

Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 对蔓茎堇菜悬浮细胞 凋亡和总黄酮含量的影响

代容春, 陈由强, 黄儒珠, 洪丽亚
(福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350007)

摘要: 用 DNA Laddering 和 DAPI 荧光检测法对 Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 诱导的蔓茎堇菜 (*Viola diffusa* Ging.) 悬浮细胞的凋亡情况进行研究, 同时还测定了诱导过程中悬浮细胞的生长量和总黄酮含量。结果表明, Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 可诱导蔓茎堇菜悬浮细胞发生凋亡, 1.0 mmol · L⁻¹ Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 胁迫诱导培养 8 d 时, 细胞凋亡率最高 (55.7%); 总黄酮含量显著增加, 达 2.820%。表明 Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 在诱导蔓茎堇菜悬浮细胞凋亡并抑制其生长的同时, 还能促进黄酮类化合物的合成。

关键词: 蔓茎堇菜; 硝酸铈铵; 细胞凋亡; 总黄酮; 悬浮培养

中图分类号: Q945.14 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2007)01-0023-05

Effect of Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ on apoptosis and content of total flavonoids of suspension cultured cells of *Viola diffusa* Ging. DAI Rong-chun, CHEN You-qiang, HUANG Ru-zhu, HONG Li-ya (College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(1): 23-27

Abstract: The apoptosis of suspension cultured cells of *Viola diffusa* Ging. which had been induced by Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ were detected by DNA Laddering and DAPI fluorescence stain methods. Cell growth and content of total flavonoids in suspension cultured cells were also determined. The results showed that different concentrations of Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ could induce apoptosis of suspension cultured cells, and the rate of apoptosis was the highest (55.7%) and content of total flavonoids reached to 2.820% when they were induced by 1.0 mmol · L⁻¹ Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ for eight days. It was indicated that Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ can induce apoptosis and inhibit cell growth, it also can promote the synthesis of flavonoids in suspension cultured cells of *V. diffusa*.

Key words: *Viola diffusa* Ging.; Ce(NH₄)₂(NO₃)₆; apoptosis; total flavonoids; suspension culture

细胞凋亡 (apoptosis) 又称细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD), 指细胞在一定的生理或病理条件下所发生的由特定基因控制的主动连续的程序化死亡过程^[1]。迄今为止, 对细胞凋亡机理的认识主要来自对动物细胞凋亡的研究^[2,3]。有关植物细胞凋亡的研究起步较晚, 其细胞凋亡机理仍很不清楚, 是否存在类似动物细胞中普遍存在的凋亡机理也不得而知, 主要是因为植物体内发生凋亡的细胞比率小、细胞同步性低、相对过程短且难以检测。作为研究细胞凋亡的有效手段之一, 体外培养体系能很好地解决这一问题。体外培养体系具有诱导同步率高、诱导量大及稳定性强等特点, 高效诱导细胞凋亡的植物体外培养体系可为植物细胞凋亡机理的研究提供良好的基础。因此, 建立稳定的植

物细胞凋亡诱导体系, 是研究植物细胞凋亡机理的基础。

蔓茎堇菜 (*Viola diffusa* Ging.) 悬浮细胞系的分散性较好, 多数呈单细胞状态存在, 生长良好且同步化程度高, 是建立植物细胞凋亡体系的理想材料之一^[4]。作者利用 Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 诱导蔓茎堇菜悬浮细胞发生凋亡, 并应用 DNA Laddering 和 DAPI 荧光检测法对诱导结果进行检测及观察, 从而确定 Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ 的诱导剂量及诱导时间, 旨在建立一种较为理想的植物细胞凋亡的诱导体系; 同时,

收稿日期: 2006-09-03

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (B0510009)

作者简介: 代容春 (1973-), 女, 福建仙游人, 硕士, 讲师, 主要从事植物生理学和植物分子生物学研究。

探讨 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞生长和总黄酮含量的影响,为实现蔓茎堇菜次生代谢物的工业化生产提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为蔓茎堇菜 (*Viola diffusa* Ging.) 叶片诱导产生的疏松愈伤组织,由福建师范大学生命科学学院植物细胞工程实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 悬浮细胞的培养 取在固体培养基上培养约 20 d,继代 3~4 次的淡黄色疏松愈伤组织,以 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的量接入液体培养基(含 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D, $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ LH 和 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 培养基, pH 5.8) 中。培养温度 (26 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 无或弱光照, 转速 $100 \sim 110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 每 12 天继代 1 次。

继代方法:培养物摇匀,静置片刻后,将上层培养基连同其中的单细胞和小细胞团倒入另一无菌小三角瓶中,弃去底部愈伤组织块及大细胞团,待单细胞及小细胞团沉入瓶底后,弃去大部分(约 2/3)培养基。摇动小三角瓶,使沉淀悬浮,吸取 1 滴滴于血球计数板上,以游离单细胞为基数计算细胞密度,重复 5 次,求其平均值。再用新鲜液体培养基稀释至细胞密度为 $2.0 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,在上述条件下继续进行培养。

1.2.2 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 处理方法 继代培养 3 次后,在培养液中加入 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$,使培养液中 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 的终浓度分别达到 0.5、1.0 和 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,对照组不添加 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$,在上述条件下培养 2、4、6、8、10 和 12 d 后,取培养液进行下列检测。

1.2.3 DNA 的提取及琼脂糖凝胶电泳 DNA 提取采用 SDS 高盐低 pH 法^[5]。将提取的 DNA 样品在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,电压为 $3 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$,电泳缓冲液为 $1 \times \text{TBE}$,EB 染色 30 min,紫外凝胶成像系统观察并拍照。

1.2.4 DAPI 荧光检测 取少量细胞悬浮液,重蒸水稀释分散后,用滴管吸取少量悬浮液至洁净的载玻片上,加 $4 \mu\text{L}$ $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI 染液,盖片推匀,封片,在奥林巴斯 BX51 型荧光数字生物显微镜下

观察细胞核形态并计算细胞凋亡率,计算公式为:凋亡率 = (凋亡个体数/计算总数) $\times 100\%$ ^[6]。

1.2.5 细胞生长量的测定 取约 10 瓶刚更换过新鲜培养液且 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 终浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的悬浮细胞液,合并后混匀。将此悬浮液分别装入 21 个 150 mL 无菌三角瓶内,每瓶约 30 mL。每 2 天取 3 瓶按下列方法测定细胞干质量。

取蔓茎堇菜细胞悬浮液, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,倾去上清液后,将离心管(含沉淀物)放入 $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内烘干,8 h 后测定沉淀物的干质量。细胞干质量测定结果取平均值。

1.2.6 总黄酮含量的测定 精密称取芦丁标样 10 mg ($105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重),加适量 60% 乙醇溶解并定容至 100 mL,摇匀;精密量取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 及 8.0 mL,分别用 60% 乙醇定容至 10 mL,摇匀,265 nm 测定 OD 值,以 60% 乙醇作为空白对照,绘制标准曲线。

参照郭晋隆等建立的蔓茎堇菜总黄酮提取方法^[7]进行总黄酮的提取。取适量蔓茎堇菜细胞悬浮液, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,倾去上清液得到新鲜细胞, $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥至恒重,研碎后过 60 目筛。精密称取 1 g 粉末,加入 20 mL 70% 乙醇, $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴回流 1 h。过滤后,滤渣重复浸提 2 次。合并滤液,减压浓缩至适量,置冰箱中过夜。将浓缩液过滤并定容至 100 mL,得到总黄酮提取液。

取 2 mL 总黄酮提取液,用 60% 乙醇稀释并定容至 10 mL,摇匀,于 265 nm 测定其 OD 值,并根据标准曲线计算样品中的总黄酮含量。

2 结果和分析

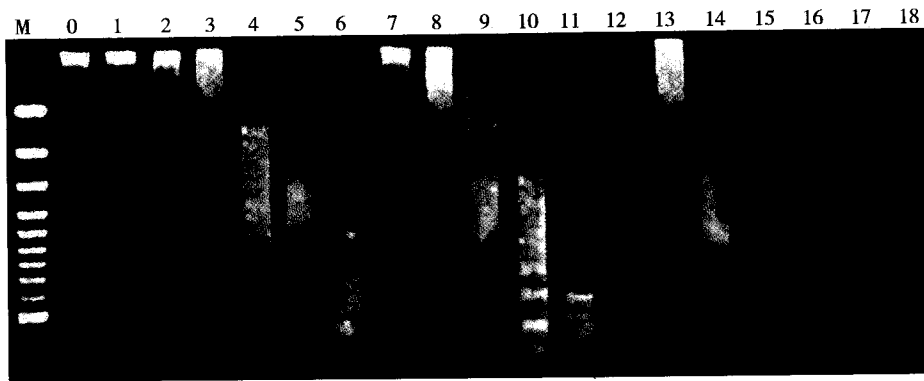
2.1 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞凋亡的影响

2.1.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析结果 根据 DNA 凝胶电泳图谱(图 1)可以发现,在培养 12 d 内,对照组悬浮细胞的总 DNA 均呈完整条带,没有降解。当 $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ 浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养第 2 天悬浮细胞的总 DNA 也呈完整条带,没有降解;之后,总 DNA 出现不同程度的降解,但没有观察到明显的已降解的 DNA 条带。当

$Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,随培养时间的延长,总 DNA 降解程度增大,培养 8~10 d 时,蔓茎堇菜悬浮细胞的 DNA 电泳图谱上可见到间隔大约为 200 bp 的 DNA 条带,表明 DNA 降解是非随机性的,细胞受损后启动了预定的死亡程序,激活了特定的核酸内切酶,最终导致细胞出现凋亡现象;而在培养 12 d 的蔓茎堇菜悬浮细胞总 DNA 电泳图谱上几乎看不到谱带,可能是因为处理时间延长致使 DNA 降解成更小的片段。当 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养 2、4 和 6 d 的蔓茎堇菜悬浮细胞总 DNA 也出现不同程度的随机降解,但没有观察到已降解的 DNA 条带;在培养 8、10 和 12 d 的悬浮细胞 DNA 电泳图谱上则看不到谱带,表

明 DNA 被降解成很小的碎片。

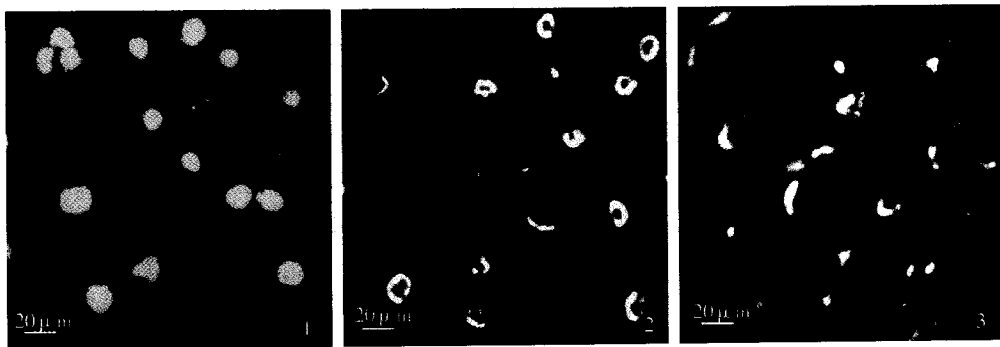
2.1.2 DAPI 荧光检测观察结果 采用 DAPI 荧光染色法观察到的蔓茎堇菜悬浮细胞的细胞核形态见图 2。由图 2 可见,对照组悬浮细胞的细胞核呈均匀、明亮的荧光,细胞核呈较规则的圆形。当 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,培养过程中相继出现核染色质的凝集及周边化现象;培养 8 d 的蔓茎堇菜悬浮细胞半数以上的细胞核呈中空形态;而培养 10 d 的细胞核多呈不规则形态,如三角形、弯月形或拉长等。当 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 0.5 和 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,各处理组中均有一定数量的悬浮细胞的细胞核呈现凋亡的形态。



M: 100 bp DNA ladder Mark; 0: 对照 Control; 1-6: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 分别诱导 2, 4, 6, 8, 10 和 12 d Induced by $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 d respectively; 7-12: $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 分别诱导 2, 4, 6, 8, 10 和 12 d Induced by $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 d respectively; 13-18: $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 分别诱导 2, 4, 6, 8, 10 和 12 d Induced by $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ for 2, 4, 6, 8, 10 and 12 d respectively.

图 1 不同浓度 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 诱导的蔓茎堇菜悬浮细胞 DNA 电泳图谱

Fig. 1 DNA fragments of suspension cultured cells of *Viola diffusa* Ging. induced by different concentrations of $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$



1: 对照 Control; 2: $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 诱导 8 d Induced by $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ for 8 d; 3: $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 诱导 10 d Induced by $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ for 10 d.

图 2 DAPI 荧光染色显示的蔓茎堇菜悬浮细胞的细胞核形态

Fig. 2 Morphology of cell nucleus of suspension cultured cells of *Viola diffusa* Ging. by DAPI fluorescence stain method

2.1.3 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对细胞凋亡率的影响
 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 诱导的蔓茎堇菜悬浮细胞凋亡率变化如表1所示。当 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养第4天细胞出现凋亡现象;随着培养时间的延长,凋亡率不断增加,第10天达到最高,之后凋亡率又开始下降。当 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养第2天便可观察到细胞凋亡现象;随着处理时间的延长凋亡率增加速度较快,第8天时最高,达55.7%;之后凋亡率开始下降。当 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 浓度为 $1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,培养第2天即可观察到细胞凋亡现象,但凋亡率较低,最大仅为26.6%,到第8天时,凋亡率下降并且已不能观察到凋亡的细胞。

表1 不同浓度 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞凋亡率的影响
 Table 1 Effect of different concentrations of $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ on rate of apoptosis of suspension cultured cells of *Viola diffusa* Ging.

浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	培养时间/d Culture time	凋亡率/% Rate of apoptosis
0.5	2	0.0
	4	2.7
	6	11.0
	8	34.5
	10	35.2
	12	27.7
1.0	2	10.2
	4	18.0
	6	33.8
	8	55.7
	10	40.4
	12	9.5
1.5	2	12.8
	4	26.6
	6	14.0
	8	0.0
	10	0.0
	12	0.0

2.2 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞生长的影响

$1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞生长的影响见表2。由表2可见,蔓茎堇菜对照组的悬浮细胞在12 d内不断生长,培养至第12天时其细胞干质量为刚接种时的3.59倍。 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞生长有明显的抑制作用,培养至第12天时,其细胞

干质量仅为 $3.700\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,增加幅度很小。

表2 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞生长量及总黄酮含量的影响
 Table 2 Effect of $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ on cell growth and content of total flavonoids in suspension cultured cells of *Viola diffusa* Ging.

浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	培养时间/d Culture time	细胞干质量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Dry weight of cell	总黄酮含量/% Content of total flavonoids	
0(CK)	0	3.033 ± 0.034	1.531 ± 0.032	
	2	3.078 ± 0.051	1.459 ± 0.043	
	4	4.089 ± 0.084	1.194 ± 0.029	
	6	5.645 ± 0.107	0.851 ± 0.034	
	8	7.611 ± 0.135	0.881 ± 0.041	
	10	9.633 ± 0.088	1.318 ± 0.009	
	12	10.900 ± 0.120	1.552 ± 0.052	
	1.0	0	3.044 ± 0.020	1.530 ± 0.030
		2	3.056 ± 0.051	1.492 ± 0.063
		4	3.744 ± 0.171	1.661 ± 0.033
		6	3.767 ± 0.115	1.969 ± 0.050
		8	4.011 ± 0.190	2.820 ± 0.065
10		3.856 ± 0.084	2.110 ± 0.101	
12	3.700 ± 0.088	1.557 ± 0.062		

2.3 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞总黄酮含量的影响

$Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 对蔓茎堇菜悬浮细胞总黄酮含量有显著的影响。由表2可见,对照组悬浮细胞的总黄酮含量在1个培养周期(12 d)内先降后升,对数生长期黄酮类化合物的合成相对较少,培养后期不断增多,第12天时含量达到最高,但仅为1.552%。用 $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 培养初期,悬浮细胞的总黄酮含量呈上升趋势;培养至第8天,总黄酮含量最高,达2.820%,是对照组的3.2倍;之后,总黄酮含量开始下降,至第12天时总黄酮含量与对照组相近。

综合上述研究结果可看出,蔓茎堇菜悬浮细胞总黄酮含量在细胞凋亡初期呈上升趋势,即 $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ 在抑制细胞生长的同时,促进了黄酮类化合物的合成;随着凋亡过程的深入,细胞凋亡率达到最高时,总黄酮含量也达到最高,随后开始下降。

3 讨论

细胞凋亡是生物体调节正常发育和抗病、抗逆等过程中不可缺少的生命活动,是细胞生命活动的

基本特征之一。有研究表明,细胞凋亡存在于植物正常发育的各个过程中,如根的发育^[8]、叶片衰老^[9]及体胚发生^[10]等。植物细胞凋亡受许多内、外因子诱导,包括化学胁迫因子^[11]、物理胁迫因子^[12]及生物胁迫因子^[13]等。上述实验结果表明,Ce(NH₄)₂(NO₃)₆能诱导蔓茎堇菜悬浮细胞发生凋亡,当Ce(NH₄)₂(NO₃)₆浓度为1.5 mmol·L⁻¹时,大部分悬浮细胞可能来不及对Ce(NH₄)₂(NO₃)₆的刺激作出反应就立即死亡,即细胞发生坏死;当Ce(NH₄)₂(NO₃)₆浓度为0.5 mmol·L⁻¹时,细胞可能通过其他方式,如改变基因表达从而产生一些抗性蛋白等,以适应逆境;当Ce(NH₄)₂(NO₃)₆浓度为1.0 mmol·L⁻¹、诱导处理达8 d时,大量悬浮细胞发生凋亡,表明该Ce(NH₄)₂(NO₃)₆浓度可导致悬浮细胞受损并激活预定的死亡程序。

近年来的许多研究结果表明,稀土是具有生理活性的化学元素,适宜浓度的稀土元素不仅能促进植物的生长发育,还能改善果实品质和增强植物抗逆能力。由于稀土元素对植物生长具有广泛的促进作用,有许多研究者已将稀土元素用于利用植物细胞培养生产次生代谢产物的研究中,如应用于长春花[*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don]细胞培养生产长春碱^[14]、东北红豆杉(*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.)细胞培养生产紫杉醇^[15]、银杏(*Ginkgo biloba* L.)细胞培养生产总黄酮^[16]等。作者的研究结果也表明,1.0 mmol·L⁻¹ Ce(NH₄)₂(NO₃)₆可促进蔓茎堇菜悬浮细胞黄酮类化合物的合成,培养8 d时,细胞内的总黄酮含量就达到对照组的3.2倍。

由上述讨论分析可见,蔓茎堇菜悬浮细胞对Ce(NH₄)₂(NO₃)₆胁迫采取2种应答方式,即启动自身凋亡程序和增加黄酮类化合物的合成,但有关二者之间的内在联系及其调控机理等仍有待进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics[J]. *Brit J Cancer*, 1972, 26: 239-257.
- [2] Jacobsen M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development[J]. *Cell*, 1997, 88: 347-354.
- [3] Ellis R E, Yuan J, Palade G E, et al. Mechanisms and functions of cell death[J]. *Annu Rev Cell Biol*, 1991, 7: 663-698.
- [4] 陈由强,代容春,朱锦懋,等. 蔓茎堇菜细胞悬浮培养的研究[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(1): 43-47.
- [5] 代容春,陈由强,朱锦懋. 蔓茎堇菜基因组DNA 3种提取方法的比较研究[J]. *生命科学研究*, 2005, 9(3): 254-257.
- [6] 王庆华,邓文君,李艳红. 细胞色素C(CytC)诱导烟草悬浮细胞(BY-2)凋亡[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(6): 666-668.
- [7] 郭晋隆,陈由强,叶冰莹,等. 蔓茎堇菜总黄酮提取工艺初探[J]. *生命科学研究*, 2002, 6(3): 277-280.
- [8] Wang H, Li J, Bostock R M, et al. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments[J]. *Plant Cell*, 1996, 8: 375-391.
- [9] Gan S S, Amasino R M. Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 313-319.
- [10] Pennell R I, Lamb C. Programmed cell death in plants[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1157-1168.
- [11] 宁顺斌,宋运淳,王玲,等. 药物诱导的玉米根尖细胞凋亡[J]. *植物学报*, 2000, 42(7): 693-696.
- [12] 陈浩明,颜长辉,姜晓芳,等. 热激诱导烟草悬浮细胞的凋亡[J]. *科学通报*, 1999, 44(2): 1-4.
- [13] Mittler R, Feng X, Cohen M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco[J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 461-473.
- [14] 元英进,胡宗定. 稀土元素对长春花植物细胞培养的影响[J]. *稀土*, 1993, 14(3): 30-33.
- [15] 元英进,胡国武,王传贵,等. 镧、铈对红豆杉细胞生长及紫杉醇合成与释放的影响[J]. *中国稀土学报*, 1998, 16: 56-60.
- [16] 崔堂兵,张长远,郑穗平,等. 稀土元素对银杏悬浮细胞生长和次生代谢产物积累的影响[J]. *广东农业科学*, 2002, 5: 29-31.