

药蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber)耐 1.5% NaCl 变异体的筛选及特性分析

张新果^{1,2}, 李银心¹, 陈华³, 石武良¹

1 中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

3 中国科学院遗传与发育研究所, 北京 100101

摘要: 为提高药蒲公英的耐盐性, 用 20~30 d 大小的药蒲公英叶片诱导愈伤, 获得的愈伤以 NaCl 作为选择因子, 用直接筛选的方法, 每 3 周进行一次继代培养, 经 3 个月继代筛选获得了耐 1.5% NaCl 的药蒲公英愈伤组织, 将耐 1.5% NaCl 的药蒲公英愈伤组织接种在分化培养基上分化出芽, 之后将再生芽转接到生根培养基中进行生根培养, 经 4 个月得到了 12 株耐 1.5% NaCl 的药蒲公英再生植株。与野生型相比, 耐盐植株叶片宽大、叶柄粗短、叶表面覆盖白色细毛, 根粗壮较短, 花茎中部具 2 cm 左右的苞叶。RAPD(Random amplified polymorphic DNA, 随机扩增的多态性 DNA)和 SDS-PAGE 检测表明, 耐盐植株与对照植株在 DNA 及蛋白水平上均存在明显差异。1.5% NaCl 处理后, 与普通再生植株相比, 耐盐株系的抗氧化酶活性明显提高, 脯氨酸含量上升幅度更为显著, 而丙二醛(MDA)含量降低, 其主要药用成分黄酮的含量显著增加。这些结果说明耐盐植株的抗氧化防御能力明显增强。以上结果表明耐 1.5% NaCl 的药蒲公英再生植株为耐 1.5% NaCl 药蒲公英变异体, 这些耐盐变异体有望成为抗盐耐海水蔬菜家族的新成员。同时, 这些耐盐变异体植株比普通植株具有更高的医用商业价值。耐 1.5% NaCl 的药蒲公英再生变异体遗传稳定性的研究正在进行中。

关键词: 活性氧清除剂, 耐盐变异体, 药蒲公英, 叶片外植体

Selection and Identification of Salt-tolerant Variants of *Taraxacum officinale*

Xinguo Zhang^{1,2}, Yinxin Li¹, Hua Chen³, and Wuliang Shi¹

1 Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

3 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: In order to obtain salt-tolerant variant plants of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber), the leaf discs were excised from 20 to 30-day old seedlings to produce callus, then the induced calli were transferred to selection mediums containing 1.5% NaCl. After regenerating and rooting, these salt-tolerant calli finally developed into 12 variant plantlets. Compared with the wild-type, these regenerated plants produced more trichomes on their leaves, and had larger leaves and shorter petioles. Additionally, the dumpy roots and an approximately 2-cm bract in middle parts of the floricanes were clearly observed in these salt-tolerant plants. By

Received: May 9, 2007; **Accepted:** June 14, 2007

Supported by: the High-Tech Research and Development (863) Program of China (No. 2007AA091705) and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-YW-N-003).

Corresponding author: Yinxin Li. Tel: +86-10-62836258; Fax: +86-10-82596139; E-mail: yxli@ibcas.ac.cn

国家 863 计划课题(No. 2007AA091705)和中国科学院重要方向性项目(No. KSCX2-YW-N-003)资助。

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) and SDS-PAGE analysis, these salt-tolerant plants showed differences from the control at DNA and protein levels. With 1.5% NaCl treatment, the antioxidant enzyme activity, proline content, and flavonoid concentration were higher in these salt-tolerant plants, whereas malonaldehyde concentration was significantly lower. Salt-tolerant lines of *T. officinale* showed stronger anti-oxidative activity and higher flavonoid contents.

Keywords: ROS scavenger, salt-tolerant variant, *Taraxacum officinale*, leaf explant

盐害是农业生产上最重要的非生物逆境危害之一^[1]。据联合国教科文组织(UNESCO)和粮农组织(FAO)不完全统计,全世界盐渍土面积约有 10 亿 hm^2 , 其中我国各种类型的盐渍土达 9913 万 hm^2 ^[2], 土壤盐碱化成为限制我国农业发展的主要因素。

为了减轻盐害对农业生产的不利影响,人们一方面采取改良土壤,合理灌溉等农业措施,另一方面培育耐盐抗旱作物品种。虽然合理的种植方式在一定程度上会减轻盐害对作物的影响,但不能从根本上解决问题。合理开发盐碱地关键还在于筛选培育新的耐盐品种^[3]。

植物耐盐新品种的选育方法主要包括抗盐品种资源筛选、常规杂交育种、生物技术如细胞工程和基因工程选育等。在生物技术育种方法中,植物抗盐基因工程虽然是通过外源基因导入并整合到目标植物基因组中直接针对抗盐性状进行改造,但由于植物耐盐机制非常复杂,抗盐性受多基因控制,外源基因导入还存在基因沉默等问题,要使耐盐性得到大幅度提高在实践中存在一定难度,特别是由于涉及转基因植物的生态安全性问题,使得该方法成本高,风险大,在实际应用中的实现路径较长;而植物细胞工程,特别是植物离体培养过程中存在广泛的体细胞变异,充分利用该变异可以很快培育出耐盐突变体材料,同时不存在安全性障碍,所以植物组织培养技术成为筛选植物耐盐突变体的常用技术和方法^[4]。现已在烟草、水稻、苜蓿、蕃茄、芦苇等植物筛选到耐盐变异体细胞系并再生了植株^[5]。

菊科蒲公英属植物分布广泛,共有 2000 余种,其中包括盐生种类窄苞蒲公英(*Taraxacum bessara-bicum* (Hornem.)Hand.-Mazz.)、双角蒲公英(*Taraxacum bicornis* Dahlst.)、多裂蒲公英(*Taraxacum dissectum* (Ledeb.)Ledeb.)、华蒲公英(*Taraxacum sinicum* Kitag.)等^[3], 它们是滩涂和盐碱地的先锋植物。这些盐生种类蒲公英虽然抗盐性很强,但生物量小,很难在生产中获得高产,开发价值不高。而与它们同属的药蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber)具

有生物量大的特点,是一种重要的中药材,还是欧美日等国普遍食用的营养保健蔬菜,但抗盐性低,不利于在滩涂盐碱地开发利用。如果通过生物技术手段筛选出耐盐性提高的变异体,有望在抗盐耐海水蔬菜家族中增添新的成员^[6]。

本文以药蒲公英为试材,通过长时间直接大量筛选得到其耐盐细胞系。在此基础上,对耐盐细胞系进行分化再生,最终获得了耐 1.5% NaCl 的药蒲公英再生植株。并从生理生化和分子水平对药蒲公英再生植株进行了分析和鉴定,确定其为药蒲公英耐盐变异体。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为温室栽培的药蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber),种子购自意大利 SAIS 公司。温室种植条件:白天温度为 25~30℃,夜间温度 18~20℃,相对湿度为 60~80%。

1.2 实验方法

1.2.1 药蒲公英愈伤组织的诱导和耐 1.5% NaCl 愈伤组织的筛选

剪取温室中生长 20~30 d 的药蒲公英的叶片,常规消毒(70%酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 1 次,5% NaClO 消毒 8 min,无菌水冲洗 3 次),之后剪成 1 cm^2 左右的小片,以此为外植体接种到愈伤诱导培养基上,15 d 后开始出现愈伤,30 d 后叶片边缘有大量的愈伤产生。将愈伤移至继代培养基上进行继代培养。将继代 4 次的普通愈伤组织接种到含 1.5% NaCl 的筛选培养基上,每 3 周挑选能够继续生长的细胞团进行继代培养,连续继代 4 次后,获得能够在 1.5% NaCl 的培养基上旺盛生长的耐 1.5% NaCl 的愈伤组织。

以 MS 为基础培养基^[7]:

愈伤诱导培养基和继代培养基相同^[8]: MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D, pH 5.9。

耐 1.5% NaCl 愈伤筛选培养基: MS + 2.0 mg/L

6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D + 1.5% NaCl, pH 5.9。

1.2.2 NaCl 选择培养基中药蒲公英耐盐愈伤的分化和植株再生

将耐盐愈伤分别置于含 0%、1%和 1.5% NaCl 的愈伤再生培养基上分化获得再生植株。将在含 0%和 1% NaCl MS 全元素培养基上再生的试管苗转到含 1% NaCl 的 1/2 MS 培养基上生根,待根长至 1 cm 左右时,将其转到含 1.5% NaCl 的 1/2 MS 培养基上生长;将在 1.5% NaCl MS 全元素培养基上再生的试管苗转到含 1.5% NaCl 的 1/2 MS 培养基上生长。将最终获得的 12 个耐 1.5% NaCl 的株系移栽到温室中生长(条件同 1.1)。

再生频率 = 能再生的愈伤块数/总愈伤块数 × 100%。

愈伤再生培养基^[8]: MS + 1.0mg/L 6-BA, pH 5.9。

1.2.3 耐 1.5% NaCl 药蒲公英株系克隆群体的建立

按陈华^[8]直接不定芽再生方法,分别剪取耐 1.5% NaCl 株系的叶片,经常规消毒(同 1.2.1),剪成 1cm² 左右的小片,放到直接不定芽再生培养基上分化,不定芽在 1/2 MS 培养基上生根后,移栽到温室中生长(条件同 1.1),建立每个株系的克隆群体,为下列相关分析和鉴定提供材料保证。

选取温室中生长 1 个月、大小一致的药蒲公英耐 1.5% NaCl 再生植株,在 1/4 Hoagland 营养液中水培,待其叶片完全展开时,开始往营养液中添加 NaCl,按照每 3 d NaCl 浓度增加 0.5%的方式经 9 d 递增至 1.5%,1.5% NaCl 处理 5 d。

选取与耐盐愈伤同期继代的对照愈伤再生所获植株为对照。对 12 个耐 1.5% NaCl 株系采用随机区组设计分为三组,每组 4 个株系,每个株系取 1 株,进行 3 次重复实验。测定抗氧化酶(超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD、过氧化氢酶 CAT 和抗坏血酸过氧化物酶 APX),丙二醛(MDA),脯氨酸(Pro),黄酮等各项生理生化指标。RAPD 和 SDS-PAGE 的检测分别采用 12 个耐 1.5% NaCl 株系混合取样样品和对照植株混合取样样品为材料。

选取温室中四叶期大小一致的植株,1.5% NaCl 处理 4 周后测定单株鲜重,每个株系各 3 个重复,每个重复 3 株。

直接不定芽再生培养基^[8]: MS + 0.2 mg/L IAA + 1.0 mg/L TDZ, pH 5.9。

1.2.4 DNA 的提取和 RAPD 检测

DNA 提取采用 CTAB 法^[9],RAPD 反应采用 12.5 μL 反应体系,不加矿物油,成分为引物(8 pmol/L)(Sangon 产品)1.25 μL, TaqDNA 聚合酶(5 u/μL,购自北京 Transgen 公司)0.25 μL, 10 × buffer 1.25 μL, 基因组 DNA(12.5 mg/L)1 μL, dNTP(10 mmol/L)0.25 μL, 无菌超纯水 8.5 μL。扩增程序: 94℃, 4min; 94℃, 30 s; 34℃, 1 min; 72℃, 2 min, 35 个循环; 最后 72 保温 7 min。反应在同一 PCR 仪(Whatman Biometra® T-gradient PCR 仪)中完成。取 10 μL 反应产物进行琼脂糖凝胶(1.5%)电泳,溴化乙锭染色,Alphaimager 凝胶成像系统观察并记录结果。DNA 分子标准(M)为 D2000, 购自北京 Tiangen 公司。

1.2.5 总蛋白的提取和蛋白电泳

总蛋白的提取参照沈世华等的 TCA 法^[10], SDS-PAGE 采用 12.5% 的分离胶和 4% 的浓缩胶(SE600 RUBY 电泳仪, GE Healthcare),染色采用改进的胶体考染法^[11],图像扫描采用 ImageScanner labscan 扫描仪(GE Healthcare)。蛋白质分子标准(M)为低分子量标准蛋白质,购自北京 Tiangen 公司。

1.2.6 SOD, POD, CAT 和 APX 活性测定

分别参考 NBT 法^[12],愈创木酚法^[13], Beers and Sizer 的方法^[14]和沈文飏的方法^[15]。以抑制 NBT 光还原的 50% 为一个 SOD 酶活单位;以每分钟内 240 nm 光吸收减少 0.1 为一个 CAT 酶活单位;以每分钟内 470 nm 光吸收变化 0.5 为一个 POD 酶活单位;以每分钟内 290 nm 光吸收减少 0.5 为一个 APX 酶活单位。

1.2.7 脯氨酸含量测定

参照酸性茚三酮法^[16]。

1.2.8 丙二醛含量测定

参照植物生理学实验^[17]。

1.2.9 黄酮含量测定

参照付桂明 AlCl₃ 的方法^[18]。

1.2.10 统计分析方法

采用 SPSS13.0(for Windows)软件包进行多重比较统计分析。

2 结果

2.1 耐 1.5% NaCl 药蒲公英愈伤组织的分化

愈伤组织继代时间的长短和选择压力大小会对其分化和再生能力产生很大影响^[19],本研究通过将

耐盐愈伤放到含 0% NaCl、1% NaCl 和 1.5% NaCl 的培养基上分化再生, 发现耐盐愈伤组织不定芽分化再生的时间随着选择压力的增大而延缓, 分化再生的频率随着选择压力的增大而降低。在 0% NaCl、1% NaCl 和 1.5% NaCl 培养基上 45 d 时耐盐愈伤的再生频率分别是 92%、58% 和 12.5%; 对照则是 81%、0% 和 0% (图 2)。耐 1.5% NaCl 愈伤组织在不含 NaCl 培养基上出现分化的时间与对照 (普通愈伤组织) 基本一致, 都是第三天开始出现芽点, 但耐 1.5% NaCl

愈伤的再生频率 (图 1A) 明显高于对照 (图 1D); 在含 1% NaCl 培养基上耐 1.5% NaCl 愈伤第 20 天有绿色芽点产生 (图 1B), 在含 1.5% NaCl 培养基上耐盐愈伤第 45 天有绿色芽点产生 (图 1C), 对照则全部褐化死亡 (图 1E, F)。说明 NaCl 浓度对药蒲公英愈伤组织出现分化的时间影响较大。NaCl 选择压力下, 愈伤组织内的生长素和细胞分裂素的含量和比例可能发生变化, 去除 NaCl 选择压力后, 愈伤组织内细胞分裂素和生长素的比例可能有所提高。

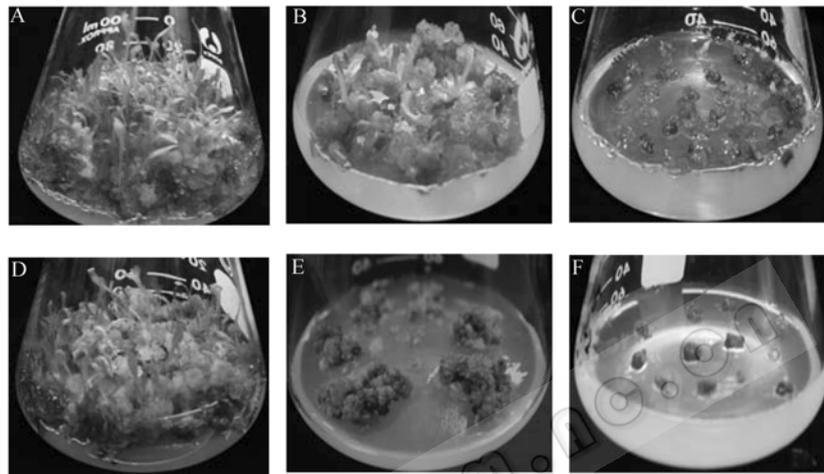


图 1 耐盐药蒲公英愈伤在含不同盐浓度培养基上的再生情况

Fig. 1 Salt-tolerant calli of *Taraxacum officinale* Weber grew on medium of different NaCl concentrations

A, B, C: Salt-tolerant calli grew on 0% (A), 1% (B) and 1.5% NaCl (C) medium for 45day, respectively.

D, E, F: control calli grew on 0% (D), 1% (E), 1.5% NaCl (F) medium for 45 days, respectively

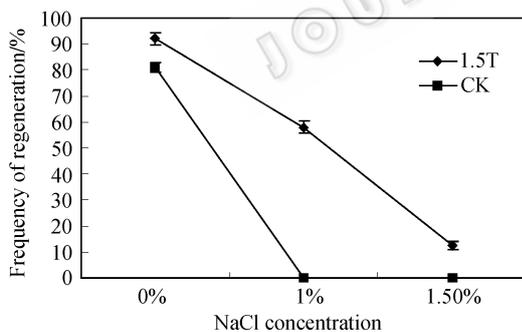


图 2 耐盐药蒲公英愈伤(1.5T)和对照愈伤(CK)在含不同 NaCl 浓度培养基上的再生频率

Fig. 2 Frequency of regeneration of salt-tolerant calli (1.5T) and control (CK) on medium with different NaCl concentrations

Data represent the mean values \pm SE of three independent experiments and were scored 45 days after culture

2.2 耐 1.5% NaCl 药蒲公英植株的再生

将 0% NaCl、1% NaCl 和 1.5% NaCl 的培养基上分化再生的芽转接到含 1.5% NaCl 的 1/2MS 培养

基上生根, 其生根频率分别为: 5%, 44%, 75%, 最终共获得 12 株完整的再生植株。这些耐 1.5% NaCl 的再生植株与普通再生植株存在表型差异。由图 3 可以看出, 与对照 (图 C, D) 相比, 耐 1.5% NaCl 再生植株 (图 A, B) 叶片宽大肥厚、叶表面覆盖细毛、叶柄粗短, 根粗壮、较短。耐盐再生植株成花后可见在花茎中部有长达 2 cm 左右的苞叶, 而对照再生植株花茎上的苞叶只有 0.5 cm 左右。

2.3 在盐胁迫下耐 1.5% NaCl 药蒲公英再生植株的生物量显著提高

植物生物量的大小是生产应用中的重要指标。因此, 在盐胁迫下相对于对照植株, 耐盐植株生物量是否有显著性的提高对于其能否作为抗盐耐海水蔬菜应用有重要的实践参考意义。对在 1% NaCl 下胁迫 4 周后耐盐植株和对照植株的生物量进行了测量 (表 1), 可以看出在正常灌溉条件下, 耐盐植株和对照的单株鲜重不存在显著性差异; 盐分胁迫下,

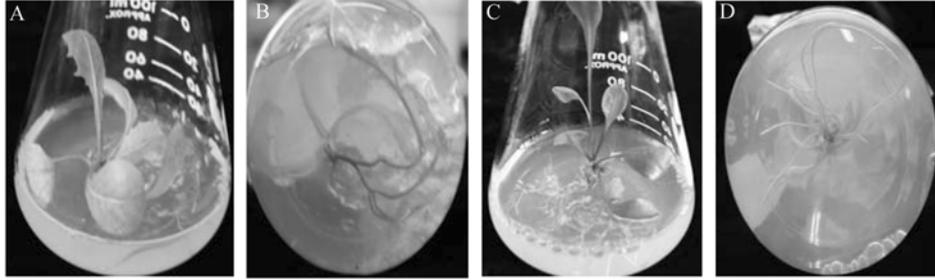


图3 药蒲公英耐1.5% NaCl愈伤分化获得的耐1.5% NaCl再生植株及根的表型

Fig. 3 Roots and Shoots of 1.5% NaCl tolerant plantlets differentiated from 1.5% NaCl tolerant calli

A, B: Shoots (A) and roots (B) of regenerants from salt-tolerant calli grew on 1.5% NaCl 1/2 MS.

C, D: Shoots (C) and roots (D) of regenerants from control calli grew on NaCl free 1/2 MS

5个不同耐盐植株株系的单株鲜重显著高于对照,其中1.5T3耐盐株系的单株鲜重最高达8.27 g,是对照的1.79倍。说明所筛选的耐盐植株有可能在生产上应用。

表1 盐胁迫下耐盐植株的鲜重(克/株)测定

Table 1 Fresh weight(g/plant FW) of variants under 1% NaCl 1.5T1,1.5T2,1.5T3,1.5T4,1.5T5 represent 5 lines of 12 salt-tolerant lines, respectively

lines	fresh weight(g/plant)	
	0% NaCl	1% NaCl
1.5T1	11.71 ± 1.32a	7.07 ± 0.73ab
1.5T2	12.38 ± 1.07a	6.52 ± 0.76b
1.5T3	11.91 ± 0.89a	8.27 ± 0.87a
1.5T4	11.86 ± 0.93a	7.69 ± 0.69a
1.5T5	12.23 ± 1.01a	7.08 ± 0.77ab
CK	12.27 ± 0.96a	4.63 ± 0.42c

Data represent the mean values ± SE(n=3).The different letter indicate significant differences at $P < 0.05$ level,by LSD test.

2.4 耐1.5% NaCl药蒲公英再生植株和对照植株在DNA水平上存在差异

大量资料表明,从愈伤组织尤其是连续继代培养的愈伤组织再生的植株经常发生变异^[20],也是我们利用这一技术路线筛选耐盐变异体的依据。为验证所筛选的耐盐植株是否为耐盐变异体,我们从DNA水平上通过RAPD的方法对获得的12耐盐株系进行了检测。共采用了248条随机引物对耐盐植株和对照进行RAPD分析,其中3条引物扩增出了与对照不同的差异条带,这3条引物扩增共得到15条电泳条带,平均每条引物可扩增得到5条,其中2条为特异条带(表2)。与对照相比,在引物S262扩增的多态性中,耐盐植株在1.8 kD和1.2 kD处各少

了1条带,在0.6 kD处多了1条带(图4中箭头所示);在引物S224扩增的多态性中,耐盐植株在0.85 kD处少了1条带,在0.6 kD处多了1条带(图4中箭头所示);在引物S267扩增的多态性中,耐盐植株在0.73 kD处多了1条带(图4中箭头所示)。耐盐株系与对照植株之间DNA的多态性的结果说明这些耐盐植株在DNA水平上发生了变异(图4),这些差异的产生可能是由于耐盐植株DNA的缺失、插入或碱基的改变而导致的。

表2 耐盐植株的RAPD分析结果统计

Table 2 Results of RAPD analysis of plantlets regenerated from 1.5% NaCl tolerant calli

Primer	Sequence	No. of amplified bands	Polymorphic fragments	
			Number	%
S224	CCCCTCACGA	5	2	40
S262	ACCCCGCCAA	7	3	42.9
S267	CTGGACGTCA	3	1	33.3
Total		15	6	40

2.5 耐1.5% NaCl药蒲公英再生植株和对照植株在蛋白水平上存在差异

基因是遗传信息的携带者,而蛋白质是基因功能的最终执行者。我们试图通过聚丙烯酰胺凝胶单向电泳从蛋白水平上进一步揭示耐盐株系和对照株系的差异,以确证耐盐株系为耐盐变异体。从图5中可以看出,盐胁迫处理前,耐盐植株和对照植株蛋白谱带相似,盐胁迫处理后,耐盐植株较对照植株在29 kD左右处诱导一条新带(图中箭头所示),说明二者在蛋白水平上存在差异。

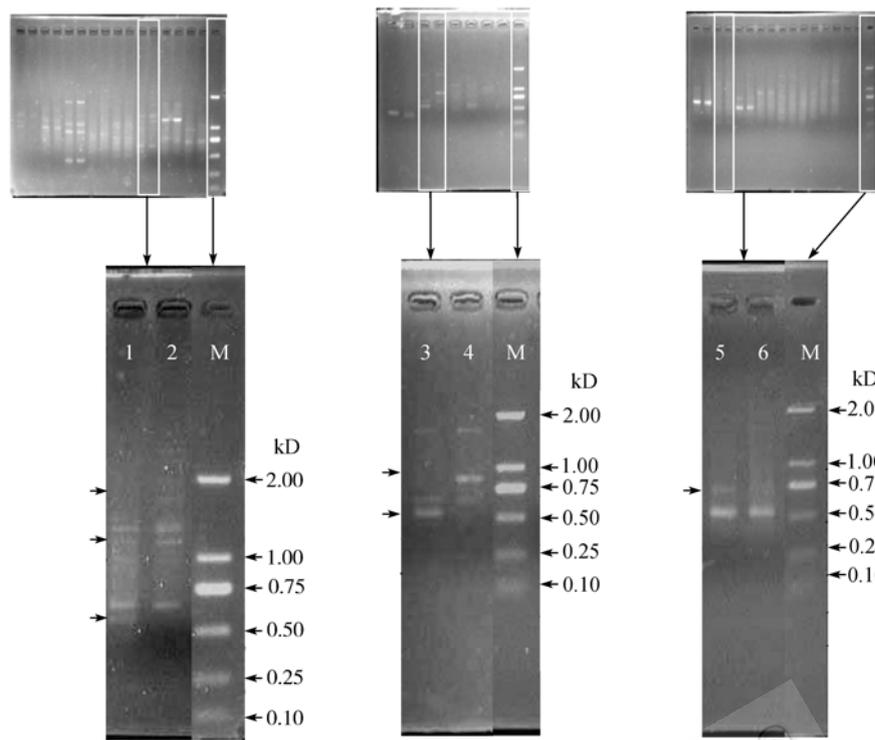


图 4 由耐 1.5% NaCl 愈伤再生获得植株的 RAPD 检测

Fig.4 RAPD analysis of plantlets regenerated from 1.5% NaCl tolerant calli

1, 3, 5: DNA pool of variants. 2, 4, 6: DNA pool of CK. M: D2000 DNA ladder. 1, 2; 3, 4; 5, 6: represent Fingerprint profile of the random primer S262, S224 and S267, respectively

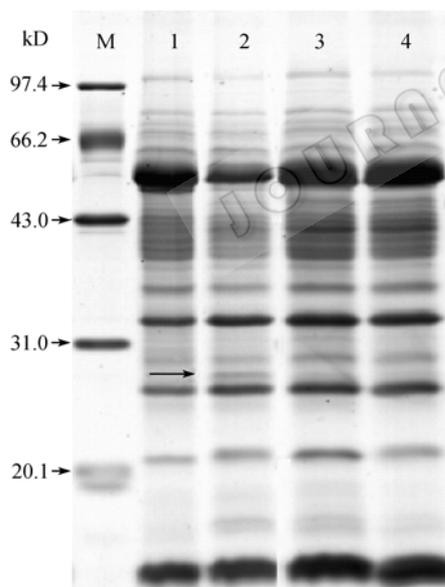


图 5 耐盐植株和对照植株的总蛋白单向聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 5 1-DE gel patterns of proteins extracted from salt-tolerant variants and control

M: molecular weight markers; 1: proteins extracted from control after NaCl treatment; 2: proteins extracted from salt-tolerant variants after NaCl treatment; 3: proteins extracted from control before NaCl treatment; 4: proteins extracted from salt-tolerant variants before NaCl

2.6 耐 1.5% NaCl 药蒲公英再生植株生理生化鉴定

2.6.1 盐处理前后耐盐植株丙二醛(MDA)含量变化测定

MDA 是膜脂过氧化的主要产物, 其含量高低可表示脂质过氧化程度和膜受损程度^[21]。由图 6 可知, 盐胁迫处理前, 耐盐植株和对照植株的 MDA 含量无显著差异, 盐胁迫处理后耐盐植株 MDA 含量上升的幅度明显低于对照, 仅为对照的 0.65 倍。说明耐盐植株的细胞膜受伤程度低于对照。

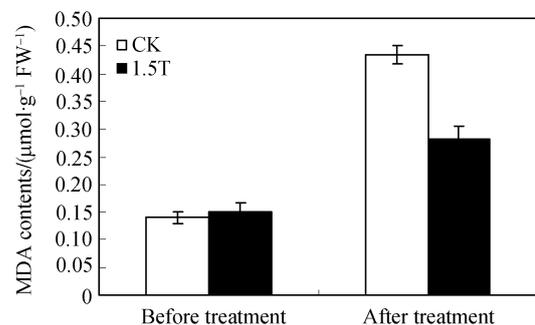


图 6 1.5% NaCl 处理前后耐盐植株(1.5T)和对照植株(CK)丙二醛含量变化

Fig. 6 MDA contents of salt-tolerant seedlings (1.5T) and control (CK) before and after 1.5% NaCl treatment
Data represent the mean values ± SE of three independent experiments

2.6.2 盐处理前后耐盐植株抗氧化酶活性分析

盐胁迫会诱导植物体内产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[22], 损害细胞膜并破坏细胞的正常代谢^[23]。为了避免伤害, 植物体进化出了一系列的防御系统来清除或减少 ROS, 如抗氧化酶 SOD, POD, CAT 和 APX 等。从图 7 中可以看出, 1.5% NaCl 处理前后, 耐盐植株的 SOD, POD, CAT 和 APX 酶活性明显高于对照。1.5% NaCl 胁迫处理后, 耐盐植株的 SOD, CAT 和 APX 酶活升高的幅度大于对照, 分别是对照的 1.35 倍、2.6 倍、1.57 倍。说明耐盐植株能够通过提高抗氧化酶活性来抵御 NaCl 胁迫引起的次级伤害。

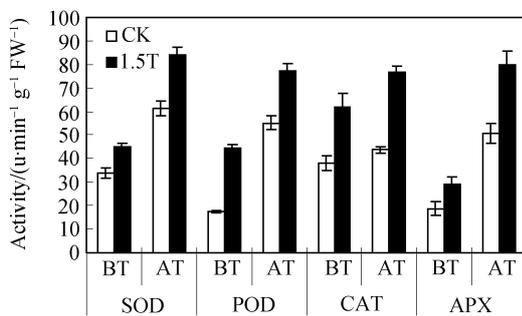


图 7 1.5% NaCl 处理前后耐盐植株(1.5T)和对照植株(CK)SOD, POD, CAT 和 APX 酶活变化

Fig. 7 SOD, POD, CAT and APX activities of salt-tolerant seedlings(1.5T) and control(CK) before and after 1.5% NaCl treatment

Data represent the mean values \pm SE of three independent experiments. BT: Before treatment; AT: After treatment

2.6.3 盐处理前后耐盐植株自由脯氨酸含量变化

除了对植物造成氧化胁迫外, 盐分亦会对植物造成渗透胁迫, 严重时造成细胞组织的水分外渗^[24]。为防止盐分的渗透胁迫对植物的伤害, 植物体内会合成一些相应的渗透调节物质以调节细胞的渗透势, 如: 脯氨酸(Pro)、甜菜碱、糖醇等^[25]。

从图 8 可以看出, 盐胁迫处理前, 耐盐植株和对照植株的脯氨酸含量较低, 但耐盐植株的脯氨酸含量明显高于对照; 盐胁迫处理后耐盐植株和对照植株的脯氨酸含量大幅度上升, 但耐盐植株的上升幅度大于对照, 是对照的 1.3 倍。盐胁迫处理前后, 耐盐植株的脯氨酸含量均高于对照。说明耐盐植株在盐胁迫下能积累更多的脯氨酸, 作为一种渗透调节物质来抵御盐胁迫对植物造成的伤害。

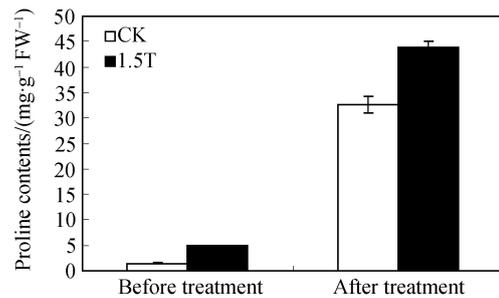


图 8 1.5% NaCl 处理前后耐盐植株(1.5T)和对照植株(CK)脯氨酸含量变化

Fig. 8 Proline contents of salt-tolerant seedlings(1.5T) and control(CK) before and after 1.5% NaCl treatment

Data represent the mean values \pm SE of three independent experiments

2.6.4 药蒲公英药用成分总黄酮含量分析

黄酮是植物合成的一种次生代谢产物, 在植物胁迫保护中起作用^[26], 同时也是药蒲公英的主要药用成分。最近对小麦的研究^[27]结果显示盐胁迫下小麦体内的黄酮含量上升, 本实验也得出了相似的结论。盐处理前后耐盐植株的总黄酮含量普遍高于对照植株(图 9), 1.5% NaCl 处理后耐盐植株的总黄酮含量可上升达到 $8.772\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}^{-1}$ 且上升幅度为 $1.544\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}^{-1}$, 是对照的 1.64 倍。说明黄酮在药蒲公英耐盐植株中可能作为一种抗胁迫物质起作用。

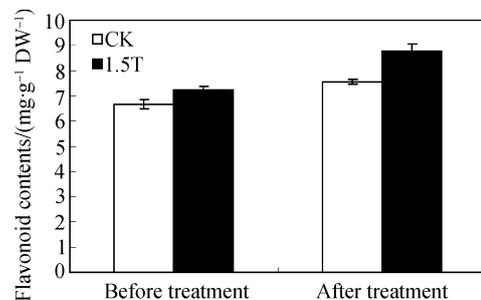


图 9 1.5% NaCl 处理前后耐盐植株(1.5T)和对照(CK)植株总黄酮含量变化

Fig. 9 Flavonoid contents of salt-tolerant seedlings(1.5T) and control(CK) before and after 1.5% NaCl treatment

Data represent the mean values \pm SE of three independent experiments

3 讨论

获得耐盐愈伤组织的途径一般有两种方法, 一是直接筛选法^[28]; 二是逐级筛选法^[29]。本实验用直接筛选的方法筛选出了耐 1.5% NaCl 的药蒲公英愈

伤并再生了植株, 它们可能是愈伤组织细胞在生长过程中产生了变异。

筛选出具有分化能力且高耐盐性的愈伤组织是产生耐盐植株的关键。许多材料的愈伤组织或培养细胞经过长期的耐盐筛选后, 往往丧失了再生植株的能力^[19]。为了获得耐盐再生植株, 本研究采用降低培养基中的 NaCl 浓度等措施, 即将获得的耐盐愈伤分别放到无盐、1% NaCl、1.5% NaCl 培养基上分化, 结果都能分化出再生苗, 但耐盐愈伤在含盐培养基上的再生时间普遍比对照延迟 20 天以上。

基于获得的耐盐植株与对照相比有明显的表型差异, 本文从分子和蛋白水平对二者的差异进行了探讨。RAPD 和 SDS-PAGE 分析发现, 耐盐植株和对照植株的 DNA 以及盐胁迫处理后的总蛋白均呈现差异(图 4, 5), 表明获得的耐盐植株在分子和蛋白水平上都发生了变异, 获得的耐盐植株是耐盐变异体。

正常情况下, 自由基的产生与清除之间保持着一种动态平衡。但在逆境条件下, 植物细胞内的活性氧产生与清除的平衡关系受到破坏, 积累的自由基就会对细胞造成伤害。植物体内的 SOD、CAT、POD 等一系列抗氧化酶, 能够在逆境胁迫和衰老过程中清除植物体内过量的活性氧, 维持活性氧的代谢平衡和保护膜结构, 协同抵御不良环境的胁迫, 从而保证植物的正常生长。因此, 抗氧化酶活性和 MDA 含量常被作为研究植物在逆境胁迫下非常重要的生理指标^[23]。为进一步确证耐盐植株是耐盐变异体并分析其可能的耐盐机理, 我们还从生理生化角度分析了耐盐植株的 MDA 含量、抗氧化酶活性以及渗透调节物质脯氨酸含量的变化。结果发现盐胁迫下, 耐盐植株体内的酶活上升且增加幅度普遍高于对照(图 7), 但耐盐植株升高的 MDA 量远低于对照(图 6), 这可能是其更为耐受盐胁迫伤害的原因之一。盐胁迫处理后耐盐植株的脯氨酸含量上升幅度大于对照(图 8), 说明脯氨酸在植物体内作为一种渗透调节物质起作用, 耐盐植株能够积累更多的脯氨酸来抵御盐胁迫。

黄酮是植物合成的一种次生代谢产物, 具有多种功能, 最近有研究^[30]发现黄酮在植物体内可能作为抗氧化物质起作用, 本实验研究表明盐处理后耐盐植株的总黄酮含量上升且上升幅度大于对照, 盐

处理前后的耐盐植株的总黄酮含量均高于对照植株(图 9), 说明黄酮在药蒲公英耐盐植株中可能作为一种抗胁迫物质起作用。另外由于黄酮是药蒲公英中的主要药用成分, 进而说明本实验获得的耐盐植株在医药方面可能具有较高的商业价值。

综上所述, 本实验筛选获得的耐盐植株是耐盐变异体, 要确定其为耐盐突变体, 还要做如下工作: 在含盐培养基上继续筛选耐盐变异体后代, 确定其耐盐的遗传稳定性, 以便大田推广应用。因为药蒲公英有二倍体, 三倍体和四倍体之分, 其中二倍体是有性生殖体且自交不亲和; 三倍体是无融合生殖体, 无融合生殖体产生的个体在遗传上与母本相同, 所以, 需要鉴定药蒲公英耐盐植株后代的倍性, 以便了解和确定其耐盐优良性状在后代中保持下去的方式。另外, 获得耐盐突变体后, 可以之为试材, 通过双向电泳检测其与对照的蛋白差异, 然后用质谱等手段鉴定差异蛋白, 深入研究其耐盐机理。

致谢: 感谢李小波同学、侯玉慧同学和王旭初同学分别在材料继代、过氧化物酶活性测定和蛋白质电泳中给予的帮助。

REFERENCES

- [1] Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science*, 1982, **218**: 443-438.
- [2] Wang ZQ. Saline Soil of China. Beijing: Science Press, 1993, pp. 325-344.
王遵亲. 中国盐渍土. 科学出版社, 1993, pp. 325-344.
- [3] Zhao KF, Li FZ. Halophyte of China. Beijing: Science Press, 1999, pp. 1-10.
赵可夫, 李法增. 中国盐生植物. 科学出版社, 1999, pp. 1-10.
- [4] Gao YH, Li Y. Application of Selection of Salt-Tolerant Mutant From Plant *In Vitro*. *Acta Agriculture Nucleatae Sinica*, 2004, **18**(6): 448-452.
高玉红, 李云. 植物离体培养筛选耐盐突变体的研究. 核农学报, 2004, **18**(6): 448-452.
- [5] Zhou RR, Yang SR, Yu SW. Research on Mechanism of Salt Tolerance and Selection of Salt Tolerant Mutant in Plants by Tissue Culture. *Plant Physiology Communications*, 1989, **25**(5): 1-19.
周荣仁, 杨燮荣, 余书文. 利用组织培养研究植物耐盐机理与筛选耐盐突变体的进展. 植物生理学通讯, 1989, **25**(5): 1-19.

- [6] Chen H, Li YX. Biotechnological Breeding for Salt Tolerance of Dandelion. *Chinese Bulletin of Botany*, 2004, **21**(1): 19–25.
陈华, 李银心. 蒲公英研究进展和用生物技术培育耐盐蒲公英展望. *植物学通报*, 2004, **21**(1): 19–25.
- [7] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, **15**: 473–497.
- [8] Chen H, Li P, Liu J, *et al.* Establishment and Optimization of the Regeneration System for Common Dandelion(*Taraxacum officinale* Weber). *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(2): 244–249.
陈华, 李平, 刘晶. 药蒲公英再生体系的建立和优化. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 244–249.
- [9] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuclear Acids Research*, 1980, **8**: 4321–4325.
- [10] Shihua Shen, Yuxiang Jing, Tingyun Kuang. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *proteomics*, 2003, **3**: 527–535.
- [11] Candiano G, Bruschi M, Musante L *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, **25**: 1327–1333.
- [12] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, **44**: 276–287.
- [13] Cakamsk I, Marschner H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*, 1992, **98**(4): 1222–1227.
- [14] Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 1952, **195**: 133–140.
- [15] Shen WB, Xu LL, Ye MB. Study on Determination of ASP Activity. *Plant Physiology Communications*, 1996, **32**(3): 203–205.
沈文彪, 徐朗莱, 叶茂炳. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨. *植物生理学通讯*, 1996, **32**(3): 203–205.
- [16] Zhu GQ. Determination of free proline in plants. *Plant Physiology Communications*, 1983, (1): 35–37.
朱光廉. 植物体内游离脯氨酸的测定. *植物生理学通讯*, 1983, (1): 35–37.
- [17] Tang ZC. Modern Experimental Protocol in Plant Physiology. Beijing: Science Press, 1999, pp. 305.
汤章城. 现代植物生理学实验指南. 科学出版社, 1999, pp. 305.
- [18] Fu GM, Wan Y, Zhou JB. Comparison of Methods of Determining the Content of Flavonoids in Extracts from *Evcommia Vlmoides Oliv.* Leaves. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2006, **6**(1): 224–229.
付桂明, 万茵, 周建斌. 杜仲叶醇提液中黄酮测定方法的比较研究. *中国食品学报*, 2006, **6**(1): 224–229.
- [19] Wang LS, Wang MG, Wang YF. The Selection of NaCl-Tolerant Mutants by Tissue and Cell Culture in Plant. *Chinese Bulletin of Botany*, 1996, **13**(2): 7–12.
王仑山, 王鸣刚, 王亚馥. 利用组织和细胞培养筛选作物耐盐突变体的研究. *植物学通报*, 1996, **13**(2): 7–12.
- [20] Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation—a novel variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981, **60**: 197–214.
- [21] Hodges DM, DeLong JM, Fomey CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, **207**: 604–611.
- [22] Ali MB, Hahn EJ, Peak KY. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. *Plant physiology and Biochemistry*, 2005, **43**(3): 213–223.
- [23] Liang Y C, Chen Q, Liu Q *et al.* Exogenous silicon(Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley(*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 2003, **160**(1): 157–164.
- [24] Zhao KF. Plant Salt Tolerance Physiology. Beijing: China Science and Technology Press, 1993, pp.52.
赵可夫. 抗盐植物生理. 中国科学技术出版社, 1993, pp. 52.
- [25] Mao GL, Xu X, Xu ZZ. Advances in physiological and biochemical research of salt tolerance in plant. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*(), 2004, **12**(1): 43–46.
毛桂莲, 许兴, 徐兆桢. 植物耐盐生理生化研究进展. *中国生态农业学报*, 2004, **12**(1): 43–46.
- [26] Zou FL, Shou SY, Ye WZ, *et al.* Advances in the Research on Flavonoid Biosynthesis and Plant Stress Response. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2004, **26**(1): 39–44.
邹凤莲, 寿森炎, 叶纨芝, 等. 类黄酮化合物在植物胁迫反应中作用的研究进展. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**(1): 39–44.
- [27] Meng ZN, Liu C, He JM, *et al.* The Effects of Increased UV-B Radiation, NaCl Stress and Their Combined Treatment on the Photosynthesis and Flavone Metabolism in Wheat Seedlings. *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(12): 1868–1871.
孟朝妮, 刘成, 贺军民, 等. 增强 UV-B 辐射、NaCl 胁迫

迫及其复合处理对小麦幼苗光合作用及黄酮代谢的影响. 光子学报, 2005, 34(12): 1868-1871.

[28] Basu S, Gangopadhyay G, Gupta S, *et al.* Screening for cross tolerance against related osmotic stress in adapted calli of salt sensitive and tolerant varieties of rice. *Phytomorphology*, 1996, 46: 357-364.

[29] Hasson E, Poljakoff-Mayber A. Callus culture from hy-

pocotyls of *Kosteletzhya virginica*(L) seedlings. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1995, 43(3): 279-285.

[30] Gu Y, Li AM. Progress in Research of Flavonoid Bioactivities. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(2): 283-286.

古勇, 李安明. 类黄酮生物活性的研究进展. 应用与环境生物学报, 2006, 12(2): 283-286.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

RNA 世界

(美)雷蒙德·F.格斯特兰德 托马斯·R.切赫 约翰·F.阿特金斯 主编

郑晓飞 主译 978-7-03-020060-0 ¥85.00 2008年1月11日出版

本书根据美国冷泉港实验室出版社出版的《RNA 世界》第三版译出。本书系统地介绍了 RNA 在生命起源中的作用和 RNA 功能, 是国际上 RNA 领域最权威的专业书籍。内容涵盖了 RNA 的起源、核酶、核糖体、剪接体、核糖开关、RNA 蛋白质复合物、snRNP、snoRNP、端粒酶 RNA、RNA 编辑、RNAi、microRNA、非编码 RNA、RNA 二级结构预测和 RNA 动力学研究等。全书具有系统性和权威性。同时, 为方便读者阅读使用, 本书还附有英汉术语对照和索引。

本书可供分子生物学、生物化学、细胞生物学、分子遗传学、微生物学、生物技术、医药卫生, 以及农、林、牧等生命科学领域相关科研、教学、技术人员, 研究生和高年级本科生参考使用。



水稻基因设计育种

钱前 主编

978-7-03-020098-3 / Q.1958 ¥98.00 2007年12月12日出版

本书系统地介绍了水稻转基因技术、花药培养、分子标记辅助育种和基因组辅助育种的基本原理和方法, 阐述了水稻产量性状、抗病虫性、抗逆性状、营养品质和特异种质的遗传研究及分子育种的最新进展、水稻基因设计育种数据库建设和水稻基因设计育种的展望, 反映了在水稻分子育种方面获得的成果。全书共分 12 章, 各章节前后呼应, 又独立成章, 是一本涵盖了水稻遗传学、分子标记辅助选择及水稻重要性状的分子育种等多方面理论和实践知识的最新参考书。

本书可供作物遗传育种、分子遗传学、生物学、农学和生物工程等专业的教师、学生及相关领域的科研人员及管理者阅读参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目