

过表达 *GmNHX1* 基因提高大豆根系的耐盐性

王敏娟^{1,2}, 侯文胜¹, 王庆钰², 林汉明^{2,3}, 韩天富¹

(1. 中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; 2. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062; 3. 香港中文大学 生命科学院, 中国 香港)

摘要: Na^+/H^+ 反向转运蛋白可调控细胞质 pH 值、钠离子浓度和细胞体积, 从而减轻盐胁迫对植物的伤害。利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 介导法, 向大豆根系导入由 CaMV35S 启动子调控的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白编码基因 *GmNHX1* 的 cDNA 序列, 通过该基因的过量表达, 提高大豆的耐盐性。通过潮霉素筛选、GUS 染色及 RT-PCR 检测, 确认获得了转 *GmNHX1* 基因的大豆发状根。对转基因发状根耐盐性分析表明: 在 100、150 和 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫下, 置于 MS 固体培养基中的转基因离体发状根的长度和重量增加值均显著大于对照。带有转基因发状根的子叶及复合体植株在盐胁迫条件下也具有较强的生存能力。试验证明, 过表达 *GmNHX1* 基因能够显著提高转基因发状根的耐盐性, 该结果为利用 *GmNHX1* 基因进行大豆耐盐性的改良提供了依据。

关键词: 大豆; 发根农杆菌; *GmNHX1*; 根系; 耐盐性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)06-0889-06

Enhancing Salt Tolerance of Soybean Roots by Overexpression of *GmNHX1*

WANG Min-juan^{1,2}, HOU Wen-sheng¹, WANG Qing-yu², LAM Hon-ming^{2,3}, HAN Tian-fu¹

(1. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI), Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China; 3. School of Life Sciences, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China)

Abstract: Na^+/H^+ antiporter is responsible for the regulation of cytoplasmic pH, sodium concentration and cell volume for plants to cope with salt stress. To enhance the salt tolerance of soybean, the *GmNHX1* cDNA that encodes a soybean Na^+/H^+ antiporter protein was driven by the Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter and overexpressed in soybean roots via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. Hpt screening, GUS and RT-PCR analysis all confirmed that *GmNHX1* was successfully integrated into the genome of soybean hairy roots. Salt tolerance analysis showed that the growth in length and weight of the transgenic hairy roots on MS agar medium were significantly better than the non-transgenic control, when supplemented with 100, 150 and 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl. Both the cotyledons and composite plants with transgenic hairy roots survived better than the non-transgenic control when subjected to salinity stress. These results support the possibility of using *GmNHX1* to improve salt tolerance in soybean.

Key words: Soybean; *Agrobacterium rhizogenes*; *GmNHX1*; Roots; Salt tolerance

大豆是中度耐盐植物, 盐胁迫不仅抑制大豆种子萌发与生长, 导致叶片失绿、白化或坏死, 也可减少根瘤、降低生物产量甚至引起植物死亡^[1]。由于利用常规手段进行耐盐育种的进展缓慢, 转基因技术在植物耐盐性改良上的应用越来越受到重视。通过导入磷酸酯酶基因、细胞渗透压调节基因、转录因子基因等与植物耐盐性相关的基因, 可在一定程度上提高受体材料的耐盐性^[2-4]。

尽管目前转基因大豆已在全球大面积种植, 但其遗传转化仍局限于根瘤农杆菌介导的子叶节转

化系统、基因枪介导的体细胞胚转化系统、胚悬浮培养转化系统等方法^[5-7]。这些转化系统普遍存在嵌合体频率高、受基因型限制、转化系统稳定性较差等问题^[8-9], 限制了转基因材料的批量创制和候选基因育种应用价值的快速评价。发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 介导的大豆发状根转化系统, 具有转化效率高、稳定性好等突出优点, 尽管目前尚不能利用该系统获得可遗传的转基因植株, 但可批量获得转基因发状根和复合体转基因植株, 用于基因功能的快速验证, 评价其在大豆育种中的利

收稿日期: 2011-09-17

基金项目: 国家大豆产业技术体系建设专项 (CARS-04); 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08010-004)。

第一作者简介: 王敏娟 (1984-), 女, 硕士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: fox0613@126.com。

通讯作者: 韩天富 (1963-), 博士, 研究员, 从事大豆遗传育种与生物技术研究。E-mail: hantf@mail.caas.net.cn。

林汉明 (1960-), 博士, 教授, 从事植物分子生物学和农业生物技术研究。E-mail: honming@cuhk.edu.hk。

用价值^[10]。

盐对植物的毒害作用主要是由水分亏缺引起的渗透胁迫以及过量 Na^+ 对重要生化过程的毒害所致^[11-12]。 Na^+/H^+ 反向转运蛋白可调控细胞质 pH 值、钠离子浓度和细胞体积,以减轻盐胁迫造成的伤害^[13]。 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因是目前研究最为系统的植物耐盐性基因之一,过表达质膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的蓝细菌^[14]和拟南芥^[15-16],过表达液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的拟南芥^[12]、甜菜^[17]、番茄^[18]、水稻^[19-20]以及小麦^[21]等,其耐盐性均得到明显提高。但过表达大豆 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因能否提高大豆的耐盐性,目前尚未见报道。该研究利用发根农杆菌介导法将大豆 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因 *GmNHX1* 转入大豆根系,分析其对耐盐性的影响,旨在评价该基因在大豆育种中的利用价值,为进一步创制耐盐转基因材料提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种 大豆品种自贡冬豆种子由该实验室保存,以子叶节为转化受体材料。

1.1.2 质粒和菌种 PUC18 载体购自 TaKaRa 公司,pBlueScript II KS(+) -*GmNHX1* 由香港中文大学提供,表达载体 pGFPGUSPlus^[22]及发根农杆菌菌株 K599 由澳大利亚昆士兰大学 Peter Gresshoff 教授惠赠,大肠杆菌 DH5 α 为该实验室所存。

1.1.3 培养基 共培养培养基: 1/10 MS、3.9 mg·L⁻¹ MES、200 mmol·L⁻¹ As、150 mg·L⁻¹ DTT、100 mg·L⁻¹ Cys、30 mg·L⁻¹ 蔗糖、7.5 g·L⁻¹ 琼脂粉(pH 5.4)。洗涤培养基: 1/2 MS、250 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠、250 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素钠、30 mg·L⁻¹ 蔗糖(pH 5.8)。发状根诱导培养基: 1/2 MS、250 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠、250 mg·L⁻¹ 羧苄青霉素钠、30 mg·L⁻¹ 蔗糖、7.5 g·L⁻¹ 琼脂粉(pH 5.8)。

1.2 试验方法

1.2.1 转基因表达载体构建 先用 *Xba*I 和 *Kpn*I 双酶切 pBlueScript II KS(+) -*GmNHX1* 载体,而后用 *GmNHX1* 编码区序列替换 pGFPGUSPlus 载体上原来的 GFP 编码区序列,构建表达载体 GFPGUSPlus-*GmNHX1*(图 1),*GmNHX1* 编码区上游为 CaMV35S 启动子,下游为 NOS 终止子;该载体的植物选择标记基因为潮霉素抗性基因。通过冻融法转入发根农杆菌

(*Agrobacterium rhizogenes*) 菌株 K599 中。

1.2.2 菌液制备 将新鲜单菌落接种到含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 YEP 液体培养基中,在 28℃、250 r·min⁻¹ 条件下震荡培养过夜,取出少量菌液二次活化,培养至 OD₆₀₀ 值在 0.6~0.8 之间时备用。

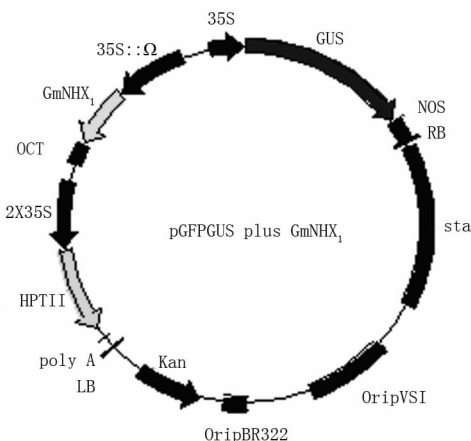


图 1 pGFPGUSPlus-*GmNHX1* 表达载体图谱

Fig. 1 Map of expression vector pGFPGUSPlus-*GmNHX1*

1.2.3 大豆发状根的制备及转化 取表面光滑无病斑的成熟种子,氯气过夜灭菌后,接种于发芽培养基中。萌发 4~7 d 后,取出无菌苗,去掉种皮,将 2 片子叶从下胚轴中线处切开,除去顶芽和腋芽,用解剖刀在子叶和胚轴交接处划 3~5 刀。将制备好的子叶节放入侵染液中侵染 30 min 后,倒掉菌液,用无菌滤纸洗掉多余的菌液,然后将外植体近轴面朝下接种在铺有一层无菌滤纸的共培养培养基上。共培养 5 d 后,用洗涤培养基清洗 3 次,浸泡 30 min 除去表面菌液,使子叶节近轴面朝上,将下胚轴插入发状根诱导培养基中,约 15 d 可见发状根。

1.2.4 GUS 检测 随机取发状根 150 条(分 3 组,每组 50 条)进行 X-Gluc^[23-24] 染色,37℃ 过夜,检测 GUS 基因的表达情况。将染色后呈蓝色的根转移至 MS 液体培养基中,在 28℃、120 r·min⁻¹ 条件下进行培养,作为后续试验材料。同时,对由不含 GFP GUSPlus-*GmNHX1* 表达载体的 K599 菌株侵染产生的发状根进行 X-Gluc 染色,作为对照。

1.2.5 大豆转基因发状根的 RT-PCR 检测 用 Trizol 法抽提总 RNA(参见 Trizol Kit 说明书)。以 mRNA 为模板,用 AMV 反转录酶扩增出第一条 cDNA 链,以 P₁ (5'-GCTCTAGAATGGTTTTTGAAATCAGTACTG-3') 和 P₂ (5'-CGAGCTCGTCAACGCCATTGATGG-3') 特异性引物,采用 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 45 s、60℃ 复性 45 s、72℃ 延伸 90 s 的 PCR 程序,进行 33

个循环后,72℃延伸 10 min,扩增约 1.7 kb 的 *GmNHX1* 目的片段,同时以 β -actin (750 bp) 作为内标基因。

1.2.6 大豆转基因离体发状根在固体/液体培养基中的耐盐性分析 将经过含 14 mg·L⁻¹ 潮霉素筛选,并经 PCR 和 *GUS* 检测验证的大豆转基因离体发状根和非转基因发状根,分别转移到 NaCl 浓度分别为 0、50、100、150 和 200 mmol·L⁻¹ 的 MS 固体和液体培养基中。在每种盐浓度处理中,放置 5 条长度为 1.5 cm 的离体发状根,经 15 d 培养后,观察记录发状根的生长情况,并统计发状根长度增加量和鲜重。以不含外源表达载体的 K599 菌株侵染产生的发状根作对照。均设 3 次重复。

1.2.7 从子叶上诱导产生的发状根的耐盐性分析 在 MS 培养基中预培养 3~5 d 后将已有发根迹象的子叶转移到 NaCl 浓度分别为 0、50、100、150 和 200 mmol·L⁻¹ 的 MS 固体培养基中,设 10 个重复,每个重复 2 个外植体,经 15 d 培养,观察记录发状根的生长情况,称量发状根的鲜重。用不含外源表达载体的 K599 菌株侵染子叶,产生发状根,作为对照。

1.2.8 复合体植株的耐盐性分析 大豆种子发芽后,剥去种皮,并去除大部分下胚轴,仅保留靠近子叶 3~5 mm 长的部分。用解剖刀将所保留的下胚轴切“十”字 2 次,放置在菌液中侵染 30 min,此后在共培养基中共培养 5 d,在 MS 培养基中预培养 3~5 d。将已有发根迹象的外植体转移到 NaCl 浓度分别为 0、50、100、150 和 200 mmol·L⁻¹ 的 MS 固体培养基(含 250 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠和羧苄青霉素钠)中。设 10 个重复,每个重复 2 个外植体。经 15 d 培养后,观察记录发状根的生长情况,称量其鲜重。以不含外源表达载体的 K599 菌株侵染产生的复合植株作对照。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 和 DPS 6.55 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 大豆转基因发状根的检测

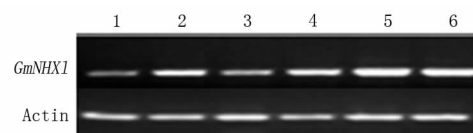
2.1.1 *GUS* 检测 *GUS* 染色结果(图 2)显示,转入外源基因的发状根呈现蓝色,而由不含外源表达载体的 K599 菌株侵染产生的发状根不能被染色,据此初步确认前者为转基因发状根。



图 2 转化 pGFPGUSPlus-*GmNHX1* 的大豆发状根及对照的 *GUS* 检测结果

Fig. 2 *GUS* detection of transformed soybean hairy roots with vector pGFPGUSPlus-*GmNHX1* and the negative control

2.1.2 *GmNHX1* 在大豆根系中的表达 为了验证 *GmNHX1* 基因在转录水平上的表达,随机选取潮霉素筛选和 *GUS* 染色呈阳性的发状根,以 β -Actin 基因作为内参对照(图 3),进行 RT-PCR 检测。结果显示,转基因和非转基因发状根均能扩增出约 1.7 kb 的特异性目的条带,但是转基因(泳道 2~6)转录本条带比非转基因材料(泳道 1)条带更加明亮,即 *GmNHX1* 基因在转基因发状根中的表达量显著高于非转基因发状根,表明由 CaMV35S 启动子调控的 *GmNHX1* 基因已成功地在转基因发状根中转录。

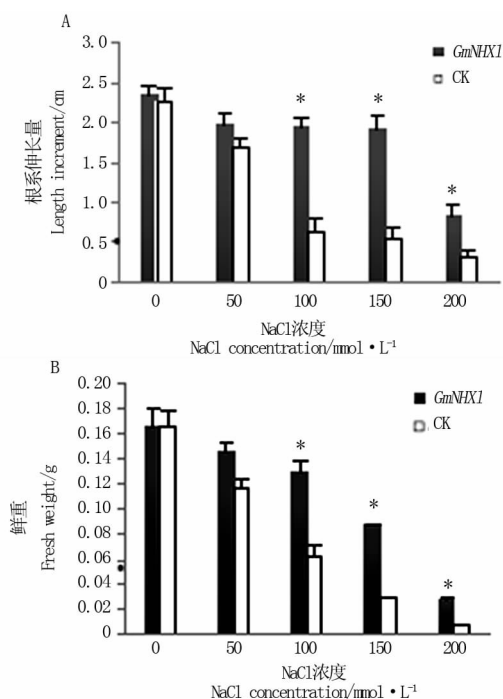


1: 由不含质粒的空菌K599诱导产生的发根; 2~6: 大豆转基因发状根。
1: Negative control(containing no vector); 2-6: Transgenic hairy roots.

图 3 转基因发状根 *GmNHX1* 基因的 RT-PCR 检测
Fig. 3 RT-PCR detection of *GmNHX1* in transgenic hairy roots

2.2 大豆转基因发状根的耐盐性分析

2.2.1 转基因离体发状根的耐盐性分析 在 NaCl 浓度为 0 或 50 mmol·L⁻¹ 时,不论在固体培养基中还是在液体培养基中,大豆转基因发状根和对照生长状况差异均不明显。但在高浓度 NaCl 条件下,培养基的状态对发状根的生长有一定影响。在固体培养基中,NaCl 浓度为 100、150 和 200 mmol·L⁻¹ 时,转基因发状根长度净增长量和鲜重显著高于对照(图 4)。其中,在含有 150 mmol·L⁻¹ NaCl 的固体培养基中,转基因发状根的长度增加量约是对照的 4 倍(图 4-A),重量也达到了 3 倍(图 4-B)。而在液体培养基中,只有在 150 和 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处



A. 转GmNHX1基因发状根与对照根长度增加量比较;
B. 转GmNHX1基因发状根与对照根鲜重量的比较。
A. Length increment of transgenic hairy roots and the control;
B. Fresh weight of transgenic hairy roots and the control.

* 差异极显著 ($P < 0.01$)。* Significantly different at 0.01 probability level.

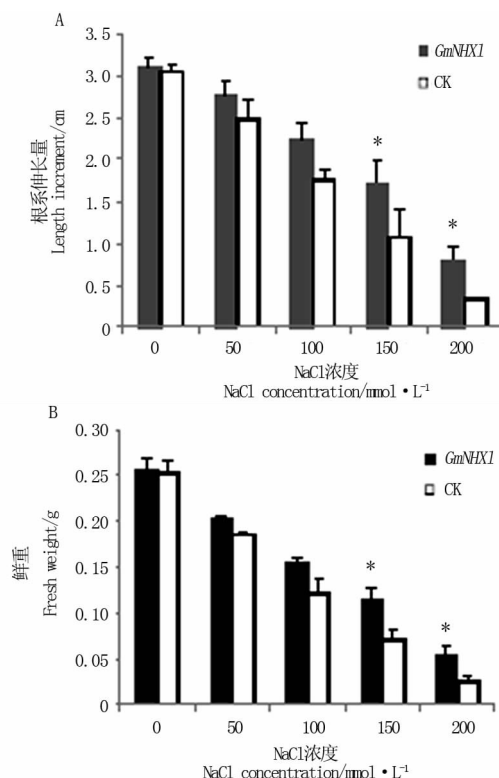
图4 固体培养基中不同浓度NaCl胁迫下转基因与非转基因发状根长度增加量和鲜重的比较
Fig.4 Comparison between transgenic hairy roots and the control in length increment and fresh weight under various NaCl concentrations

理下,转基因发状根净增长量和鲜重显著高于对照(图5)。

2.2.2 从子叶上诱导产生的发状根的耐盐性分析

将带子叶的转基因发状根和非转基因发状根转移至含有不同浓度NaCl的固体MS培养基中培养15 d。结果显示,在NaCl浓度分别为50、100和150 mmol·L⁻¹的培养基上,转基因发状根的生长状况明显优于对照,且发状根的数量和重量均显著大于对照;但在200 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下,含GFPGUS-Plus-GmNHX1的发根农杆菌和不含外源表达载体的发根农杆菌K599菌株侵染大豆子叶节均不能诱导产生正常的发状根(图6和图7)。

2.2.3 复合体植株的耐盐性分析 含转基因发状根的复合体植株和对照在0、50 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫条件下长势良好,差异不显著;但在100和150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下,复合体植株发状根鲜重极显著高于对照;在含200 mmol·L⁻¹ NaCl培养基中,2种复合体植株生长均受到明显抑制(图8和图9)。



A. 转GmNHX1基因发状根与对照根长度增加量比较;
B. 不同浓度NaCl胁迫下转GmNHX1基因发状根与对照根鲜重量比较。
A. Length increment of transgenic hairy roots and the control;
B. Fresh weight of transgenic hairy roots and the control.

* 差异极显著 ($P < 0.01$)。* Significantly different at 0.01 probability level.

图5 液体培养基中不同浓度NaCl胁迫下转基因与非转基因发状根长度增加量和鲜重的比较
Fig.5 Comparison between transgenic hairy roots and the control in length increment and fresh weight under various NaCl concentrations

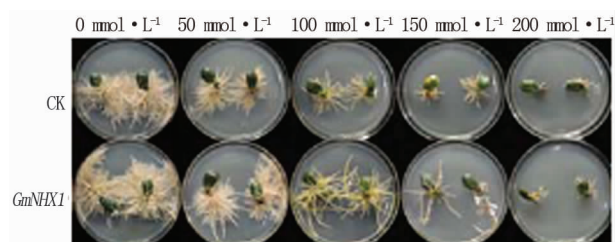
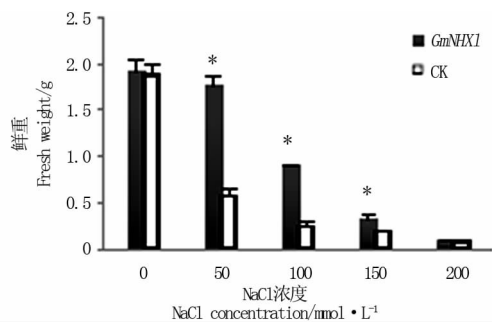


图6 从子叶上诱导产生的发状根在固体培养基上的表现
Fig.6 Performances of hairy roots induced from cotyledons on solid culture medium with NaCl stress

3 讨论

近年来,植物逆境分子生物学研究进展迅速,已将一些抗盐基因转入目标植物,提高了其耐盐性,从而开辟了耐盐植物品种选育的新途径^[25-26],弥补了常规育种方法的不足。



* 差异极显著 ($P < 0.01$)。* Significantly different at 0.01 probability level.

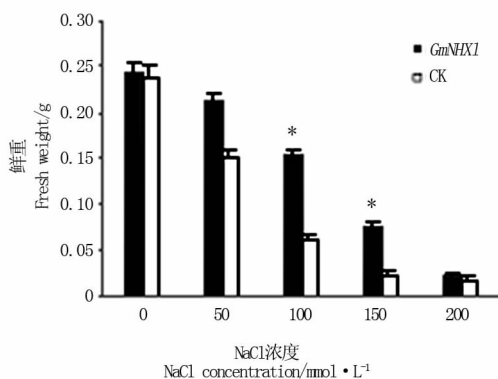
图7 固体培养基中不同浓度 NaCl 胁迫下带子叶转基因发状根与对对照鲜重的比较

Fig. 7 Fresh weight between transgenic hairy roots induced from cotyledons and the control under various NaCl concentrations



图8 大豆复合体植株在含有不同浓度 NaCl 的固体培养基上的生长情况

Fig. 8 Performances of various soybean composite plants on solid culture medium with NaCl stress



* 差异极显著 ($P < 0.01$)。* Significantly different at 0.01 probability level.

图9 固体培养基中不同浓度 NaCl 胁迫下复合体植株与对照根系鲜重的比较

Fig. 9 Comparison of fresh weight between composite plants and the control under various NaCl concentrations

快速鉴定候选基因在目标作物中的育种价值,是培育转基因品种的前提,而在大豆遗传转化较为困难的限制下,实现候选基因育种价值的批量评价还有一定难度。发根农杆菌转化可在一定程度上弥补大豆遗传转化率低不足。由发根农杆菌诱导产生的发状根来源于同一个植物细胞,每个转基因发状根可代表一个独立的转化事件,且遗传操作简便、转化效率高^[27-29]。利用发根农杆菌转化系统的这些特点可批量评价耐盐基因,进而筛选关键基因,开展转基因大豆育种工作。如能利用大豆转基因发状根获得再生植株,则可为大豆的遗传转化带来新的突破。

根部排盐和地上部细胞对盐的区域化集中是植物耐盐性的重要途径^[30]。大量研究表明,细胞内过多的 Na^+ 从质膜向细胞外的排放和 Na^+ 在液泡中的区隔化分别是由位于质膜和液泡膜上的 Na^+/H^+ 反向转运蛋白完成的^[31]。 Na^+/H^+ 反向转运蛋白是一种 Na^+/H^+ 反向运输体,在植物渗透调节中发挥重要作用,同时还可减小细胞毒性^[12]。Staal 等^[32]对耐盐和敏盐车前基因型中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活力进行比较,证明在耐盐基因型中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是由盐胁迫诱导表达的,而在敏盐材料中,未检测到 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活性,由此可见, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的活力在不同基因型中存在明显差异。该研究利用发根农杆菌介导法将大豆 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *GmNHX1* 转入中度耐盐物种大豆的根系中,证明其过表达可在一定程度上提高大豆根系的耐盐性,为进一步利用该基因培育转基因大豆品种提供了依据。

参考文献

- [1] Lee G J, Boerma H R, Villagarcia M R, et al. A major QTL conditioning salt tolerance in S-100 soybean and descendent cultivars [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 109 (8): 1610-1619.
- [2] Li F W Y, Wong F L, Tsai S N, et al. Tonoplast-located *GmCLC1* and *GmNHX1* from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells [J]. Plant, Cell and Environment, 2006, 29(6): 1122-1137.
- [3] Li F W Y, Shao G, Lam H M. Ectopic expression of *GmPAP3* alleviates oxidative damage caused by salinity and osmotic stresses [J]. New Phytologist, 2008, 178(1): 80-91.
- [4] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21* and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(5):

- 486-503.
- [5] Di R, Purcell V, Collins G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. *Plant Cell Reports*, 1996, 15(10):746-750.
 - [6] Hinchey M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Nature Biotechnology*, 1988, 6(8):915-922.
 - [7] Stewart C N J, Adang M J, All J N, et al. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIac* gene[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(1):121-129.
 - [8] 于洋, 侯文胜, 韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展[J]. *大豆科学*, 2010, 29(4):696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in soybean[J]. *Soybean Science*, 2010, 29(4):696-701.)
 - [9] Yan B, Srinivasa Reddy M S, Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(11):1090-1097.
 - [10] Cao D, Hou W, Song S, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2009, 96(1):45-52.
 - [11] Wyn Jones R G. Salt tolerance[M]//Johnson C B. Physiological processes limiting plant productivity, Butterworths, London-Boston, 1981:271-292.
 - [12] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, 285(5431):1256-1258.
 - [13] Fukuda A, Yazaki Y, Ishikawa T, et al. Na^+/H^+ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots[J]. *Plant Cell Physiology*, 1998, 39(2):196-201.
 - [14] Waditee R, Hibino T, Nakamura T, et al. Overexpression of a Na^+/H^+ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(6):4109-4114.
 - [15] Gao X, Ren Z, Zhao Y, et al. Overexpression of SOD2 increases salt tolerance of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4):1873-1881.
 - [16] Shi H, Lee B H, Wu S J, et al. Overexpression of a plasma membrane Na^+/H^+ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 21(1):81-85.
 - [17] Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, et al. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(22):12832-12836.
 - [18] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(8):765-768.
 - [19] Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, et al. Introduction of a Na^+/H^+ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice[J]. *FEBS Letters*, 2002, 532(3):279-282.
 - [20] Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(2):146-159.
 - [21] Xue Z Y, Zhi D Y, Xue G P, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ [J]. *Plant Science*, 2004, 167(4):849-859.
 - [22] Vickers C E, Schenk P M, Li D, et al. pGFPGUS-Plus, a new binary vector for gene expression studies and optimizing transformation systems in plants [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(11):1793-1796.
 - [23] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO Journal*, 1987, 6(13):3901-3907.
 - [24] Sieburth L E, Meyerowitz E M. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically[J]. *Plant Cell*, 1997, 9(3):355-365.
 - [25] 周宜君, 冯金朝, 马文文, 等. 植物抗逆分子机制研究进展[J]. 中央民族大学学报(自然科学版). 2006, 15(2):169-176. (Zhou Y J, Feng J C, Ma W W, et al. Progress of molecular mechanism of stress resistance in plants[J]. *Journal of the Central University for Nationalities (Natural Science Edition)* 2006, 15(2):169-176.)
 - [26] 杨晓慧, 蒋卫杰, 魏珉, 等. 提高植物抗盐能力的技术措施综述[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(1):88-91. (Yang X H, Jiang W J, Wei M, et al. The technical approaches of improving the plant salt-resistant ability[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(1):88-91.)
 - [27] Kereszt A, Li D, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4):948-952.
 - [28] 陈敏, 王和勇, 廖志华, 等. 发根农杆菌介导的药用植物遗传进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(3):98-102. (Chen M, Wang H Y, Liao Z H, et al. Review of studies on medicinal plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2000, 12(3):98-102.)
 - [29] Petit A, David C, Dahl G A, et al. Further extension of the opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation[J]. *Molecular and General Genetics*, 1983, 190(2):204-214.
 - [30] Blumwald E, Poole R J. Na^+/H^+ antiporter in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiology*, 1985, 78(1):163-167.
 - [31] Repishti M, Hogan D L, Pratha V, et al. Human duodenal mucosal brush border Na^+/H^+ exchangers NHE2 and NHE3 alter net bicarbonate movement[J]. *American Journal of Physiology*, 2001, 281(1):159-163.
 - [32] Staal M, Maathuis F J M, Elzenga J T M, et al. Na^+/H^+ antiporter activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media* [J]. *Physiologia Plantarum*, 1991, 82(2):179-184.