

DOI: 10.11931/guihaia.gxz201405016

冯汉青,王玉佩,王婉,等. NaCl 胁迫下交替呼吸途径对烟草悬浮细胞死亡调节作用的研究[J]. 广西植物, 2016, 36(4):425-429

FENG HQ, WANG YP, WANG W, et al. Role of the alternative respiratory pathway in mediating the cell death induced by NaCl stress on tobacco suspension cells [J]. *Guihaia*, 2016, 36(4):425-429

NaCl 胁迫下交替呼吸途径对烟草悬浮 细胞死亡调节作用的研究

冯汉青^{1*}, 王玉佩^{2,3}, 王 婉¹, 管冬冬¹, 贾凌云¹

(1. 西北师范大学 生命科学学院, 兰州 730070; 2. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 盐分胁迫是植物在自然环境中经常遭遇的环境胁迫因素之一, 会引起植物代谢紊乱乃至细胞死亡, 这严重限制了植物的生长、繁育和生存。交替呼吸途径是植物较之动物独特的线粒体呼吸途径。该研究在烟草悬浮细胞中调查了交替呼吸途径对 NaCl 胁迫引起的植物细胞死亡过程的调节作用及相应的内在机制, 以及在 200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理的烟草悬浮细胞中研究了交替呼吸途径和细胞死亡发生及 H₂O₂ 之间的关系。结果表明: (1) 随着 NaCl 处理浓度的增加, 烟草悬浮细胞死亡水平逐渐增加, 而交替呼吸途径的容量也逐渐上升。(2) 与 NaCl 处理相似, 外源 H₂O₂ 的处理也能导致烟草悬浮细胞死亡水平的增加。200 mmol · L⁻¹ NaCl 的胁迫导致明显的细胞死亡发生和 H₂O₂ 产量的显著性增加; 而较之 200 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫下的细胞, 用水杨基氧肟酸(交替呼吸途径的抑制剂)预处理后的细胞再置于 200 mmol · L⁻¹ NaCl 的胁迫下导致更高水平的细胞死亡和 H₂O₂ 的产生。综上所述, 高盐胁迫诱导了烟草悬浮细胞的交替呼吸途径的增加, 而交替呼吸途径则可能通过抑制活性氧的产生而起到缓解细胞死亡发生的作用。

关键词: 交替呼吸途径, 烟草悬浮细胞, H₂O₂, 细胞死亡

中图分类号: Q945.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)04-0425-05

Role of the alternative respiratory pathway in mediating the cell death induced by NaCl stress on tobacco suspension cells

FENG Han-Qing^{1*}, WANG Yu-Pei^{2,3}, WANG Wan¹, GUAN Dong-Dong¹, JIA Ling-Yun¹

(1. College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730070, China; 3. University of China Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Soil salinity stress is the one of the most widespread environmental stresses that growing plants have to frequently face. The effects of salinity stress on plants are generally associated with the disruption of metabolism. In particular, high level of salt stress can cause cell death. This seriously limits the development, growth, survival, and productivity of plants. The alternative respiratory pathway is a plant-specific respiratory pathway, which does not exist in animals. By using tobacco suspension cells, the present work investigated whether the alternative respiratory pathway could play a role in me-

收稿日期: 2014-10-07 修回日期: 2015-03-02

基金项目: 国家自然科学基金(31260059;30900105); 教育部科学技术研究重点项目(211190); 甘肃省财政厅高校科研基本业务费[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31260059;30900105); Key Program for Science and Technology Research from Ministry of Education (211190); Basic Research Foundation for Colleges and Universities of Gansu Department of Finance]。

作者简介: 冯汉青(1978-), 河北保定市人, 博士, 副教授, 主要从事植物生理学研究, (E-mail) fenghanq@nwr.edu.cn。

* 通讯作者

diating the high-salt-induced death of plant cells. And, the possible mechanism for this function of the alternative respiratory pathway was also studied. The results showed that with the increase of the concentrations of NaCl, the levels of cell death of tobacco suspension cells increased, and the increased levels of cell death were followed with the increases of the capacity of the alternative respiratory pathway. Similar to the treatment with NaCl, the treatment with exogenous hydrogen peroxide (H_2O_2) also induced an increase in the level of cell death. The relationship among the alternative respiratory pathway, cell death, and H_2O_2 production was studied in the tobacco suspension cell subjected to $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl. The treatment with $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl caused an obvious increase of cell death and a significant enhancement of the H_2O_2 production. The $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl-stressed cells pretreated with salicylhydroxamic acid, a specific inhibitor of the alternative respiratory pathway, exhibited higher levels of cell death and H_2O_2 production than the tobacco suspension cells subjected to $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress alone. These results suggest that high salt stress can induce an increase of the alternative respiratory pathway, which plays a role in alleviating cell death under high salt stress. And, this function of the alternative respiratory pathway may relate to its ability to limit the generation of H_2O_2 .

Key words: alternative respiratory pathway, tobacco suspension cells, hydrogen peroxide, cell death

盐分胁迫是植物在自然环境中所面临的主要环境胁迫因素之一 (Munns & Tester, 2008)。盐分胁迫会导致植物离子含量的不平衡、渗透压增加、水分缺失、氧化压力、生长繁殖水平下降乃至细胞死亡 (Hamada et al, 2001; Munns & Tester, 2008)。NaCl 水平过高是造成盐分胁迫的主要原因 (潘瑞炽等, 2008)。线粒体作为呼吸作用主要场所为细胞的生存发育及相关的代谢活动提供了能量。在高等植物的线粒体呼吸途径中,除了细胞色素呼吸途径外,还存在着交替呼吸途径。该途径的运行使得电子绕过了线粒体电子传递链中的复合物 III 和复合物 IV 两个 ATP 形成位点,而使得电子从 UQ 库直接传递到氧分子 (Millenaar & Lambers, 2003)。

低温、病原菌感染、水分缺失等环境胁迫因素均可导致植物交替呼吸途径水平的上升,且该交替呼吸途径的增加有助于植物抵抗上述的环境胁迫 (Feng et al, 2008; Bartoli et al, 2005; Simons et al, 1999)。Smith et al (2009) 和 Wang et al (2010) 研究发现,盐胁迫会导致拟南芥幼苗或愈伤组织中交替呼吸途径的增加,且盐胁迫下交替呼吸途径的增加能在一定程度上缓解盐胁迫所导致的电子渗漏和生长速率的下降。而目前对于交替呼吸途径在植物抵抗盐胁迫中的生理学作用的认识较为有限。如盐胁迫特别在较高的水平下,能导致植物细胞的死亡,而交替呼吸途径是否在盐胁迫下也能影响植物细胞死亡的发生则报道较少。基于此,本文在烟草悬浮细胞中研究了 NaCl 胁迫下交替呼吸途径对植物细胞死亡的调节作用,有助于进一步认识交替呼吸途径在逆境下的生理学作用以及植物在盐胁迫下细胞死亡发生及调控的机理。

1 材料与方法

1.1 烟草 BY-2 悬浮细胞培养

烟草悬浮细胞 (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2) 由香港大学姜里文教授提供。悬浮细胞在 MS (Murashige & Skoog, 1962) 液体培养基 (pH 值 5.8) (Sigma-Aldrich 公司) 中生长,并在其中补充 3% (w/v) 蔗糖和 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-二氯苯氧乙酸。培养物于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的黑暗条件下振荡培养 (Nagata et al, 1981)。在 7 d 生长周期的时间间隔下,吸取 10 mL 细胞培养物,加入到 100 mL 的新鲜液体培养基中完成传代培养。实验所用细胞为转入到新鲜培养基中 4~5 d 后的细胞,所有步骤均在无菌条件下完成。

1.2 细胞处理

吸取一定体积的细胞悬液,以 1:5 (v/v) 用去离子水稀释并摇匀,取 5 mL 均匀的稀释悬液过滤,再用去离子水洗涤过滤待用。在第一组试验中,将细胞分别置于 50、100、200 和 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 下处理 5 h,以用去离子水处理的细胞作为对照。在第二组试验中,将细胞用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SHAM (水杨基氧肟酸,交替呼吸途径的抑制剂) 预处理 5 h 后,分别置于 0 或 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 下处理 5 h,或以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SHAM 的溶剂预处理细胞 5 h 后再置于 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 下处理 5 h,以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SHAM 的溶剂预处理细胞 5 h 后再置于 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 下的细胞作为对照。在第三组试验中,分别用 0、50、100、200、 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 处理细胞 5 h。

1.3 细胞死亡测定

细胞死亡采用伊文思蓝染色法进行测定。(1) 将处理后的细胞悬液摇匀,取 1 mL 细胞悬液于加入 100 μL 0.025% (w/v) 伊文思蓝染液中染色 8 min, 之后先在 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 1 min, 去上清, 再用磷酸缓冲液冲洗沉淀。(2) 加入 1 mL 裂解液 [含 1% (w/v) 的十二烷基磺酸钠(SDS) 和 50% (w/v) 的甲醇] 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 0.5 h 以裂解细胞。(3) 在 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 取上清在 595 nm 处检测吸光值, 吸光值可反应细胞的死亡程度 (Yang et al, 2004)。

1.4 呼吸速率测定

将处理后的细胞悬液立即置于测量杯中, 利用 Clark 氧电极 (中国科学院上海植物生理生态研究所制) 测量在氰化钾存在下细胞的耗氧速率, 所得值即为交替呼吸的容量值, 具体操作参照 Bingham & Farrar (1989)。

1.5 H_2O_2 含量检测

取处理后的细胞用 5% (w/v) 三氯乙酸 (TCA) 磨样, 接着在 12 000 $\times g$ 条件下离心 10 min。取 0.9 mL 上清液与 0.1 mL 0.1% (w/v) 硫酸钛形成的 $\text{Ti-H}_2\text{O}_2$ 的复合物用 20% (v/v) H_2SO_4 溶解混匀, 测定光吸收值 (OD_{405}), 以 H_2O_2 标准曲线确定样品 H_2O_2 含量 (Patterson et al, 1984)。

1.6 数据分析

利用 SPSS 软件对数据采用单因素方差分析, 再用最小显著差数 (LSD) 法进行两两比较和显著性差异水平分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫对烟草细胞死亡的影响

悬浮细胞经 50、100、200、400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 处理后细胞死亡水平显著性增加, 且细胞死亡程度随 NaCl 处理浓度增大而增大 (图 1)。

2.2 NaCl 胁迫下烟草细胞交替呼吸途径的变化

与细胞死亡的变化相似, 细胞交替呼吸的容量也随着 NaCl 胁迫浓度增大而不断增大 (图 2)。与对照相比, 在 50 和 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 处理后交替呼吸的容量分别增加了 1.18 和 1.68 倍, 但增加不显著。而 200 和 400 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 处理后交替呼吸的容量分别是对照的 1.68 倍、2.06 倍和 2.20 倍, 且均达到了显著性差异 (图 2)。

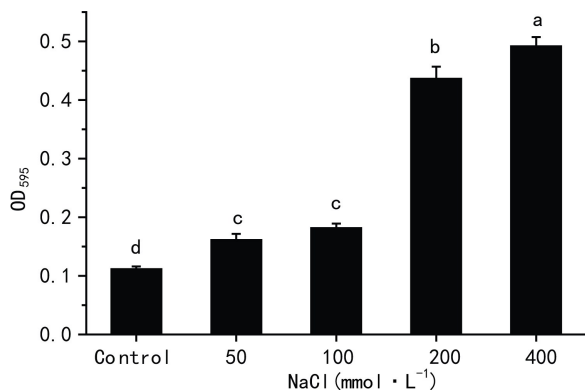


图 1 NaCl 胁迫对细胞死亡的诱导 细胞死亡水平的测量使用伊文思蓝染色法, 即通过测量在 595 nm 下所提染液的吸光值来反映。数值为至少 3 次独立处理重复试验的平均值 \pm 标准差。不同字母表示数值间在 $P < 0.05$ 水平有显著性差异。

Fig. 1 NaCl-induced cell death examination The levels of cell death were measured using Evans blue staining assay by measuring the absorbance of extracted dye at 595 nm. Each value represents the mean \pm SD of at least three experiments. The means denoted by the different letters represent significant differences at $P < 0.05$.

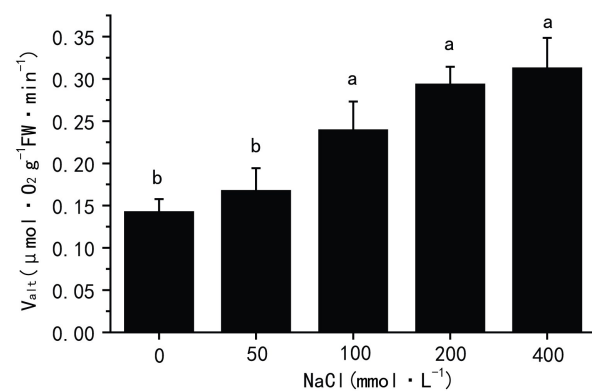


图 2 NaCl 胁迫对细胞交替呼吸途径的影响 数值为至少 3 次独立处理重复试验的平均值 \pm 标准差。不同字母表示数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异。

Fig. 2 Effects of NaCl stresses on the capacity of the alternative respiratory pathways Each value represents the mean \pm SD of at least three experiments. The means denoted by the different letters represent significant differences at $P < 0.05$.

2.3 细胞死亡的发生和过氧化氢水平的上升有关

由于 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 导致了细胞死亡和交替呼吸途径的显著性上升, 因此检测 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下细胞体内 H_2O_2 水平的变化以及交替呼吸途径的抑制剂对其的影响。结果表明, 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫导致细胞 H_2O_2 水平的显著性上升 (图 3), 提示盐胁迫所导致细胞死亡的发生可能是 H_2O_2 在体内的积累或上升所致。

SHAM (水杨基氧肟酸) 为交替呼吸途径的抑制

剂。与对照相比,1 mmol · L⁻¹的 SHAM 的单独处理并未对细胞 H₂O₂水平发生显著性影响。而细胞先经 1 mmol · L⁻¹ SHAM 处理后再置于 200 mmol · L⁻¹ NaCl 下则使得 H₂O₂水平显著性高于对照,也显著高于 200 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫下的细胞,表明 SHAM 对盐胁迫下 H₂O₂的产生有促进作用。

进一步用不同浓度外源 H₂O₂对细胞进行处理,处理浓度依次为 50、100、200、400 mmol · L⁻¹。结果表明,H₂O₂的处理导致了细胞死亡的发生,且细胞死亡程度随 H₂O₂浓度的增大而逐渐增大,分别为对照组的 1.34、1.6、2.5 和 4.07 倍(图 4),表明了细胞死亡能够被 H₂O₂所诱导。

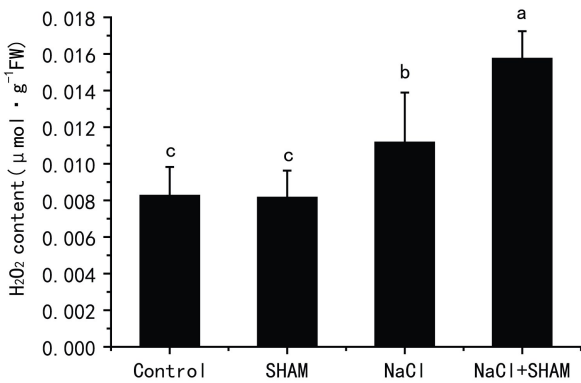


图 3 不同处理对烟草 BY-2 悬浮细胞 H₂O₂水平的影响 将细胞分别置于 1 mmol · L⁻¹的 SHAM (SHAM) 或 200 mmol · L⁻¹的 NaCl (NaCl) 下;或先经 1 mmol · L⁻¹的 SHAM 处理后再置于 200 mmol · L⁻¹ NaCl 下 (SHAM+NaCl)。以 1 mmol · L⁻¹ SHAM 的溶剂处理后的细胞置于 0 mmol · L⁻¹的 NaCl 下的细胞作为对照 (Control)。数值为 6 次独立处理重复试验的平均值±标准差。不同字母表示数值之间在 P<0.05 水平上具有显著性差异。

Fig. 3 Effects of different treatments on the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) of tobacco BY-2 suspension cells

The cells were treated as follows: the cells were respectively exposed to 1 mmol · L⁻¹ SHAM (SHAM), 200 mmol · L⁻¹ NaCl (NaCl). Or, the cells were pretreated with 1 mmol · L⁻¹ SHAM and then subjected to 200 mmol · L⁻¹ NaCl (SHAM+NaCl). The cells pretreated with the solvent of 1 mmol · L⁻¹ SHAM and then subjected to 0 mmol · L⁻¹ NaCl were used as control (Control). Each value represents the mean ± SD of six experiments. The means denoted by the different letters represent significant differences at P<0.05.

2.4 交替呼吸途径对 NaCl 胁迫下细胞死亡发生的调节作用

1 mmol · L⁻¹的 SHAM 处理并未对细胞 H₂O₂的水平发生显著性影响(图 3);而 1 mmol · L⁻¹的 SHAM 对盐胁迫下 H₂O₂的产生具有促进作用(图 3)。相似地,对细胞单独用 1 mmol · L⁻¹的 SHAM 处

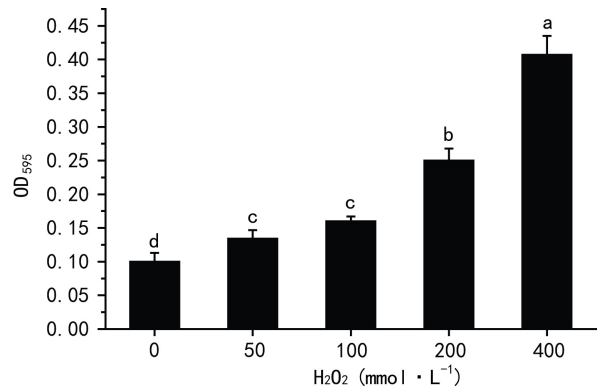


图 4 过氧化氢(H₂O₂)对烟草 BY-2 悬浮细胞细胞死亡的诱导 细胞的死亡水平的测量使用伊文思蓝染色法,即通过测量在 595 nm 下所提染液的吸光值来反映。数值为至少 3 次独立处理重复试验的平均值±标准差。不同字母表示数值之间在 P<0.05 水平上具有显著性差异。

Fig. 4 Hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced cell death examination of tobacco BY-2 suspension cells The levels of cell death were measured using Evans blue staining assay by measuring the absorbance of extracted dye at 595 nm. Each value represents the mean ± SD of at least three experiments. The means denoted by the different letters represent significant differences at P<0.05.

理并未对细胞的死亡水平发生显著性影响(图 5),表明在未受到 NaCl 胁迫的条件下,交替呼吸途径的抑制不会对 H₂O₂和细胞活力的水平产生影响。而较之 200 mmol · L⁻¹的 NaCl 的单独处理,细胞先经 1 mmol · L⁻¹的 SHAM 处理后再置于 200 mmol · L⁻¹ NaCl 下则导致了细胞死亡程度的进一步上升(图 5)。这些结果说明了在盐胁迫下,抑制交替呼吸的活性,可以产生更多的过氧化氢并加剧细胞死亡程度。

3 讨论与结论

本研究发现,NaCl 的处理导致了植物细胞死亡的发生。通常来讲,细胞死亡水平的增加会导致细胞代谢水平的下降;然而,细胞交替呼吸途径的水平却随着细胞死亡水平的增加而不断上升,这提示交替呼吸途径可能是细胞抵御外界盐胁迫的一种生理学反应。

盐胁迫会导致植物活性氧水平的上升(Hessini et al, 2009; Skopelitis et al, 2006)。在细胞产生的活性氧当中,H₂O₂具有最长的半衰期;同时,由于 H₂O₂的弱极性,其还具有穿膜的功能(Dat et al, 2000)。本研究测量了 200 mmol · L⁻¹的 NaCl 胁迫

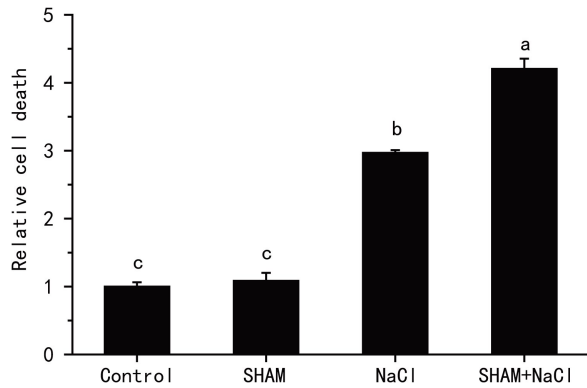


图5 不同处理对烟草 BY-2 悬浮细胞细胞死亡水平的影响 将细胞分别置于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SHAM (SHAM) 或 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl (NaCl) 下;或先经 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SHAM 处理后再置于 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 下 (SHAM+NaCl)。以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SHAM 的溶剂处理后的细胞置于 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 下的细胞作为对照 (Control) 并以对照值设为 1.0。数值为至少 3 次独立处理重复试验的平均值 \pm 标准差。不同字母表示数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异。

Fig. 5 Effects of different treatments on the death levels of tobacco BY-2 suspension cells The cells were treated as follows: the cells were respectively exposed to $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SHAM (SHAM), $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (NaCl). Or, the cells were pretreated with $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SHAM and then subjected to $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl (SHAM+NaCl). The cells pretreated with the solvent of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SHAM and then subjected to $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl were used as control (Control) and the values in the control were set to 1.0. Each value represents the mean \pm SD of at least three experiments. The means denoted by the different letters represent significantly differences at $P < 0.05$.

下细胞的 H_2O_2 水平的变化,发现该水平的 NaCl 胁迫诱导了细胞明显的 H_2O_2 的产生。Maxwell et al (1999) 发现,在非光合组织或器官当中,植物活性氧产生的主要位点是线粒体。由于本实验采用的 Bright Yellow-2 烟草悬浮细胞也是无法进行光合作用的细胞,故推测 NaCl 胁迫下产生的 H_2O_2 也主要来自于线粒体。本研究进一步调查了细胞 H_2O_2 水平的增加是否能够引起细胞死亡,结果表明, H_2O_2 可以以剂量依赖的方式诱导细胞死亡的发生。同时,已有报道 H_2O_2 等活性氧水平的增加会对蛋白质等生物分子造成的损伤,同时又可以以信号分子的方式引发程序化细胞死亡相关基因的表达 (Dat et al, 2000; Rhoads et al, 2006)。因此,我们认为 H_2O_2 的产生可能是 NaCl 胁迫下细胞死亡发生的重要原因。

本研究表明, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SHAM 单独处理细胞并不会影响细胞的生存活力;相比于 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 单独处理,细胞先经 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SHAM

处理后再置于 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 下则导致了更高水平的细胞死亡,说明在 NaCl 的胁迫下交替呼吸途径的增加能够缓解细胞死亡的发生;与细胞死亡的变化相似的是 SHAM 也导致了 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的胁迫下 H_2O_2 水平的进一步上升,说明 NaCl 的胁迫下交替呼吸途径的增加能够降低 H_2O_2 的产生。交替呼吸途径是线粒体中的一条电子传递途径,该途径的运行可以通过降低线粒体电子传递链的过度还原而限制线粒体活性氧的产生 (Maxwell et al, 1999)。线粒体活性氧既是 NaCl 胁迫下细胞 H_2O_2 产生的主要位点,又是 NaCl 胁迫下细胞死亡发生的重要原因。因而,本研究认为在 NaCl 的胁迫下,植物细胞交替呼吸途径的抑制会导致更多活性氧的产生,从而加剧了细胞死亡的发生。故而交替呼吸途径可能是植物在 NaCl 胁迫下维持细胞活力的生理学机制之一。

参考文献:

- BARTOLI CG, GOMEZ F, GERGOFF G, et al, 2005. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions [J]. *J Exp Bot*, 56(415): 1 269–1 276.
- BINGHAM IJ, FARRAR JF, 1989. Activity and capacity of respiratory pathways in barley roots deprived of inorganic nutrients [J]. *Plant Physiol Biochem*, 27: 847–854.
- DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVA E, et al, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses [J]. *Cell Mol Life Sci*, 57(5): 779–795.
- FENG HQ, LI X, DUAN JG, et al, 2008. Chilling tolerance of wheat seedlings is related to an enhanced alternative respiratory pathway [J]. *Crop Sci*, 48(6): 2 381–2 388.
- HAMADA A, SHONO M, XIA T, et al, 2001. Isolation and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini* [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 46(1): 35–42.
- HESSINI K, CRUZ C, GANDOUR M, et al, 2009. Do reactive oxygen species (ROS) induced by NaCl contribute to ammonium accumulation in *Spartina alterniflora*? [J]. *J Plant Nutr Soil Sci*, 172(6): 851–860.
- MAXWELL, DP, WANG Y, MCINTOSH L, 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cell [J]. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 96(14): 8 271–8 276.
- MILLENAAR FF, LAMBERS H, 2003. The alternative oxidase: in vivo regulation and function [J]. *Plant Biol*, 5(1): 2–15.
- MUNNS R, TESTER M, 2008. Mechanisms of salinity tolerance [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 59: 651–681.
- MURASHIGE T, SKOOG F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Physiol Plant*, 15(3): 473–497.
- NAGATA T, OKADA K, TAKEBE I, et al, 1981. Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes) [J]. *Mol Gen Ge-*
- (下转第 502 页 Continue on page 502)