

一氧化氮和亚甲基蓝对盐胁迫抗虫棉根系的抗氧化能力的影响

孙 锋

(安徽农业大学生命科学学院,合肥 230036)

摘要:通过检测抗氧化酶活性和抗氧化物含量,研究一氧化氮和亚甲基蓝对盐胁迫抗虫棉根系的抗氧化能力的影响。在正常条件和盐胁迫条件下分别用一氧化氮和亚甲基蓝处理抗虫棉幼苗,检测抗坏血酸(ASA)含量、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性、谷胱甘肽还原酶(GR)活性、谷胱甘肽(GSH/GSSG)值、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性,并作对比。结果表明:正常生长条件下添加NO能促进棉花幼苗生长,而添加亚甲基蓝(MB)显著抑制抗虫棉幼苗的生长;添加NO显著缓解了盐胁迫对棉花幼苗生长的抑制,提高了根系的抗氧化能力,盐胁迫下添加NO的同时添加MB可不同程度地降低以上抗氧化物质含量和抗氧化酶活力,解除NO对盐胁迫的促长作用。

关键词:一氧化氮;亚甲基蓝;盐胁迫;棉花根系;抗氧化

中图分类号:S562.01 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2009)04-0313-06

Effects of Nitric Oxide and Methylene Blue on Antioxidant Capacity of the Insect-resistant Cotton Seedling Roots under NaCl Stress

SUN Feng

(School of Life Science, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: Effects of nitric Oxide and methylene blue on antioxidant capacity of the insect-resistant cotton seedlings roots under NaCl stress by determining activity of antioxidant enzymes and content of antioxidants were studied. The cotton seedlings were dealt with nitric oxide and methylene blue (MB) respectively under normal and salt stress conditions, and enzyme activities of ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), dehydroascorbate reductase (DHAR), mono-dehydroascorbate reductase (MDAR) and content of ascorbic acid (ASA), glutathione (GSH/GSSG) were determined and analyzed. Results Showed that it promoted the growth of cotton seedlings by adding NO and significantly inhibited the growth of cotton seedlings by adding MB in normal conditions, lessened the inhibition of growth of cotton seedlings in salt stress by adding NO, and improved antioxidant capacity in roots. The activities of antioxidant enzymes and contents of antioxidants decreased by adding NO and NB at the same time in salt stress conditions, and the role of NO in the promotion of growth was removed.

Key words: nitric oxide; methylene blue; salt stress; cotton roots; antioxidant

棉花是我国重要的农业经济作物,主要分布在中西部地区。由于该地区气候原因,造成约2000万hm²盐荒地和667万hm²盐渍化耕地,温室土壤的次生盐渍化也已成为设施栽培中普遍

存在的问题^[1]。试验证明,植物细胞在盐胁迫条件下,由于代谢受阻而会产生大量的活性氧(ROS),造成对植物细胞的细胞膜脂过氧化作用的加强,活性氧产生与清除之间的动态平衡被破

收稿日期:2008-11-12 作者简介:孙 锋(1972-),男,硕士,讲师,sunfenganhui2008@126.com

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目

坏,导致膜系统损伤和细胞伤害。在此过程中,植物主动或被动地调节抗氧化酶类如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GR)等和抗氧化物质如抗坏血酸(ASA)、谷胱甘肽(GSH)等来消除这些活性氧和氧自由基,减缓和抵御其对细胞的伤害^[2]。

一氧化氮(NO)广泛存在于植物组织中,是一种重要的氧化还原信号分子和毒性分子,参与植物在生物及非生物胁迫下适应性的提高过程^[3],其重要途径之一是激活鸟苷酸环化酶(cGC)产生环鸟苷单磷酸(cGMP)。亚甲基蓝(methylene blue, MB)属于吩噻嗪类染料,与嘧啶有相似的结构,其与DNA有插入和静电作用^[4-5],是鸟苷酸环化酶和一氧化氮结合酶的强效抑制剂。同时亚甲基蓝具有氧化还原能力,对生物体内自身产生的氧自由基起杀灭功能^[6]。

研究表明,外源NO通过提高NaCl胁迫下小麦^[7]、番茄^[8]等幼苗超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性来缓解盐胁迫导致的ROS的累积,从而起到保护作用。本实验以对NaCl胁迫主要作物之一棉花为材料,研究外源NO对NaCl胁迫下棉花幼苗生长和根系非酶促抗氧化物质及相关抗氧化酶系统的调节作用,为进一步了解NO提高植物耐盐性的作用机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于2008年4月在安徽农业大学农业推广基地实验室进行。供试棉花品种为鲁抗33(转Bt基因抗虫棉,盐敏感)。

1.2 方法

将抗虫棉种子在26℃恒温箱培养36h,播于装有厚度为5cm石英砂的白磁盘中,每穴2粒,穴间间隔2cm,培养箱温度设为:昼温25~30℃,夜温16~20℃,自然光照。在幼苗第2片真叶展开时,选整齐一致的幼苗移入20L塑料周转箱中(含营养液)进行水培,每小时通气40min,预培养3d后用NaCl(50mmol·L⁻¹)处理,同时在营养液中加入NO供体硝普(sodium-nitroprusside, SNP)或NO信号传递途径关键酶cGC抑制剂亚甲基蓝(MB)。

试验设6个处理:(1)正常营养液(以色列HAMAN公司,用时50倍稀释)栽培(NR);(2)

正常营养液栽培(NR)+100μmol·L⁻¹SNP(NSO);(3)正常营养液栽培(NR)+5μmol·L⁻¹MB(NM);(4)50mmol·L⁻¹NaCl胁迫(NC);(5)50mmol·L⁻¹NaCl胁迫+100μmol·L⁻¹SNP(CSO);(6)50mmol·L⁻¹NaCl胁迫+100μmol·L⁻¹SNP+5μmol·L⁻¹MB(CSM),处理期间每两天更换一次营养液,于处理后第0、2、4、6、8d取幼苗根系进行抗氧化酶系活性的测定。实验设3次重复。

1.2.1 测定指标和方法。采样时,轻轻拔起幼苗,先用自来水对幼苗根部冲洗2~3次,再用手术剪刀剪下棉苗根部,在蒸馏水下冲洗2次,吸水纸吸干后称量鲜重,放置于恒温干燥箱105℃烘20min后,70℃烘干至恒重,称其干重。

抗坏血酸(ASA)含量按照Arakawa等^[9]方法测定;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性按照Nakano和Asada^[10]方法测定;谷胱甘肽还原酶(GR)活性按照Foyer和Halliwell^[11]方法测定;谷胱甘肽(GSH、GSSG)含量按照Griffith^[12]方法测定;脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性按照Hossain和Asada^[13]方法测定;单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性按照Miyake和Asada^[14]方法测定。

1.2.2 统计分析。所有数据用SAS软件进行单因素方差分析,并对平均数用Duncan's新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 NO和MB对幼苗根系生长的影响

2.1.1 NO和MB对幼苗根系生长形态的影响。由图1-3可以看出,正常条件下经过NO处理后,棉花根系和不处理的相比较为发达,但经过NO和MB同时处理后,棉花根系显得纤细而且质脆。在图4-6中,盐胁迫下,棉花根系由于受到NaCl的影响,主根和侧根都较细,经NO处理后可见,棉花主根较为发达,侧根也很粗壮,但在NO和MB同时处理后发现,棉花根系细小且质脆,颜色呈褐色。NO对棉花根系生长有促进作用,而MB对棉花根系生长起着阻碍作用。

2.1.2 NO和MB对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系重量的影响。从表1可以看出,正常生长条件下添加外源SNP对抗虫棉幼苗根生长略有促进作用,根鲜重、干重与对照差异均未达到显著水平,正常生长条件下添加MB显著抑制了棉花幼苗的

生长,生物量较对照显著下降。在 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫 8 d 后,抗虫棉幼苗根鲜重、干重比正常生长条件下显著下降,一定浓度的 NaCl 处理显著抑制了棉花幼苗的生长。NaCl 胁迫下添加 SNP 后,根系的鲜重、干重和单独 NaCl 处理相比

显著增加,显著缓解了 NaCl 胁迫对抗虫棉幼苗生长的抑制。NaCl 胁迫条件下添加外源 NO 的同时添加 SNP 的抑制剂 MB,幼苗的生长状况与单独 NaCl 处理相当,从某种程度上消除了 NO 对 NaCl 胁迫下抗虫棉幼苗生长的缓解作用。



图1 正常棉花幼苗根系
Fig.1 Cotton seedling roots
in normal conditions



图2 经NO处理后棉花幼苗根系
Fig.2 Cotton seedling roots on NO



图3 经NO和MB处理后棉花幼苗根系
Fig.3 Cotton seedling roots
on NO and MB



图4 盐胁迫下棉花幼苗根系
Fig.4 Cotton seedling roots
in salt stress conditions



图5 经NO处理后盐胁迫棉花幼苗根系
Fig.5 Cotton seedling roots in
salt stress conditions on NO



图6 经NO和MB处理后盐胁迫棉花幼苗根系
Fig.6 Cotton seedling roots in salt
stress conditions on NO and MB

表 1 NO 和 MB 对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系重量的影响

Table 1 Effects of nitric oxide and methylene blue on the fresh and dry weight of cotton seedlings under NaCl stress

不同处理	NR	NSO	NM	NC	CSO	CSM
根鲜重/(g·株 ⁻¹)	8.98	8.75	0.44	0.47	8.77	0.45
根干重/(g·株 ⁻¹)	1.12	1.07	0.48	0.51	1.04	0.48
5%显著水平	a	a	c	c	b	c

注:表中小写字母表示在同期处理间的差异达 5% 时的显著水平;以下表均同。

2.2 NO 和 MB 对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系抗坏血酸(ASA)含量和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的影响

由表 2 可以看出,正常生长条件下添加 SNP(NSO 处理)也能提高棉花幼苗根系内 ASA 含量,在第 4、6、8 d 与对照差异显著;正常条件下添加 MB 时(NM 处理)ASA 含量在第 2 d 显著高于对照,然后下降,在第 6、8 d 显著低于对照。在 NaCl 胁迫的条件下,抗虫棉根系的抗坏血酸

(ASA)含量在第 2 d 时上升,然后下降,NaCl 胁迫条件下,添加 SNP(CSO 处理)提高了根系内的 ASA 含量,在整个胁迫期间与单独 NaCl 胁迫处理间均有显著性差异;NaCl 胁迫条件下添加 SNP 的同时添加 MB(CSM 处理)抑制了 NO 的作用,ASA 含量下降,在胁迫第 2 d 和第 6 d 时与 NSO 处理差异显著。上述结果说明 NO 可能通过 cGC 对植株根系 ASA 含量进行调节。

正常生长条件下添加 SNP 同样促进了根系

APX活性的提高,在处理的第4、6、8 d时显著高于对照,正常条件下添加MB也提高了APX的活性,在处理第2 d时显著高于对照。在NaCl胁迫下抗虫棉幼苗根系抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性提高,且在整个处理期间都显著高于对照;CSO处理后的APX活性进一步提高,在处

理的第2、4、8 d显著高于单独NaCl胁迫处理,在CSM处理的第2 d APX活性显著高于CSO处理,随后APX活性降低,低于CSO处理,在处理的第4、6 d两处理间差异显著。说明NO对植株根系APX活性的调节不仅仅通过cGC,还存在其它途径。

表2 NO和MB对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系抗坏血酸(ASA)含量和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的影响

Table 2 Effects of nitric oxide and methylene blue on the content of ASA and activities of APX in cotton

处理时间/d	seedling roots under NaCl stress											
	NR		NSO		NM		NC		CSO		CSM	
	ASA	APX	ASA	APX	ASA	APX	ASA	APX	ASA	APX	ASA	APX
0	0.303a	200a	0.303a	200a	0.303a	200a	0.303a	200a	0.303a	200a	0.303a	200a
2	0.311d	203b	0.325d	215a	0.457c	226c	0.466c	248c	0.597a	305b	0.522b	325b
4	0.308b	201b	0.368a	221a	0.311b	208c	0.287c	270c	0.380a	332c	0.333a	302c
6	0.310b	210b	0.422a	230a	0.195d	198d	0.198d	308e	0.296c	306c	0.188d	295e
8	0.306b	205b	0.423a	208a	0.188c	198c	0.191d	275c	0.201c	298c	0.187c	287c

2.3 NO和MB对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系谷胱甘肽还原酶(GR)活性和谷胱甘肽(GSH/GSSG)值测定

由表3可以看出,正常条件下添加SNP也促进了GR(NSO)活性提高,在处理的第4、6、8 d显著高于对照,正常生长条件下添加MB抑制了根系GR的活性,在处理的第8 d与对照差异显著。随处理时间的延长,NaCl胁迫下幼苗根系GR活性逐渐提高,但在处理第4、6、8 d又有降低的趋势;NaCl胁迫下添加SNP(CSO)后GR活性提高且在处理的第2、6、8 d与单独NaCl胁迫处理差异显著,NaCl胁迫条件下添加SNP的同时添加MB(CSM)抑制了NO对GR的调节作用,GR活

性降低,在整个处理期间与CSO处理差异显著。

在正常条件下添加NO显著提高了GSH/GSSG,在整个处理期间与对照差异显著;正常条件下添加MB(NM),GSH/GSSG降低,在处理的第6 d与对照差异显著。NaCl胁迫下GSH/GSSG下降,在处理的第2、4、6 d与对照差异显著。NaCl胁迫下添加SNP(CSO),GSH/GSSG与单独NaCl胁迫下处理比较有所提高,在第6 d时与单独NaCl胁迫差异显著;NaCl胁迫下添加SNP同时添加MB(CSM)抑制了NO对GSH/GSSG的调节作用,GSH/GSSG下降且在第6 d与CSO处理差异显著。

表3 NO和MB对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系抗谷胱甘肽还原酶(GR)活性和谷胱甘肽(GSH/GSSG)值的影响

Table 3 Effects of nitric oxide and methylene blue on the activities of GR and GSH/GSSG in cotton seedling roots

处理时间/d	under NaCl stress											
	NR		NSO		NM		NC		CSO		CSM	
	GR	GSH/GSSG	GR	GSH/GSSG	GR	GSH/GSSG	GR	GSH/GSSG	GR	GSH/GSSG	GR	GSH/GSSG
0	0.223a	0.301a	0.222a	0.300a	0.222a	0.302a	0.220a	0.300a	0.223a	0.305a	0.222a	0.300a
2	0.224d	0.322b	0.247d	0.465a	0.251c	0.300b	0.255c	0.210c	0.342a	0.253b	0.228b	0.263c
4	0.226b	0.296b	0.333a	0.460a	0.193b	0.262b	0.201c	0.191c	0.346a	0.187c	0.265a	0.186d
6	0.225b	0.331b	0.358a	0.453a	0.190d	0.228d	0.205d	0.184e	0.444c	0.254c	0.305d	0.193d
8	0.223b	0.302b	0.400a	0.535a	0.188c	0.224d	0.203d	0.211d	0.452c	0.266d	0.312d	0.209d

2.4 NO和MB对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性的影响

正常生长条件下添加SNP(NSO)对DHAR的活性有促进作用,在整个处理期间都显著高于对照;正常条件下添加MB(NM)也促进了DHAR活性的提高,在处理的第2、6、8 d时与对照差异显著。说明外源NO和MB对根系

DHAR无明显的调节作用。NaCl胁迫条件下,转基因抗虫棉幼苗根系DHAR活性显著提高,在整个处理期间都显著高于对照;NaCl胁迫条件下添加SNP(CSO)处理的DHAR活性也略有提高,NaCl胁迫条件下添加SNP的同时添加MB(CSM),对DHAR的活性也无显著影响。

正常条件下添加SNP(NSO)对棉花幼苗MDAR无显著影响;添加MB(NM)的第2 d

MDAR 活性低于对照,随后一直高于对照,在处理的第 8 d 时显著高于对照。NaCl 胁迫条件下棉花幼苗根系 MDAR 活性有显著的提高(近 80%),在整个处理期间与对照差异显著。NaCl 胁迫下添加 SNP(CSO) 处理的 MDAR 活性与单

独 NaCl 胁迫处理相比较也有所升高,但差异并不显著。NaCl 胁迫下添加 SNP 的同时添加 MB(CSM),MDAR 的活性在整个处理期间与 CSO 处理差异不显著。

表 4 NO 和 MB 对盐胁迫下抗虫棉幼苗根系脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)活性值测定

Table 4 Effects of nitric oxide and methylene blue on the activities of DHAR and MDAR in cotton seedling roots

处理时 间/d	under NaCl stress											
	NR		NSO		NM		NC		CSO		CSM	
	DHAR	MDAR	DHAR	MDAR	DHAR	MDAR	DHAR	MDAR	DHAR	MDAR	DHAR	MDAR
0	0.322a	0.385a	0.321a	0.388a	0.320a	0.385a	0.322a	0.383a	0.325a	0.380a	0.324a	0.387a
2	0.325c	0.388d	0.395b	0.605b	0.328c	0.355c	0.417a	0.675b	0.444a	0.655a	0.421a	0.786a
4	0.321b	0.421b	0.359b	0.655a	0.335b	0.486b	0.422b	0.679a	0.473a	0.673a	0.448b	0.774a
6	0.322b	0.392c	0.377b	0.626b	0.356b	0.592b	0.431a	0.687a	0.468a	0.680a	0.450a	0.785a
8	0.323c	0.417c	0.368c	0.622b	0.422b	0.603b	0.513a	0.894a	0.511a	0.888a	0.519a	0.886a

3 讨论

盐胁迫条件下,植物生长受到抑制,这可能是碳化合物减少,渗透调节能耗和维持生长能耗增加的结果^[15]。NO 能促进 NaCl 胁迫条件下棉花幼苗的生长,与 NO 可通过质外体直接作用于细胞壁组分,使细胞壁松弛,以及 NO 作用于膜的磷脂双分子层,增强膜的流动性,从而促进细胞扩展、植株生长有关^[16],说明 NO 对 NaCl 胁迫下植株耐盐性的提高具有特殊的作用。而 NaCl 胁迫条件下添加外源 NO 缓解了 NaCl 胁迫对抗虫棉幼苗生长的抑制作用,添加 NO 的同时添加 NO 的抑制剂 MB,NO 的缓解作用被解除。

外源 NO 能诱导 NaCl 胁迫下棉花幼苗 SOD、POD、CAT 活性的升高,延缓 O₂⁻、H₂O₂ 的积累,同时明显地提高了 NaCl 胁迫条件下棉花幼苗根系 APX 和 GR 活性以及 GSH 含量和 GSH/GSSG 比值,APX 活性的提高标志着植物体清除活性氧能力的增强。GR 是 ASA-GSH 循环中的一种关键酶,在 NADPH 作用下,催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原为还原型谷胱甘肽(GSH),GSH/GSSH 比值可以作为细胞内的信号分子,从而对相关基因表达、翻译速率、蛋白质巯基化以及酶活性的调节进行直接的调控,同时,超量表达 GR 的转基因植物的耐盐性亦显著提高^[17]。当盐胁迫下加 NO 和 MB 时,对 APX 和 ASA 仍存在不同程度的影响。

APX 的活性直接影响到 ASA 的含量,ASA 在 APX 的作用下与 H₂O₂ 反应,H₂O₂ 接受以 GSH 为中介的 NADPH 的电子还原成 H₂O,从而清除 H₂O₂ 的毒性,形成单脱氢抗坏血酸

(MDHA)和脱氢抗坏血酸(DHA)^[18]。NO 缓解了 NaCl 胁迫下抗虫棉幼苗根系 ASA 含量的下降,这可能与 NO 能改变 NaCl 胁迫下植物细胞内的氧化还原状态或提高 ASA 合成酶的活性有关。

从试验结果看,抗虫棉和其它农作物(如小麦、西红柿等)一样,苗期用 NO 处理,在某种程度上可暂缓盐胁迫带来的危害,这对棉花、水稻等必需育苗的农作物有一定的意义。

参考文献:

- [1] 王艳娜,侯振安,龚江,等. 咸水滴灌对棉花生长和离子吸收的影响[J]. 棉花学报,2007,19(6):472-476.
WANG Yan-na, Hou Zhen-an, Gong Jiang, et al. The effect of drip irrigation with saline water on growth and ion uptaking of cotton[J]. Cotton Science, 2007, 19(6):472-476.
- [2] 唐薇,罗振,温四民,等. 干旱和盐胁迫对棉苗光合抑制效应的比较[J]. 棉花学报,2007,19(1):28-32.
TANG Wei, Luo Zhen, Wen Si-min, et al. Comparison of inhibitory effects on leaf photosynthesis in cotton seedlings between drought and salinity stress[J]. Cotton Science, 2007, 19(1):28-32.
- [3] 蔡红涛,汤一卒,刁品春,等. 棉花花铃期土壤持续干旱胁迫对产量形成的调节效应[J]. 棉花学报,2008,20(4):300-305.
CAI Hong-tao, Tang Yi-zu, Diao Pin-chun, et al. Regulating effect of soil progressive drought on yield of cotton during blooming and bolling periods[J]. Cotton Science, 2008, 20(4):300-305.

- [4] ROHS R, Sklenar H, Lavery R, et al. Methylene blue binding to DNA with alternating GC base sequence; a modeling study[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(18): 2860-2866.
- [5] ZHAO Guang-chao, Zhu Jun-jie, Chen Hong-yuan. Spectroscopic studies of the interactive model of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin [J]. *Spectrochim Acta*, 1999, 5(5): 1109-1117.
- [6] OZKAN D, Kara P, Kerman K, et al. DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrode by using methylene blue as an electrochemical label[J]. *Bioelectrochemistry*, 2002, 58(1): 119-126.
- [7] 阮海华, 沈文彪, 刘开力, 等. 外源一氧化氮供体对盐胁迫下小麦幼苗叶片谷胱甘肽抗氧化酶系统的影响[J]. *作物学报*, 2005, 31(9): 1144-1149.
RUAN Hai-hua, Shen Wen-biao, Liu Kai-li, et al. Effects of exogenous NO donor on glutathione dependent antioxidative system in wheat seedling leaf under salt stress[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(9): 1144-1149.
- [8] 吴雪霞, 朱月林, 朱为民, 等. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长和光合作用的影响[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(6): 1206-1211.
WU Xue-xia, Zhu Yue-lin, Zhu Wei-min, et al. Effects of exogenous nitric oxide on seedling growth of tomato under NaCl stress[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2006, 26(6): 1206-1211.
- [9] ARAKAWA N, Tsu T M, Sanceda N G, et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1981, 45(5): 1289-1290.
- [10] NAKANO Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22: 867-880.
- [11] FOYER C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts; a proposed role in ascorbic acid metabolism[J]. *Planta*, 1976, 133: 21-25.
- [12] GRIFFITHS O W. Determination of glutathione and glutathione disulphide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine [J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 106: 207-212.
- [13] HOSSAIN M A, Asada K. Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme[J]. *Plant Cell Physiology*, 1984, 25(1): 85-92.
- [14] MIYAKE C, Asada K. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplast and photoreduction of its primary oxidation product of monodehydroascorbate radicals in thylakoids[J]. *Plant Cell Physiology*, 1992, 33: 541-553.
- [15] 沈法富. 盐胁迫对棉花幼苗子叶超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. *棉花学报*, 1993, 5(1): 39-44.
SHEN Fa-fu. The effect of salt stress on superoxide dismutase in cotton seedling cotyledon[J]. *Cotton Science*, 1993, 5(1): 39-44.
- [16] LESHEM Y Y, Hamaraty E. Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage [J]. *J Plant Physiol*, 1996, 148: 258-263.
- [17] ALLEN R D, Webb R P, Schake S A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses[J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, 23: 473-479.
- [18] 杨广东, 李燕娥, 石跃进, 等. 抗虫棉品系 I.22 依赖抗坏血酸 H_2O_2 清除酶系统活性的降低[J]. *棉花学报*, 2002, 14(2): 97-98.
YANG Guang-dong, Li Yan-e, Shi Yue-jin, et al. The decrease of ascorbate dependent H_2O_2 -scavenging system activities in transgenic Bt cotton line I.22[J]. *Cotton Science*, 2002, 14(2): 97-98. ●