

超表达 *AVPI* 基因提高转基因百脉根的耐盐性和抗旱性

程星*, 王燕雯*, 包爱科, 王锁民**

兰州大学草地农业科技学院, 兰州 730020

摘要: 本研究以超表达拟南芥液泡膜 H^+ -焦磷酸酶编码基因 *AVPI* 的转基因百脉根为材料, 对其耐盐性和抗旱性进行了检测。结果显示: 在 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 下处理或自然干旱 7 d 后, 转基因植株的生长虽然受到抑制, 但受抑程度明显低于野生型植株, 前者叶片相对含水量比后者分别高 18% 和 14%, 净光合速率分别高 20% 和 21%, 而 MDA 含量则分别低 35% 和 27%, 相对质膜透性分别低 28% 和 27%。此外, 随着盐和干旱胁迫的加剧, 与野生型植株相比, 转基因植株体内积累了更多 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 。以上结果表明, *AVPI* 基因的超表达可能提高了百脉根细胞 Na^+ 区域化能力, 既减轻了过量 Na^+ 对细胞质的毒害作用, 也提高了植株的渗透调节能力, 从而增强了百脉根的耐盐性和抗旱性。

关键词: 转基因百脉根; *AVPI* 基因; 耐盐性; 抗旱性

Overexpression of *AVPI* Enhanced Salt and Drought Tolerance of Transgenic *Lotus corniculatus* L.

CHENG Xing*, WANG Yan-Wen*, BAO Ai-Ke, WANG Suo-Min**

College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: The *Arabidopsis thaliana* vacuolar H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) gene (*AVPI*) was overexpressed in *Lotus corniculatus* could enhance salt and drought tolerance of transgenic plants. The results indicated that the growth of transgenic lines was inhibited in the presence of $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl or under a water-deprivation condition after 7 days, while the wild-type plants suffered from much more serious growth inhibition. Under $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl or water-deprivation treatments, transgenic plants retained more water in leaves and higher photosynthesis activity compared with wild-type whereas the content of MDA and the relative membrane permeability of transgenic plants was lower than wild-type. Furthermore, under salt or water-deficit stress, transgenic plants accumulated more Na^+ , K^+ and Ca^{2+} in their leaves and roots. These results demonstrated that overexpression of *AVPI* gene might enhance compartmentalization of Na^+ in vacuole, which not only reduced the damage of excess Na^+ in the cytosol under salt stress, but also enhanced the osmoregulation capacity of cells, and therefore improved salt and drought resistance of transgenic *L. corniculatus*.

Key words: transgenic *Lotus corniculatus*; *AVPI*; salt resistance; drought resistance

百脉根是一种优良的豆科牧草, 广泛分布于我国华东、华中、西南及西北地区, 其不仅营养丰富、皂素含量低、适口性好, 而且细胞再生性在豆科牧草中是最好的, 遗传转化效率相对较高(陈燕等 1996)。百脉根不仅在家畜饲养中有重要作用, 也是研究外源基因转化、生物固氮机理、牧草品质改良的豆科模式植物, 同时也是作为生物反应器进行动物疫苗生产的理想材料(佳耀林和马诚 1985)。但是大多数百脉根栽培品种耐盐抗旱性差, 在盐碱化和荒漠化土地上种植难以获得高产。因此, 在传统育种的基础上, 利用生物技术对其加以遗传改良, 以培育出优质、高产的新品种, 对提高西北地区百脉根人工草地产量以及改良和利用大

面积盐碱地和荒漠化土地具有重要意义。

研究表明, 超表达液泡膜 H^+ -焦磷酸酶(H^+ -PPase)编码基因可增强植物的耐盐性和抗旱性(Gaxiola 等 2001; Brini 等 2007; Bao 等 2009; Gao 等 2006)。这是因为, H^+ -PPase 基因的超表达可以为液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(NHX)提供更强大的质子驱动力, 将细胞质中过多的 Na^+ 区域化至液泡中, 一方面减轻其对细胞质的毒害作用, 另一方面还可将

收稿 2010-04-12 修定 2010-05-10

资助 “十一五” 国家科技支撑计划(2008BADB3B01)和国家自然科学基金(30770347)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: smwang@lzu.edu.cn; Tel: 0931-8910983)。

Na⁺作为一种廉价的渗透调节剂来维持细胞的渗透平衡,从而提高植物对盐和干旱的适应能力(Blumwald 2000)。同时, H⁺-PPase 超表达还能提高植物生长素的运输效率(Li等2005),促进转基因植株根系的发育,使其在盐或水分胁迫下吸收更多的水分和养分,从而进一步提高植物的耐盐抗旱性(Park等2005)。可见,利用 H⁺-PPase 基因改良作物的耐盐性和抗旱性是一条非常具有潜力的途径。我们前期已将拟南芥 H⁺-PPase 基因 *AVPI* 成功转入百脉根,获得了超表达拟南芥 *AVPI* 基因的转基因植株,本研究对转基因百脉根的耐盐性和抗旱性进行检测,以期为培育百脉根新品系奠定基础。

材料与方法

1 转基因植株的获得

参照孙艳香等(2006)的方法,利用美国亚利桑那州立大学 Roberto A. Gaxiola 教授赠送的携带 *AVPI* 基因的质粒和农杆菌菌株 GV3101,对百脉根 (*Lotus corniculatus* L.) 品种‘迈瑞伯’进行遗传转化。将百脉根无菌苗子叶(带叶柄)切两半置于 B₅+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 的分化培养基上预培养 3 d,用 OD₆₀₀ 为 0.5 的菌液侵染 20 min,共培养 3 d 后,转入含 50 mmol·L⁻¹ 卡那霉素和 300 mmol·L⁻¹ 羧苄青霉素的分化培养基(B₅+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA)上进行筛选培养。20 d 后,外植体分化出不定芽,移到生根培养基(1/2MS+0.05 mg·L⁻¹ NAA)上生根成苗。得到的抗性苗经 PCR 检测全部为阳性。

2 材料准备

将转基因百脉根和野生型百脉根组培苗炼苗 3~4 d 后,移入经过高压灭菌的蛭石、珍珠岩和草炭土(1:1:1)的基质中,浇灌蒸馏水后放入人工气候箱内培养。待移栽苗开始生长时,剪取其茎段作为插条,插枝长 4 cm 左右,含 2~3 个节,下端在近节处斜剪,在 100 mg·L⁻¹ 的萘乙酸(NAA)中浸泡 15 s 后插入蛭石和珍珠岩(1:1)的基质中,放入人工气候箱于(24±2) °C、16 h·d⁻¹ 光照下培养,浇灌 1/8 Hoagland 营养液。插条生根后,选取苗高、根长以及长势基本一致的扦插苗作为实验材料。

3 盐胁迫处理

将野生型和转基因型植株移入蛭石和珍珠岩(1:1)中,放入培养箱中于(24±2) °C、16 h·d⁻¹ 光照

下培养,每隔 2 d 用 1/8 Hoagland 营养液浇灌,生长 4 周后,用含 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/8 Hoagland 营养液浇灌,每隔 1 d 以 50 mmol·L⁻¹ 的浓度递增,最后达到终浓度 0、50、100、150 和 200 mmol·L⁻¹。保持终浓度 7 d 后,测定相关指标,每个指标至少 6 个重复。

4 干旱胁迫处理

将野生型和转基因型植株移入蛭石和珍珠岩(1:1)中,培养条件同上。采用 Park 等(2005)的方法,用 1/8 Hoagland 营养液进行浇灌至田间最大持水量培养 4 周。然后停止浇水,使土壤自然变干,直到第 7 天所有植株都出现萎蔫,于第 8 天再恢复浇水至田间最大持水量。在干旱胁迫期间,每隔 1 d 测定相关指标,每个指标至少 6 个重复。

5 指标测定

5.1 地上部干重 分别取野生型和转基因型植株的地上部分,在 80 °C 下烘 48 h,称重。

5.2 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 含量 阳离子含量的测定参考 Flowers 和 Hajibagheri (2001)的方法。首先将根系用去离子水浸泡 10 s,用冰硝酸锂溶液清洗;然后将根、叶于 80 °C 下烘 48 h 后称取干重,捣碎放入 20 mL 试管中,加入 100 mmol·L⁻¹ 的冰乙酸 10 mL。密封试管,90 °C 水浴 2 h,冷却后过滤,稀释适当倍数后,在火焰光度计(2655-00)上测定 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 含量。

5.3 叶片相对含水量 叶片相对含水量(RWC)的测定参考李莉等(2007)的饱和鲜重法稍做改动。取野生型和转基因植株高度一致的叶片 3~5 g,用去离子水冲洗干净,滤纸吸干表面水分,测定鲜重(FW),然后在 4 °C 的去离子水中浸泡过夜,取出后用滤纸吸干表面水分,称取饱和鲜重(RW),最后转到 80 °C 烘 48 h 后称得干重(DW),叶片相对含水量=(FW-DW)/(RW-DW)×100%。

5.4 叶片质膜透性(相对电导率) 参照薛应龙(1985)的方法:取高度一致的叶片,用去离子水冲洗干净并用滤纸吸干,剪成大小均一的小片,称取 0.2 g 于试管中,加 20 mL 去离子水并抽气至叶片下沉,除去叶表面和细胞间隙中的空气,使叶组织内电导液易渗出,取出试管置于恒温震荡箱中,在 25 °C 震荡 2 h,用电导仪(EC215, HANNA, Italy)测定外渗液的电导值(L1),然后沸水浴 10 min,冷却后再次测定

外渗液的电导值(L2), 相对质膜透性 = $L1/L2 \times 100\%$ 。

5.5 MDA 含量 采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)的含量(Peever 和 Higgins 1989)。取高度一致的叶片0.2 g放入研钵中, 加入少许石英砂和2 mL 10%的三氯乙酸(TCA), 研成匀浆, 将匀浆移到试管中, 用3 mL 10%的三氯乙酸冲洗研钵2次, 合并匀浆, 在提取液中加入5 mL 0.6%的硫代巴比妥酸溶液, 摇匀, 然后将试管放入沸水中煮10 min (自试管中出现小气泡时开始计时)后, 立即将试管取出并放入冷水浴中, 待试管冷却后, 过滤, 量其体积, 以0.3%的硫代巴比妥酸溶液为空白, 用紫外分光光度计测450、532和600 nm处的OD值, 最后根据文献中的公式计算MDA含量。

5.6 净光合速率 净光合速率的测定参照Qiu等(2003)的方法, 用LI-6400光合仪测定。

6 数据分析

实验所得数据用SPSS 13.0 (SPSS Inc., USA)软件分析, 用Excel表格作图。

实验结果

1 AVPI转基因植株的耐盐性和抗旱性均强于野生植株

在正常条件下, 野生型和转基因植株在形态上

没有明显差异(图1-A); 200 mmol·L⁻¹ NaCl处理7 d后, 转基因植株的生长虽然受到抑制, 但受抑程度要远轻于野生型植株(图1-B)。地上部生物量测定结果(图2)显示: 随着盐浓度的递增, 野生型和转基因植株单株地上部干重均呈逐渐下降的趋势, 但在相同NaCl浓度下, 转基因植株的地上部生物量显著高于野生型植株。例如, 200 mmol·L⁻¹ NaCl处理7 d后, 转基因植株的地上部干重是野生型植株的1.4倍。可见, AVPI转基因植株比野生型植株表

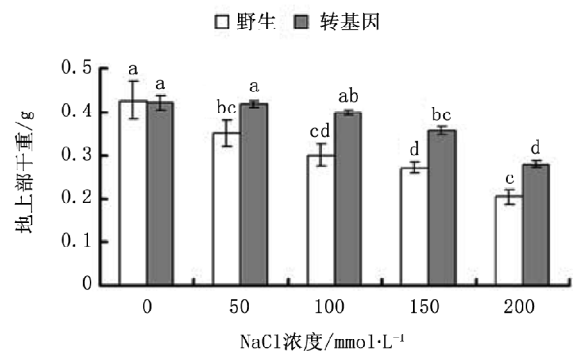


图2 NaCl胁迫7 d对野生型和转基因百脉根单株地上部干重的影响

Fig.2 The effect of NaCl stress for 7 days on the shoot biomass of transgenic and wide type *L. corniculatus*

图中的柱子代表平均值±标准差(n=7), 柱子上的不同字母代表在P<0.05水平上差异显著(Duncan test)。图4~8同。

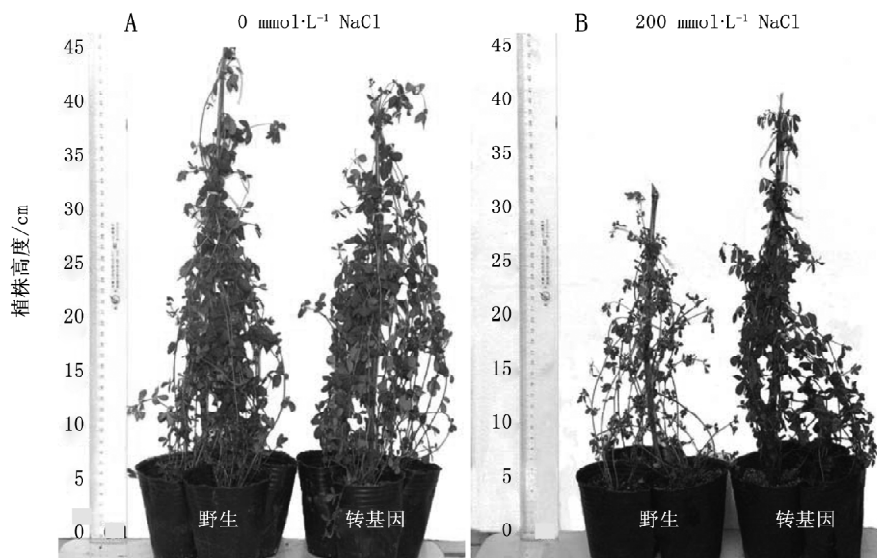


图1 NaCl胁迫对转基因和野生百脉根生长的影响

Fig.1 Effects of NaCl stress on the development of transgenic and wide type *L. corniculatus*

照片显示的是野生植株和转基因植株在正常条件(A)和200 mmol·L⁻¹ NaCl (B)处理7 d后的生长状况。

现出更强的耐盐性。

干旱胁迫5 d后, 野生型植株生长受到抑制, 出现萎蔫, 而转基因植株仍然正常生长(图3-A), 直到第7天才发生萎蔫(图3-B); 干旱处理第8天对所有植株复水, 2 d后, 转基因植株解除萎蔫并恢复正常生长, 而野生型植株则发生永久萎蔫, 最后死亡(图3-C、D)。可见, *AVPI* 基因的超表达也提高了转基因植株的抗旱性。

2 *AVPI* 转基因植株中积累了更多的阳离子

为研究 *AVPI* 超表达对转基因植株体内阳离子含量的影响, 本实验分别测定了不同强度NaCl和干旱处理下转基因和野生型植株叶和根中 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 的含量。从图4可见, 随着NaCl浓度增加, 转基因和野生型植株叶和根中 Na^+ 和 Ca^{2+} 含量均显著增加, 但转基因植株中增加的速度更快, 在同一盐浓度下, 转基因植株叶和根中 Na^+ 和 Ca^{2+} 含

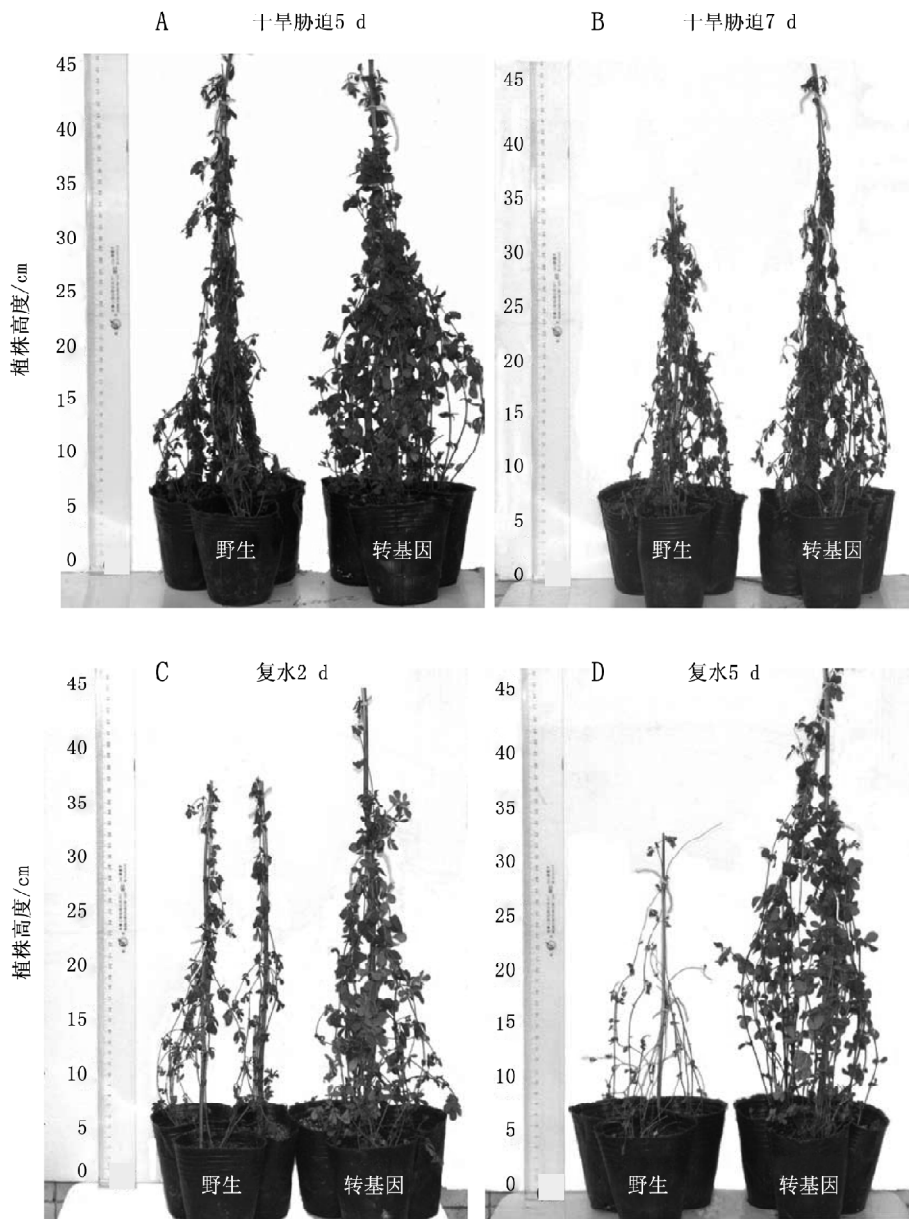


图3 干旱胁迫5 d (A)、7 d (B)及复水2 d (C)、5 d (D)对野生型和转基因百脉根生长的影响

Fig.3 The effect of drought stress for 5 days (A), 7 days (B) and rewatering for 2 days (C), 5 days (D) on the development of transgenic and wide type *L. corniculatus*

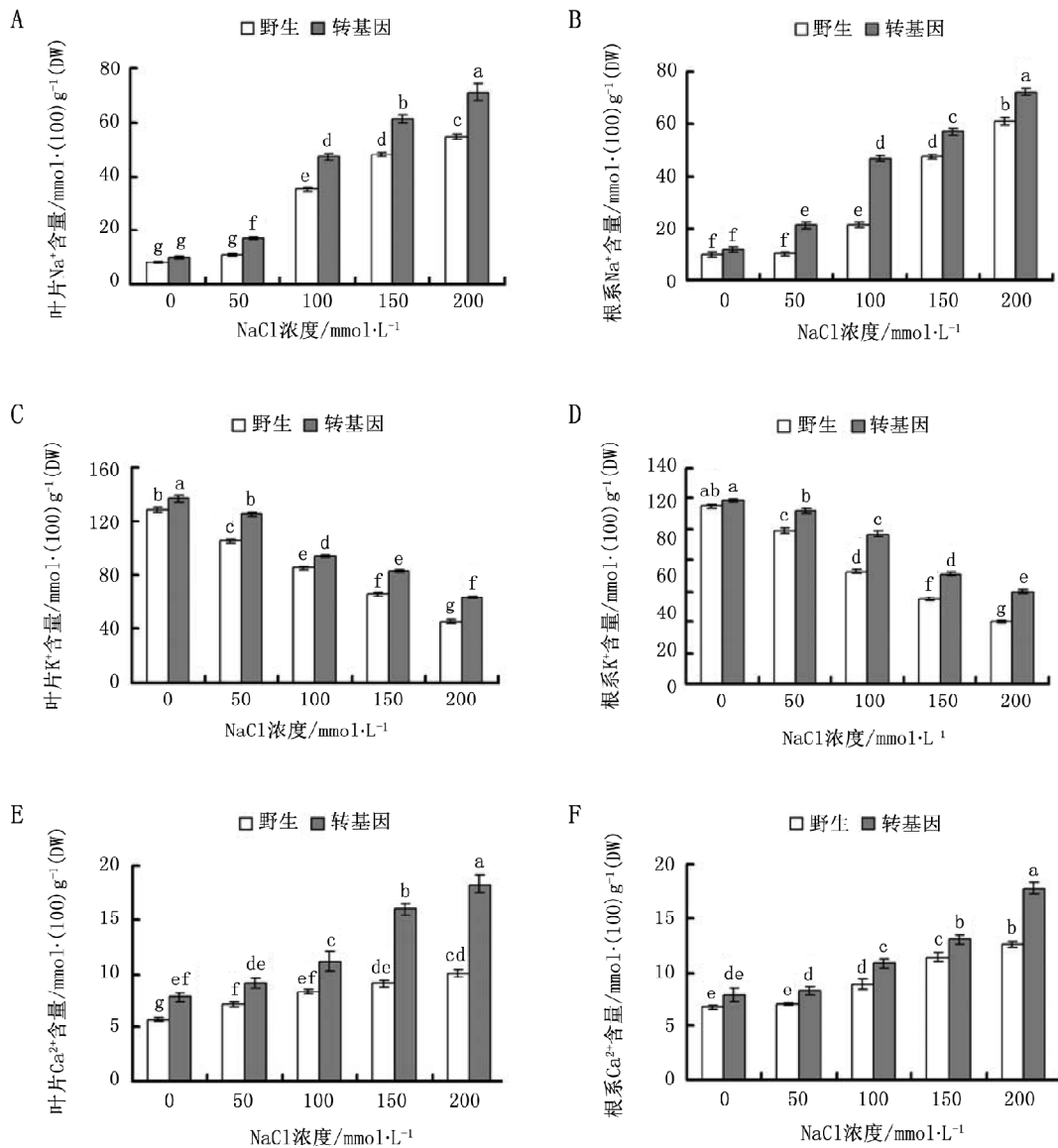


图4 不同浓度 NaCl 处理 7 d 后转基因百脉根和野生型植株叶和根中的 Na⁺ (A、B)、K⁺ (C、D) 和 Ca²⁺ (E、F) 含量
Fig.4 Na⁺ (A, B), K⁺ (C, D), and Ca²⁺ (E, F) contents in leaf and root of transgenic and wide type *L. corniculatus* under different NaCl concentrations for 7 days

量显著高于野生型植株。比如 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 7 d 后, 转基因植株叶和根中 Na⁺ 含量分别是野生型植株的 1.3 倍和 1.2 倍(图 4-A、B), Ca²⁺ 含量则分别是野生型植株的 1.8 倍和 1.4 倍(图 4-E、F)。虽然随着盐胁迫加剧, 转基因和野生型植株叶和根中 K⁺ 含量均显著下降, 但在同一 NaCl 浓度下, 转基因植株中 K⁺ 的含量显著高于野生型。比如在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 下, 转基因植株叶和根中的 K⁺ 含量分别是野生型的 1.4 倍和 1.5 倍(图 4-C、D)。

由图 5 可知, 随着干旱时间的延长, 除了野生

型植株根中 Ca²⁺ 含量没有显著变化外(图 5-F), 所有植株叶及根中 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 含量均呈现出逐渐增加的趋势, 且转基因植株中增加得更快; 干旱胁迫后期, 转基因植株叶及根中 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 含量显著高于野生型植株。如干旱胁迫 7 d, 转基因植株叶中的 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 含量分别比野生型植株高 74%、55% 和 88% (图 5-A、C、E), 根中的 Na⁺、K⁺ 和 Ca²⁺ 含量分别比野生型植株高 63%、61% 和 200% (图 5-B、D、F)。

以上结果表明, 在盐和干旱胁迫下, 与野生型

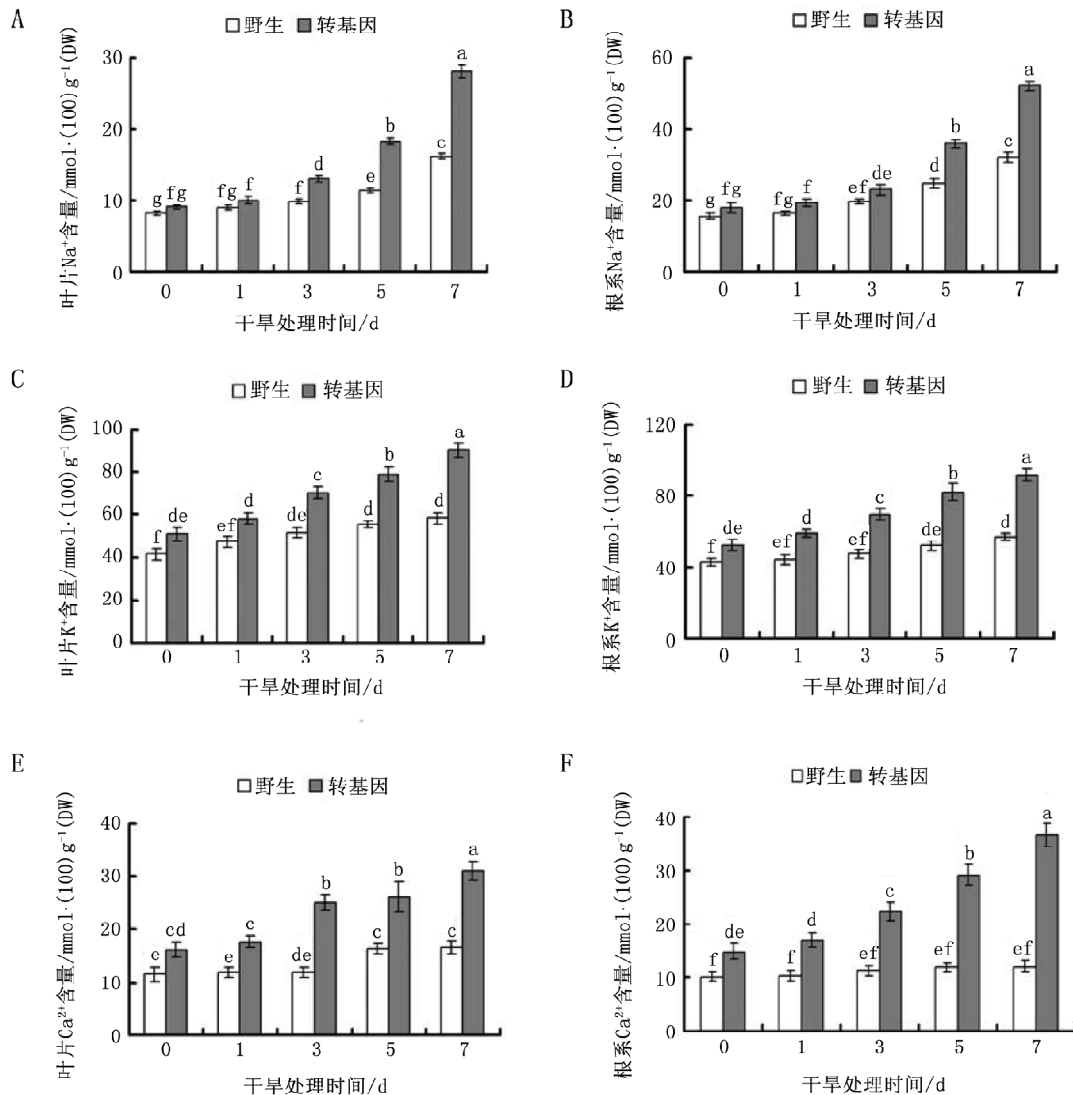


图5 干旱胁迫下转基因和野生百脉根叶片和根中Na⁺ (A、B)、K⁺ (C、D)和Ca²⁺ (E、F)含量
Fig.5 Na⁺ (A, B), K⁺ (C, D), and Ca²⁺ (E, F) contents in leaf and root of transgenic and wide type *L. corniculatus* under drought stress

植株相比, 转基因植株体内积累了更多的Na⁺、K⁺和Ca²⁺。

3 AVPI转基因植株的叶片相对含水量高于野生型植株

为研究转基因植株的渗透调节能力, 在盐或干旱胁迫下测定了野生型及转基因植株的叶片相对含水量。随着盐胁迫或干旱胁迫的加剧, 野生型植株和转基因植株的叶片相对含水量均呈下降趋势, 但相比之下, 转基因植株叶片相对含水量的下降幅度小于野生型植株(图6)。例如, 在200 mmol·L⁻¹ NaCl下处理7 d, 野生型植株的叶片相对含水量下降了

36%, 而转基因植株仅下降了18%; 同样, 经过7 d的水分胁迫, 野生型植株的叶片相对含水量下降了38%, 而转基因植株只下降了24%。这说明转基因植株具有较强的渗透调节能力, 在受到逆境胁迫时具有较强的保水能力, 进而能维持植株的正常生长, 表现出更强的耐盐抗旱性。

4 AVPI转基因植株的细胞膜稳定性高于野生型植株

MDA含量和相对质膜透性是反应植物在逆境条件下细胞膜受损程度的两个指标。本研究中, 在正常条件下, 叶片MDA含量和相对质膜透性在转

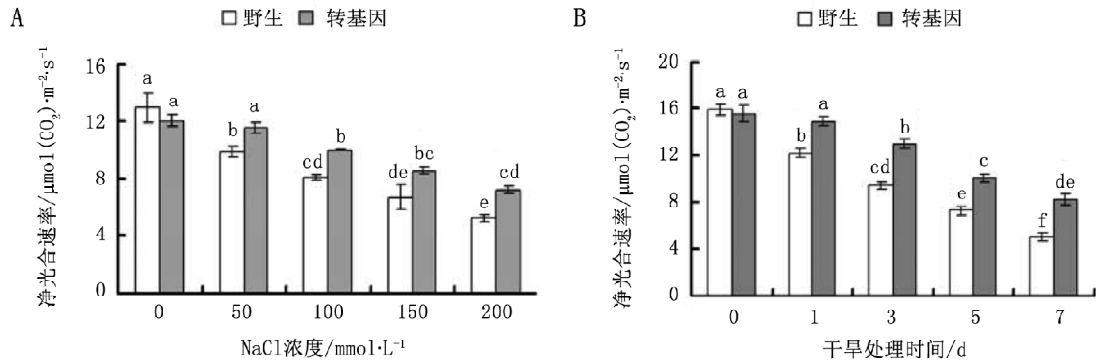


图6 NaCl胁迫(A)或干旱胁迫(B)对转基因和野生百脉根叶片相对含水量的影响

Fig.6 The effect of NaCl stress (A) or drought stress (B) on the leaves relative water content of transgenic and wild type *L. corniculatus*

基因和野生型植株间均无差异;随着盐浓度的增加或水分胁迫的加剧,植株叶片MDA含量和相对质膜透性均呈增加趋势,但在相同胁迫条件下(除50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理的MDA含量无显著差异外),转基因植株叶片MDA含量和相对质膜透性均显著低于野生型植株(图7)。200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl处理7 d,转基因植株叶片MDA含量和相对质膜透性分别比野生型植株低35%和28%(图7-A、C);水分胁迫7 d后,转基因植株叶片MDA含量和相对质膜透

性均比野生型植株低27%。上述结果表明,转基因植株细胞膜在逆境条件下受损程度轻,生长状况良好,进而表现出较强的耐盐性和抗旱性。

5 AVPI转基因植株的净光合速率高于野生型植株

随着盐浓度的增加或干旱胁迫时间的延长,植株的净光合速率均呈下降的趋势,但相比之下,野生型植株的净光合速率下降速度更快。例如,在200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl下处理7 d后,野生型植株的净光合速率下降了60%,而转基因植株则仅下降了

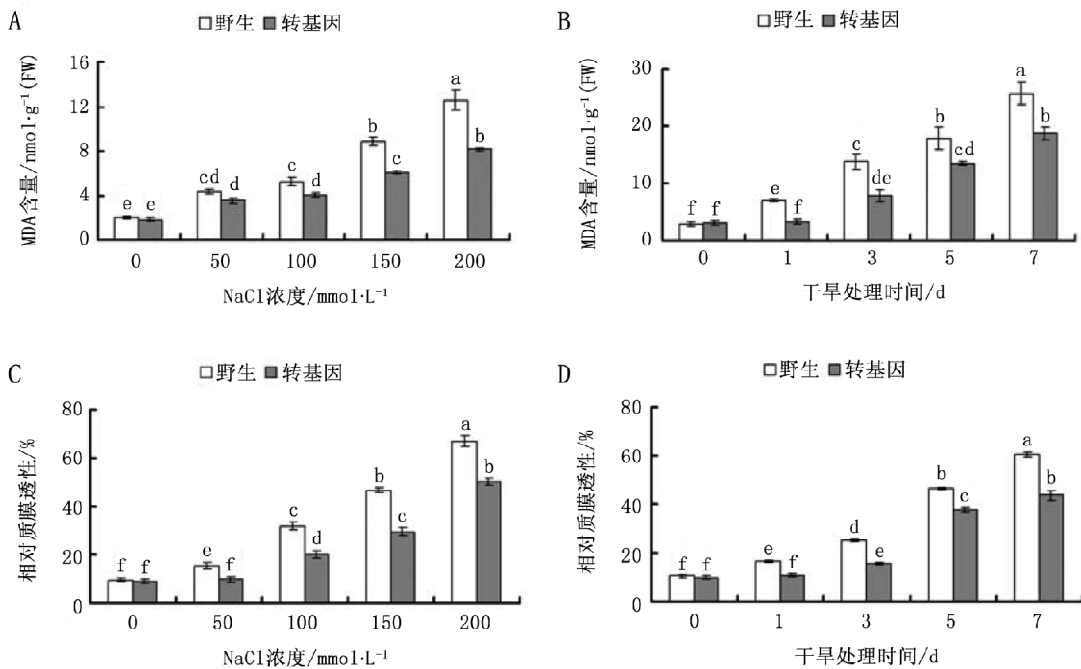


图7 NaCl胁迫(A、C)或干旱胁迫(B、D)对野生型和转基因百脉根叶片MDA含量和相对质膜透性的影响

Fig.7 The effect of NaCl stress (A, C) or drought stress (B, D) on leaf MDA content and relative membrane permeability of transgenic and wild type *L. corniculatus*

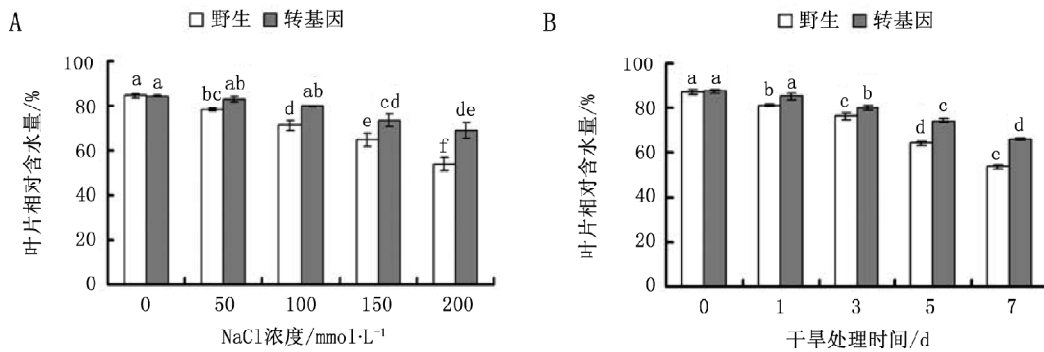


图8 NaCl胁迫(A)或干旱胁迫(B)对野生型和转基因百脉根净光合速率的影响

Fig.8 Effects of NaCl stress (A) or drought stress (B) on the net photosynthesis of transgenic and wild type *L. corniculatus*

40% (图8-A); 经过7 d的水分胁迫, 野生型植株的净光合速率下降了68%, 但转基因植株仅下降了47% (图8-B)。表明转基因植株在逆境条件下保持了较高的光合能力。

讨 论

盐和干旱是影响植物生长的两个主要的非生物胁迫因子(Zhu 2002), 培育具有较强耐盐抗旱性的植物新品系具有重要的现实意义。与前人在其他一些植物上得到的结论相一致(Gaxiola等2001; Gao等2006; Brini等2007; Bao等2009), 本研究发现, 与野生型百脉根相比, *AVPI*转基因百脉根的耐盐性、抗旱性有了显著提高(图1~3)。在盐或干旱胁迫下, 与野生型植株相比, 转基因植株叶片和根系中更高的Na⁺积累水平(图4-A、B; 图5-A、B)说明*AVPI*基因过量表达可能提高了转基因植株的Na⁺区域化能力; 更多的Na⁺、K⁺、Ca²⁺含量(图4、5)及较高的叶片相对含水量(图6)则表明Na⁺区域化能力的提高会促使转基因植株吸收更多的溶质, 进而降低植物的渗透势, 增强其保水能力(Gaxiola等2001)。

同时, Na⁺区域化能力的提高能减轻过量的Na⁺对细胞的毒害作用(包爱科等2006), 这在本研究中也得到了充分体现。盐和干旱胁迫会破坏植物细胞膜结构, 导致MDA含量和相对质膜透性升高(Peever和Higgins 1989)。本研究中, 在盐胁迫下, 转基因和野生型植株的MDA含量和相对质膜透性均增加, 但前者的增加较为平缓(图7-A、C), 这与*TsVP*在烟草中超表达的结果相一致(Gao等2006)。同样, 在干旱胁迫下, 转基因百脉根细胞膜受损程

度低于野生型植株(图7-B、D)。这可能是*AVPI*基因过量表达促使植株吸收更多的溶质, 使其在水分胁迫期间吸收更多的水分, 进而减轻干旱对植株造成的伤害。同时, 在盐胁迫和干旱胁迫下, 植物细胞含水量的减少或过多的Na⁺会抑制光系统I和光系统II (Allakhverdiev 2000), 进而引起光合作用的减弱(Greenway和Munns 1980)。在本研究中, 在盐或干旱胁迫下, 转基因植株比野生型植株具有较高的净光合速率(图8), 表明其光合器官在逆境中遭受的破坏较小, 这与*SsNHX1*基因和*AVPI*基因在水稻上共表达后得到的转基因水稻的结果相一致(Zhao等2006)。上述结论再次说明*AVPI*基因的超表达提高了Na⁺的区域化能力, 降低了Na⁺对细胞质的毒害作用, 增强了植物的保水能力, 从而减轻转基因植株在盐和干旱胁迫下所受的伤害。

另外, Gaxiola等(2001)指出, 除了通过提高Na⁺区域化减轻过量Na⁺对细胞质的毒害外, H⁺-PPase的超表达还有利于细胞对其他离子如K⁺和Ca²⁺的吸收, 从而调节细胞内的离子稳态平衡, 使得转基因植物在盐或干旱胁迫条件下受到较小的伤害。已有的研究表明, K⁺在植物的生长中起着重要作用, 在盐和干旱胁迫下保持较高的细胞质K⁺浓度对植物耐盐抗旱性是很有必要的(Zhu 2001)。Ca²⁺在植物耐盐性及抗旱性方面也发挥着重要作用, 如稳定细胞壁和细胞膜, 刺激细胞对K⁺的吸收、调节水分平衡以及充当第二信使等(Yang和Poovaiah 2002)。在盐或干旱胁迫下, 转基因百脉根叶片和根中积累的K⁺和Ca²⁺含量都显著高于野生型植株(图4、5)。这与拟南芥*AVPI*在紫花苜蓿(Bao等2009)和小麦*TVPI*在拟南芥(Brini等2007)中超表达的结果

是一致的。

综上所述, *AVPI* 基因过量表达提高了转基因百脉根的耐盐性和抗旱性, 这对培育百脉根新品系创造了新的育种材料。随着对 H^+ -PPase 的逐渐了解, 以及对植物耐盐抗逆分子机制的研究和生物技术的不断完善, 有望在作物耐盐抗旱性研究方面取得重要突破, 为培育高效耐盐抗旱作物迎来曙光。

参考文献

- 包爱科, 张金林, 郭正刚, 王锁民(2006). 液泡膜 H^+ -PPase 与植物耐盐性. 植物生理学通讯, 42: 777~783
- 陈燕, 李聪, 苏加楷(1996). 发根农杆菌介导的百脉根的基因转化. 草地学报, 4 (2): 116~120
- 佳耀林, 马诚(1985). 植物组织培养. 北京: 科学出版社, 101~107
- 李莉, 韦翔华, 王华芳(2007). 盐胁迫对烟草幼苗生理活性的影响. 问题探讨, 26: 79~83
- 孙艳香, 杨红梅, 耿云红, 朱晔荣, 王宁宇, 王勇(2006). 根癌农杆菌介导的百脉根遗传转化体系的优化研究. 南开大学学报(自然科学版), 39: 51~57
- 薛应龙(1985). 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社
- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Inaba M, Murata N (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. Plant Physiol, 123: 1047~1056
- Bao AK, Wang SM, Wu GQ, Xi JJ, Zhang JL, Wang CM (2009). Overexpression of the *Arabidopsis* H^+ -PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Sci, 176: 232~240
- Blumwald E (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. Curr Opin Cell Biol, 12: 431~434
- Brini F, Hanin M, Mezghani I, Berkowitz GA, Masmoudi K (2007). Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiporter *TNHX1* and H^+ -pyrophosphatase *TVPI* improve salt and drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. J Exp Bot, 58: 301~308
- Flowers TJ, Hajibagheri MA (2001). Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentrations in root cells of cultivars differing in salt tolerance. Plant Soil, 231: 1~9
- Gao F, Gao Q, Duan XG, Yue GD, Yang AF, Zhang JR (2006). Cloning of an H^+ -PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. J Exp Bot, 57: 3259~3270
- Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *AVPI* H^+ -pump. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 11444~11449
- Greenway H, Munns R (1980). Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. Annu Rev Plant Physiol, 31: 149~190
- Li J, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL et al (2005). *Arabidopsis* H^+ -PPase *AVPI* regulates auxin-mediated organ development. Science, 310: 121~125
- Park S, Li J, Pittman JK, Berkowitz GA, Yang H, Undurraga S, Morris J, Hirschi KD, Gaxiola RA (2005). Up-regulation of a H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 18830~18835
- Peever TL, Higgins VJ (1989). Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and non specific elicitors from *Cladosporium fluvum*. Plant Physiol, 90: 867~875
- Qiu NW, Lu QT, Lu CM (2003). Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. New Phytol, 159: 479~486
- Yang T, Poovaiah BW (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 4097~4102
- Zhao FY, Zhang XJ, Li PH, Zhao YX, Zhang H (2006). Co-expression of the *Suaeda salsa* *SsNHX1* and *Arabidopsis* *AVPI* confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single *SsNHX1*. Mol Breeding, 17: 341~353
- Zhu JK (2001). Plant salt tolerance. Trends Plant Sci, 6: 66~71
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol, 53: 247~273