

# 不同倍性菘蓝幼苗对盐渍胁迫的耐受能力 及保护性酶的响应机制

王丽艳, 荆瑞勇, 郭永霞, 殷奎德

(黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319)

**摘 要:** 为了比较不同倍性菘蓝对盐胁迫的耐受能力及其体内保护性酶的响应机制, 采用在 MS 培养基中加入不同浓度的 NaCl 模拟盐胁迫处理, 观测二倍体和四倍体菘蓝种子的萌发和幼苗生长状况, 测定幼苗中丙二醛及脯氨酸含量, 同时对其地上部分保护性酶 SOD、POD 和 CAT 的活性进行测定。对种子萌发、幼苗生长以及丙二醛和脯氨酸含量的测定结果均表明, 四倍体较二倍体耐盐胁迫能力强。对其体内保护性酶的研究结果表明, 在不同 NaCl 浓度下, 起主要保护作用的酶是不同的, 无论有无盐胁迫、NaCl 浓度高低, 四倍体中的 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性均高于二倍体, 这说明在盐胁迫下四倍体菘蓝对活性氧的清除能力要高于二倍体菘蓝, 部分解释了四倍体比二倍体对盐胁迫耐受能力高。

**关键词:** 二倍体; 四倍体; 菘蓝; 盐胁迫; 保护性酶

**中图分类号:** Q945.78

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-3409(2013)04-0224-06

## Resistant Ability of *Isatis indigotica* Seedling with Different Ploid to Salting and Responding Mechanism of Its Protective Enzyme

WANG Li-yan, JING Rui-yong, GUO Yong-xia, YIN Kui-de

(Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

**Abstract:** To compare tolerant capacity of different ploidy *Isatis indigotica* to salt stress and response mechanism of protective enzymes in vivo, different concentrations of sodium chloride were added into MS medium to imitate salt stress. Germination of seed and seedling growth condition of Diploid and tetraploid of *Isatis indigotica* were measured, malondialdehyde and proline content in seedling were measured and protective enzymes in aboveground part including SOD, POD and CAT were determined. The results of germination, seedling growth and malondialdehyde and proline content showed that tolerant stress of tetraploid of *Isatis indigotica* is better than that of diploid. Results of protective enzyme showed that enzyme which plays primary role is different, It was showed that active oxygen removal ability of tetraploid is higher than that of diploid under salt stress that SOD, POD and CAT activity of tetraploid were higher than those of diploid regardless of salt stress and sodium chloride, which can partly explain that tolerant ability of tetraploid to salt stress is higher than that of diploid.

**Key words:** diploid; tetraploid; *Isatis indigotica*; salt stress; protective enzyme

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)为十字花科菘蓝属两年生草本植物,以干燥根及叶入药,分别称板蓝根和大青叶,为常用中药材<sup>[1]</sup>。有关菘蓝二倍体和四倍体的比较研究中,有从生药角度研究根中靛蓝、靛玉红、总氨基酸含量的,结果表明,四倍体较二倍体

均有明显提高<sup>[2]</sup>,菘蓝根中四倍体游离氨基酸和水解氨基酸的含量均高于二倍体<sup>[3]</sup>;遗传特性方面的比较研究表明,菘蓝二倍体与其同源四倍体具有中等偏高的遗传差异性<sup>[4]</sup>;在生理方面对菘蓝体内超氧化物歧化酶的活性研究结果表明,四倍体的酶活性比二倍体

的高<sup>[5]</sup>。有关二倍体和四倍体在耐盐性方面的比较研究目前还未见报道。

黑龙江大庆市大同区是板蓝根的主产区之一,也是最大的产区,大庆板蓝根种植面积约为全国的2/3,平常年份板蓝根的年产量约在 2.5 万 t 左右。所产板蓝根品质上乘,目前种植的菘蓝主要为二倍体品种。大庆地区有大面积的盐碱地区,如能推广种植菘蓝也是一个不错的选择。另外板蓝根的主要药效成分为次生代谢产物,逆境条件下可能会增加其药效成分,根据前人在生药学方面的研究,四倍体较二倍体优越很多<sup>[2-3]</sup>,因此本试验对二倍体和四倍体在耐盐性方面进行比较分析,为不同倍性菘蓝种植区域的选择,同时也为四倍体菘蓝能否在大庆盐碱地区推广种植提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为二倍体和四倍体菘蓝,购于亳州市春秋药材种业有限公司。

### 1.2 盐胁迫处理方法

采用在 MS 培养基中加入不同浓度的 NaCl 模拟盐胁迫。MS 培养基中附加 30 g/L 蔗糖、8 g/L 植物琼脂,pH 值 5.7,分别附加浓度为 0,50,100,150,200,250,300 mmol/L 的 NaCl 进行盐胁迫处理,以 NaCl 浓度为 0 的作为对照。

将二倍体和四倍体菘蓝种子去除种皮后用 75% 的乙醇处理 5 min,再用 0.1% 的升汞处理 10 min,用无菌水冲洗 4~5 遍,然后接种于上述不同处理的培养基中,本试验共设 7(盐浓度)×2(倍性)=14 个处理,每处理重复 3 次,每个重复 5 瓶,每瓶 20 粒。置于温度为(25±2)℃的组织培养室中进行培养,前三天进行暗培养,然后于光强 1 500~2 000 lx,每日光照时数 14 h 的光照下培养 7 d,每天统计发芽率。培养到第 10 天时进行相关指标的测定。

### 1.3 测定项目

#### 1.3.1 发芽率、发芽势、发芽指数的测定

种子发芽率=种子正常发芽粒数/供试种子数×100%;

种子发芽势=种子第 4 天正常发芽粒数/供试种子粒数×100%;

种子发芽指数= $\sum G_i/D_i$

式中: $G_i$ —— $D_i$  相对应的每天发芽种子数; $D_i$ ——发芽时间。

1.3.2 株高、根长、幼苗鲜重、根冠比的测定 当种子接入培养基 10 d 后进行芽长、根长、根重、芽重和根冠比测定。

1.3.3 丙二醛和脯氨酸含量的测定 将种子接种到培养基中 10 d 后,采样测定植株茎叶中的丙二醛和脯氨酸的含量:丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法<sup>[6]</sup>;脯氨酸含量的测定采用磺基水杨酸比色法<sup>[6]</sup>。

1.3.4 保护性酶 SOD、POD、CAT 活性测定 超氧化物歧化酶(SOD)采用氮蓝四唑(NBT)法进行测定<sup>[6]</sup>;过氧化物酶(POD)采用愈创木酚法进行测定,以每分钟内  $A_{470}$  变化 0.01 为 1 个酶活性单位(U)<sup>[6]</sup>;过氧化氢酶(CAT)的活性测定采用紫外吸收法进行测定,以每分钟内  $A_{240}$  下降 0.1 的酶量为 1 个酶活单位(U)<sup>[7]</sup>。

### 1.4 统计分析

利用统计软件 Excel 和 SPSS 13.0 进行数据的统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫处理对不同倍性菘蓝发芽率、发芽势、发芽指数的影响

#### 2.1.1 盐胁迫处理对不同倍性菘蓝发芽率的影响

将菘蓝种子接种于不同处理的培养基中后,每天统计发芽率,采用多重比较中的最小显著差法(LSD)进行方差分析,结果见图 1。从图 1 中可以看出,随着 NaCl 浓度的增加,二倍体和四倍体菘蓝发芽率均呈下降的趋势。当 NaCl 浓度为 0~150 mmol/L 时,到第 5 天时发芽率基本达到最大值,而 NaCl 浓度>150 mmol/L 时,到第 6 天时发芽率达到最大值;从二倍体和四倍体的差异来看,二倍体对照和 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时第 7 天的发芽率达 96%,而当 NaCl 浓度为 100 mmol/L 和 150 mmol/L 时,其发芽率分别为 77%和 73%,从方差分析来看其与对照和 NaCl 浓度为 50 mmol/L 的发芽率差异达到显著性水平,而四倍体对照第 7 天的发芽率达 99%,当 NaCl 浓度为 50、100 mmol/L 和 150 mmol/L 时,第 7 天的发芽率均达到 90%以上分别为 92%,90%和 90%。通过显著性分析可知,两个倍性菘蓝品种第 7 天发芽率的差异表现为:在 NaCl 浓度为 100、150 mmol/L 和 200 mmol/L 时,四倍体的发芽率显著高于二倍体,其他浓度下差异不显著。因此,从发芽率来看,四倍体菘蓝较二倍体菘蓝耐盐胁迫能力强。

2.1.2 盐胁迫处理对不同倍性菘蓝发芽势和发芽指数的影响 种子在失去发芽力之前,已发生了劣变,可从发芽势或发芽指数反映出来,故二者比发芽率更能灵敏地表现种子活力。

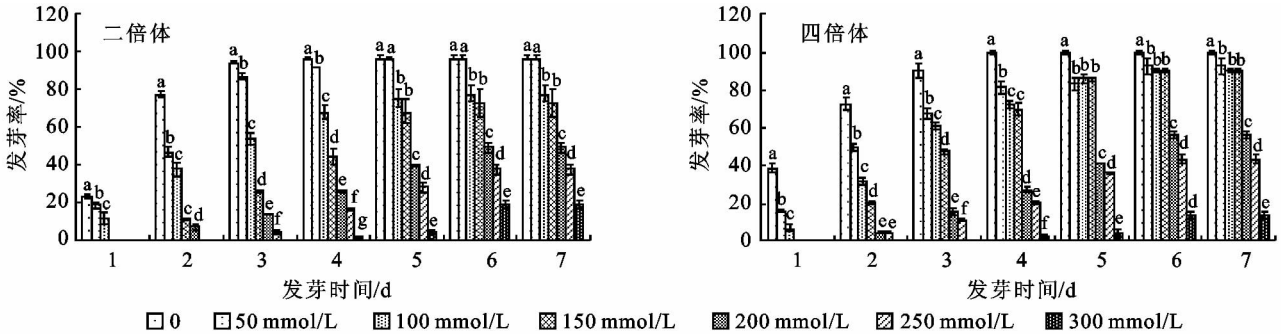


图 1 不同浓度 NaCl 处理下菰蓝的发芽率

注:有相同字母代表差异性不显著,无相同字母代表差异性显著, $P<0.05$ ,下同。

总体来看,二倍体和四倍体菰蓝的发芽势均随 NaCl 浓度的增加呈逐渐下降的趋势,从方差分析可以看出,二倍体菰蓝的发芽势在各 NaCl 浓度之间的差异均达到显著水平,而四倍体在 NaCl 浓度为 100 mmol/L 和 150 mmol/L 时发芽势之间无显著性差异,并且在此浓度下四倍体较二倍体的发芽势要高;二倍体和四倍体菰蓝的发芽指数均随着 NaCl 浓度的增加而呈逐渐下降的趋势,

从方差分析可以看出,二倍体和四倍体菰蓝的发芽指数在各 NaCl 浓度之间的差异均达到显著水平。但四倍体较二倍体下降的趋势要缓和,NaCl 浓度为

50 mmol/L 时,二倍体的发芽指数要高于四倍体,随着 NaCl 浓度的增加,当浓度为 100~250 mmol/L 时,四倍体要高于二倍体,尤其是 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时,四倍体较二倍体要高得多。从两个倍性菰蓝品种发芽势和发芽指数的差异显著性分析可知,当 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,二倍体菰蓝的发芽势和发芽指数显著高于四倍体菰蓝,而当 NaCl 浓度为 150 mmol/L 时四倍体菰蓝又显著高于二倍体菰蓝,其他浓度下二倍体和四倍体间的差异不显著(图 2)。因此发芽势和发芽指数均可以说明,四倍体菰蓝较二倍体菰蓝的耐盐胁迫能力强。

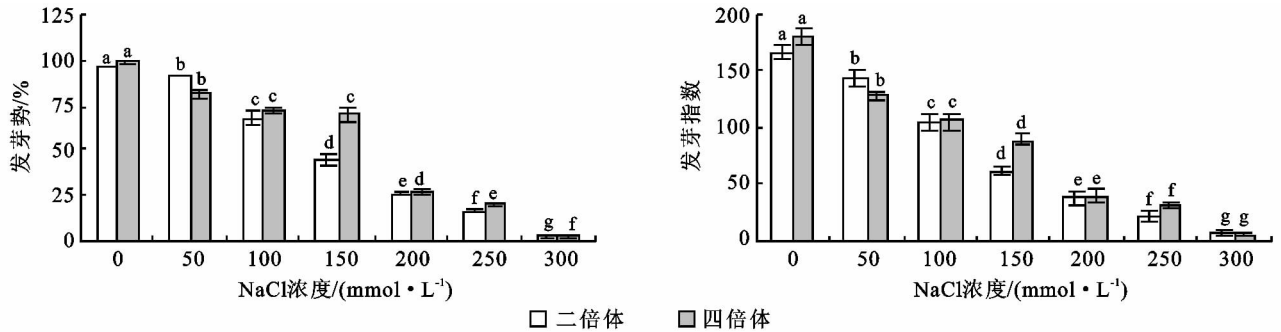


图 2 不同浓度 NaCl 处理下菰蓝的发芽势和发芽指数

2.2 盐胁迫处理对不同倍性菰蓝芽长、根长、根重、芽重和根冠比的影响

当种子接入培养基 10 d 后,将组培苗取出,进行根长、芽长、根重、芽重的测定,进一步计算出根冠比,统计结果如图 3 所示。由于当 NaCl 浓度大于 200 mmol/L 时,在种子接种 10 d 后,仅有芽发出而未能形成植株,因此此部分未对其进行统计分析。

从图 3 中可以看出,总体来看,二倍体菰蓝的根长、芽长、根重、芽重均随着 NaCl 浓度的增加呈逐渐下降的趋势,且根长和根重的降低幅度明显大于芽长和芽重;而四倍体菰蓝的根长、芽长、根重、芽重均随着 NaCl 浓度的增加呈先增加后下降的趋势。二倍体对照的根长、芽长、根重、芽重均高于四倍体对照,而

随着 NaCl 的加入,四倍体又均高于二倍体。说明盐胁迫对二倍体的影响较四倍体大,四倍体较二倍体耐盐胁迫能力强。二倍体菰蓝根冠比呈逐渐下降的趋势,四倍体菰蓝呈逐渐增加的趋势。从方差分析可以看出,二倍体菰蓝在 NaCl 浓度 $>100$  mmol/L 时根冠比无差异,四倍体菰蓝在 $>150$  mmol/L 时根冠比无差异。当 NaCl 浓度为 50,100,150,200 mmol/L 时,四倍体的根冠比分别为二倍体的 1.67,2.46,3.24,3.29 倍。对二倍体和四倍体菰蓝上述指标的方差分析可知,对照组的根长和芽长二倍体菰蓝显著高于四倍体菰蓝,根重、芽重和根冠比差异不显著;当有 NaCl 加入时,四倍体菰蓝的根长、芽长、根重、芽重和根冠比显著高于二倍体菰蓝。

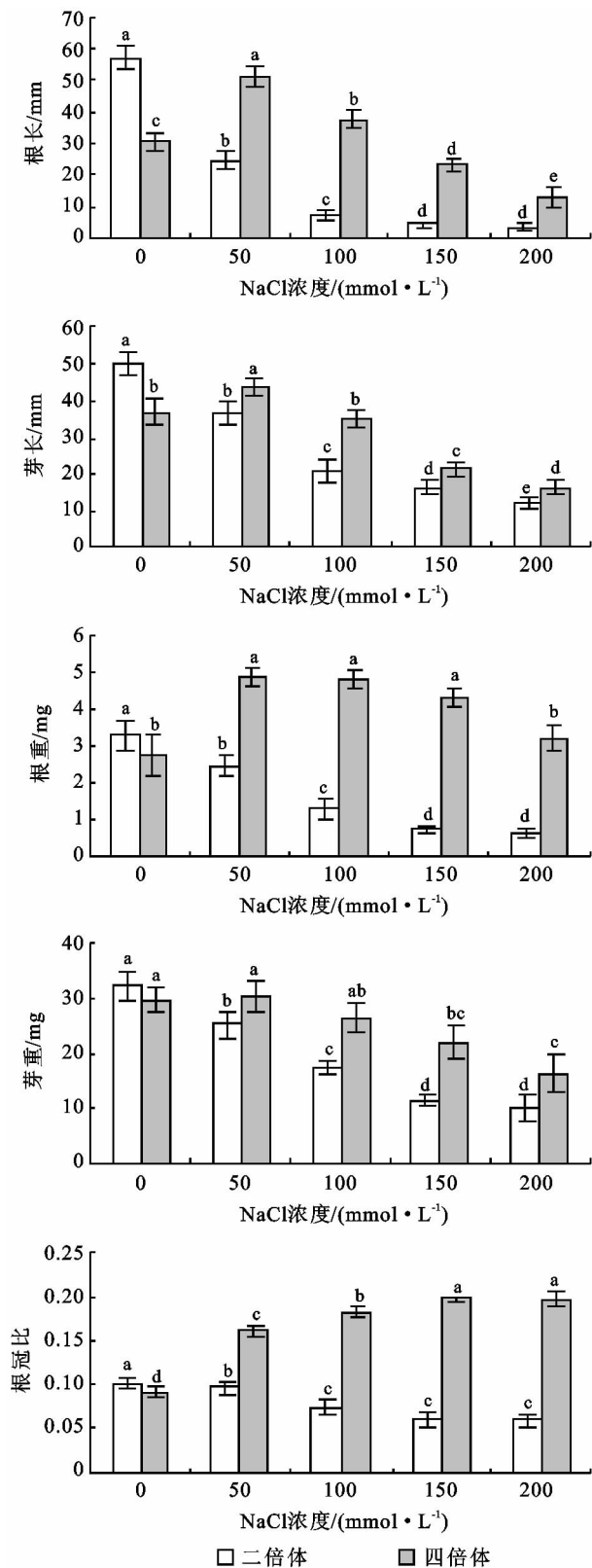


图 3 不同浓度 NaCl 处理下苕蓝的根长、芽长、根重、芽重和根冠比变化

### 2.3 盐胁迫处理对不同倍性苕蓝丙二醛和脯氨酸含量的影响

丙二醛是膜脂氧化的最终产物,是膜系统受伤的重要标志之一,其含量可以表示膜脂过氧化作用

的程度<sup>[8]</sup>。不同浓度 NaCl 处理下不同倍性苕蓝中丙二醛含量的测定结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,二倍体和四倍体苕蓝随着 NaCl 浓度的增加,丙二醛含量呈现先稍降低后增加的趋势,在浓度为 50 mmol/L 时最低。从方差分析可以看出,NaCl 浓度为 0 与 50 mmol/L 之间时,二者丙二醛含量的差异不显著,但与其它浓度之间差异均达显著性水平,说明 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,膜系统基本没有受到损伤,但随着 NaCl 浓度的增加,膜系统受损程度逐渐加重。从图 4 中还可以看出,各浓度下二倍体苕蓝丙二醛含量均高于四倍体苕蓝。当 NaCl 浓度为 200 mmol/L 时,丙二醛含量较对照二倍体增加了 2.64 倍,四倍体增加了 2.3 倍。从二倍体苕蓝和四倍体苕蓝丙二醛含量的差异性分析可知,对照组和 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,二倍体与四倍体之间的差异不显著,当 NaCl 浓度>50 mmol/L 时,二倍体的丙二醛含量显著高于四倍体。这在一定程度上说明随着 NaCl 浓度的增加,四倍体苕蓝的膜系统受损程度低于二倍体苕蓝。这在一定程度上说明四倍体苕蓝较二倍体苕蓝的耐盐胁迫能力强。

脯氨酸是植物细胞质中重要的渗透调节物质<sup>[9]</sup>。植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗性强的品种往往积累较多的脯氨酸<sup>[6]</sup>,在逆境条件下,植物体内脯氨酸的含量显著增加。不同浓度 NaCl 处理下不同倍性苕蓝中脯氨酸含量的测定结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,随着 NaCl 浓度的增加,二倍体和四倍体苕蓝脯氨酸含量呈逐渐增加的趋势。从方差分析可以看出,各 NaCl 浓度之间脯氨酸含量差异均达到显著性水平。在 NaCl 浓度较低(0~100 mmol/L)时二倍体脯氨酸增加量较四倍体明显,在 NaCl 浓度较高(150~200 mmol/L)时四倍体脯氨酸增加量较二倍体明显。从二倍体苕蓝和四倍体苕蓝脯氨酸含量的差异性分析可知,NaCl 浓度为 50 mmol/L 时,二倍体显著高于四倍体,当 NaCl 浓度为 200 mmol/L 时,四倍体显著高于二倍体,其他浓度下二倍体和四倍体脯氨酸含量差异不显著。这也在一定程度上说明四倍体苕蓝较二倍体苕蓝耐盐胁迫能力强。

### 2.4 盐胁迫处理对不同倍性苕蓝保护性酶 SOD、POD、CAT 活性的影响

在盐胁迫下,苕蓝体内活性氧代谢失调,此时由 SOD、POD、CAT 等内源活性氧清除剂构成的酶保护系统被激活,其活性增加以清除活性氧,以此来缓解盐胁迫对苕蓝造成的伤害。由图 5 可见,随着 NaCl 浓度的增加,二倍体和四倍体苕蓝中 SOD、POD 和

CAT 三种保护性酶均呈现先增加后降低的趋势。酶活性之所以降低是因为当盐浓度增大后,植物体内活性氧的产生能力大于清除能力时,过量的活性氧就破坏或降低了保护性酶的结构或活性<sup>[10]</sup>。其中 SOD 和 CAT 的增加趋势一致,当 NaCl 浓度为 50 mmol/L 时菰蓝体内酶活性最大。而 POD 当 NaCl 浓度为 100 mmol/L 时的酶活性最大,这说明在不同 NaCl 浓度下,起主要保护作用的酶是不同的。从不同倍性菰蓝来看,当 NaCl 浓度从 0 增加到 200 mmol/L 时,四倍体的 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性均高

于二倍体。方差分析可知,POD 活性在对照组和 NaCl 浓度为 200 mmol/L 时,二倍体菰蓝与四倍体菰蓝间的差异不显著,当 NaCl 浓度为 50,100 和 200 mmol/L 时,四倍体菰蓝 POD 活性显著高于二倍体;SOD 活性在 NaCl 浓度为 100 mmol/L 和 150 mmol/L 时,四倍体显著高于二倍体,其他浓度下二者差异不显著;CAT 活性在对照组二倍体与四倍体间的差异不显著,有 NaCl 加入时,四倍体 CAT 活性均显著高于二倍体。这说明在盐胁迫下四倍体菰蓝对活性氧的清除能力要高于二倍体菰蓝。

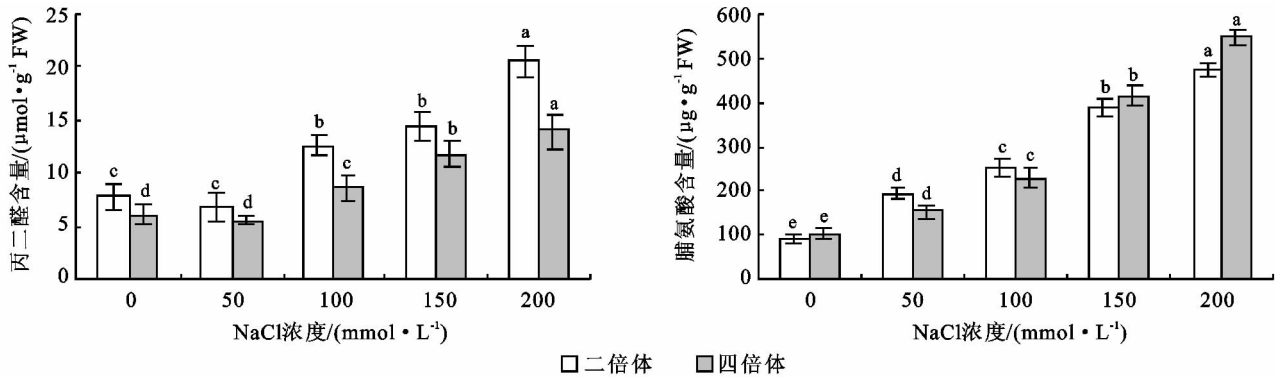


图 4 不同浓度 NaCl 处理下菰蓝的丙二醛和脯氨酸含量

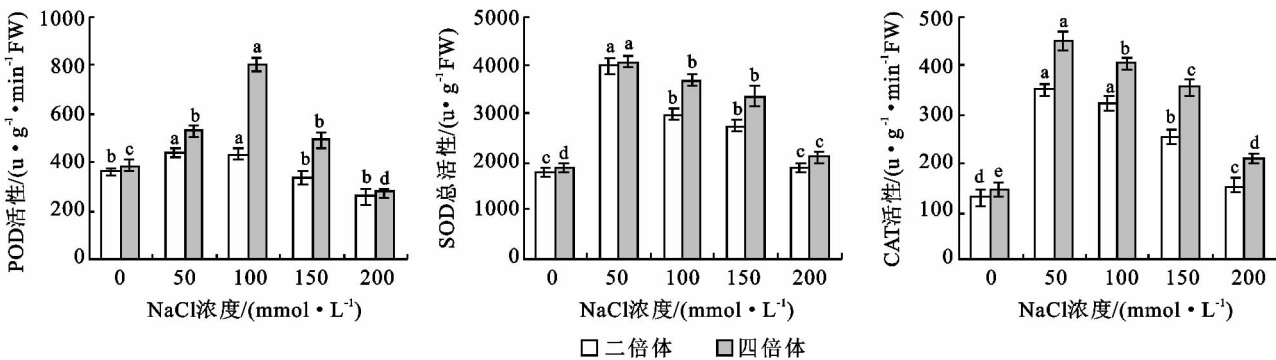


图 5 不同浓度 NaCl 处理下菰蓝的 SOD、POD、CAT 活性

### 3 结论与讨论

种子萌发是植物体生活史中重要的阶段,直接影响到植物体后期的生长发育和形态建成,从而会间接影响产量的形成,因此种子能够迅速整齐的萌发,是获得高产、稳产的基础<sup>[11]</sup>。盐胁迫与干旱胁迫不同,盐胁迫在植物的整个生活史中都会起作用,而干旱与灌溉量或降雨量有关,属于阶段性胁迫,因此对盐胁迫来说,种子萌发阶段显得更加重要。本试验结果无论从发芽率、发芽势还是发芽指数方面的结果均说明四倍体较二倍体均具有更好的耐盐胁迫能力。

盐胁迫对植物最普遍、最显著的影响就是抑制生长。生长特性是植物对盐胁迫的综合反应,也是植物耐盐性的最优评价指标<sup>[12]</sup>。种子植物苗期是生活史中最为脆弱的阶段,本试验对菰蓝苗期生长情况进行

统计分析,结果表明,当 NaCl 浓度为 0 时,二倍体的根长、芽长、根重、芽重均高于四倍体,而随着 NaCl 的加入,四倍体又均高于二倍体。根冠比表现为二倍体随着 NaCl 浓度的增加而降低,而四倍体正好相反,随着 NaCl 浓度的增加而增加,说明四倍体较二倍体耐盐胁迫能力强。

植物在逆境条件下,往往发生膜脂过氧化作用,丙二醛是其产物之一,因此其可以表示植物对逆境条件反应的强弱以及膜系统受损伤的程度,植物体内脯氨酸含量在一定程度上反映了植物的抗逆性,抗逆性强的品种往往会积累较多的脯氨酸。本研究发现,随着 NaCl 浓度的增加,二倍体和四倍体中丙二醛含量均呈现先降低后增加的趋势,膜系统受损程度越发加重,但四倍体中丙二醛含量始终低于二倍体,由此说明随着 NaCl 浓度的增加,四倍体菰蓝的膜系统受损

伤程度低于二倍体菘蓝,四倍体菘蓝较二倍体菘蓝的耐盐胁迫能力强;在 NaCl 浓度较低时,二倍体脯氨酸增加量较四倍体明显,在 NaCl 浓度较高时,四倍体脯氨酸增加量较二倍体明显。这也在一定程度上说明四倍体菘蓝较二倍体菘蓝的耐盐胁迫能力强。

植物体内始终存在着活性氧产生与清除两个过程,正常情况下两个过程处于平衡状态,而当植物遭受逆境时,植物体内活性氧代谢的动态平衡被破坏,产生大量的活性氧自由基破坏植物细胞膜<sup>[13]</sup>。SOD 是一切需氧有机体中普遍存在的一种起保护作用的酶,在植物抵抗盐害的过程中起防止、中断膜脂过氧化、保护细胞膜系统不受损伤的作用,其酶活力与植物抗逆性关系密切<sup>[14]</sup>。POD 在植物体内具有广泛的作用<sup>[15]</sup>,其主要作用之一是分解由 SOD 产生的  $H_2O_2$ ,进一步形成  $H_2O$  和  $O_2$ <sup>[16-17]</sup>。CAT 可以直接将  $H_2O_2$  分解为  $H_2O$  和  $O_2$ ,不需要还原力而具有较高的反应速率<sup>[18]</sup>。本试验结果表明,在不同 NaCl 浓度下,起主要保护作用的酶是不同的,无论有无盐胁迫、NaCl 浓度高低,四倍体中的 SOD、POD 和 CAT 三种保护性酶活性均高于二倍体。这说明在盐胁迫下四倍体菘蓝对活性氧的清除能力要高于二倍体菘蓝,因此部分解释了四倍体菘蓝的耐盐胁迫能力要高于二倍体。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:191.
- [2] 乔传卓,戴富宝,崔熙,等. 两种倍性水平靛蓝的生药学研究[J]. 中草药,1995,26(8):423-428.
- [3] 陈桂平,客绍英. 二倍体及四倍体菘蓝氨基酸含量的测定分析[J]. 中药材,2011,34(4):506-508.
- [4] 段英姿. 菘蓝二倍体及其同源四倍体遗传差异的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报,2012,32(8):1534-4538.
- [5] 陈玉芹,聂姬锋,客绍英,等. 不同倍性菘蓝超氧化物歧化酶的活性变化[J]. 唐山师范学院学报,2008,30(2):44-47.
- [6] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:258.
- [7] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000:194.
- [8] 梁新华,史大刚. 干旱胁迫对光果甘草幼苗根系丙二醛含量及保护酶 POD、CAT 活性的影响[J]. 干旱地区农业研究,2006,24(3):108-110.
- [9] 谭勇,梁宗锁,安玉艳. 冬季干旱胁迫下黄土高原三种常绿树种叶片渗透调节物质变化研究[J]. 水土保持研究,2007,14(3):70-73.
- [10] 付艳,高树仁,杨克军,等. 盐胁迫对玉米耐盐系与盐敏感系苗期几个生理生化指标的影响[J]. 植物生理学报,2011,47(5):459-462.
- [11] 张春平,何平,袁凤刚,等. 外源 5-氨基乙酐丙酸对于旱胁迫下甘草种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2011,31(8):1603-1610.
- [12] Levitt J. Response of Plants to Environmental Stress [M]. New York:Academic Press,1980.
- [13] 赵黎芳,张金政,张启翔,等. 水分胁迫下扶芳藤幼苗保护酶活性和渗透调节物质的变化[J]. 植物研究,2003,23(4):437-441.
- [14] 王建华,刘鸿先,徐同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用[J]. 植物生理学通讯,1989(1):1-7.
- [15] 段慧荣,李毅,马彦军. PEG 胁迫对沙冬青种子萌发过程的影响[J]. 水土保持研究,2011,18(3):221-225.
- [16] 崔大练,马玉心,石戈,等. 紫穗槐幼苗叶片对不同干旱梯度胁迫的生理生态响应[J]. 水土保持研究,2010,17(2):178-182.
- [17] 曹兵,宋丽华,唐春慧. 臭椿幼苗对渗透胁迫的生理响应[J]. 水土保持研究,2008,15(4):168-170.
- [18] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. Catalase is a sink for  $H_2O_2$  and is indispensable for stress defence in  $C_3$  plants[J]. The EMBO Journal,1997,16(16):4806-4816.