

黄瓜发育早期对邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)胁迫的亚显微结构及生理响应比较研究

张颖, 段淑伟, 王蕾, 张惠, 杜娜

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要:通过盆栽试验比较分析黄瓜发育早期叶片亚显微结构对不同浓度(0、6、10、20、40 mg·kg⁻¹)DEHP胁迫的响应。透射电镜观察发现, DEHP胁迫对黄瓜叶肉细胞亚显微结构造成了不同程度损伤,随着DEHP处理浓度的增大,液泡逐渐膨大,细胞的膜结构消失。当DEHP达到10 mg·kg⁻¹时,线粒体嵴数目减少,线粒体呈空泡状;同时叶绿体类囊体膨胀,直至破裂,叶绿体被膜受到破坏,叶绿体中淀粉粒明显膨大、增多;当DEHP达到20 mg·kg⁻¹时,细胞核核仁解体,染色质凝聚,核膜断裂。与亚显微观察结果相一致,随着DEHP浓度的增加,黄瓜叶片中的叶绿素a、b和总叶绿素含量均呈现下降的趋势,而过氧化氢(H₂O₂)含量则呈上升趋势,表明DEHP胁迫通过产生过量的活性氧破坏黄瓜叶片正常的亚显微结构。

关键词:黄瓜;DEHP;亚显微结构;叶绿素;H₂O₂

中图分类号:X503.231 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)09-1706-06 doi:10.11654/jaes.2014.09.006

A Comparative Study of Leaf Ultrastructure and Physiological Changes of Cucumber Seedlings Grown Under Stress of Di-2-ethylhexyl Phthalate(DEHP)

ZHANG Ying, DUAN Shu-wei, WANG Lei, ZHANG Hui, DU Na

(College of Resources & Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract:Due to its wide uses, di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) is everywhere in the environment. It has been detected in most agricultural soils in China. It may affect the growth and development of plants. A comparative analysis of the influence of different concentrations of DEHP (0, 6, 10, 20, 40 mg·kg⁻¹) on ultrastructure of cucumber seedling leaves at the early growth stages was performed in a pot experiment. Transmission electron microscope (TEM) was employed to examine the effects of DEHP on the ultrastructure of the leaves. Increasing DEHP concentrations led to expanded vacuoles and collapsed structure of cell membrane. At 10 mg·kg⁻¹ of DEHP, mitochondria became vacuolized, and the number of mitochondrial cristae decreased. Meanwhile, thylakoids of chloroplast swelled gradually, chloroplast envelopes were destroyed, and the quantity and volume of starch grains in the chloroplast increased. At 20 mg·kg⁻¹ DEHP, the nucleolus became integrated, the chromatin of nucleus was agglutinated, and the nuclear membrane was disrupted. Consistent with the ultrastructure results, the contents of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll decreased while the content of hydrogen peroxide (H₂O₂) increased with increasing concentrations of DEHP, indicating that DEHP stress caused damages to the ultrastructure of cucumber leaves by overproducing reactive oxygen species.

Keywords: cucumber; DEHP; ultrastructure; chlorophyll; H₂O₂

邻苯二甲酸酯(PAEs)是工业上最常见的物质,被广泛应用于塑料、汽车、服装、润滑剂和农药等行业。PAEs是一种有毒有机污染物,通过各行各业不断

进入环境之后,在环境中大量存在,造成了巨大的污染^[1]。而且PAEs在环境中难以迅速降解,被植物吸收后可通过食物链进入人体,对人体健康造成危害并扰乱生态平衡。其中邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸正二丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)等6种PAEs类化合物被美国国家环保局(US EPA)列为优控污染物^[2]。

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP),毒性较

收稿日期:2014-03-20

基金项目:国家高技术研究发展计划(“863”计划)“设施农业土壤酞酸酯污染与生物修复研究(2012AA101405)

作者简介:张颖(1972—),女,教授,博士,研究方向为环境污染生物修复。E-mail:zhangyinghr@hotmail.com

高,具“三致危害”,可以通过食物链在生物体内富集,引起神经、免疫、肝脏、生殖等毒性作用^[3]。目前,DEHP已成为全球最普遍的污染物之一。在中国大部分省的农业土壤中均能检测出PAEs,最高可达 $35.62 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中DEHP为主要污染物,检出率为88.0%,含量最高为 $25.11 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,超过欧盟标准^[4-5]。当土壤PAEs浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,辣椒果实中Vc与辣椒素含量分别下降20%左右^[6]。土壤中PAEs的存在不仅影响植物品质,也会对植物种子萌发以及幼苗的生长产生影响^[7]。在丹麦,不同人群从食物中摄入的DEHP限量被评定为 $4.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw} \cdot \text{d}^{-1}$ (成年人)、 $26 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw} \cdot \text{d}^{-1}$ (1~7岁儿童)和 $11 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw} \cdot \text{d}^{-1}$ (7~14岁儿童),欧洲食品安全科学小组确定小鼠饮食DEHP生殖毒性的无毒性反应最高浓度(NOEL)仅为 $3.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}^{[8-9]}$ 。DEHP已被美国国家环保局和中国环境监测总站列为优先控制污染物。

DEHP是塑料农膜的主要成分,农用塑料膜在中国的使用量位居世界前列,中国农业用地年残留量高达35万t,残膜率高达42%,DEHP污染成为困扰农业生产的巨大问题^[10-11]。

农膜中的PAEs类物质,如DEHP有较为独立的化学性质,可以通过挥发、转移等方式从塑料农膜中释放,直接污染农业生产环境,而且由于DEHP不易溶于水,其固体吸附系数较大,迁移性较差,在自然环境中的性质非常稳定,不易降解,可以吸附在植物根系,并通过积累直接影响作物品质,对农作物造成毒害,导致减产,严重威胁农业生产环境的生态健康。本研究以典型设施蔬菜黄瓜为试验对象,通过透射电子显微镜(TEM)观察及生理生化方法,研究DEHP对黄瓜发育早期成熟叶片的亚细胞结构及叶绿体和过氧化氢(H_2O_2)含量的影响,为DEHP的植物毒理研究提供科学依据、为DEHP的治理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取黄瓜品种“津研4号”为试验材料。首先,用蒸馏水洗净黄瓜种子, 55°C 温水中浸种过夜,人工气候箱暗培养发芽后,将黄瓜幼苗移栽到装满蛭石的陶盆中,Hoagland营养液浇灌,保持湿度为60%。乙醇溶解DEHP配成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,用Hoagland营养液将DEHP母液稀释成不同的浓度(30、50、100、 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),以逐级扩大方法添加到蛭石中,直至混合均匀,使蛭石中DEHP终浓度分别为0、6、10、20、 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,将

蛭石置于阴凉避光处,使乙醇完全挥发。当黄瓜长到“三叶一心”期,将黄瓜幼苗移栽到装有不同浓度DEHP的蛭石的陶瓷盆中,每个浓度处理设4个重复。正常培养14d之后,取黄瓜茎顶端第三片成熟真叶作为试验材料^[13]。

1.2 叶绿素含量测定

取待测叶片,将叶片材料切成1cm的小段,准确称取0.2g叶片放入具塞试管中,加入4mL 80%的丙酮和4mL的二甲基亚砜,盖好塞子摇匀,放在 65°C 的水浴锅中保温提取,直至叶片变白为止,冷却后用80%的丙酮将提取液定容到25mL的容量瓶中,用分光光度计分别检测645、663、652nm吸光度,以80%丙酮为空白对照^[14]。

1.3 过氧化氢含量测定

称取新鲜植物组织2~5g(视 H_2O_2 含量多少而定),按材料与提取剂1:1的比例加入 4°C 下预冷的丙酮和少许石英砂研磨成匀浆后,转入离心管下离心10min,上清液即为样品提取液。用移液管吸取样品提取液1mL,后加入5%硫酸钛和浓氨水,待沉淀形成后离心10min,弃去上清液。沉淀用丙酮反复洗涤3~5次,直到去除植物色素。最后向洗涤后的沉淀中加入2mol/L硫酸5mL,待完全溶解后,与标准曲线同样的方法定容并比色^[15]。

1.4 叶片亚显微结构观察

从每个处理中随机挑取成熟叶片,采用透射电子显微镜(TEM)分析叶肉的亚细胞结构。将叶片剪切成 1 mm^2 样品后,用2.5%戊二醛前固定,磷酸缓冲溶液(pH6.8)冲洗干净,2%四氧化锇固定2h,梯度乙醇脱水,Epon-812环氧树脂包埋,超薄切片机切片,乙酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色,在Hitach-600IV透射电镜下分析观察叶片细胞全貌、线粒体、叶绿体及细胞核等结构的变化。

1.5 统计分析

采取完全随机试验,所有的试验数据来自4个重复的平均值(每个处理从3棵长势相同幼苗取6片子混匀,随机选取),试验原始数据的处理和制图采用SPSS 19.0,应用Duncan多重比较法进行 $P < 0.05$ 水平的显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 叶片表面的亚显微结构

根据TEM照片,在图1a中黄瓜幼苗叶肉细胞中细胞膜结构完整;细胞核核仁清晰,核膜明显;细胞核

周围分布着结构清晰的液泡及叶绿体,卵圆形的叶绿体具有清晰可辨的内部结构,其中的基粒及类囊体发育良好;线粒体数量较多,线粒体膜结构清晰,内部嵴分布均匀,表明对照叶肉细胞的细胞器结构完整,并未受到损伤。与CK相比,梯度DEHP胁迫对黄瓜叶肉细胞亚显微结构造成了不同程度损伤,并且随着DEHP处理浓度的逐步增大,叶肉细胞结构受到的损伤逐渐增加。当DEHP为 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,细胞亚显微结构与CK相比变化并不明显,只有叶绿体中的淀粉粒的数目及体积稍有增加(图1b);当DEHP达到 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,线粒体和叶绿体逐渐膨胀,线粒体嵴数目减少,叶绿体中的类囊体较对照明显模糊,部分基粒片层断裂,叶绿体中的淀粉粒明显膨大(图1c)。

当DEHP达到 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,叶肉细胞内部分膜结构破裂,紊乱的细胞渗透将细胞中其他结构压迫到细胞壁周围,细胞核核仁开始解体,染色质凝聚;叶绿体中基质片层消失,类囊体膨胀,部分断裂,叶绿体被膜受到破坏;叶绿体中淀粉粒明显膨大、增多;线粒体膨胀,线粒体嵴开始解体(图1d)。当DEHP浓度达到

$40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,细胞膜结构受到严重破坏;细胞核膜基本消失,只有残余的染色体被巨大的液泡包裹;同时,虽然叶绿体膜仍有部分残留,但是叶绿体原本排列规则的片层结构被完全破坏;淀粉粒的体积极度膨胀,基本占据了叶绿体的大部分空间,使叶绿体严重变形;线粒体嵴结构消失,大部分线粒体呈空泡状甚至消失(图1e)。通过对TEM图片的分析,不难发现随着DEHP处理水平的提高,淀粉粒的数量及体积表现异常。环境胁迫会导致叶肉细胞中淀粉粒数目及体积的增加已得到多篇报道的支持^[16-17]。淀粉粒数量异常是代谢机制紊乱的首要信号,也是DEHP对植物毒性作用的一个主要效应^[13]。

植物细胞的叶绿体、线粒体和质膜是胁迫条件下ROS(活性氧)的主要产生区域^[18-19]。根据TEM结果,DEHP对线粒体产生较大的损害,使线粒体膨胀、呈空泡状。据Yamane等^[20]报道,盐胁迫会产生大量的 H_2O_2 ,破坏线粒体结构,Romero-Puertas等^[21]也发现盐胁迫和Cd胁迫也会破坏线粒体结构,使其空泡化。事实上,DEHP胁迫对叶肉细胞的破坏作用是广泛

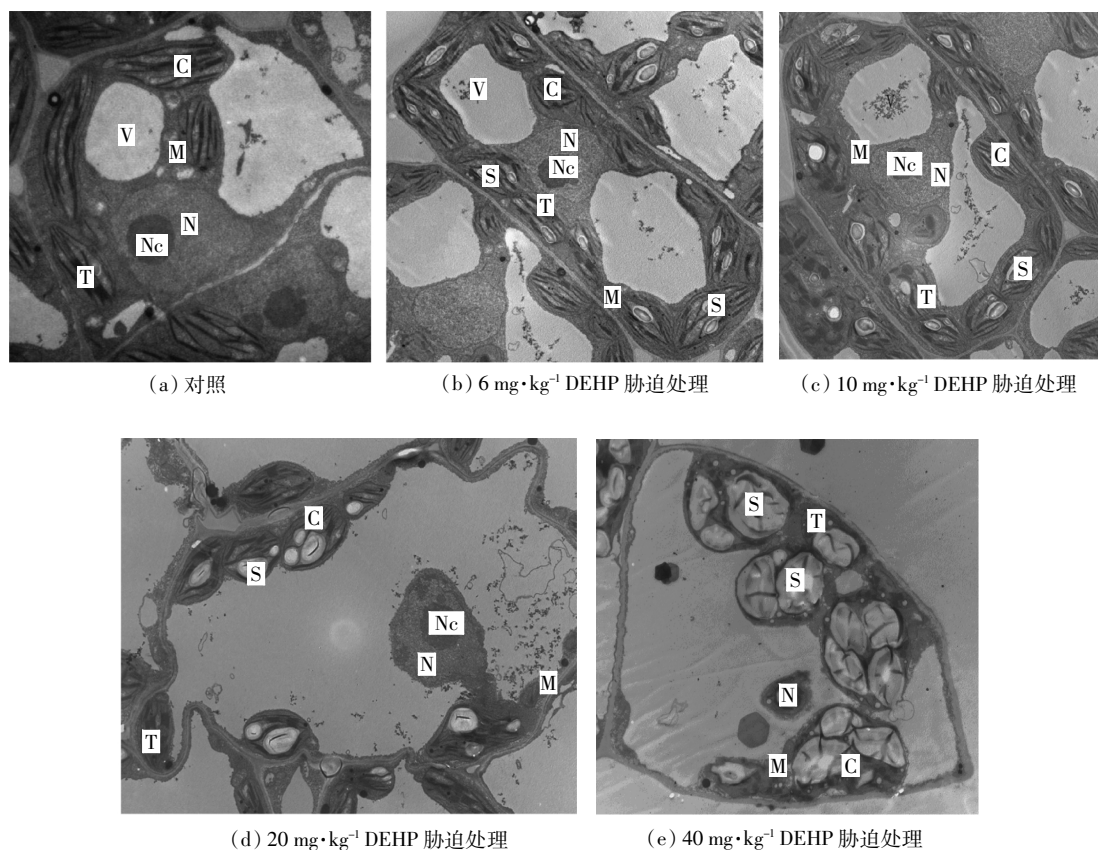


图1 DEHP对黄瓜幼苗叶肉亚显微结构的影响
Figure 1 Influences of DEHP on ultrastructure of cucumber mesophyll

的,表现为几乎所有亚细胞结构的损伤。李锋民等^[22]关于 EMA(2-甲基乙酰乙酸乙酯)对藻类亚显微结构影响的研究与之类似,他们发现加入 EMA 后,蛋白核小球藻的细胞膜受到破坏,藻细胞中叶绿体原本排列规则的片层结构被破坏,多个小淀粉粒合并成为少数大的淀粉粒,细胞中央的蛋白核在 EMA 作用下结构被破坏,核仁成为不规则的形状,线粒体被破坏成多个碎块,液泡体积增大。这说明 DEHP 对黄瓜的毒性机理与 EMA 对藻类细胞相类似,可能是使细胞产生过量的 H_2O_2 且无法及时清除,过量的活性氧使细胞内发生过氧化作用,使细胞的膜系统被破坏(包括细胞膜和细胞内膜),多种细胞器形态发生变化或解体,最终导致细胞死亡或破裂^[23]。

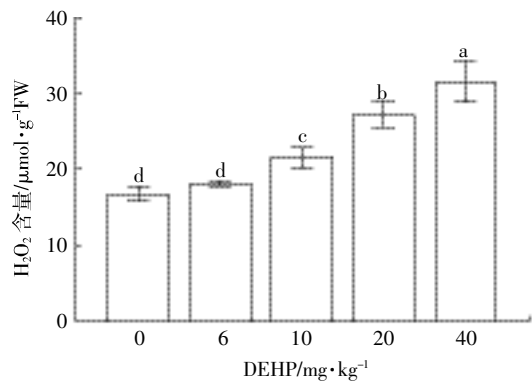
2.2 DEHP 对黄瓜叶片中过氧化氢产量的影响

由图 2 可以明显的看出,随着 DEHP 浓度的增加,黄瓜叶片中 H_2O_2 的含量也随之升高。当 DEHP 处于低浓度时($6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),与 CK 差异并不显著,但是当 DEHP 处理水平超过 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,黄瓜叶片中 H_2O_2 含量显著升高。与 CK 相比,当 DEHP 浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, H_2O_2 含量上升了 $88.58\%\pm 13.16\%$ 。多种有机污染物胁迫均会使植物叶片中 H_2O_2 的含量升高^[24-25],我们之前的研究也发现 DBP 和 DEP 会导致黄瓜根系及叶片中 H_2O_2 的含量上升^[13]。由此可知, H_2O_2 含量的上升表明逐渐升高的氧化压力与 DEHP 胁迫相关,直接表现为亚显微结构的破坏及叶绿体含量的降低。

与对照相比较,DEHP 处理的样品亚显微结构和 H_2O_2 显示了极大的差异,黄瓜对 DEHP 胁迫的响应同时体现在细胞结构及生理生化水平,细胞结构及生理生化水平均是评价植物应对胁迫压力的主要因素或指标^[26]。本研究结果表明,DEHP 胁迫会刺激 H_2O_2 大量产生,并引发细胞结构的损伤,说明 DEHP 具有较高的生物毒性。

2.3 DEHP 对叶绿素的影响

叶绿体含量是评价植物光合速率的重要生理指标。根据图 3 可知,与 CK 相比较,低浓度的 DEHP 处理条件下($6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)叶绿素 a、b 和叶绿素(a+b)的变化不大。但是随着 DEHP 浓度的升高,叶绿素含量急剧下降,与对照相比较, $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理条件下,黄瓜幼苗叶片中叶绿素 a、b 和叶绿素(a+b)含量分别降低了 $37.05\%\pm 8.28\%$ 、 $36.55\%\pm 5.76\%$ 和 $38.038\%\pm 4.95\%$ 。该结果说明 DEHP 胁迫严重影响了黄瓜叶片中叶绿素的含量,该结果与 DEHP 浓度梯度对黄瓜幼苗叶肉细胞叶绿体影响变化一致。叶绿素 a、b 和叶绿素(a+



不同小写字母之间表示差异显著($P<0.05$)。下同

Bars with different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

图 2 DEHP 对黄瓜叶片中过氧化氢产量的影响

Figure 2 Production of hydrogen peroxide in cucumber leaves under DEHP stress

b)含量的降低,可以认为是黄瓜幼苗对 DEHP 胁迫的一种生理响应,并最终导致叶绿体的破坏而阻碍光合作用,影响植物的正常发育^[27]。DEHP 对叶绿体结构的胁迫压力也证明了该结论。

研究表明,各种胁迫压力,如重金属、盐胁迫和有机污染物等,均会破坏植物光合系统,如叶绿体膜结构的完整性、叶绿素含量等,最终导致植物光合作用无法正常进行,严重影响植物正常生长发育^[28-29]。Yuan 等^[30]研究了 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 胁迫对黄瓜幼苗叶绿素含量、光合性质及叶绿体亚显微结构等的影响,发现 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 会显著降低叶绿素含量及阻碍光化学活性,影响光合系统及膜结构,并损害类囊体层。蒋明义等^[31]研究渗透胁迫对水稻幼苗中叶绿素影响时,发现水分胁迫可导致叶绿素含量降低,随着胁迫强度的增加和时间的延长,叶绿素降解加剧;吴楚等^[32]关于磷胁迫对水曲柳幼苗叶绿素合成影响的研究也得到了相同的结果;魏国强等^[33]发现不同品种黄瓜幼苗的叶绿素含量也

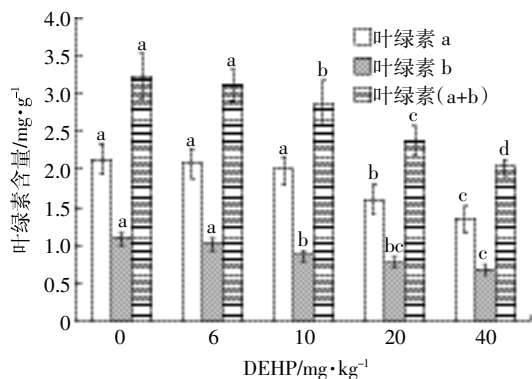


图 3 DEHP 对黄瓜叶绿素含量的影响

Figure 3 Effects of DEHP on cucumber leaf chlorophyll

会随 NaCl 浓度增加呈下降趋势。

值得一提的是,随着 DEHP 胁迫水平的升高,叶绿素(a/b)表现为先升高后降低的趋势(图4),在 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的处理条件下,叶绿素(a/b)比 CK 增加了 $20.99\%\pm 6.73\%$,而在较高浓度的 DEHP 处理条件下,叶绿素(a/b)逐渐减低至 CK 水平,说明相对于叶绿素 a,叶绿素 b 对 DEHP 胁迫压力更加敏感,而较高 DEHP 浓度对叶绿素 a 和 b 的压力表现较为一致。Horn 等^[34]研究发现叶绿素 b 与光捕获系统的结合要明显慢于叶绿素 a,因此更容易受到环境变化的影响。

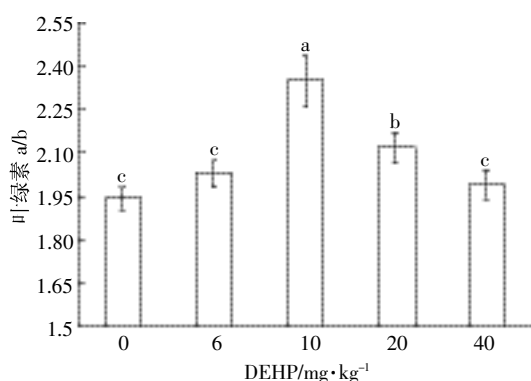


图4 DEHP对黄瓜叶绿素 a/b 的影响

Figure 4 Effects of DEHP on cucumber leaf chl.a/chl.b

本研究中,DEHP 胁迫使叶绿素含量显著降低,同时 DEHP 会导致 H_2O_2 含量明显升高,因此 H_2O_2 含量增加可能会导致叶绿素生物合成受到抑制,引起色素缺乏和叶绿体结构的改变,而从 TEM 图也可清晰看出细胞结构遭到破坏,尤其是叶绿体的膜结构受到损害,类囊体破裂,基粒片层逐渐消失,叶绿体中淀粉粒明显膨大、增多导致叶绿体膨胀变形。这一结果也与叶绿体含量的降低相符。

3 结论

(1)通过 TEM 分析,DEHP 胁迫对黄瓜幼苗叶肉细胞的亚显微结构产生了极大的损伤,表现为线粒体和叶绿体膜结构破坏,线粒体逐渐呈空泡状,叶绿体类囊体逐渐消失,淀粉粒数量和体积明显增加,细胞核结构受到破坏。

(2)DEHP 胁迫使黄瓜幼苗叶片中产生了大量的 H_2O_2 ,并随着 DEHP 浓度的增加, H_2O_2 的产量明显增加。

(3)DEHP 胁迫抑制了黄瓜幼苗叶片中叶绿素 a、b 和叶绿素(a+b)的含量,当 $\text{DEHP}\geq 10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时抑制作用显著,叶绿素 b 对 DEHP 的胁迫较叶绿素 a 敏感。

参考文献:

- [1] Clausen P A, Hansen V, Gunnarsen L, et al. Emission of di-2-ethyl-hexyl phthalate from PVC flooring into air and uptake in dust: Emission and sorption experiments in FLEC and CLIMPAQ[J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(9):2531-2537.
- [2] Xu G, Li F S, Wang Q H. Occurrence and degradation characteristics of dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in typical agricultural soils of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 393(2): 333-340.
- [3] 安 琼,靳 伟,李 勇,等. 酞酸酯类增塑剂对土壤-作物系统的影响[J]. *土壤学报*, 1999, 36(1): 118-125.
An Qiong, Jin Wei, Li Yong, et al. Phthalate esters plasticizer effect on soil-crop systems[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 1999, 36(1): 118-125.
- [4] 蔡全英,莫测辉,李云辉,等. 广州、深圳地区蔬菜生产基地土壤中邻苯二甲酸酯(PAEs)研究[J]. *生态学报*, 2005, 25(2): 283-288.
CAI Quan-ying, MO Ce-hui, LI Yun-hui, et al. The study of PAEs in soils from typical vegetable fields in areas of Guangzhou and Shenzhen, South China[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2): 283-288.
- [5] 关 卉,王金生,万洪富,等. 雷州半岛典型区域土壤邻苯二甲酸酯(PAEs)污染研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 622-628.
GUAN Hui, WANG Jin-sheng, WAN Hong-fu, et al. PAEs pollution in soils from typical agriculture area of Leizhou peninsula[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 622-628.
- [6] Cai Q Y, Mo C H, Wu Q T, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in the soil-radish (*Raphanus sativus*) system with sewage sludge and compost application[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(6): 1830-1836.
- [7] 蔡玉祺,汤国才,王珊龄,等. 邻苯二甲酸酯对蔬菜幼苗的影响[J]. *农业环境保护*, 1994, 13(4): 163-166.
CAI Yu-qi, TANG Guo-cai, WAN Shan-ling, et al. Effects of phthalate esters on vegetable seedlings[J]. *Agro-environmental Protection*, 1994, 13(4): 163-166.
- [8] Sharpe R M, Walker M, Millar M R, et al. Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on sertoli cell number and testicular development in the marmoset: Comparison with the rat[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 62(6):1685-1693.
- [9] Koch H M, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of DEHP and other phthalates in the general population[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2003, 206: 77-83.
- [10] Latini G, Ferri M, Chiellini F. Materials degradation in PVC medical devices, DEHP leaching and neonatal outcomes[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(26): 2979-2989.
- [11] 杨晓涛. 农膜污染的防治对策[J]. *农业环境与发展*, 2000, 17(1): 28-29.
YANG Xiao-tao. The agro-plastic sheeting pollution and counter measure[J]. *Agro-Environment and Development*, 2000, 17(1): 28-29.
- [12] Parks L G, Ostby J S, Lambright C R, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat[J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 58(2): 339-349.

- [13] Zhang Y, Wang L, Du N, et al. Effects of diethylphthalate and di-(2-ethyl)hexylphthalate on the physiology and ultrastructure of cucumber seedlings[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(2): 1020–1028.
- [14] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiology*, 1949, 24(1): 1.
- [15] Feng M L, Hu H Y. Isolation and characterization of a novel ant algal allelochemical from *Phragmites communis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 6545–6553.
- [16] Santos R W, Schmidt E C, Bouzon Z L. Changes in ultra structure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium[J]. *Protoplasma*, 2013, 250(1): 297–305.
- [17] Bouzon Z L, Ferreira E C, dos Santos R, et al. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro[J]. *Protoplasma*, 2006, 249(3): 637–650.
- [18] Shinogi T, Suzuki T, Kurihara T, et al. Microscopic detection of reactive oxygen species generation in the compatible and incompatible interactions of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype and host plants[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2003, 69(1): 7–16.
- [19] Xu S, Li J L, Zhang X Q, et al. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress[J]. *Environmental Experimental Botany*, 2006, 56(3): 274–285.
- [20] Yamane K, Taniguchi M, Miyake H. Salinity-induced subcellular accumulation of H_2O_2 in leaves of rice[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(2): 301–308.
- [21] Romero-Puertas M C, Rodríguez-Serrano M, Corpas F J, et al. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves[J]. *Plant Cell and Environment*, 2004, 27(9): 1122–1134.
- [22] 李锋民, 胡洪营, 种云霄, 等. 2-甲基乙酰乙酸酯对藻细胞膜和亚显微结构的影响[J]. 环境科学. 2007, 28(7): 1534–1538.
LI Feng-min, HU Hong-ying, CHONG Yun-xiao, et al. Effects of allelochemical EMA isolated from phragmites communis on algal cell membrane lipid and ultrastructure[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(7): 1534–1538.
- [23] Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, et al. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat[J]. *Plant, Cell & Environmental*, 2001, 24(12): 1337–1344.
- [24] Hassanpour H, Khavari-Nejad R A, Niknam V, et al. Effects of penconazole and water deficit stress on physiological and antioxidative responses in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.)[J]. *Acta physiologiae plantarum*, 2012, 34(4): 1537–1549.
- [25] Ceylan H A, Turkan I, Sekmen A H. Effect of coronatine on antioxidant enzyme response of chickpea roots to combination of PEG-induced osmotic stress and heat stress[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2013, 32(1): 72–82.
- [26] Padinha C, Santos R, Brown M T. Evaluating environmental contamination in Ria Formosa (Portugal) using stress indexes of *Spartina maritima*[J]. *Marine Environmental Research*, 2000, 49(1): 67–78.
- [27] Gajewska E, Sklodowska M, Slaba M, et al. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots[J]. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(4): 653–659.
- [28] Zai X M, Zhu S N, Qin P, et al. Effect of *Glomus mosseae* on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence parameters, and chloroplast ultrastructure of beach plum (*Prunus maritima*) under NaCl stress[J]. *Photosynthetica*, 2012, 50(3): 323–328.
- [29] Aschan G, Pflanz Z, Vodnik D, et al. Photosynthetic performance of vegetative and reproductive structures of green hellebore (*Helleborus viridis* L. agg.)[J]. *Photosynthetica*, 2005, 43(1): 55–64.
- [30] Yuan L, Shu S, Sun J, et al. Effects of 2,4-epibrassinolide on the photosynthetic characteristics, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* L. under $Ca(NO_3)_2$ stress[J]. *Photosynthesis Research*, 2012, 112(3): 205–214.
- [31] 蒋明义, 杨文英, 徐江, 等. 渗透胁迫下水稻幼苗中叶绿素降解的活性氧损伤作用[J]. 植物学报, 1994, 36(4): 289–295.
JIANG Ming-yi, YANG Wen-ying, XU Jiang, et al. Active oxygen damage effect of chlorophyll degradation in rice seedling under osmotic stress[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 1994, 36(4): 289–295.
- [32] 吴楚, 范志强, 王政权. 磷胁迫对水曲柳幼苗叶绿素合成、光合作用和生物量分配格局的影响[J]. 应用生态学报. 2004, 5(6): 935–940.
WU Chu, FAN Zhi-qiang, WANG Zheng-quan. Effect of phosphorus stress on chlorophyll biosynthesis, photosynthesis and biomass partitioning pattern of *Fraxinus mandchurica* seedlings[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 5(6): 935–940.
- [33] 魏国强, 朱祝军, 方学智. NaCl 胁迫对不同品种黄瓜幼苗生长叶绿素荧光特性和活性氧代谢的影响[J]. 中国农业科学. 2004, 37(11): 1754–1759.
WEI Guo-qiang, ZHU Zhu-jun, FANG Xue-zhi. The effects of NaCl stress on plant growth, chlorophyll fluorescence characteristics and active oxygen metabolism in seedlings of two cucumber cultivars[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(11): 1754–1759.
- [34] Horn R, Grundmann G, Paulsen H. Consecutive binding of chlorophylls a and b during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-a/b protein (LHCIIb)[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 366(3): 1045–1054.