

研究报告

Research Report

山葡萄耐盐愈伤组织筛选及其抗氧化水平分析

赵滢 杨义明 张宝香 刘迎雪 李昌禹 王衍莉 路文鹏*

中国农业科学院特产研究所, 长春, 130112

* 通信作者, zhaoying01@caas.cn

摘要 以山葡萄叶片外植体诱导出的愈伤组织为试材, 氯化钠(Sodium chloride, NaCl)为选择因子, 筛选耐盐愈伤组织。通过比较不同浓度 NaCl 处理后愈伤组织相对生长率及生长情况, 初步明确了山葡萄耐盐愈伤组织筛选的临界 NaCl 浓度为 1.5%; 且 1.5% NaCl 培养基上处理的愈伤组织白藜芦醇含量也最高, 处理 3 周后含量高达 1 580 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, 是未经 NaCl 处理愈伤的 3.13 倍, 但当 NaCl 浓度为 2.0% 时, 其白藜芦醇含量又降至 652 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。进一步在无盐和含 1.5% NaCl 培养基交替培养 3 次, 每 4 周继代 1 次后, 初步获得了山葡萄耐盐愈伤组织。经 1.5% NaCl 处理后, 耐盐愈伤组织的相对生长率大幅提高, 是普通对照愈伤组织的 6.09 倍, 其 H_2O_2 含量则大幅下降, 而抗氧化酶活性也明显升高。说明山葡萄耐盐愈伤组织可能通过提高抗氧化水平来降低盐分造成的伤害。

关键词 山葡萄, 愈伤组织, NaCl, 耐盐性, 抗氧化

Selection of Salt-tolerant Callus and its Antioxidant Analysis in *Vitis amurensis*

Zhao Ying Yang Yiming Zhang Baoxiang Liu Yingxue Li Changyu Wang Yanli Lu Wenpeng*

Institute of special animal and plant sciences of CAAS, Changchun, 130112

* Corresponding author, zhaoying01@caas.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0031

Abstract In order to gain the salt-tolerant calli of *Vitis amurensis*, NaCl as the treated factor to select the calli induced from the leaf explants. Comparing the relative growth rate and status of calli under different NaCl concentrations, the critical concentration of 1.5% NaCl was determined. Meanwhile, the resveratrol content of calli was also the highest at this concentration, up to 1 580 $\mu\text{g/g}$ FW (fresh weight) after 3 weeks by 1.5% NaCl treatment, which was 3.13 times higher than calli without NaCl treatment. But the resveratrol content of calli decreased to 652 $\mu\text{g/g}$ FW at the 2.0% NaCl concentration. Furthermore, the salt-tolerant calli of *Vitis amurensis* was obtained by alternate culture in salt-free and medium containing 1.5% NaCl for 3 times and subculture every 4 weeks. After treatment with 1.5% NaCl, the relative growth rate of salt-tolerant calli increased significantly, which was 6.09 times as much as that of the control calli, while the content of H_2O_2 decreased significantly, and the activity of antioxidant enzymes also increased significantly. It suggested that the salt-tolerant calli of *Vitis amurensis* might reduce the damage caused by salt by increasing the antioxidant level.

Keywords Amur grape (*Vitis amurensis*), Callus, NaCl, Salt tolerance, Antioxidant

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 8 月 31 日; 接受日期: 2020 年 9 月 2 日; 发表日期: 2020 年 9 月 9 日

引用格式: 赵滢, 杨义明, 张宝香, 刘迎雪, 李昌禹, 王衍莉, 路文鹏, 2020, 山葡萄耐盐愈伤组织筛选及其抗氧化水平分析, 分子植物育种(网络版), 18(31): 1-5 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0031) (Zhao Y., Yang Y.M., Zhang B.X., Liu Y.X., Li .Y., Wang Y.L., and Lu W.P., 2020, Selection of salt-tolerant callus and its antioxidant analysis in *Vitis amurensis*, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(31): 1-5 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0031))

近年来,土壤盐渍化已成为危害全球农业生产的主要环境因素之一(Khan et al., 2000)。山葡萄(*Vitis amurensis* Rupr.)作为东北地区葡萄酒酿造工业的主要原料,其果皮中的白藜芦醇具有抗氧化、抑制肿瘤活性等功效,酿造出的山葡萄酒深受消费者喜爱(艾军等, 2017, 中国农业出版社, pp.1-2)。但在山葡萄栽培过程中同样面临土壤盐渍化威胁,限制了优良山葡萄资源的栽培推广。因此,选育耐盐作物品种目前已成为开发利用盐碱荒地的关键。

目前,在盐胁迫生理机制研究方面,多以盆栽的完整植株为研究材料,采用高渗溶液法进行处理。这种研究方法易受环境、植株生长周期和取样部位等因素影响(王兰兰等, 2006)。植物愈伤组织具有脱分化和再分化潜力,同时组织培养方式处理受环境影响小,也是良种培育的理想途径(Larner and Seeweroft, 1981)。通过筛选耐盐愈伤组织获得耐盐再生植株,如耐盐水稻、烟草、苜蓿等品种,已成为耐盐品种选育的一种手段(高玉红和李云, 2004; 周荣仁等, 1989)。山葡萄作为木本植物,愈伤组织诱导本身具有一定难度,有关山葡萄耐盐愈伤组织筛选及其理化特性研究也未见报道。

在我们前期研究基础上,筛选出了山葡萄叶片外植体诱导愈伤组织的适宜培养基。本研究将在此基础上,以 NaCl 为选择因子,测定不同盐浓度下山葡萄愈伤组织相对生长率、组织培养情况及白藜芦醇含量,并在此基础上,确定耐盐愈伤组织筛选的临界盐浓度,初步筛选出白藜芦醇含量较高的耐盐愈伤组织,从细胞水平上探讨山葡萄耐受 NaCl 胁迫的生理机制,为优良耐盐山葡萄品种选育及高产优质栽培提供育种材料和理论依据。

1 结果与分析

1.1 山葡萄愈伤组织诱导及继代培养

将 1 cm×1 cm 山葡萄叶片外植体接种到愈伤组织诱导培养基上,2 周后叶片外植体边缘开始出现愈伤组织(图 1A),4 周后有大量浅黄色疏松型的愈伤组织产生(图 1B),无褐变情况发生,愈伤组织诱导率为 100%。随后将诱导出的愈伤组织进行继代培养。

1.2 不同浓度 NaCl 对山葡萄愈伤组织相对生长率的影响

从下方的图 2 可以看出,处理 3 周后 0.5% NaCl 对愈伤组织生长的抑制作用不显著,但 NaCl 浓度达 1.0%后,随 NaCl 浓度的增加愈伤组织相对生长率大

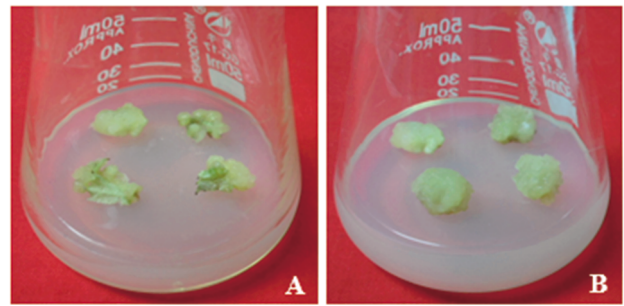


图 1 山葡萄叶片愈伤组织诱导培养

Figure 1 Calli were induced from leaf in amur grape

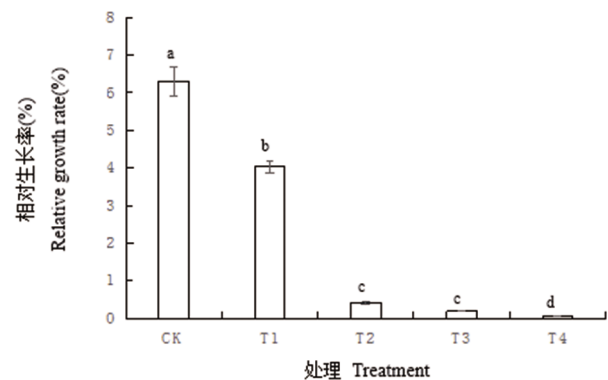


图 2 不同浓度 NaCl 对山葡萄愈伤组织相对生长率的影响

注: CK (0.0% NaCl), T1 (0.5% NaCl), T2 (1.0% NaCl), T3 (1.5% NaCl), T4 (2.0% NaCl)

Figure 2 Effects of different NaCl concentrations on the relative grow rate of calli in amur grape

Note: CK (0.0% NaCl), T1 (0.5% NaCl), T2 (1.0% NaCl), T3 (1.5% NaCl), T4 (2.0% NaCl)

幅下降。其中 1.5%和 2.0% NaCl 处理 3 周后,绝大部分愈伤组织褐变死亡,但在 1.5% NaCl 处理的部分变褐死亡的愈伤组织周围长出了新的愈伤组织团(图 3)。

1.3 不同浓度 NaCl 对山葡萄愈伤组织白藜芦醇含量的影响

由图 4 可以看出,随培养基中 NaCl 浓度的增加白藜芦醇含量逐渐增加,当培养基含有的 NaCl 浓度达到 1.5% (T3)时,愈伤组织中的白藜芦醇含量达到最高为 1 580 $\mu\text{g/g}$ FW,显著高于其它 NaCl 浓度中培养的愈伤组织($p < 0.05$)。NaCl 浓度为 2.0% (T4)时,愈伤组织中的白藜芦醇含量则又大幅下降,基本接近对照(CK)。

1.4 山葡萄耐盐愈伤组织的初步筛选

根据不同 NaCl 浓度下愈伤组织的相对生长率及白藜芦醇含量,确定 1.5% NaCl 为耐盐愈伤组织诱导的临界盐浓度。利用方法 3.3 进行耐盐愈伤组织

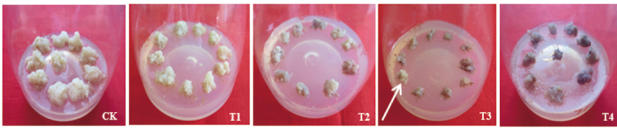


图3 不同浓度 NaCl 对山葡萄愈伤组织生长的影响

注: CK (0.0% NaCl); T1 (0.5% NaCl); T2 (1.0% NaCl); T3 (1.5% NaCl); T4 (2.0% NaCl)

Figure 3 Effects of different NaCl concentrations on the growth of calli in amur grape

Note: CK (0.0% NaCl); T1 (0.5% NaCl); T2 (1.0% NaCl); T3 (1.5% NaCl); T4 (2.0% NaCl)

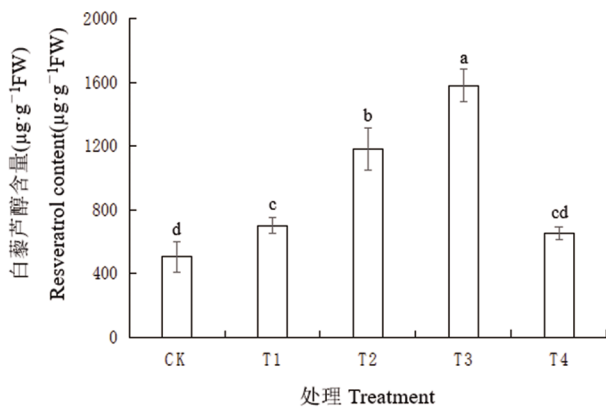


图4 不同浓度 NaCl 对山葡萄愈伤组织白藜芦醇含量的影响

注: CK (0.0% NaCl); T1 (0.5% NaCl); T2 (1.0% NaCl); T3 (1.5% NaCl); T4 (2.0% NaCl)

Figure 4 Effects of different NaCl concentrations on the resveratrol of calli in amur grape

Note: CK (0.0% NaCl); T1 (0.5% NaCl); T2 (1.0% NaCl); T3 (1.5% NaCl); T4 (2.0% NaCl)

筛选并获得耐盐愈伤系。与普通愈伤组织相比,耐盐愈伤组织在含 1.5% NaCl 培养基上处理 1 个月后,有大量新的愈伤组织诱导产生,而对照愈伤组织大部分已褐变死亡(图 5)。耐盐愈伤组织的相对生长率也明显高于对照愈伤组织($p < 0.05$),是对照愈伤组织的 6.09 倍(图 5)。

1.5 山葡萄耐盐愈伤组织生理特性分析

在含 1.5% NaCl 培养基上胁迫处理 2 周后,发现耐盐愈伤组织的 H_2O_2 含量明显小于对照愈伤组织中的过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)含量($p < 0.05$)。相比于对照,耐盐愈伤组织中的 H_2O_2 含量下降了 33.78% (图 6A);

而三种抗氧化酶超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)的活性则是耐盐愈伤组织明显高于对照愈($p < 0.05$),相比于对照,耐盐愈伤组

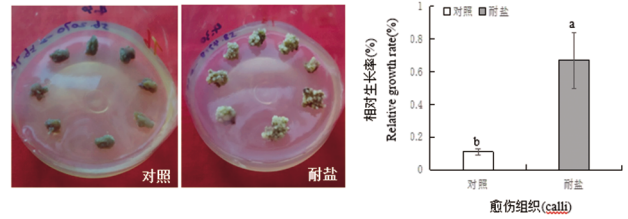


图5 山葡萄耐盐愈伤组织的初步筛选

Figure 5 Effects of different NaCl concentrations on the growth of calli in amur grape

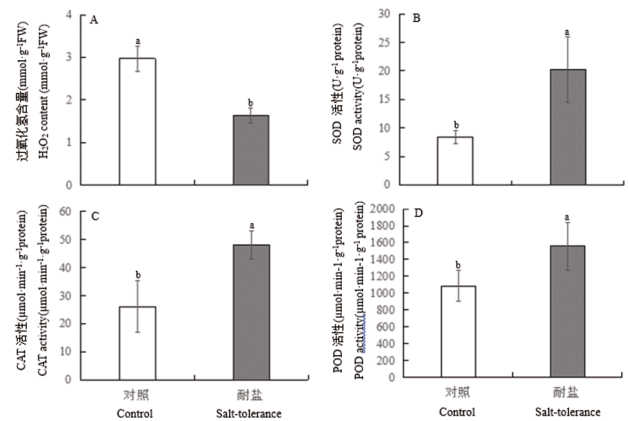


图6 山葡萄耐盐愈伤组织与对照愈伤组织生理特性比较

注: A: 过氧化氢含量比较; B: SOD 活性比较; C: CAT 活性比较; D: POD 活性比较

Figure 6 Comparison on the physical characterization between salt-tolerant calli and control calli of amur grape

Note: A: Comparison of H_2O_2 content; B: Comparison of SOD activity; C: Comparison of CAT activity; D: Comparison of POD activity

织中的 SOD、CAT 和 POD 活性分别高出了 150.23%、60.71% 和 54.29% (图 6)。

2 讨论

有研究表明,直接高盐胁迫下筛选到的耐盐愈伤组织或植株才有可能为真正的耐盐突变体(张建华等, 2002)。张新果等(2008)以药蒲公英叶片为外植体诱导愈伤组织,以 NaCl 为选择因子,从愈伤组织中成功筛选到了药蒲公英耐盐变异体。本试验采用直接筛选的方法获得了耐 1.5% NaCl 的山葡萄耐盐愈伤组织。

植物愈伤组织在 NaCl 胁迫下的直接表现是生长减缓(陆卫和贾敬芬, 1994),这在本研究中也得到了证实。而筛选出的耐盐山葡萄愈伤组织在高盐胁迫下的相对生长率得到大幅提升,是普通山葡萄愈伤组织的 6.09 倍。植物在盐胁迫下的生理响应变化可反映其耐盐适应机制。山葡萄愈伤组织中的白藜

芦醇含量随着 NaCl 浓度的升高呈先升高后下降的趋势,在 1.5% NaCl 胁迫下白藜芦醇含量达到最高。白藜芦醇具有抗氧化作用,可清除自由基(杜彬和孟宪军, 2006; Yang et al., 2009)。

一般情况下,耐盐植物通过启动自身的抗氧化系统,来有效清除盐胁迫产生的活性氧,从而减轻氧化伤害(杨颖丽等, 2008; Rahnama and Ebrahimzadeh, 2005),是植物对逆境胁迫的一种适应性反应。Shalata 等(2001)就指出,NaCl 胁迫下番茄品种的耐盐性与其抗氧化酶活性密切相关。本试验结果表明,在 1.5% NaCl 的胁迫处理下,耐盐山葡萄愈伤组织的 H₂O₂ 含量与普通山葡萄愈伤组织相比明显降低(图 6A),其三种抗氧化酶 SOD、CAT 和 POD 活性则显著升高。抗氧化酶 SOD 具有催化作用,可以使逆境胁迫下植物中产生的超氧自由基(Superoxide radical, O₂⁻)转化为 H₂O₂,过量的 H₂O₂ 可在 CAT 和 POD 协同作用下被清除,有利于提高愈伤组织细胞对盐胁迫的适应能力(李会云和郭修武, 2008; Zhang and Shi, 2013; 宋靓苑等, 2020),张新果(2008)、陆卫和贾敬芬(1994)等学者的研究也证实了此类耐盐适应机制,这在一定程度上消除了高盐胁迫下生长抑制的发生。因此,耐盐山葡萄愈伤组织在高盐胁迫下仍有大量愈伤组织诱导产出,未受到明显抑制。

3 材料与方 法

3.1 山葡萄愈伤组织诱导培养

以山葡萄(*Vitis amurensis*)为试材,6 月份初生长期从国家果树种质左家山葡萄圃(田间)中剪取生长正常、无病虫害的新梢带回实验室,将展叶新梢剪成小段,放入少量洗衣粉水中摇晃 10 min,流水冲洗 20 min,取叶片于超净工作台上用 0.1%升汞表面消毒 1 min,无菌水冲洗 5 次后,将消毒的叶片剪成 1 cm×1 cm,作为外植体接种在 MS+2.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(N-(Phenylmethyl)-9H-purin-6-amine, 6-BA)+0.05 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)培养基上进行愈伤组织诱导培养(赵滢等, 2018, 中国专利, ZL201611075162.7)。培养基中蔗糖含量为 30 g/L,琼脂含量为 6 g/L, pH 为 6.0。且愈伤组织继代培养基与诱导培养基相同。

3.2 盐分对山葡萄愈伤组织相对生长率的影响

将诱导出的愈伤组织继代培养 4 次后,切成 0.5 cm 左右的小块分别接种到含 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0% NaCl 浓度的培养基中,每个浓度接种 10

瓶,每瓶 10 块愈伤组织。培养 3 周后,参照张新果等(2008)方法统计山葡萄愈伤组织的相对生长率。相对生长率(%)=[愈伤组织鲜重(g)-愈伤组织的原始重量(g)]/愈伤组织的原始重量(g)。统计后的愈伤组织用液氮迅速冷冻,研磨成粉末,于 -80℃ 的超低温冰箱中保存,用于白藜芦醇含量的测定。

3.3 山葡萄耐盐愈伤组织的初步筛选

参照张新果等(2008)方法,略有改进。在 1.5% NaCl 培养基上培养的部分褐变死亡的愈伤组织周围长出了新的愈伤组织团,将长出的愈伤团接种到新的无盐培养基上扩增后,接种到新的含 1.5% NaCl 培养基上,再次将其转到无盐和含 1.5% NaCl 的培养基交替培养(每 4 周继代 1 次,共交替继代 3 次)。

测定 1.5% NaCl 培养基上接种 2 周的耐盐愈伤组织与普通愈伤组织的过氧化氢含量和抗氧化酶活性;接种 1 个月,统计耐盐愈伤组织与普通愈伤组织的相对生长率。

3.4 生理指标测定

3.4.1 白藜芦醇含量

白藜芦醇含量测定参照张庆田等(2011)方法。称取 0.5 g 愈伤组织粉末,加入 5 mL 甲醇研磨,避光提取 12 h 后,0.45 mm 微孔滤膜过滤,获得的滤液采用高效液相色谱法测定白藜芦醇含量。Agilent-2100 型液相色谱条件:色谱柱 Zorbax 反相 C18 柱, 250 mm×4.6 mm, 5 μm;流速 1 mL/min;柱温 30℃;检测波长 306 nm, 288 nm;梯度洗脱为流动相 A:水;流动相 B:乙腈。洗脱程序:0~10 min, B 为 5~15%; 10~20 min, B 为 15~30%; 20~30 min, B 为 30~50%; 30~35 min, B 为 50~100%; 34~40 min, B 为 100~5%; 40~45 min, B 为 5%。

3.4.2 过氧化氢、抗氧化酶活性及可溶性蛋白含量测定

过氧化氢(H₂O₂)和可溶性蛋白含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性测定参照 Song 等(2006)方法。

3.5 数据分析

采用 SAS 9.0 软件对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和差异显著性检验(LSD 法, α=0.05)。

作者贡献

赵滢为本试验的主要设计者和主要完成人,并

完成文章初稿的撰写;杨义明,张宝香,刘迎雪和李昌禹参与了相关研究内容;王衍莉参与试验数据分析;路文鹏指导了本试验,完成了论文最终修改工作。全体作者均已阅读并同意最终的文本。

致谢

本项目由“国家科技资源共享服务平台”子平台(NICGR-2019-058),中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610342020001),吉林省科技厅项目(20200402076NC)和吉林省科技厅项目(2019110103-0YY)共同资助。

参考文献

- Du B., and Meng X.J., 2006, Study on the antioxidation of resveratrol in the wild grape skin, *Shipin Gongye (The Food Industry)*, 2: 39-41 (杜彬, 孟宪军, 2006, 对山葡萄皮中白藜芦醇的抗氧化性质研究, *食品工业*, 2: 39-41)
- Gao Y.H., and Li Y., 2004, Application of selection of salt-tolerant mutant from plant in vitro, *Henong Xuebao (Acta Agriculturae Nucleatae Sinica)*, 18(6): 448-452, 422 (高玉红, 李云, 2004, 植物离体培养筛选耐盐突变体的研究, *核农学报*, 18(6): 448-452, 422)
- Khan M.A., Ungar I.A., and Showalter A.M., 2000, Effects of Salinity on Growth, Water Relations and Ion Accumulation of the Subtropical Perennial Halophyte, *Atriplex griffithii* var. *Stocksii*, *Annals of Botany*, 85(2): 225-232
- Larner P.J., and Seoweroft W.R., 1981, Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theoretical and Applied Genetics*, 60(4): 179-214
- Li H.Y., and Guo X.W., 2008, Influence of NaCl on activities of protective enzymes and MDA content in grape rootstock leaves, *Guoshu Xuebao (Journal of Fruit Science)*, 25 (2) : 240-243 (李会云, 郭修武, 2008, 盐胁迫对葡萄砧木叶片保护酶活性和丙二醛含量的影响, *果树学报*, 25 (2) : 240-243)
- Lu W., and Jia J.F., 1994, Selection of NaCl-tolerant cell line from embryogenic calli of Millet and studies on its physiological and biochemical characteristics, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 20(2): 241 -247 (陆卫, 贾敬芬, 1994, 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*, 20(2): 241-247)
- Rahnama H., and Ebrahimzadeh H., 2005, The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seeding, *Biol. Plantarum.*, 49(1): 93-97
- Shalata A., Mittova V., Volokita M., Guy M., and Tal M., 2001, Response of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt dependent oxidative stress: the root antioxidative system, *Physiologia Plantarum*, 112: 487-494
- Song L.L., Ding W., Zhao M.G., Sun B.T., and Zhang L.X., 2006, Ni tric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed, *Plant Science*, 171(4): 449-458
- Song L.Y., Lin T.Y., Xu J.W., and Cai M.L., 2020, Effects of epibrassinolide on callus growth and regeneration of *Zoysia matrella* (L.) Merr. Under salt stress, *Henong Xuebao (Journal of Nuclear Agricultural Sciences)*, 34(7): 1440-1446 (宋靓苑, 林恬逸, 许静雯, 柴明良, 2020, 盐胁迫下表油菜素内酯对沟叶结缕草愈伤组织生长和再生的影响, *核农学报*, 34(7): 1440-1446)
- Wang L.L., Zhang L.J., Chen G. and Li X.M., 2006, Physiological responses of sweet potato callus to drought and salt stress, *Shengtaixue Zazhi (Chinese Journal of Ecology)*, 25 (12): 1508-1514 (王兰兰, 张立军, 陈贵, 李雪梅, 2006, 甘薯愈伤组织对干旱胁迫和盐胁迫的生理反应对比, *生态学杂志*, 25(12): 1508-1514)
- Yang J., Martinson T.E., and Liu R.H., 2009, Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes, *Food Chemistry*, 116(1): 332-339
- Yang Y.L., Shi R.X., Wei X.L., Fan Q., and Wang L., 2008, Physiological Responses to NaCl Treatment in *Nitraria tangutorum* Bobr. Callus, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.)*, 28 (11): 2238-2243 (杨颖丽, 史如霞, 魏学玲, 范庆, 王莱, 2008, NaCl 胁迫对唐古特白刺愈伤组织的生理效应, *西北植物学报*, 28(11): 2238-2243)
- Zhang J.H., Chen H.Y., and Zhuang T.M., 2002, In vitro selection of salt-resistant mutant in *Lycopersicon esculentum*, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.)*, 22 (2): 257-262 (张建华, 陈火英, 庄天明, 2002, 番茄耐盐体细胞变异体的离体筛选, *西北植物学报*, 22(2): 257-262)
- Zhang J.L., and Shi H.Z., 2013, Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance, *Photosynthesis Research*, 115(1) :1-22
- Zhang Q.T., Yang Y.P., Song R.G., Meng Q.G. Liu S.Y., and Shen Y.J., 2011, Beifang Yuanyi (Northern Horticulture), (18): 32-34 (张庆田, 杨玉平, 宋润刚, 孟庆国, 柳树有, 沈育杰. 2011, 山葡萄发酵酿酒皮渣中原花青素, 白藜芦醇和葡萄籽油含量测定分析, *北方园艺*, (18): 32-34)
- Zhang X.G., Chen X.Y., Jiang D., and Li Y.X., 2008, Selection and characterization of salt-tolerant calli of *Taraxacum officinale*, *Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology)*, 24(7): 1202-1209 (张新果, 陈显扬, 姜丹, 李银心, 2008, 耐盐药蒲公英(*Taraxacum officinale* Weber)愈伤组织筛选及生理生化特性分析, *生物工程学报*, 24(7) : 1202-1209)
- Zhou R.R., Yang S. R., and Yu S. W., 1989, Research on mechanism of salt tolerance and selection of salt tolerant mutant in plants by tissue culture, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, (5): 11-19 (周荣仁, 杨燮荣, 余书文, 1989, 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*, (5): 11-19)