

## 研究报告

# 耐盐药蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber)愈伤组织筛选及生理生化特性分析

张新果, 陈显扬, 姜丹, 李银心

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

**摘要:** 为获得耐 1.5% NaCl 的药蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber)愈伤组织, 以药蒲公英叶片外植体为材料诱导愈伤组织。以 NaCl 为选择因子, 从愈伤组织直接筛选。在选择培养基上, 大部分愈伤组织褐化死亡, 个别褐化死亡的愈伤组织周围有少量新的细胞团长出, 将其转接到新鲜的选择培养基上, 每 3 周继代一次, 经 3 个月继代筛选获得了耐 1.5% NaCl 的药蒲公英细胞团。以普通愈伤组织为对照, 发现随着 NaCl 浓度升高, 耐盐愈伤组织的相对生长率下降但显著高于对照; 且随着盐胁迫处理时间延长持续升高, 而普通愈伤组织对照几乎停止生长, 说明耐盐愈伤组织具有相对稳定的耐盐性。在蛋白水平上, 耐盐愈伤组织与对照愈伤组织差异明显, SDS-PAGE 分析显示: 耐盐愈伤组织比对照多出一条 34 kD 大小的蛋白带, 且 30 kD、18 kD 左右的蛋白带明显上调。相同处理条件下耐盐愈伤组织脯氨酸的增加幅度高于对照。盐胁迫条件下, 耐盐愈伤组织的超氧化物歧化酶(Super oxidase dimutase, SOD)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性明显高于对照, 且随着处理时间的延长和盐浓度的增加呈现升高的趋势, 而对照则呈现先升高后下降的趋势。结果说明耐盐愈伤组织一方面通过小分子有机溶质如脯氨酸的方式调节其渗透平衡, 另一方面还可通过提高抗氧化能力降低盐分造成的次级伤害。积累蛋白也可能是耐盐愈伤组织调节渗透平衡的一种方式。通过生理生化分析确定我们获得的耐盐愈伤组织为耐盐变异体。

**关键词:** 药蒲公英, 组织培养, 变异愈伤筛选, 耐盐性, 活性氧清除剂, 渗透平衡

## Selection and Characterization of Salt-tolerant Calli of *Taraxacum officinale*

Xinguo Zhang, Xianyang Chen, Dan Jiang, and Yinxin Li

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

**Abstract:** In order to obtain salt-tolerant calli of Dandelion (*Taraxacum officinale* Weber), calli were induced from leaf explants of Dandelion on Murashige and Skoog's medium supplemented with 2.0 mg/L 6-benzyladenine and 0.5 mg/L 2,4-dichlorophen oxyacetic acid. With 1.5% NaCl as selection pressure, most calli became brown and dead, whereas some new cell clusters appeared at the edge of the brown calli after 2 to 3 weeks. The survived cells were picked out and sub-cultured every 3 weeks onto the fresh selection medium and salt-tolerant calli were finally obtained through 4 continuous selections on the selection medium supplemented with 1.5% NaCl. Salt-tolerant calli increased steadily under a fixed NaCl stress though their relative growth rate decreased with

**Received:** October 17, 2007; **Accepted:** December 10, 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)和中国科学院知识创新工程重要方向性项目(No. KSCX2-YW-N-003)资助。

increased NaCl concentration whereas the control calli which were sub-cultured by 4 continuous selections on salt free medium ceased to grow under the same condition. This result indicated that the salt-tolerance of the selected calli is improved and this character is stable. Compared with the control, the SDS-PAGE pattern of the salt-tolerant calli had a unique 34 kD protein band. Its 30 kD and 18 kD protein bands were up-regulated. Further more, within the NaCl stress range up to 1.5%, the activities of antioxidant enzymes such as super oxidase dimutase, peroxidase and catalase, and the proline contents of the salt-tolerant calli were higher than those of the control. The results indicated that the selected calli with improved and stable salt tolerance were cell variants. The accumulation of the organic compatible solutes including proteins and the enhanced antioxidant capabilities in the salt tolerant calli are the two ways for them to regulate their osmotic homeostasis and alleviate the secondary reactive oxygen species damage respectively.

**Keywords:** *Taraxacum officinale*, tissue culture, variant callus selection, salt-tolerant, ROS scavenger, osmotic homeostasis

土壤盐渍化是降低农作物产量的主要环境因素之一<sup>[1]</sup>。在耕地面积有限的情况下, 开发利用盐荒地是国内外研究的热点, 而适宜的耐盐作物品种的选择是开发利用盐碱荒地的关键。Shepard<sup>[2]</sup>证明植物细胞与组织培养中存在大量的体细胞变异, 这种变异的频率在百分之几到几十之间<sup>[3]</sup>。以大量培养的细胞为选择对象, 在选择压力下直接进行定向筛选, 有可能筛选出耐盐的细胞并再生植株<sup>[4]</sup>。目前, 分离突变体的细胞材料包括愈伤组织、悬浮细胞和原生质体。其中, 愈伤组织虽然有一些缺点, 如培养物生长慢、选择压力不均一、胁迫变异小, 个别抗性细胞可能由于周围组织的障碍, 失去分裂新细胞的能力等; 但它是分离突变体最简单的细胞材料, 方法简便, 较易再生获得突变植株<sup>[5]</sup>。现已筛选出烟草、水稻、苜蓿、蕃茄、芦苇等植物的耐盐细胞变异体并再生了植株<sup>[6]</sup>。

对植物的抗盐机理的了解是耐盐育种研究工作的重要基础。植物的抗盐机制非常复杂, 是多种生理生化代谢过程在分子、细胞、组织、器官乃至整体植物等多个层面协同作用的结果。植物愈伤组织是未分化的细胞团, 愈伤组织由于其脱分化特点和再分化潜力, 是植物细胞生物学、植物胚胎学、发育和分子生物学等研究的良好基础平台, 又由于愈伤组织通常具有生长迅速、繁殖量大、占用空间小、能够在控制条件下进行工厂化生产的优越性和特点, 可作为医药生物反应器加以应用, 同时胚性的愈伤细胞还可用于人工种子生产, 因此还是一种很好的繁殖体。近年来通过筛选耐盐愈伤组织后比较耐盐愈伤组织和对照两者生理生化差异的方法, 已成为在细胞水平研究抗盐机理的重要手段<sup>[7-9]</sup>。

药蒲公英(*T. officinale* Weber), 属于菊科蒲公英属, 是一种重要的中药材, 与该属其他种类相比

具有生物量大的特点, 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, 利用生物技术提高其抗盐性有望使之成为抗盐耐海水蔬菜家族的新成员<sup>[10]</sup>。

以往研究大多采用不同浓度的盐处理普通愈伤组织的方法分析盐胁迫对愈伤组织的一些生理指标的影响。本研究以药蒲公英叶片外植体为材料诱导愈伤组织, 以 NaCl 为选择因子, 在适宜的选择压下, 对愈伤组织进行定向直接筛选, 获得耐盐细胞团。通过筛选耐盐的愈伤组织, 并在此平台基础上, 以其为研究对象, 通过比较耐盐愈伤组织和普通愈伤组织在蛋白表达谱上的差异, 分析脯氨酸含量和超氧化物歧化酶, 过氧化物酶, 过氧化氢酶等生理指标的变化, 探讨其耐盐性提高的分子生理基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

实验材料为温室栽培的药蒲公英(*T. 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℃, 夜间温度为 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继代培养

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<sup>2</sup>左右的小片, 以此为外植体接种到愈伤诱导培养基上, 15 d 后开始出现愈伤组织, 30 d 后叶片边缘有大量的愈伤组织产生。将愈伤组织移至继代培养基上进行继代培养。

以 MS<sup>[11]</sup>为基本培养基。

愈伤诱导培养基和继代培养基相同<sup>[12]</sup>: MS+

2.0 mg/L 6-BA +0.5mg/L 2,4-D, pH 5.9。

### 1.2.2 药蒲公英耐盐变异体的筛选

(1) 耐盐愈伤组织筛选的临界盐浓度的确定: 将继代 4 次的愈伤组织切成 0.5 cm 左右的小块分别接种到含 0%、0.5%、1.0%、1.2%、1.5%、2.0% NaCl 的继代培养基中, 每个浓度 8 瓶, 每瓶 8~10 块愈伤组织。培养 10 d、18 d、26 d 后, 统计愈伤组织的相对生长率。确定筛选耐盐愈伤组织的盐浓度。根据公式  $RGR=(FW_f-FW_i)/FW_i$  计算出愈伤块在各种处理培养基上的相对生长率(Relative growth rate, RGR),  $FW_f$  表示测定时的愈伤组织鲜重,  $FW_i$  表示愈伤组织的原始重量。

(2) 耐盐愈伤组织的筛选: 将继代 4 次(每 3 周继代 1 次)的愈伤组织转到含 1.5% NaCl 的培养基上, 3 周继代 1 次, 继代 4 次后, 获得耐 1.5% NaCl 的愈伤组织, 将其转到无盐和含 1.5% NaCl 的培养基交替培养(继代 4 次, 每 3 周继代 1 次), 然后将其转到无盐的愈伤继代培养基上扩增培养 2 个月。

将普通愈伤组织和在无盐的愈伤继代培养基上扩增培养两个月后的耐盐愈伤组织分别接种到含 0%、0.5%、1% 和 1.5% NaCl 的继代培养基上, 培养 2 周, 测定愈伤组织的鲜重; 另一部分耐盐愈伤组织和对照愈伤组织接种到 1% NaCl 培养基上培养 4 周, 每周测 1 次鲜重。将所得的数据作愈伤相对生长率曲线, 比较愈伤组织的相对生长率以确定耐盐愈伤组织细胞的耐盐性及耐盐稳定性。作生长量测定时, 每种愈伤组织每个处理接种 6 瓶, 每瓶接种 8~10 块。

### 1.2.3 药蒲公英耐 1.5% NaCl 愈伤组织的生理生化指标测定

耐盐愈伤组织分别放到含 0%、0.5%、0.8%、1%、1.5% NaCl 的培养基上, 分别处理 4 d、8 d、12 d、16 d 后进行抗氧化酶活性测定, 分别处理 2 d、4 d、6 d、8 d 后进行脯氨酸含量测定。提取在无盐培养基上生长 2 个月的耐盐愈伤组织和对照愈伤组织总蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

### 1.2.4 耐盐愈伤组织总蛋白的提取

提取方法参照沈世华等的 TCA 法<sup>[13]</sup>, 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<sup>[14]</sup>, 图像扫描采用 ImageScanner labscan 扫

描仪(GE Healthcare)。蛋白分子标准(M)为低分子量标准蛋白质, 购自北京 Tiangen 公司。

### 1.2.5 SOD、POD 和 CAT 活性测定

分别参考 NBT 法<sup>[15]</sup>, 愈创木酚法<sup>[16]</sup>, Beers and Sizer 的方法<sup>[17]</sup>。

### 1.2.6 脯氨酸测定

参照酸性茚三酮法<sup>[18]</sup>。

### 1.2.7 统计分析方法

采用 SPSS13.0 (for windows)软件包进行多重数据比较统计分析。

## 2 结果

### 2.1 药蒲公英愈伤组织的诱导和耐盐愈伤组织的筛选

#### 2.1.1 耐盐愈伤组织的诱导

将温室中生长 20~30 d 的药蒲公英的叶片放到愈伤诱导培养基上, 15 d 后在叶片的周围开始出现愈伤组织, 30 d 后在叶片周围有大量的愈伤组织产生, 将愈伤组织切下放到愈伤继代培养基上扩增, 以备筛选耐盐愈伤组织使用。图 1 为药蒲公英叶片在愈伤诱导培养基上培养 20 d 的愈伤组织诱导情况及继代扩繁培养情况。愈伤组织诱导频率为 100%。

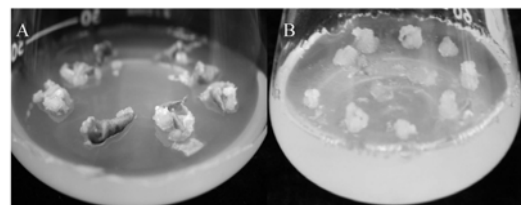


图 1 愈伤组织的诱导

Fig. 1 Calli were induced from leaf discs of 20-30 days old plant of dandelion

A: leaf discs on callus induction medium for 20 days; B: calli on callus induction medium

#### 2.1.2 筛选药蒲公英耐盐愈伤组织临界盐浓度的确定

NaCl 筛选浓度的确定是进行耐盐细胞筛选的关键。若 NaCl 选择压力(浓度)过高则可能杀死变异的细胞, 若选择压力过低则会增加获得假阳性变异细胞的几率, 因此需要确定一个适宜的临界 NaCl 浓度来筛选耐盐愈伤组织。临界浓度通常为半致死以上浓度。从图 2 看出, 0.5% NaCl 对愈伤组织生长的抑制作用并不显著, 1.0% 及更高浓度的 NaCl 则明显抑制愈伤组织的生长, 其中 1.5% 和 2.0% 处理 26 d 后, 愈伤块因严重失水而皱缩, 并且大部分发生褐

化死亡。因此 1% 以上的 NaCl 浓度为适宜耐盐愈伤组织筛选的盐浓度, 我们选择 1.5% 为筛选的临界盐 (NaCl) 浓度。

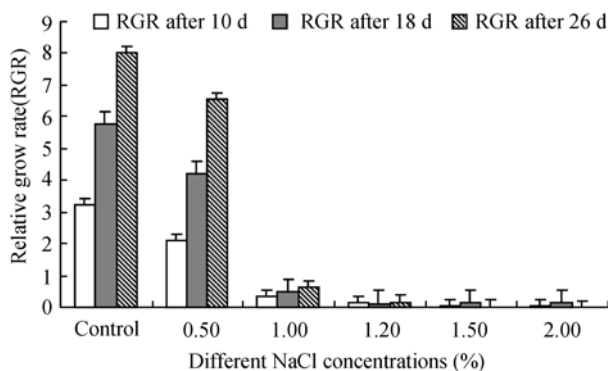


图 2 不同浓度 NaCl 对非耐盐细胞系生长的影响

Fig. 2 Effects of NaCl concentrations on growth of the calli  
RGR: relative growth rate

### 2.1.2 药蒲公英耐盐愈伤组织的获得

在确定了 1.5% NaCl 为筛选耐盐愈伤组织的临界盐浓度后, 以大量培养细胞为基础, 进行高通量、大规模的筛选是获得耐盐变异愈伤组织的唯一途径。将非耐盐的普通愈伤组织放到含 1.5% NaCl 的继代培养基上后, 1 周后开始变褐(图 3B), 2 周(图 3C)至 3 周(图 3D)后开始死亡, 四周后, 绝大部分 (86.7%) 愈伤组织变褐死亡(图 3E), 但在部分变褐死亡的愈伤组织周围长出了新的愈伤组织团(图 3E, F), 将长出的细胞团接种到新的含 1.5% NaCl 的培养基上继代, 每 3 周继代 1 次, 3 个月后将耐盐愈伤组织(图 3G), 将其放到无盐培养基上扩增培养(图 3H)。

### 2.2 耐盐愈伤组织的耐盐性分析

所筛选的耐盐愈伤组织为耐盐变异体还是生理适应型, 需要通过耐盐性及耐盐稳定性分析进行确

定。为此, 我们将普通愈伤组织对照接种到无盐和含 1% NaCl 继代培养基上, 在无盐培养基上生长 2 个月的耐盐愈伤组织接种到含 1% NaCl 培养基上, 根据愈伤组织鲜重增长情况作出相对生长率曲线(图 4)。从图 4 中可以看出, 随着处理周数的增加, 耐盐愈伤组织的相对生长率明显高于对照, 仅略低于非耐盐愈伤组织在无盐培养基上的相对生长率, 说明耐盐愈伤组织对 NaCl 的耐性是相对稳定的。

将筛选的耐盐愈伤组织与普通愈伤组织分别培养在含不同 NaCl 浓度的继代培养基中, 比较其生长的差异。从图 5 可以看出, 随着 NaCl 浓度的升高, 耐盐愈伤组织和对照的相对生长率下降, 但耐盐愈伤组织在 0.5% NaCl 浓度下, 其相对生长率是对照的 1.2 倍; 当 NaCl 浓度为 1% 时, 耐盐愈伤组织的相对生长率为 2.088, 为对照的 2.5 倍; 在 1.5% NaCl 浓度下, 耐盐愈伤组织的相对生长率为 1.01, 而对照受抑制程度严重, 相对生长率非常低。在各盐浓度处理下的耐盐愈伤组织和对照的相对生长率呈显著性差异。可见本实验获得的耐盐愈伤组织具有明显的耐盐性。

### 2.3 耐盐愈伤组织总蛋白与对照总蛋白存在明显差异

蛋白质是一切生物基因功能的最终执行者, 我们试图通过 SDS-PAGE 检测耐盐愈伤组织与普通愈伤组织在蛋白表达谱上的差异, 以确证本实验获得的耐盐愈伤组织为变异组织。结果显示耐盐愈伤组织在 34 kD 左右处明显出现了一条新的带, 在 30 kD 和 18 kD 左右处的两条带的量明显上调(图 6)。说明耐盐愈伤组织在蛋白水平上确实发生了变异, 耐盐愈伤组织中蛋白表达量增加。

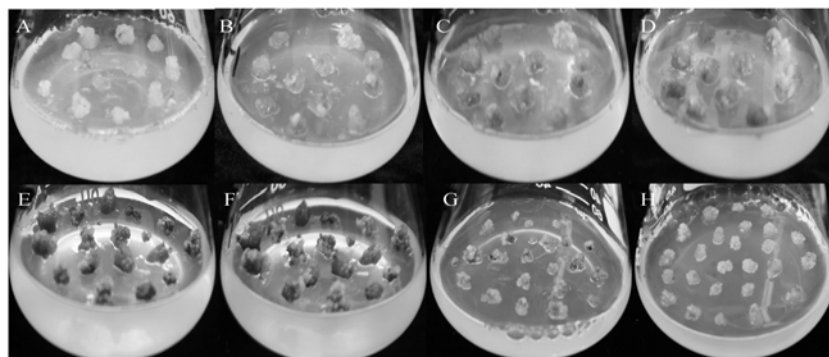


图 3 耐盐药蒲公英愈伤组织的筛选

Fig. 3 Selection of salt-tolerant calli

A: calli on selection medium free of NaCl; B, C, D, E, F: calli on selection medium with 1.5% NaCl for 1, 2, 3, 4 and 5 weeks, respectively; G: salt-tolerant calli on medium containing 1.5% NaCl for 3 months; H: salt-tolerant calli on NaCl free medium for 2 months

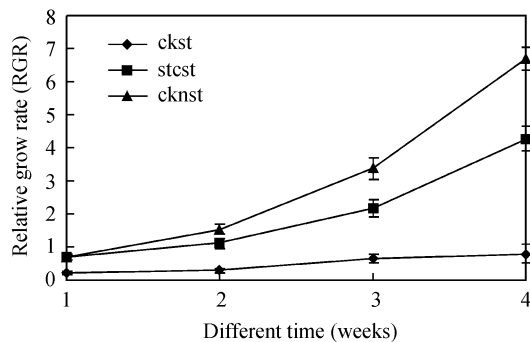


图4 耐盐愈伤组织和对照愈伤组织在 1% NaCl 培养基上的相对增长率

Fig. 4 Effects of 1% NaCl at different times on salt tolerant calli and normal calli growth

RGR: relative growth rate; ckst: control calli on medium with 1% NaCl; stcst: Salt tolerant calli on medium with 1% NaCl; cknst: control calli on normal medium

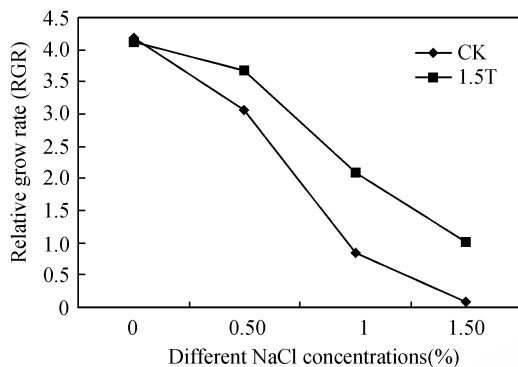


图5 耐盐愈伤组织(1.5T)和对照愈伤组织(CK)分别在不同盐浓度培养基上培养 2 周的相对增长率

Fig. 5 Effects of different NaCl concentrations on the growth of salt-tolerant calli and normal calli

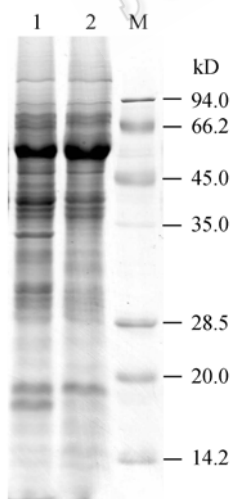


图6 耐盐愈伤组织和对照愈伤组织的总蛋白电泳图

Fig. 6 1-DE gel patterns of proteins extracted from salt tolerant calli and normal calli

1: proteins extracted from salt-tolerant calli; 2: proteins extracted from normal calli; M: molecular weight markers

## 2.4 在盐胁迫下耐盐愈伤组织积累脯氨酸

在盐胁迫下耐盐愈伤组织积累脯氨酸是其保持渗透平衡的一种方式, 因此盐胁迫条件下脯氨酸含量是否增高通常作为抗盐调节能力大小的标识。从图 7 可以看出处理时间或盐浓度一定时, 耐盐愈伤组织的脯氨酸含量随着 NaCl 浓度的升高或处理时间的增加都呈现升高的趋势。相同处理条件下, 耐盐愈伤组织的脯氨酸含量高于对照愈伤组织。

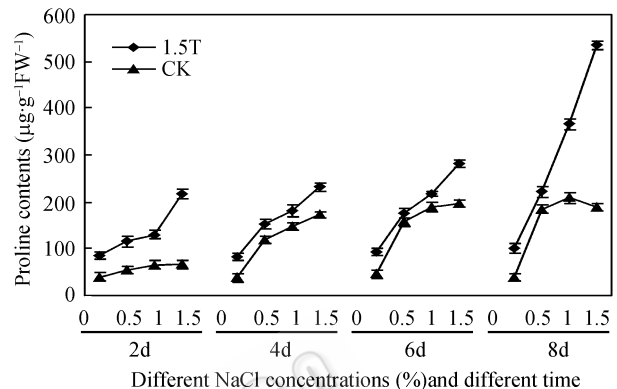


图7 不同时间不同 NaCl 浓度处理下,单位耐盐愈伤组织中的脯氨酸含量

Fig. 7 Effects of salinity on proline contents of salt tolerant calli

Each value represents the mean of three independent replicates  $\pm$  S.E.

对照愈伤组织在处理时间低于或等于 6 d 时, 随着处理时间或处理盐浓度的增加, 脯氨酸含量呈现上升的趋势; 当处理时间为 8 d 时, 随着盐浓度的增加, 脯氨酸含量先升高后降低, 说明第 8 天 1.5% NaCl 处理时, 对照愈伤组织已受到 NaCl 胁迫的伤害。

## 2.5 耐盐愈伤组织抗氧化能力增强

抗氧化酶(SOD, POD 和 CAT)活性随着 NaCl 胁迫浓度的升高和胁迫时间的增加而增强。盐胁迫会诱导植物体内产生活性氧(Reactive oxygen species, ROS)<sup>[19]</sup>, 损害细胞膜并破坏细胞的正常代谢<sup>[20]</sup>, 造成对植物的次级伤害。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。因此盐胁迫条件下植物体内抗氧化酶活性的高低是反映植物抵御 NaCl 胁迫引起的次级伤害能力大小的指标。在植物对膜脂过氧化的酶促防御系统中, SOD、POD 和 CAT 等都是非常重要的保护酶。从图 8~10 可以看出: 处理时间或盐浓度一定时, 耐盐愈伤组织的 SOD、POD 和 CAT 活性随着 NaCl 浓度的

升高或处理时间的增加呈现升高的趋势, 表明耐盐愈伤组织可以增加足量的抗氧化酶活性以清除盐胁迫产生的活性氧(ROS)。而对照愈伤组织在处理 8 天以内时, 其酶活性随着盐浓度的增加而升高, 时间超过 8 d 后, 随着盐浓度的增加酶活呈现先升高后下降的趋势, 亦即盐浓度低于 0.8% 时, 酶活性随着处理时间的增加而增加, 当盐浓度高于或等于 1% 时, 酶活性随着处理时间的增加呈现先上升后下降的趋势, 第 12 天时达到最大值(唯一例外的是 1.5% NaCl 处理对照时, 其 SOD 酶活第 8 天就达到最大值), 表明在 12 d 以前, 对照愈伤组织体内增加的抗氧化酶足以清除活性氧的增加量, 12 d 以后增加的抗氧化酶不足以将胁迫产生的 ROS 清除, 积累的 ROS 量逐渐增加, 对植物体细胞膜造成伤害<sup>[21]</sup>, 进而影响到抗氧化酶活性。

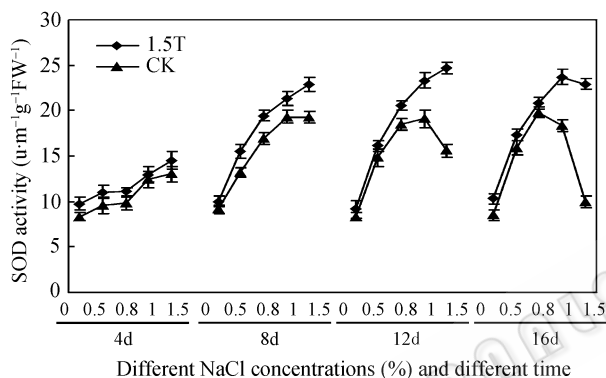


图 8 在不同时间不同 NaCl 浓度处理下, 耐盐愈伤组织和对照愈伤组织的 SOD 酶活性变化

Fig. 8 SOD activities of salt-tolerant calli and normal calli under different NaCl concentrations at different time  
Each value represents the mean of three independent measurements  $\pm$  S.E.

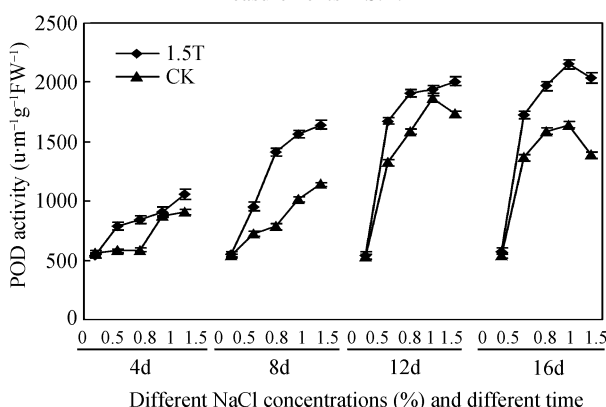


图 9 在不同时间不同 NaCl 浓度处理下, 耐盐愈伤组织和对照愈伤组织的 POD 酶活性变化

Fig. 9 POD activities of salt-tolerant calli and normal calli under different NaCl concentrations at different time  
Each value represents the mean of three independent measurements  $\pm$  S.E.

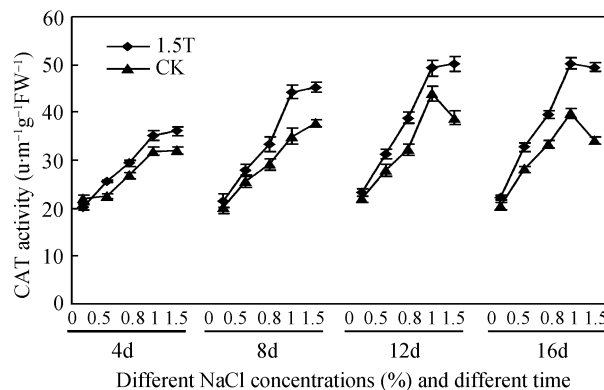


图 10 在不同时间不同 NaCl 浓度处理下, 耐盐愈伤组织和对照愈伤组织的 CAT 酶活性变化

Fig. 10 CAT activities of salt-tolerant calli and normal calli under different NaCl concentrations at different time  
Each value represents the mean of three independent measurements  $\pm$  S.E.

在 1.5% NaCl 处理时, 对照愈伤组织的 SOD 酶活在 8 d 时酶活上升到最高, 其达到最大值的时间早于 POD 和 CAT, 可能是 SOD 对盐胁迫的响应早于 POD, 这与 SOD 催化  $O_2^-$  产生  $H_2O_2$ , POD 清除  $H_2O_2$  这一反应顺序保持一致。在相同处理条件下, 耐盐愈伤组织的抗氧化酶活明显高于对照。

### 3 讨论

获得耐盐愈伤组织的途径一般有两种, 一是直接筛选<sup>[22]</sup>; 二是逐级筛选<sup>[23]</sup>。本实验用直接筛选的方法筛选出了耐 1.5% NaCl 的药蒲公英愈伤组织, 它们可能是愈伤组织细胞在生长过程中产生了变异。

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, 如: 脯氨酸、甜菜碱、糖醇等<sup>[24]</sup>。作为渗透调节物质的脯氨酸具有降低渗透势, 维持膨压, 稳定膜结构和保护酶功能的作用。脯氨酸含量的提高是细胞在盐胁迫下的一种保护性反应<sup>[7,25]</sup>。NaCl 胁迫除了对植物造成渗透胁迫伤害外, 还会对植物造成氧化伤害。在正常情况下, 植物细胞中存在着自由基的产生和消除的动态平衡过程。在盐胁迫下, 植物的光合磷酸化和呼吸代谢被抑制, 细胞内包括  $HO\cdot$  和  $O_2^-$  等的 ROS 大量积累, 自由基的产生和消除过程的平衡被破坏, 从而诱发细胞的膜脂过氧化, 对植物造成次生氧化伤害<sup>[26]</sup>。SOD、CAT 和 POD 等保护酶类在植物体内协同作用, 在逆境胁迫中清除过量的活性氧, 维

持活性氧的代谢平衡、保护膜结构,从而使植物在一定程度上忍耐、减缓或抵御逆境胁迫伤害<sup>[20]</sup>。

本实验通过耐盐性分析鉴定证明耐盐愈伤组织耐盐性比对照强且具有相对稳定性。SDS-PAGE 检测表明,耐盐愈伤组织在蛋白水平上与对照差异明显;同时,从生理角度分析了耐盐愈伤组织的抗氧化酶活性,渗透调节物质脯氨酸含量的变化,以进一步确认获得的耐盐愈伤组织为变异愈伤组织并探究其耐盐的生理基础。耐盐愈伤组织不同于对照的蛋白谱带,以及比对照高的脯氨酸含量、抗氧化酶活性(图 7-10),说明了本实验获得的耐盐愈伤组织为耐盐变异愈伤组织。

从图 7 中可以看出,随着 NaCl 浓度的增加或处理时间的延长,单位耐盐愈伤组织的脯氨酸含量逐渐上升。这些实验结果显示,耐盐愈伤组织可能通过积累脯氨酸调节其抗盐能力。同时,耐盐愈伤组织的蛋白表达量增加,该结果意味着通过增加细胞中蛋白积累调节细胞渗透压,有可能也是耐盐愈伤组织抵抗盐胁迫的一种方式。从图 8~10 中可以看出:随着 NaCl 浓度的升高或处理时间的延长耐盐愈伤组织的 SOD、POD、CAT 活性呈现升高的趋势,表明耐盐愈伤组织体内可以提高抗氧化酶活性以清除盐胁迫产生的活性氧(ROS)。而对照愈伤组织,当盐浓度高于或等于 1%处理时间大于或等于 12 d 时,其抗氧化酶活性开始下降,表明对照愈伤组织抗氧化酶活性提高的幅度不足以将胁迫产生的 ROS 清除,对照愈伤组织受到盐胁迫引起的次级氧化胁迫伤害。

另外,获得的耐盐愈伤组织在无盐和含 1.5% NaCl 的培养基上交替培养后(继代 4 次,每 3 周继代 1 次),在含盐培养基上耐盐愈伤组织能够稳定生长,经过再生获得了耐盐再生植株。

综上所述,本实验筛选获得的耐盐愈伤组织是耐盐变异体,下一步的工作,首先是在含盐培养基上获得再生的耐盐植株,在蛋白和分子及生理水平上鉴定其耐盐性,确定其为耐盐变异体;然后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,便于大田推广应用;同时,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,最终确定其为耐盐突变体。

## REFERENCES

- [1] Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science*, 1982, **218**: 443-438.
- [2] Shepard IF. A lot of variants in plant cell and tissue cultures. *Scientific American*, 1982, **246**: 58.
- [3] Zhao CZ. Discussion on plant somaclonal variation and crop improvement. *Progress in Biotechnology*, 1993, **13**(4): 32-36.  
赵成章. 再生植物体细胞无性系变异与作物改良. 生物工程进展, 1993, **13**(4): 32-36.
- [4] Huber W, Schmidt F. Zur Wirkung verschiedener Salze und von Polyathylen glycol auf den Prolin- und Aminosäurestoffwechsel von *Pennisetum rhyoides*. *Z Pflanzenphysiologie*, 1978, **89**: 251-258.
- [5] 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.
- [6] 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, (5): 11-19.  
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, (5): 11-19.
- [7] Li B, Jia XF, Li YB. Inducement of NaCl resistant alfalfa callus and measurement of the physiological and biochemical indexes. *Seed*, 2005, **24**(2): 35-37.  
李波, 贾秀峰, 李云波. 苜蓿抗盐愈伤组织的诱导及其生理生化指标的测定. 种子, 2005, **24**(2): 35-37.
- [8] Lu W, Jia JF. Selection of NaCl-tolerance cell line from embryogenic calli of miller and studier on its physiological and biochemical characteristics. *Acta Agronomica Sinica*, 1994, **20**(2): 241-247.  
陆卫, 贾敬芬. 谷子胚性愈伤组织耐盐系的选择及其生理生化特性分析. 作物学报, 1994, **20**(2): 241-247.
- [9] Gangopadhyay G, Basu S, Mukherjee BB, *et al*. Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, **49**: 45-52.
- [10] Chen H, Li YX. Biotechnological breeding for salttolerance 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.
- [11] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, **15**: 473-497.
- [12] 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与优化. *生物工程学报*, 2005, **21**(2): 244–249.
- [13] Shen SH, Jing YX, Kuang TY. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics*, 2003, **3**: 527–535.
- [14] 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.
- [15] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1971, **44**: 276–287.
- [16] 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.
- [17] Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal Biological Chemistry*, 1952, **195**: 133–140.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Liang YC, 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.
- [21] Zhang LH, Li XM, Chen Q, *et al.* Effects of lead on antioxidant enzymes and root activities among maize cultivars. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2006, **28**(2): 119–122.
- 张利红, 李雪梅, 陈强, 等. 铅对不同品种玉米幼苗抗氧化酶活性及根系活力的影响. *吉林农业大学学报*, 2006, **28**(2): 119–122.
- [22] 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.
- [23] Hasson E, Poljakoff-Mayber A. Callus culture from hypocotyls of *Kosteletzhya virginica*(L) seedlings. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1995, **43**(3): 279–285.
- [24] 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.
- [25] Huo LY, Yu HM, Bao XZ. Effects of salts on the physiological variance of recovery tissue in grape. *Journal of jilin institute of chemical technology*, 2002, **19**(2): 10–13.
- 霍丽云, 于惠敏, 鲍雪珍. 盐对葡萄愈伤组织生理变化的影响. *吉林化工学院学报*, 2002, **19**(2): 10–13.
- [26] Foryer CH, Descourvières P, Kunert KJ. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment*. 1994, **17**: 507–523.

## 我单位《生物工程学报》等4种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近1年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等4种期刊自第1卷第1期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计130卷620余期, 约1万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。