,随着处理浓度的上升,含量下降很快,但下降到一定水平后与铜浓度的关系就不明显了。但环境中铜含量水平的升高对类胡萝卜素的作用不太明显,在培养前后无论是对照和处理组都没有变化。铜对光合作用色素的影响作用的结果列于表 1。

### 2.3 铜对叶绿素 a 荧光产生的影响

铜水平的升高对叶绿素 a 荧光的影响的结果列于表 2。铜对叶绿素 a 荧光产生的影响在于短时间的铜的升高使叶绿素 a 荧光的  $F_o$ 、 $F_m$  值增大,虽然其  $F_v/F$  值的变化并不明显。但随处理时间的延长和处理浓度的升高,叶绿素 a 荧光的  $F_o$  和  $F_m$  都快速下降,尤其是  $F_m$  值下降更快。然而在低浓度铜(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )处理时,其  $F_o$  和  $F_m$  的值下降的很少。

表 1 铜处理后对紫萍光合作用色素含量的影响  
Table 1 Content of pigment after 5 days exposed to enriched-copper medium

色素种类 Pigment	对照 Control	Concentration of copper-added( $\mu\text{mol/L}$ )				
		8	0.1	1	2	4
叶绿素 a	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.036
Chl a	1.05	1.12	0.86	0.61	0.62	0.59
叶绿素 b	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Chl b	0.36	0.34	0.29	0.26	0.24	0.21
类胡萝卜素	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Caro	0.19	0.20	0.22	0.20	0.19	0.20

Note: First number is the content of pigment just before exposed to copper, second number is of exposure to Cu for 5 days.

表 2 铜对叶绿素 a 荧光产生的影响

Table 2 Effect of copper-added in medium on fluorescence emission of chlorophyll a

叶绿素 a 荧光 Fluo. of Chl. a	对照 Control	Concentration of enriched-copper( $\mu\text{mol/L}$ )				
		0.1	1	2	4	8
0 h	—	—	—	—	—	—
$F_o$	332	323	302	301	332	321
$F_m$	1156	1151	1040	993	1162	1165
$F_v/F_m$	0.712	0.719	0.709	0.696	0.714	0.724
24 h	—	—	—	—	—	—
$F_o$	339	370	406	429	469	530
$F_m$	1165	1283	1366	1514	1542	1761
$F_v/F_m$	0.709	0.711	0.716	0.702	0.696	0.699
72 h	—	—	—	—	—	—
$F_o$	309	235	219	184	145	98
$F_m$	1108	835	694	573	297	122
$F_v/F_m$	0.721	0.718	0.684	0.679	0.512	0.197

表 3 紫萍体内的铜含量 (mg/kg 干重)

Table 3 Content of copper in tissue of *Spirodela polyrhiza*

铜含量 Content of Cu	对照 Control	Concentration of copper-added in medium ( $\mu\text{mol/L}$ )				
		0.1	1	2	4	8
Before treated	51.82 $\pm$ 8.34	51.82 $\pm$ 8.34	51.82 $\pm$ 8.34	51.82 $\pm$ 8.34	51.82 $\pm$ 8.34	51.82 $\pm$ 8.34
Treated for 5 days	53.2 $\pm$ 7.8	296.2 $\pm$ 38.4	420.1 $\pm$ 46.3	798.4 $\pm$ 80.6	962.6 $\pm$ 97.5	1 105.7 $\pm$ 103.2

平要更明显和更低一些,表明干重作为生物监测和评价的指标的意义更大。同时由于在高浓度铜处理后,植物不仅不表现出生长,即质量的增长,甚至降低,说明植物已有部分组织被进行了内源性的消化,或有部分老组织已死亡,亦或是一些或全部的个体

### 2.4 铜在紫萍体的累积

培养后铜在植物体内的累积情况见表 3。从表 3 我们可以发现,经过 5 d 的染铜培养,紫萍体内的铜含量水平有大幅增加,而且随浓度的升高铜的累积含量有增加的趋势。

## 3 讨论

### 3.1 铜对紫萍生长的影响

植物的生长是植物最基本的生命活动,特别是对于像紫萍这样的具有快速生长增殖能力的植物,对生长的抑制,是生命活动被抑制的显著标志,在没有其它精密仪器设备的情况下,生长常是进行生物监测和评价的唯一指标。环境中铜水平的升高,对于生活在正常背景中的紫萍来说,作为一个胁迫因素,在低浓度下其抑制作用还不明显,但浓度达到一定水平后,其对生长的抑制作用就很显著,不论是在干重或鲜重上都是如此,并且在本实验的结果中还可以看到,干重与鲜重相比,其受抑制程度和阈值水

已死亡,此时植物体的含水量和含水形式与活体有较大区别,这样在不同处理组之间再进行鲜重的比较可能与实际情况不符。

### 3.2 铜对光合作用色素的作用

光合作用色素的含量水平是植物生长能力大小

的直接表现。低的色素水平说明植物受一些因素的限制,例如营养水平、年龄、季节、胁迫因素等,但若将其移入适宜的生长环境中,光合色素的含量水平应该很快的增长到一个较高的水平,正如实验中要在实验室中培养至对数生长时才能用于实验那样,以便使实验材料处于旺盛生长阶段,这样胁迫作用才能显著地表现出来。在实验中,当加入的铜较少时,如仅  $0.1 \mu\text{mol/L}$  时,色素的含量与对照组相比几乎没有差别,表明还没有产生明显的作用,还未达到出现急性毒害的阈值;但在加入的铜在  $1 \mu\text{mol/L}$  以上时,色素水平在处理前后有明显下降,下降程度可达 30% 以上。但实验也表明铜主要是对叶绿素 a、b 起作用,对类胡萝卜素的影响不明显。

### 3.3 铜对叶绿素 a 荧光产生的影响

叶绿素 a 荧光作为研究光合作用原初过程的有效工具,为人们研究光系统 II 的作用过程发挥了巨大作用。由于其对样品的无破坏性及反应灵敏、测定快速、简便,使得它在植物环境生物学中得到广泛应用,成为研究植物胁迫反应的一个得力手段。通过测定叶绿素 a 荧光就能够直接定量出非光化猝灭组分,而由于非光化学荧光猝灭是控制和调节光合作用的一种非常重要的机制,是它维持着能量转化和能量消耗之间的平衡,外界环境的突然或长期的改变将会干扰这种平衡,植物在它们各自的遗传背景下可能以极不相同的方式重新调节这种平衡(陈贻竹等,1995)。在本研究中,紫萍在外界环境的突然改变时,即铜含量水平的突然升高,在短时间内使  $F_0$ (初始荧光)和  $F_m$ (最大荧光)都上升,维持  $F_v/F_m$  值的基本不变,说明植物的调节机制发挥了作用。但是随着处理时间的延长, $F_0$  和  $F_m$ 、 $F_v/F_m$  值都下降,且  $F_m$  值下降更快。而这种趋势随处理浓度的增加而加强,尽管在加入的铜为  $0.1 \mu\text{mol/L}$  时,这种变化不如浓度高时的显著,但变化还是可以看出。由于在高浓度铜处理时  $F_0$ 、 $F_m$ 、 $F_v/F_m$  值都下降到很低的水平,有时  $F_0$ 、 $F_m$  值已在 50 以下,甚至  $F_0 > F_m$ 、 $F_v/F_m$  为负值,可能是光合作用机构已经遭到破坏,叶绿素 a 已失活造成的。

### 3.4 铜在紫萍体内的累积

实验结果还表明,随着浓度的升高,在紫萍体内的累积有升高的趋势,但由于在高浓度铜处理时,植物的鲜重和干重都趋于快速下降,这样铜在植物内的总积累量并不是在铜处理浓度最高时达到最大。同时,由于在高浓度时部分组织或个体的死亡和分

解,已从环境中吸收或吸附的铜还有可能重新释放回环境中,这样也达不到修复的目的。因此,如果要利用紫萍作为植物修复的材料,就需要通过实验确定一个适当的铜浓度水平才能使用。由于来自于不同生长背景中的植物在遗传上的巨大差异性,因而可能来自于一个高铜背景中的植物对铜有更高的耐性,所以在去除水体中的铜时也许具有更好的效果,这种情况已有过报道(Clark 等,1981)。正因为如此,选择一个理想的、对重金属耐性较高的植物或生态型就成为保证重金属的生物修复效果的基本条件。

利用浮萍评价化学品的毒性已成为许多国家的标准评价方法,这与他们在这方面的众多研究成就是分不开的(Walbridge,1977;Lockhart 等,1989;Huebert 和 Shay,1993;Wang,1986)。这也是发达国家在经受了严重的环境污染之苦,对环境问题进行深思的结果。使得人们在认识上有了极大的深化,不仅各种环保运动开展得如火如荼,而且从立法、行政、技术开发等方面加强了对各种危险化学品的研究和控制,对它们的环境行为和危害,不仅是对人体、饲养的畜禽、水产品的危害,还包括对各种植物的危害机制进行深入研究,以保护环境中的生物的安全和生物多样性,保护生态系统的完整性,维护生态安全。由于植物是生态系统的生产者,是生态系统存在的基础,在维持生态系统的结构和功能,维护生态平衡中具有至关重要的作用,因此在发达国家,植物的毒性评价与其它评价方法一样成为维护生态安全的一道安全阀,在监测和评价化学品毒性,保护环境发挥着重要的作用。我国还没有利用高等植物评价化学品毒性的规定,这既说明我们对这个问题的认识还不够,也表明我们对此问题的研究水平也较低。加强这方面的研究就极为必要。在国外还有利用浮萍进行水体重金属污染修复的专业化公司,说明该技术是经济可行的。本实验研究也表明,可以利用紫萍的一些指标用来评价重金属的毒性,还能用于铜污染的植物修复中。

### 参考文献:

- 库 克. 1990. 世界水生植物[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 147-150.  
Chen YZ(陈贻竹), Li XP(李晓萍), Xia L(夏 丽), et al. 1995. The application of chlorophyll fluorescence technique (下转第 361 页 Continue on page 361)

- 园艺(台湾省), 34(4): 337—341.
- 林炎坤. 1989. 常用的几种蒽酮比色定糖法的比较和改进[J]. 植物生理学通讯, 4: 53—54.
- 周厚高, 周焱, 宁云芬, *et al.* 2001a. 新铁炮百合自交后代主要性状遗传变异初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 14(2): 1—8.
- 赵祥云, 王树栋, 陈新露, 等. 1999. 中国百合二十年研究进展, 50年中国花卉科技进展[M]. 北京: 中国林业出版社, 515—525.
- 高彦仪, 张金娣, 刘德义, 等. 1986. 兰州百合生长发育特性特征观察[J]. 甘肃农业科技, 10: 2—5.
- 松尾英辅. 1980. 麝香百合鳞茎生长发育的研究(第9报)鳞片干物率与共着生部位的关系在鳞茎贮藏期间的变化[J]. 园艺学会杂志, 48(4): 483—487.
- Matsuo T, Mizuno T. 1974. Changes in the amounts of two kinds of reserve glucose-containing polysaccharides during germination of the Easter lily bulb[J]. *Plant Cell Physiology*, 15: 555—558.
- Miller WB. 1990. Low temperature alters carbohydrate metabolism in Easter lily bulbs[J]. *Hortscience*, 25(4): 463—465.
- Wang YT. 1983. Influence of air and soil temperatures on the growth and development of *Lilium longiflorum* during different growth stages[J]. *J Amer Hort Sci*, 108(5): 810—815.
- Wang YT. 1988. Growth Potential of the Easter Lily Bulb[J]. *Hortscience*, 23(2): 360—362.
- Zhou HG(周厚高), Zhou Y(周焱), Ning YF(宁云芬), *et al.* 2002. The Allozyme Analysis of the Genetic Differentiation in Self-inbred Early Generations of *Lilium longiflorum* Hort(新铁炮百合自交初代的遗传多样性分析)[J]. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 29(1): 72—78.
- Zhou HG(周厚高), Zhou Y(周焱), Ning YF(宁云芬), *et al.* 2001b. Genetic Structure and Genetic Differentiation Analyses of *Lilium longiflorum* in Self-cross Early Generations(新铁炮百合自交初代居群遗传结构与遗传分化的研究)[J]. *Journal of Zhongkai Agrotechnical College*(仲恺农业技术学院学报), 14(3): 1—7.
- in the study of responses of plants to environmental stresses (叶绿素荧光技术在植物环境胁迫研究中的应用)[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*(热带亚热带植物学报), 3(4): 79—86.
- Clark JR, VanHassel JH, Nicholson RB, *et al.* 1981. Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 87—96.
- Flemming CA, Trevors JT. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: A review[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 18: 143—158.
- Huebert DB, Shay JM. 1993. Considerations in the assessment of toxicity using duckweed[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 481—483.
- Lockhart WL, Billeck BN, Baron CL. 1989. Bioassays with a floating aquatic plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate[J]. *Hydrobiologia*, 188/189: 353—359.
- Maksymiec W. 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants[J]. *Photosynthetica*, 34(3): 321—342.
- OECD. 2002. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals [S]; Revised proposal for a new guideline for 221. Draft guideline 221, July 2002. Paris.
- Schopfer P. 1989. Experimentelle Pflanzenphysiologie. Einführung in die Anwendung. Springer-Verlag, Berlin.
- USEPA. 1996. Ecological Effects Test Guidelines [S]. OPPTS 850.4400 EPA712-C-96-156, April, USA.
- Walbridge CT. 1977. A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.) [R]. Environmental Research Laboratory-Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. 1977. September 1977.
- Wang W. 1986. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed[J]. *Environmental Pollution* (Ser. B), 11, 1—14.

( 上接第 366 页 Continue from page 366 )