

转 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 (*AlNHX1*) 大豆纯合系筛选及生理分析

董丽君¹, 刘灵娣², 车文利³, 张书玲¹, 杜 环¹, 高佳佳¹, 刘建凤¹

(1. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 河北省农林科学院 经济作物研究所, 河北 石家庄 050051; 3. 廊坊市农林科学院 作物研究所, 河北 廊坊 065000)

摘要: 为了获得转 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 (*AlNHX1*) 大豆纯合株系并验证其盐胁迫条件下生理反应, 对转 *AlNHX1* 基因 T₃ 代材料进行了 PCR 筛选和 RT-PCR 鉴定, 并在水培条件下研究了纯合系植株耐盐性、K⁺/Na⁺ 比值、丙二醛 (MDA)、过氧化氢 (H₂O₂) 含量和相关抗氧化酶活性变化。结果显示经 PCR 和 RT-PCR 鉴定, 野生型植株没有出现目的条带, 而转基因株系有相应的目的条带, 表明 *AlNHX1* 基因已经整合到大豆基因组中并正常转录。在盐胁迫条件下, 转基因各株系成活率明显高于野生型对照, 地上部干重和根部干重较野生型显著增加, 达到了显著差异水平 ($P < 0.05$)。此外, 在盐胁迫条件下, 转基因幼苗能维持根和叶中较高的 K⁺/Na⁺ 比值, 同时伴随着植株体内 MDA 和 H₂O₂ 含量的下降以及超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化酶 (POD) 的增加。本研究结果表明供试外源 *AlNHX1* 基因在大豆高代材料中超表达, 提高了转基因大豆耐盐能力, 可为进一步培育适应盐渍化土壤环境下生长的大豆新品种提供重要的种质资源。

关键词: 大豆 (*Glycine max* L.); 钠氢逆向转运蛋白基因 (*AlNHX1*); 转基因植株; 耐盐能力

中图分类号: S521 **文献标识码:** A **DOI:** 10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 03. 0378

Screening of Homogeneous Transgenic Lines with Na⁺/H⁺ Antiporter Gene (*AlNHX1*) in Soybean and Its Physiological Analysis

DONG Li-jun¹, Liu Ling-di², CHE Wen-li³, ZHANG Shu-ling¹, DU Huan¹, GAO Jia-jia¹, LIU Jian-feng¹

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Institute of Cash Crops, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 3. Crops Institute of Academy of Agricultural and Forestry Sciences of Langfang, Langfang 065000, China)

Abstract: To develop a salt-tolerant soybean cultivar (*Glycine max* L.), a Na⁺/H⁺ antiporter gene *AlNHX1* from *Aeluropus litoralis* was successfully expressed in soybean cultivar TF-29. Further, to obtain homogeneous transgenic lines with expression of *AlNHX1* gene and to identify the salt-tolerant ability of the transgenic soybean plants, PCR amplification and RT-PCR detection, plant growth performance, K⁺/Na⁺ ratio, MDA and H₂O₂ and the change of antioxidant enzyme activity of transgenic soybean plants were analyzed under hydroponic condition. The results showed that *AlNHX1* gene had been integrated into the soybean genome and expressed in transgenic lines. Under 150 mmol·L⁻¹ NaCl salt stress, transgenic lines showed a significant increase in rate of survival, its shoot dry weight and root dry weight reached significant level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) compared with wild type plants. The different phenotypes of transgenic soybean and wild type plants were also observed, the transgenics displayed robust performance whereas growth by WT plants was significantly reduced under stress conditions. Also, a higher ratio of K⁺ to Na⁺ in the leaves and roots of the transgenic plants was retaining, accompanied with the decline of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) and the higher activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) under salt stress. These findings proved that over-expression of exogenous *AlNHX1* in soybean have enhanced salt tolerance, and they have significant implications for increasing crop yields on high-salinity soils.

Keywords: Soybean (*Gossypium hirsutum* L.); Na⁺/H⁺ antiporter gene (*AlNHX1*); Transgenic plant; Salt-tolerance ability

我国土壤盐渍化程度较重, 盐碱地面积达4 000 万 hm², 且呈逐年增加趋势, 以致作物产量降低。尤其, 大豆是对盐分较敏感的作物, 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, 而且可减少根瘤、降低生物产量甚至引起植物死亡^[1]。因此, 开发利用盐碱地, 提高盐碱地大豆产量对于提高我国大豆产量具有重要意义^[2]。采用基因工程分子技术培育耐盐性强的大豆品种, 充分

利用和开发大面积的盐碱化土地, 将具有广阔的应用前景。

Na⁺/H⁺ 逆向运输蛋白备受人们关注, 是植物耐盐的关键因子之一。研究发现转化该耐盐基因能够明显地改善大豆植物的耐盐性^[3-4]。Cao 等^[5]利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 转化法, 将小麦抗盐基因 *TANHX2* 导入大豆毛状根中, 结果发现经盐胁迫处理后, 转基因植株表现出极强的耐

收稿日期: 2014-08-28
基金项目: 河北大学引进人才启动项目 (2011-221); 保定市科学技术研究与发展指导计划项目 (11ZF096); 生物学强势特色学科资助。
第一作者简介: 董丽君 (1981-), 女, 硕士, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: donglijun1024@163.com。
通讯作者: 刘建凤 (1979-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物分子育种研究。E-mail: jianfengliu@hbu.edu.cn。

盐性,而对照植株则出现萎蔫并在 15 d 内死亡。同时采用根癌农杆菌法把 *TANHX2* 转入大豆中,亦发现大豆转基因植株耐盐性明显提高。王敏娟等^[6]利用发根农杆菌介导法,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,提高了大豆的耐盐性。转 ABA8'-羟基化酶基因沉默载体大豆在盐胁迫条件下的生长状态和生理指标检测结果表明转化的 ABA8'-羟基化酶基因沉默载体调控了大豆对盐胁迫的积极应答,提高了大豆的耐盐性^[7]。可见,外源 *NHX* 基因的导入可以改善大豆植株耐盐胁迫能力。

本课题组已利用子房滴注转化方法获得了转 *AlNHX1* 基因大豆转基因材料,并初步对转基因阳性植株进行了耐盐性分析,发现转基因植株的耐盐性有了明显提高^[8-9]。现继续对转基因材料自交后代(T_3 代)进行分析,研究转基因株系是否达到纯合以及其在盐胁迫条件下植株长势和相关的生理反应,为进一步培育耐盐能力强的大豆新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*AlNHX1*)植物表达载体,由大连理工大学安利佳教授提供;转 *AlNHX1* 基因铁丰-29 T_3 代种子,由本课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 转基因植株的 PCR 筛选 选取 3 个转基因株系的部分植株 S4(55 株),S10(63 株)和 S24(58 株)进行 PCR 检测。用 CTAB 法提取大豆基因组 DNA,分别对转基因植株与野生型的 DNA 进行 PCR 扩增,引物为:上游引物:5'-GCACCTTCCTTGAGT-GTTTGCT-3',下游引物:5'-GGTACCGTCAAAGTCT-TCGTTTTCTCTCA-3'。扩增体系为 20 μL :10 \times PCR Buffer 2.0 μL 、2.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 2 μL 、0.1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的上游引物和下游引物各 1.0 μL 、模板 DNA 100 ng、2.5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq DNA 聚合酶 0.2 μL 、ddH₂O 12.8 μL 。PCR 扩增程序:95℃ 4 min;95℃ 50 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环后,72℃ 延伸 5 min,10℃ 保温。

为了检测转化植株中 *AlNHX1* 基因是否表达,进行了 RT-PCR 检测。采用 Trizol RNA 提取试剂提取部分转基因的纯系和野生型大豆的 RNA,分别取 10 μL RNA,2.0 μL Oligo dT,70℃ 5 ~ 10 min,冰浴 5 min,再加入 4 μL 5 \times RT buffer,1.0 μL dNTP(10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$),2.0 μL MgCl₂,0.5 μL RNase Inhibitor,0.5 μL AMV 反转录酶,反应体积 20 μL ,37℃ 1 h;

70℃ 10 min。以反转录产物作为模板,利用 AF、AR 引物进行 PCR 扩增,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统照相。

1.2.2 成活率统计 根据大豆生长特性,在吴畏等^[10]方法基础上略有改进。将供试大豆种子(T_3 代转基因大豆种子和对照野生型种子)经浸种催芽后,播种到珍珠岩基质中,每天浇灌 50 mL 清水。待第 3 片真叶展开时,即播种后 10 d 开始进行盐胁迫,每天浇灌 1 次 50 mL 150 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl。每隔 2 d 浇灌 1 次清水,以免造成盐分积累。盐胁迫 10 和 20 d 后,调查幼苗成活率。

1.2.3 K^+ 和 Na^+ 含量离子测定 分别收获盐胁迫处理 20 d 植株幼苗地上部叶片和根部,置于恒温干燥箱中 120℃ 杀青 2 h,然后 80℃ 烘干至恒重。准确称取烘干样品 0.1 g 于 100 mL 三角瓶中,加入 10 mL 浓硝酸与高氯酸混合液(4:1,v/v)消化 24 h。高温加热至生成大量白烟且溶液由棕黄色变为无色为止,冷却至室温,分别加入去离子水定容至 100 mL。空白对照为去离子水,重复 3 次。使用火焰光度计(FP6410,上海精密仪器仪表有限公司)测定 K^+ 、 Na^+ 含量,并计算 K^+/Na^+ 比值。

1.2.4 过氧化氢(H_2O_2)含量的测定 采用紫外吸收法,参照蒋明义和郭绍刚的方法^[11]进行测定。

1.2.5 丙二醛含量的测定 采用硫代巴比妥酸法,参照汤章城主编的《现代植物生理学实验指南》^[12]进行测定。

1.2.6 SOD 与 POD 活性 叶片 SOD 与 POD 活性测定参照 Prochazkova^[13]的方法。

1.3 数据分析

试验数据均采用 Origin 7.5 进行统计分析,差异显著性比较采用 *t* 检验法。

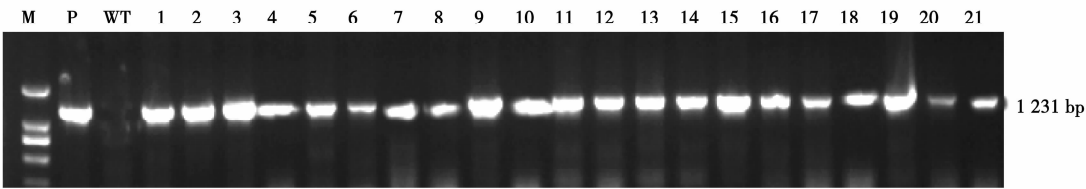
2 结果与分析

2.1 转基因纯合株系的筛选

对子房滴注法获得的 T_3 代转基因株系 S4、S10 和 S24 进行 PCR 检测,结果来源于 S4 的 54 株、S10 的 61 株和 S24 的 56 株均为 PCR 阳性植株。部分株系后代植株扩增结果见图 1,结果表明 S4、S10 和 S24 株系可能达到转基因纯合。

2.2 转基因植株的 RT-PCR 鉴定

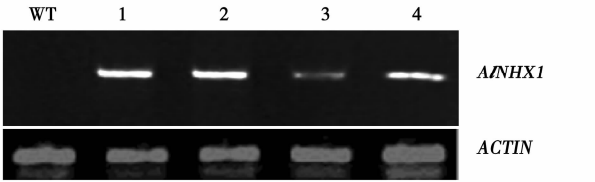
提取经 PCR 检测为阳性的部分转化植株及野生型对照植株的总 RNA,进一步做 RT-PCR,分析转化植株中 *AlNHX1* 基因在 RNA 水平上的表达情况,结果发现转化植株中 *AlNHX1* 基因已正常转录,而野生型植株没有出现相应的扩增条带(图 2),说明在转化植株中 *AlNHX1* 基因已在转录水平上。



M:DL2000;WT:野生型植株;P:pUC119-NHX 质粒 DNA;1~21:转基因植株。
M: DNA Marker DL2000; WT: Wild-type plant; P: pUC119-NHX plasmid; 1-21: Transgenic plants.

图1 T₃代转基因株系 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of T₃transgenic line



WT:野生型植株;1~4: 转 *AINHX1* 基因大豆植株。
WT: Wild type plant; 1-4: Transgenic soybean plants.

图2 T₃代转 *AINHX1* 基因大豆的 RT-PCR 分析

Fig. 2 RT-PCR analysis of T₃ generation
AINHX1-transgenic soybean

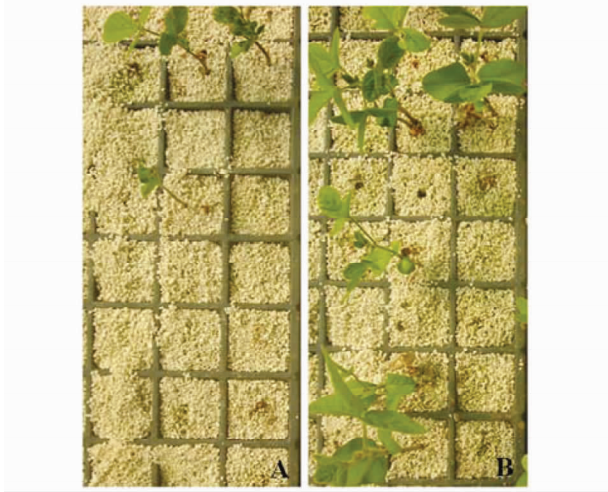
2.3 *AINHX1* 基因表达株系的耐盐性

3 个转基因株系在盐胁迫 10 d 时,S4、S10 成活率较野生型(49%)分别增加了 21.1% 和 16.3%,而 S24 成活率与野生型差异不大;胁迫 20 d 时,各转基因株系成活率下降比例明显低于野生型。其中 S4 的成活率始终最高(表 1)。同时对盐胁迫 20 d 后的幼苗植株观察发现,对照表现出植株弱小、萎蔫和黄化等明显的盐害症状,而转化材料植株盐伤害症状不明显,生长基本正常(图 3)。

表 1 盐筛后的转 *AINHX1* 基因大豆后代的耐盐性分析

Table 1 Stress tolerance assessment for *AINHX1* transgenic soybean progeny after salt stress

株系 Lines	盐胁迫前株数 No. of seedlings before salt stress	处理 10 d 剩余株数 No. of seedlings after 10 d stress	处理 20 d 剩余株数 No. of seedlings after 20 d stress	处理 10 d 时成活率 Rate of survival after 10 d stress/%	处理 20 d 时成活率 Rate of survival after 20 d stress/%
WT	100	49	6	49.0	6.0
S4	151	106	75	70.2	49.7
S10	121	79	36	65.3	29.8
S24	90	40	23	44.4	25.6



进一步测定转基因株系(S4,S10 和 S24)与野生型(WT)T₃代幼苗植株盐胁迫 20 d 后植株干重。结果表明在正常处理条件下,转基因植株与野生型植株地上部和根部干重没有显著差异,而胁迫处理 20 d 后,转基因各株系植株地上部干重较野生型对照分别增加了 35.8%、37.7% 和 35.8%,根部干重分别增加了 40%、36% 和 20%,均达到显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)差异水平(表 2)。表明在外界盐胁迫条件下,*AINHX1* 基因的表达能够促进转基因大豆植株生长发育,主要表现为地上部和根部干重的增加,增强植株对盐胁迫的应答能力。

图3 盐胁迫 20 d 后野生型植株(A)与转基因大豆幼苗(B)的长势。

Fig. 3 The growth performance of wild type plants (A) and transgenic plants (B) for 20-day salt treatment

表 2 盐胁迫处理对转基因株系和野生型大豆植株干重影响
Table 2 Effect of salt stress on dry weight in transgenic and wild type soybean plant

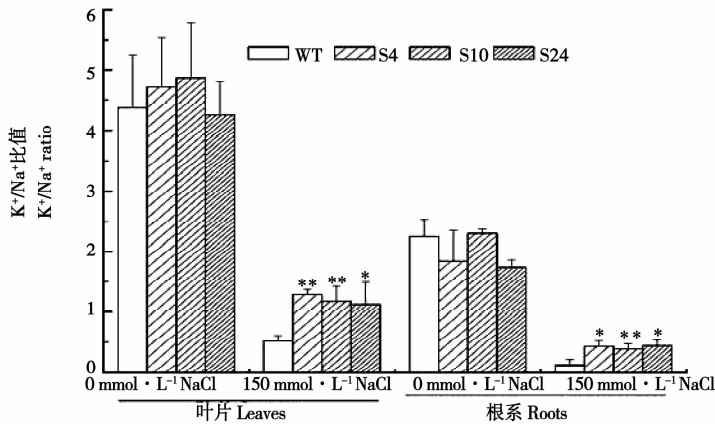
株系 Lines	地上部干重/Shoot dry weight /g		根部干重/Root dry weight/g	
	0 mmol·L ⁻¹	150 mmol·L ⁻¹	0 mmol·L ⁻¹	150 mmol·L ⁻¹
WT	0.79 ± 0.10	0.53 ± 0.09	0.42 ± 0.02	0.25 ± 0.02
S4	0.82 ± 0.17	0.72 ± 0.11 *	0.45 ± 0.02	0.35 ± 0.01 * *
S10	0.76 ± 0.08	0.73 ± 0.10 * *	0.43 ± 0.05	0.34 ± 0.02 *
S24	0.81 ± 0.11	0.72 ± 0.01 *	0.40 ± 0.07	0.30 ± 0.06 *

数据为平均值 ± 标准差, n = 3 (* 5% 水平差异显著, * * 1% 水平显著)。
Data are presented as means ± S. D. (n = 3). (*, P < 0.05, * *, P < 0.01).

2.4 *AlNHX1* 基因表达株系的 K⁺/Na⁺ 比值

分别对转基因大豆与野生型对照植株叶片和根系的 K⁺/Na⁺ 比值统计结果显示, 对照处理各转基因植株叶片和根中的 K⁺/Na⁺ 比值含量未表现出显著性差异, 而在盐胁迫处理 20 d 后转基因各株系叶片中的 K⁺/Na⁺ 比值较野生型对照分别提高了 1.48, 1.27 和 1.17 倍, 均表现为显著 (P < 0.05) 或

极显著 (P < 0.01) 差异 (图 4), 同时根中的 K⁺/Na⁺ 比值较野生型对照分别提高了 2.31, 2.00 和 2.38 倍, 差异亦均达到显著水平 (P < 0.05) 或极显著 (P < 0.01) 差异 (图 4)。说明在外界盐胁迫条件下, *AlNHX1* 能够在提高转基因大豆细胞内较高离子浓度的同时提高了胞内 K⁺/Na⁺ 比值, 进而有利于维持细胞的正常代谢过程, 并提高了大豆的耐盐性。



数据为平均值 ± 标准差, n = 3 (* 1% 水平差异显著, * 5% 水平差异显著, 下同)。
Data are the mean ± SD of three independent measurements (* * P < 0.01, * P < 0.05. The same below).

图 4 盐胁迫下 T₃ 代转基因大豆叶片与根中的 K⁺/Na⁺

Fig. 4 The K⁺/Na⁺ in leaves or roots of soybean (T₃ generation) under salt stress

2.5 *AlNHX1* 基因表达株系的 H₂O₂ 和 MDA 含量

植物在逆境下遭受伤害与活性氧积累诱发及膜质过氧化作用密切相关。因此本研究进一步对转基因大豆胞内 H₂O₂ 和 MDA 进行检测, 结果显示, 对照处理的各转基因大豆叶片组织中的 H₂O₂ 和 MDA 含量与野生型对照比较均未表现出显著性差异, 而处理 20 d 后转基因大豆各株系叶片中 H₂O₂ 较野生型对照分别降低了 32.1%、22.6% 和 38.2%, 差异均达到显著 (P < 0.05) 或极显著 (P < 0.01) 水平 (图 5); 其叶片中的 MDA 较野生型对照分别降低了 30.7%、36.7% 和 40.3%, 亦均达到显著 (P < 0.05) 或极显著 (P < 0.01) 差异水平 (图 5)。表明转基因植株在细胞水平上抗氧化胁迫能力较

强, 进而使转基因植株受到盐胁迫伤害较小。

2.6 *AlNHX1* 基因表达株系的 POD 和 SOD 活性

对图 6 所示对照处理的各转基因大豆叶片组织中的 POD 和 SOD 的活性与野生型对照比较均未表现出显著性差异, 而处理 20 d 后转基因大豆各株系叶片中 POD 活性较野生型对照分别提高了 60.6%、83.5% 和 95.2%, 均达到显著 (P < 0.05) 或极显著 (P < 0.01) 差异水平 (图 6); 其叶片中的 SOD 活性较野生型对照分别提高了 53.9%、63.7% 和 51.8%, 亦均达到显著 (P < 0.05) 或极显著 (P < 0.01) 差异水平 (图 6)。表明 *AlNHX1* 的表达能够促进一些保护酶类的活化, 提高氧化酶的活性, 有利于体内超氧离子的清除。

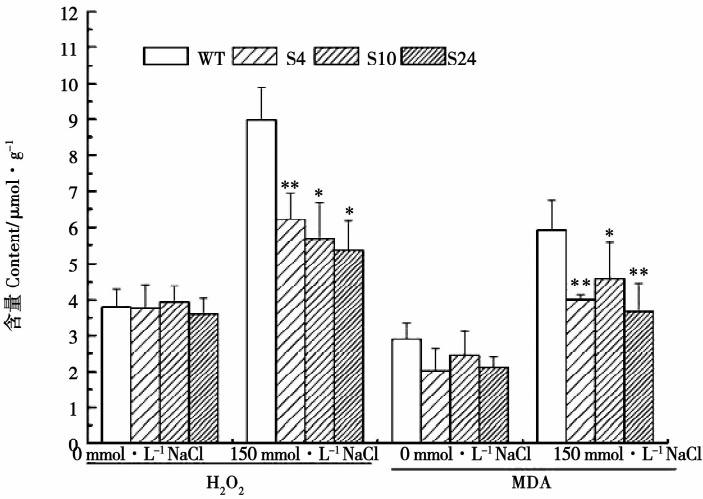


图 5 盐胁迫下转 *AtNHX1* 基因与野生型大豆 H_2O_2 和 MDA 含量的变化

Fig. 5 The content of H_2O_2 and MDA in leaves of transgenic soybean (T_3 generation) under salt stress

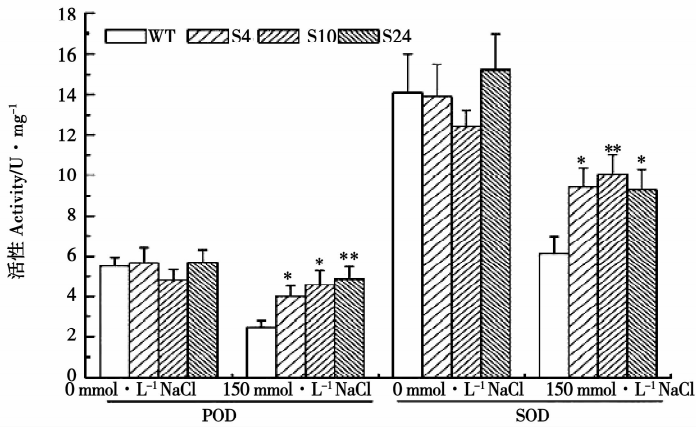


图 6 盐胁迫下转 *AtNHX1* 基因与野生型大豆 POD 和 SOD 活性的变化

Fig. 6 The activity of POD and SOD in leaves of transgenic soybean (T_3 generation) under salt stress

3 讨 论

植物细胞液泡膜 Na^+/H^+ 反向转运蛋白是一种调控 Na^+ 和 H^+ 跨膜转运的膜蛋白,可将细胞中过多的 Na^+ 区隔化进液泡,调节渗透压和平衡离子等活动,从而赋予植物耐盐性。它是第一个真正被用来改良农作物耐盐性的优良基因。随后,人们发现拟南芥 *NHX1* 基因家族 6 个基因被标注为编码 Na^+/H^+ 反向转运蛋白的功能成员,表明植物通过液泡的 Na^+ 区隔化来进行 Na^+ 均衡的调节非常重要。近年来,对 *NHX1* 基因家族的研究有了更深入的了解,并在拟南芥^[14]、油菜^[15]、大豆^[8]等植物中过量表达 Na^+/H^+ 反向转运蛋白基因能显著提高植物的抗逆性。本课题组在前期研究中已获得 3 个转 *AtNHX1* 基因 T_2 代株系(S4,S10 和 S24)^[9]。本研究中,通过对这 3 个株系自交后代的 PCR 检测发现,阳性率为 100%,从而进一步验证了株系 S4、S10 和 S24 的 *AtNHX1* 基因已达到纯合。在盐胁迫条件下

转基因株系后代成活率和各植株长势明显高于野生型,这些结果进一步表明转基因已达到了转基因纯合,且外源基因的表达提高了转基因植株的耐盐性。

植物细胞内维持较高的 K^+/Na^+ 对于植物进行正常的生命活动具有重要作用^[16]。在本研究中,通过对 150 mmol · L⁻¹ NaCl 盐胁迫处理 20 d 的转基因大豆植株叶片和根部的 K^+/Na^+ 含量的测定可以看出转基因大豆的叶片内 K^+/Na^+ 明显高于野生型对照大豆植株。前人的研究表明,在转基因水稻 *OsNHX1* 基因的转基因黑麦草和转基因拟南芥 *AtNHX1* 基因的转基因小麦中,其植株叶片内 K^+/Na^+ 比值明显高于野生型对照植株^[17-18],本试验结果与之相一致。另外,植物在盐胁迫条件下,体内活性氧代谢会加强,从而使 H_2O_2 发生累积,而 MDA 与植物逆境下遭受伤害与活性氧积累诱发的膜质过氧化作用密切相关^[19];在逆境条件下,植物体内的活性氧自由基的产生速度超出了植物清除活性氧的能力,引起活性氧积累,从而引起伤害。因此,也常以抗氧化物酶

(SOD 和 POD) 活性高低作为作物抗逆性的指标^[20]。本研究表明,在盐胁迫条件下转基因各株系植株叶片的 H₂O₂ 和 MDA 含量均较野生型对照明显降低,转 *AlNHX1* 基因大豆的 SOD 活性和 POD 活性比未转化植株高,与本课题组前期数据结果一致^[9]。因此,本研究进一步说明,在盐胁迫下转基因植株体内 *AlNHX1* 基因表达产物的积累,提高了转基因纯合株系植株体内 K⁺/Na⁺ 比值,维持了植株细胞内正常的活性氧代谢和正常的生理生化反应,从而提高了转基因植株的耐盐性。

参考文献

[1] Launchli A. Salt exclusion: an adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions[M]// Staples RC, Toeniessen G H. Salinity tolerance in plants. Strategies for crop improvement. New York:Wiley, 1984:171-187.

[2] Maas E V, Hoffman G J. Crop salt tolerance current assessment [J]. Journal of Irrigation and Drainage Engineering-asce, 1977, 103(2): 115-134.

[3] 陈观平,王慧中,施农农,等. Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白与植物耐盐性关系研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(5): 101-106. (Chen G P, Wang H Z, Shi N N et al. Research the advance on the relation of Na⁺/H⁺ antiporter protein and salt tolerance [J]. China Biotechnology, 2006, 26(5): 101-106.)

[4] Blumwal E. Sodium transport and salt tolerance in plants [J]. Cell Biology, 2000, 12: 431-434.

[5] Cao D, Hou W S, Liu W, et al. Overexpression of *TANHX2* enhances salt tolerance of ‘composite’ and whole transgenic soybean plants [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2011, 107(3): 541-552.

[6] 王敏娟,侯文胜,王庆钰,等. 过表达 *GmNHX1* 基因提高大豆根系的耐盐性[J]. 大豆科学, 2011, 30(6): 889-894. (Wang M J, Hou W S, Wang Q Y, et al. Enhancing salt tolerance of soybean roots by overexpression of *GmNHX* [J]. Soybean Science, 2011, 30(6): 889-894.)

[7] 魏立兴. *GmABA 8’ OH* 基因在大豆中的表达及耐盐性分析 [D]. 长春:东北师范大学, 2012. (Wei L X. The expression of *GmABA8’ OH* gene and the analysis of salt tolerance in soybean [D]. Changchun;Northeast Normal University, 2012.)

[8] 刘建凤,崔栗,安利佳. 转 *AlNHX1* 基因大豆后代遗传稳定性及耐盐性分析[J]. 河北大学学报, 2012, 32(2): 173-179. (Liu J F, Cui L, An L J. Genetic stability analysis and salt tolerance of the progenies of soybean transformed *AlNHX1* gene [J]. Journal of Hebei University, 2012, 32(2): 173-179.

[9] Liu J F, Zhang S L, Dong L J, et al. Incorporation of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Aeluropus littoralis* confers salt tolerance in soybean [J]. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 2014, 51(1): 58-65.

[10] 吴畏,苏乔,刘建凤,等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因玉米的田间筛选及生理分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(4): 612-614. (Wu W, Su Q, Liu J F, et al. Screening in field and physiological analysis on transgenic maize with Betaine aldehyde dehydrogenase gene [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2007, 38(4): 612-614.)

[11] 蒋明义,郭绍刚. 渗透胁迫下水稻铁催化的膜脂过氧化作用 [J]. 植物生理学报, 1996, 22(1): 6-12. (Jiang M Y, Guo S G. Iron catalyst on membrane lipid peroxidation of rice seedling under osmotic stress[J]. Plant Physiology Journal, 1996, 22(1): 6-12.)

[12] 汤章城. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999. (Tang Z C. Guide the modern plant physiology experiment [M]. Beijing: Science Press, 1999.)

[13] Prochazkova R K D, Sairam G C, Srivasava D V. Single oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves [J]. Plant Science, 2001, 161(4): 765-771.

[14] 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.

[15] 王艳,曾幼玲,贺宾,等. 农杆菌介导 *NHX* 基因转化甘蓝型油菜的研究[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 278-282. (Wang Y, Ceng Y L, H B, et al. Research of *NHX* gene transformation in Brassica napus by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Acta Agonomica Sinica, 2006, 32(2): 278-282.)

[16] Viswanathan C, Andre J, Zhu J K. Understanding and improving salt tolerance in plants [J]. Crop Science, 2005, 45(2): 437-448.

[17] Zhan 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]. PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(22): 12832-12836.

[18] Wu Y Y, Chen Q J, Chen M. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene [J]. Plant Science, 2005, 169: 65-73.

[19] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.

[20] Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress [J]. Plant Cell, 2002, 14: 165-183.