

# 增强 UV-B 辐射和 He-Ne 激光对 小麦原生质体微管骨架的影响

郭爱华, 高丽美, 李永锋, 韩榕\*

(山西师范大学 生命科学学院 细胞工程研究所, 山西 临汾 041004)

**摘要:** 以小麦叶片原生质体为材料, 采用间接免疫荧光定位法标记其微管系统, 并利用激光共聚焦扫描显微系统进行观察。研究了低剂量 He-Ne 激光( $5\text{mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ )、增强 UV-B 辐射( $10.08\text{kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ )及二者的复合处理对小麦幼苗叶肉细胞中微管骨架的影响。结果表明, 增强 UV-B 辐射后, 小麦叶片细胞中微管骨架发生解聚, 呈短棒状或点状分布, 微管束弥散且荧光强度减弱; 而增强 UV-B 辐射后再施以 He-Ne 激光处理, 小麦叶肉细胞微管骨架有部分断裂, 但较单独 UV-B 处理组的损伤程度轻, 说明低剂量的 He-Ne 激光可以部分修复增强 UV-B 辐射对微管骨架的损伤, 且对微管的聚合有促进作用。

**关键词:** 微管骨架; 免疫荧光定位; 小麦; He-Ne 激光; UV-B 辐射

**中图分类号:** Q245 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2010)02-0250-06

## Influence on microtubule in wheat mesophyll cell exposed to enhanced ultraviolet-B radiation and He-Ne laser irradiation

GUO Ai-Hua, GAO Li-Mei, LI Yong-Feng, HAN Rong\*

(Institute of Cell Engineering, College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

**Abstract:** In this paper, the protoplasts from fresh leaves of wheat seedlings was acted as material, which was exposed to enhanced UV-B radiation( $10.08\text{kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ), He-Ne laser irradiation( $5\text{mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) and the combined treatments of UV-B and He-Ne laser. Effects of different treatments on microtubule(MT) cytoskeleton, which was labeled with indirect immunofluorescence localization, was studied through confocal laser scanning microscope(CLSM). The results showed that microtubule of protoplast in wheat seedlings was depolymerized significantly to stick and spot under the condition of enhanced UV-B radiation, the MT bundles was trend to dispersivity and decreasing of fluorescence intensity. However, the depolymerization of MT was decreased by He-Ne laser irradiation after enhanced UV-B radiation. Therefore, the damage of microtubule in wheat seedlings induced by enhanced UV-B radiation that can be repaired partly by He-Ne laser irradiation.

**Key words:** microtubule; immunofluorescence localization; wheat; He-Ne laser; UV-B radiation;

大气平流层中臭氧层的破坏, 导致到达地球表面的 UV-B 辐射大量增加(吴永波等, 2004; Kakani 等, 2003; Jeremy 等, 1996)。臭氧量每减少 1%, 地球表面的 UV-B 辐射强度就将增加 2%(吴永波等,

2004; Kakani 等, 2003)。UV-B(280~320 nm)辐射的增加, 对地球上的动、植物以至人类本身都构成严重威胁(韩榕, 2002)。研究表明, 增加的 UV-B 辐射对植物, 特别是对紫外线敏感植物在生长发育, 生理

收稿日期: 2009-12-15 修回日期: 2010-03-03

基金项目: 国家自然科学基金(30671061); 山西省自然科学基金(2008011059-1, 20041101)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671061); the Natural Science Foundation of Shanxi Province(2008011059-1, 20041101)]

作者简介: 郭爱华(1983-), 女, 山西人, 硕士研究生, 研究方向为植物细胞学, (E-mail) guoaihua2000@163.com.

\* 通讯作者(Author for correspondence): 男, 博士, 教授, 研究方向为环境植物学, (E-mail) hanrong @ dns. sxnu. edu. cn.

生化代谢,遗传学水平都产生重要影响(韩榕,2002; Kalbin 等 2001; Jeremy 等,1996; Mulpuri 等,1996)。因此,揭示 UV-B 对作物的损伤及其作用机理,寻找有效的防护措施显得尤为重要(韩榕,2002)。

He-Ne 激光作为一种新技术,在农业、园艺、遗传育种、生物工程等方面获得了广泛的应用。其低剂量可促进植物的生长发育、生理代谢等(韩榕,2002;Ou,2007)。微管(Microtubule, MT)是植物细胞骨架的重要组成部分之一,它在维持细胞形状、适应生长发育和环境变化,调控细胞分裂等方面起着重要作用。它既参与细胞内物质运输,又能感受、传导外界信号刺激,并能产生灵敏的反应(党磊等,2002)。因此,微管骨架的研究已成为生命科学领域中必不可少的一部分,且鉴于其研究技术不断趋于完善,尤其是近年来激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)的应用,为研究细胞的精细结构开辟了一条新的途径。本文以小麦为研究材料,采用 He-Ne 激光及增强的 UV-B 辐射对其处理,旨在探明 UV-B 辐射对小麦叶肉细胞中微管骨架的损伤机制,以及 He-Ne 激光对其的修复效应,为今后农业、林业生产实践提供可靠的理论依据,同时为微管在分子水平上的研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

冬小麦晋麦 8 号(*Triticum aestivum* cv. Jinmai 8),由山西省农科院小麦研究所提供。选取籽粒饱满、大小均一的种子,经 0.1% 氯化汞表面消毒,浸泡于玻璃器皿中,待种子露白后培养于铺有两层湿纱布的培养皿内,每盘 30 粒,25 °C 培养,待处理。

### 1.2 处理设置

试验设置对照组(CK)、UV-B 处理组(B)、He-Ne 激光处理组(L)、以及 UV-B 与 He-Ne 激光复合处理组(B+L)。各组处理方法如表 1,材料处理 6 日后用于后期研究。

1.2.1 UV-B 处理 将小麦置于紫外培养箱(紫外灯:秦牌,宝鸡制造,30 W,297 nm),通过调整 UV-B 灯与植物培养皿之间的距离来控制 UV-B 辐射的强度,剂量选择  $10.08 \text{ KJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.2 He-Ne 激光辐照 He-Ne 激光器(M SHN - A -B450 MM,西北大学光电研究所制造)波长为 632.8 nm,光斑直径 2 mm。激光辐照处理安排在

夜间进行,以排除杂光影响。

表 1 各处理组设置及程序  
Table 1 Establishment and treatment procedure of different groups

处理组 Treatment	光照 Light (h/d)	UV-B 辐射 UV-B radiation(h/d)	He-Ne 激光 He-Ne laser (min/d)	暗培养 Dark culture (h/d)
CK	8	—	—	16
B	8*	8	—	16
BL	8*	8	2	16
L	8	—	2	16

\* 表示与 UV-B 辐射同时进行。

It' at the same time with UV-B radiation.

### 1.3 方 法

1.3.1 原生质体的制备 参考刘炜等(2001),略有改动。取 6 日龄小麦幼苗第一片真叶,蒸馏水冲洗干净,用双面刀片将其切成 1~2 mm 的小碎块,置于酶解液中在  $(26 \pm 1)$  °C 中暗解 3 h 左右,中间每隔 0.5 h 震荡一次。材料与酶解液之比为 1:5(W/V)。酶解液组成为 1.5% 纤维素酶 R-10(cellulase R-10, Japan),0.1% 果胶酶(pectinase, Fluka)溶于标准液中配置而成。标准溶液成分为:5 mmol/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,0.5 mol/L 甘露醇,0.5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,2 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ ,3 mmol/L 2-氮吗啉乙烷磺酸(MES, Sigma),pH 调至 5.6。待酶解完成后用 280 目尼龙网过滤除去未酶解完全的叶肉组织碎片,滤液转移到离心管中,300 r/min 离心 2 min 后收集纯化原生质体,并用 PBS 悬浮,常温静置以备。

1.3.2 原生质体活力检测 用荧光素二乙酸(FDA)测定原生质体的活力。取 50 mg FDA 溶于 1 mL 丙酮中配成母液,用 20  $\mu\text{L}$  FDA 母液溶于 5 mL 标准液中,再以 1:1(V/V)与原生质体悬浮液混合,室温放置 10 min 后检测原生质体的活力(刘炜等,2001)。

1.3.3 免疫荧光标记微管 将获得的原生质体附在涂有 1 mg/mL 多聚赖氨酸(Mr 300 000; Sigma)的载玻片上,静置约 5 min,吸去多余的液体。以 3.7% 多聚甲醛(PBS 配制)固定 30 min,0.5% TritonX-100 抽提 20 min, PBS(pH7.4)洗涤 3 次,每次 5 min,以 3% BSA(PBS 配制)封闭 15 min。用单克隆抗微管蛋白(小鼠)的一抗(Sigma 产品),以稀释度 1:160 在 37 °C 孵育 1 h,以 PBS 缓冲液洗涤,再用 Texas Red-羊抗鼠 IgG(Invitrogen)以稀释度 1:200 在 37 °C 孵育 1 h, PBS 缓冲液洗 5 次,每次 5 min。最后用 50% 甘油(PBS 缓冲液配制)封片,透

明指甲油封边(David等,1990;Wick & Dunice,1981;斯佩克特等,2003;Akashi & Shibaoka,1991)。对照1是以3% BSA/PBS代替一抗来孵育,其他步骤同前所述;对照2是在原生质体进行免疫荧光标记微管之前,以50  $\mu\text{mol/L}$ 的微管解聚剂-Oryzalin(黄草消)处理1 h,其他步骤同前所述(党磊等,2002)。

1.3.4 图像的观察与采集 原生质体观察使用普通数码显微镜,物镜镜头使用10倍和40倍;荧光制片使用激光共聚焦扫描显微镜 Nikon TE-2000进行观察与图像采集,激发光为543 nm,原生质体活力测定时激发光为488 nm,物镜镜头使用40倍镜和60倍油镜,图像采集使用512 $\times$ 512像素。

## 2 结果与分析

### 2.1 原生质体的制备与活力测定

在小麦叶肉原生质体制备过程中不断镜检直到有大量球形细胞产生为止。如图版I:1所示,在普通显微镜下观察这些原生质体,其外观呈光滑球形,淡绿色,细胞质稠密并有颗粒内含物,叶绿体清晰可见,中央的大液泡不清晰,被原生质包围,说明其生理活性较高(图版I:2)。在激光共聚焦扫描显微镜488nm波长激光激发下,原生质体中叶绿体的自发荧光呈现红色,细胞核没有荧光而呈现黑色(图版I:3)。对所制备原生质体活力的测定采用荧光指示剂FDA。FDA本身没有荧光,是一种亲脂性物质,可透过完整的原生质膜进入细胞内部,在细胞中被胞内脂酶分解成一种非脂类的荧光极性物质,它不能出入原生质膜,因而被保留在细胞膜内,因此,有活力的细胞在488nm激发下显示黄绿色荧光,而无活力的细胞则不能产生此荧光。本研究以FDA检测获得的原生质体即使放置时间较长,原生质体活力仍然较高,满足了后续试验的需要(图版I:4)。

### 2.2 增强UV-B辐射对原生质体制备的影响

小麦叶肉细胞原生质体的制备过程中,对照组叶片在(26 $\pm$ 1)  $^{\circ}\text{C}$ 酶解3 h后,显微镜视野中原生质体较多,透明的细胞膜包裹着原生质内含物,形态饱满光滑(图版I:1,2)。与对照组相比,在相同制备原生质体的条件下,增强UV-B辐射处理组所获得的球形原生质体较少,浓度较低,视野中多有未酶解完全的细胞,呈现短棒状或几个细胞连接状(图版I:5),说明增强UV-B辐射后对小麦叶片细胞的胞

壁有影响从而影响了小麦叶肉细胞原生质体的制备。

### 2.3 不同处理组微管骨架的比较

对四个处理组的小麦叶肉细胞原生质体进行间接免疫荧光标记其微管,在激光共聚焦扫描显微镜下观察微管骨架分布的变化。对照组中微管骨架的荧光亮度较强,结构清晰。细胞中周质微管呈现复杂的立体网络状结构,存在于整个细胞质中,且它们围绕着细胞中的叶绿体排列(图版I:6)。胞质微管从细胞核核膜向胞质辐射出微管骨架结构而呈现辐射状排列(图版I:7)。用激光共聚焦扫描显微镜对整个原生质体细胞做断层扫描时,细胞中的液泡部分不存在微管网络结构,且微管多存在于细胞内叶绿体层的区域(图版I:8)。

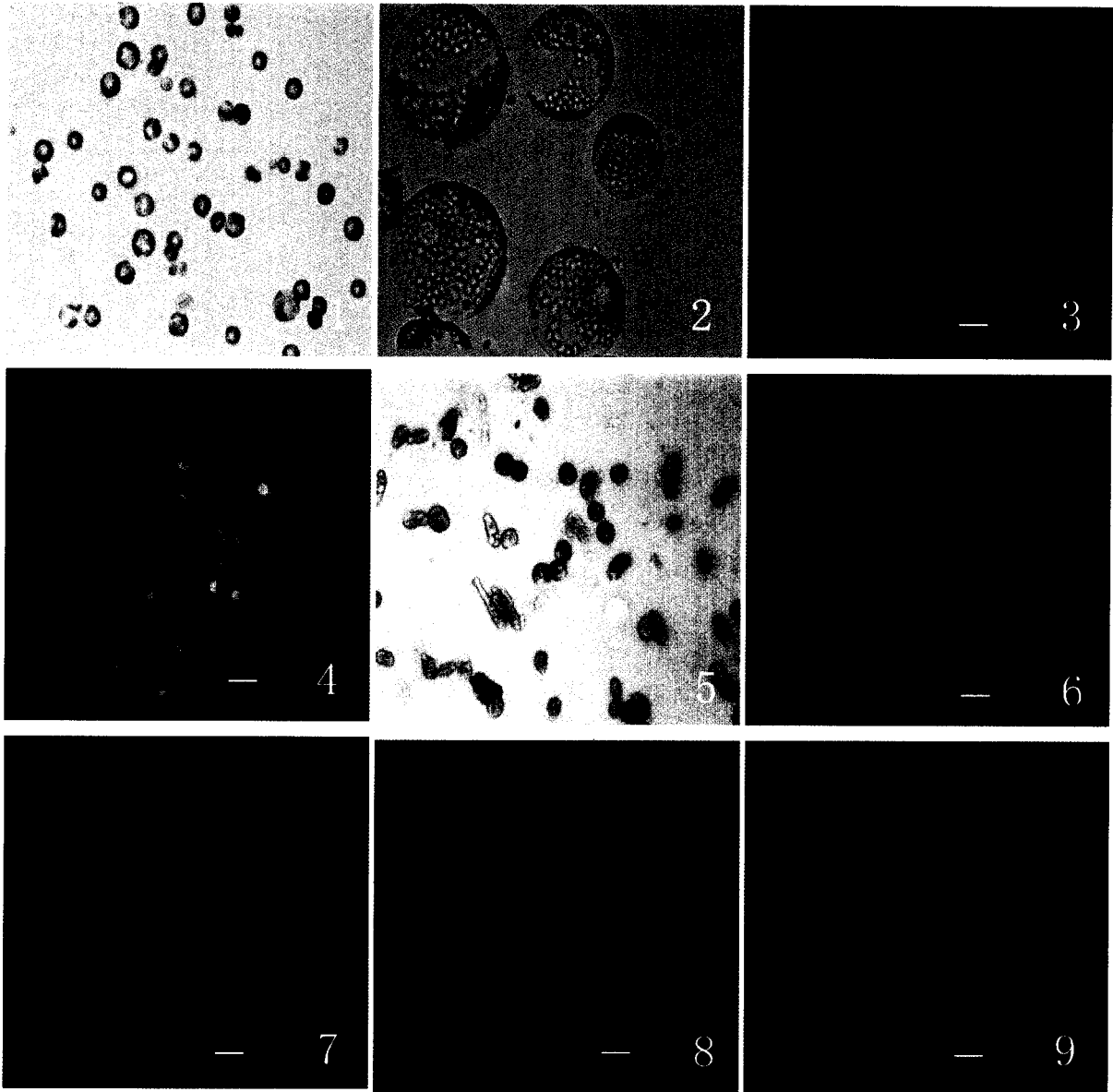
与对照组相比,增强UV-B辐射处理的细胞,特异性免疫荧光标记微管后,发现图像中荧光多呈现片段状或点状分布,除点状荧光亮度较强外其他荧光弥散不明亮(图版I:9),这说明增强UV-B使细胞中微管骨架发生解聚。而增强UV-B辐射后再施以He-Ne激光的复合处理细胞中,其微管结构虽不如对照组的网络清晰明亮,还有解聚的点状荧光(图版II:10),但与单独UV-B处理组相比,复合处理组点状明显少于B组,且细胞中微管网络骨架也较其明显。单独激光处理组的微管网络结构清晰,与对照组的微管布局无明显差异,其荧光强度较对照组强(图版II:11)。本研究中各处理组微管分布的差异表明,低剂量的He-Ne激光可以促进增强UV-B辐射所造成的微管解聚后的聚合,对增强UV-B辐射所造成的微管损伤有一定的修复作用。

在进行微管间接免疫荧光标记对照试验中,不加一抗的对照原生质体中荧光强度非常弱,几乎看不见荧光,在激光共聚焦扫描显微镜下观察不到微管的网络结构(图版II:12);在提前经过微管解聚剂处理的原生质体中有荧光,但荧光呈点状和弥散状分布,说明微管已解聚(图版II:14),这证明了微管间接免疫荧光标记的可靠性。

## 3 讨论

### 3.1 小麦原生质体的制备

原生质体(protoplast)由于失去了细胞壁的保护,对外界条件非常敏感,因此在制备的过程中对理化条件要求较严格(余晓丽,1998)。影响原生质体产量和活性的因素中作用较大的是酶的种类、浓度



图版 I 1. 普通显微镜下小麦叶片的原生质体；2. 普通显微镜下原生质体内叶绿体和细胞核；3. 激光共聚焦扫描显微镜下 488 nm 激发的原生质体，细胞内红色部分为叶绿体，黑色部分为细胞核；4. 放置 10 h 原生质体的活力；5. 增强 UV-B 辐射后制得的原生质体；6. CK 组原生质体内网络状的微管束；7. 原生质体内辐射状微管束；8. 示细胞的液泡中无微管网络结构；9. B 组解聚后的微管骨架。

Plate I 1. Purified protoplasts of wheat seedlings under optical microscope; 2. Chloroplast and nucleus of protoplast under optical microscope; 3. Protoplast at CLSM stimulated by 488 nm, red is chloroplast and black is cell nucleus; 4. Vigour of protoplasts after 10 hours; 5. Wheat mesophyll protoplasts after enhanced UV-B radiation under optical microscope; 6. Network MTs in wheat mesophyll protoplasts of control; 7. Radiating MTs in wheat mesophyll protoplasts; 8. showing no MTs in vacuole; 9. dispersivity MTs after enhanced UV-B radiation.

和酶解的时间(邢朝斌等,2006)。本研究采用六日龄小麦幼苗叶片为材料,酶液浓度是 1.5 %纤维素酶和 0.1%果胶酶,酶解液的 pH 值为 5.6,酶解 3 h 后发现原生质体产量较高,且活性较强。原生质体由于消除了细胞壁的障碍,被认为是遗传育种、基因转化、生理生化研究的理想材料(余晓丽,1998;党磊,2002)。在细胞骨架的免疫荧光标记中,它模拟了单细胞结构

和功能的完整性,排除了周围细胞的影响;细胞壁的去除了荧光探针的导入提供了便利条件(党磊,2002)。

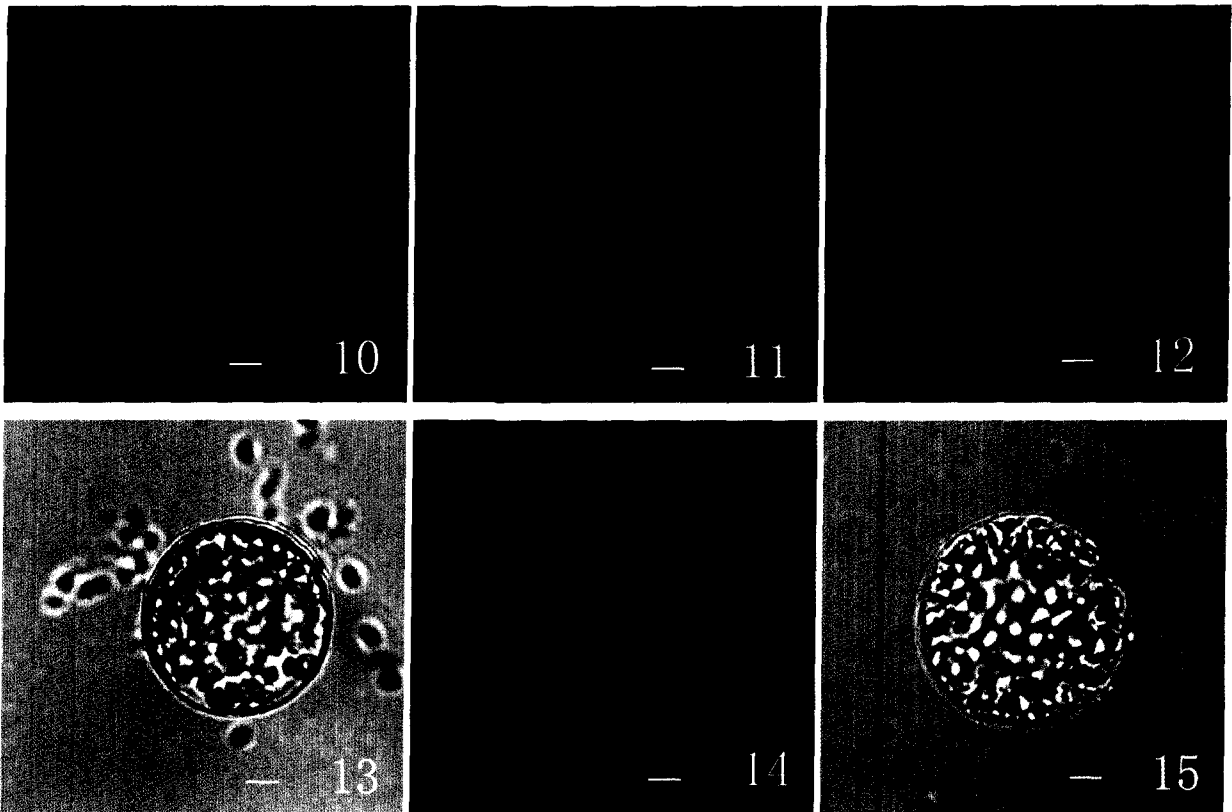
本文以小麦原生质体为材料,运用间接免疫荧光定位法标记微管,研究增强 UV-B 辐射及 He-Ne 激光对其的影响,为植物在逆境中细胞骨架及信号转导的研究奠定了一定的理论基础。

### 3.2 增强 UV-B 辐射对小麦原生质体的影响

叶片是对环境胁迫最为敏感的器官,能直接反映外界环境对植物产生的影响(瞿先能等,2006)。在关于增强 UV-B 辐射对叶片的影响研究中,韩榕(2002)用扫描电镜观察发现,增强 UV-B 辐射造成小麦叶表面气孔周围产生大量的蜡质,且与 UV-B 辐射的剂量呈正相关;Kakani 等(2003)研究也表明增强的 UV-B 辐射会增加叶片表面的蜡质含量,且蜡质含量增加有利于增强作物对 UV-B 辐射的抗性。此外,植物的表皮角质层增厚对提高植物对

UV-B 辐射增强的抗性有一定益处(瞿先能等,2006)。

本研究在制备原生质体时发现,在相同条件下,与对照组相比,经过增强 UV-B 辐射的叶片所制得的原生质体多有棒状,为未完全酶解的细胞,这说明经增强 UV-B 辐射的小麦叶片蜡质含量高,表皮层加厚,致使叶片更密、更结实,而使其细胞壁不易酶解。这是植物对外界环境条件的一种反应,这种变化使植物在经受逆境时增强抵抗不良条件的能力而保护自身不受到严重侵害。



图版 II 10. BL 组的微管分布; 11. L 组原生质体中网络状微管; 12. 未加一抗的对照; 13. 图 12 的明场透射图; 14. 经过微管解聚剂处理的对照; 15. 图 14 的明场透射图; 图 4 标尺=100 μm,图 3,6-15 标尺=10 μm。

Plate II 10. MTs of He-Ne laser irradiation after enhanced UV-B radiation; 11. Network MTs after He-Ne laser irradiation; 12. Control that have no first antibody; 13. Transmission image of Fig. 12; 14. Control after Microtubule depolymerization reagent-Oryzalin; 15. Transmission image of Fig. 14; Fig. 4 bar is 100 μm, Fig. 3,6-15 bar is 10 μm.

### 3.3 增强 UV-B 辐射和 He-Ne 激光对小麦微管骨架的影响

微管能对微重力、冷害刺激(刘刚等,2006)、病原微生物的侵入(党磊,2002)、激素、光电信号(于荣等,1998)等条件作出灵敏的反应,使细胞骨架的排布发生变化。完整微管骨架布满整个细胞空间的自身特点决定其相互作用参与细胞的信号转导作用(刘刚等,2006),如微管骨架参与第二信使转导中信号的扩

大过程,钙离子能直接调控细胞骨架的稳定性,也可以通过和钙调素结合发挥作用,还可以由  $Ca^{2+}/CaM$  通过微管骨架相关蛋白影响骨架成分的稳定性并调节它们之间的相互作用(刘刚等,2006)。所以,完整的细胞微管骨架是信号转导所必需的,如果微管受到干扰,依赖细胞骨架进行的信号转导反应也会受到干扰或终止发生。

本研究发现增强 UV-B 辐射后细胞中微管骨架

的排布结构发生变化, 损伤形成片段状和点状。其机理可能是, 细胞感受到外界刺激, 首先作用于信号感知和传导的主要平台——质膜(李永才等, 2006), 质膜上的信号受体、物质运输载体、活化底物的酶等重要结构在感受到刺激后使其各种信号通路打开, 细胞骨架是各种信号传导途径的下游靶子, 信号的改变使微管骨架结构发生解聚或聚合变化, 而这种结构的变化又参与了信号级联反应过程(李永才等, 2006), 它们的相互作用使细胞中相关蛋白和基因活化最终表现在植物形态结构和生理代谢的改变上, 构成植物形成自我防卫的机制。增强 UV-B 辐射后, 微管结构发生变化势必影响到细胞中各种信号转导的发生, 而微管受到了哪些信号分子的影响及它又是通过哪些信号转导途径发生作用的? 这些仍有待于进一步研究。

激光对生物体的作用主要表现为光效应、电磁效应、热效应和压力效应。但低功率的激光产生的热和压力很少, 因此对生物的影响主要是光效应和电磁效应。He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射后小麦的形态和生理代谢表现为具有一定的修复作用(韩榕, 2002)。本研究发现, 增强 UV-B 辐射使小麦叶细胞表皮增厚, 且原生质体中微管骨架发生解聚, 而低剂量的 He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射造成的微管解聚具有促进其聚合的作用。激光通过其光效应和磁场效应作用于细胞中蛋白质和酶类, 从多种水平对细胞遭受 UV-B 后的损伤进行修复(韩榕, 2002)。

## 参考文献:

- 党磊. 2002. 激发子对小麦叶肉原生质体微管骨架和胞钙含量的影响[D]. 河北: 河北农业大学生命科学学院
- 斯佩克特 DL, 戈德曼 RD, 莱因万德 LA 著. 黄培堂等译. 2003. 细胞实验指南[M]. 科学出版社: 1 004—1 008
- 韩榕. 2002. He-Ne 激光对小麦增强 UV-B 辐射损伤的修复效应及机理[D]. 西安: 西北大学生命科学学院
- Akashi T, Shibaoka H. 1991. Involvement of transmembrane proteins in the association of cortical microtubules with the plasma membrane in tobacco BY-2 cells[J]. *J Cell Sci*, **98**: 169—174
- David W, McCurdy, Brian ES, et al. 1990. Reorganization of cortical actin microfilaments and microtubules at preprophase and mitosis in wheat root-tip cells; A double label immunofluorescence study[J]. *Cell Motil Cytoskel*, **15**: 76—87
- Dang L(党磊), Wang DM(王冬梅), Liu J(刘娟), et al. 2002. Immunofluorescence localization of microtubule in wheat mesophyll protoplast and its influence factors(小麦叶片原生质体微管骨架的免疫荧光标记及其影响因素)[J]. *J Agr Univ Hebei* (河北农业大学学报), **25**(3): 23—27
- Jeremy DB, Kevin EP, Nigel DP, et al. 1996. The influence of UV-B radiation on the physicochemical nature of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf surfaces[J]. *J Exp Bot*, **47**(294): 99—109
- Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, et al. 2003. Effect of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum*) morphology and anatomy [J]. *Ann Bot-London*, **91**(77): 817—826
- Kalbin G, Hidema J, Brosche M, et al. 2001. UV-B-induced DNA damage and expression of defence genes under UV-B stress; tissue-specific molecular marker analysis in leaves[J]. *Plant Cell and Environ*, **24**: 983—990
- Liu W(刘炜), Sun DL(孙德兰), Wang H(王红), 等. 2001. Influence of low temperature on spatial-temporal changes of Ca<sup>2+</sup> in winter or spring wheat(低温处理对冬、春小麦细胞 Ca<sup>2+</sup> 时空变化的影响)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), **43**(12): 1 218—1 223
- Li YC(李永才), An LZ(安黎哲), Bi Y(毕阳). 2006. Research advances about the role of microtubule cytoskeleton in plant acclimation to low-temperature stress(微管骨架在植物适应低温胁迫中的功能研究进展)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **26**(7): 1 500—1 504
- Liu G(刘刚), Wang DM(王冬梅). 2006. The role of the plant cytoskeleton in defending invading pathogens(细胞骨架在植物抗病中的作用)[J]. *Chin J Cell Biol* (细胞生物学杂志), **28**: 437—441
- Mulpuri VR, Gopinadhan P, Douglas PO. 1996. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, **110**: 125—136
- OU Lin. 2007. Observations and analysis on fluorescence of microalgae induced by laser[J]. *Acta Laser Biol Sin*, **116**(6): 737—740
- Wick SM, Dunice J. 1981. Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells—preprophase band development and concomitant appearance of nuclear envelope-associated tubulin[J]. *J Cell Biol*, **89**: 685—690
- Wu YB(吴永波), Xue JH(薛建辉). 2004. Research advances about effects of enhanced UV-B radiation on plants(UV-B 辐射增强对植物影响的研究进展)[J]. *World Fore Res* (世界林业研究), **17**(3): 29—31
- Xing ZB(邢朝斌), Shen HL(沈海龙), Zhao XY(赵星宇), et al. 2006. Method for isolation of protoplast from young leaves of *Eleutherococcus senticosus* (刺五加幼叶原生质体的分离法)[J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), **42**(2): 288—290
- Yu R(于荣), Yuan M(袁明), Wang XC(王学臣). 1998. Dynamics and regulation of microtubule system(微管骨架的动态特性及其调控)[J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), **15**(6): 19—29
- Yu XL(余晓丽). 1998. Application and progress in plant protoplast research(植物原生质体培养研究进展及应用)[J]. *Bull Biol* (生物学通报), **33**(5): 7—9
- Zi XN(贻先能), Chen ZY(陈宗瑜), Guo SC(郭世昌), et al. 2006. Influence of enhanced UV-B radiation on crop morphology and physiological function(UV-B 辐射的增强对作物形态及生理功能的影响)[J]. *Chin J Agr Meteorol* (中国农业气象), **27**(2): 102—106