

辽棉 19 号转化耐盐基因 *AINHX1* 的研究

丰明 王旭达 王鹤 张高华*

(辽宁省农业科学院 大连生物技术研究, 辽宁 大连 116029)

摘要 为提高辽宁棉花品种的耐盐性,利用农杆菌介导上胚轴外植体转化法,将来源于盐生植物獐茅的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(*AINHX1*)导入棉花辽棉 19 号中,分析影响棉花上胚轴外植体农杆菌转化的几个重要因素,建立并优化了该品种的转化体系,结果表明:1)农杆菌侵染的最佳时间为 90 s,共培养过程中乙酰丁香酮最适浓度为 100 mg/L,筛选培养基中潮霉素最适浓度为 30 mg/L,生根培养基中吲哚乙酸 IBA 的最适浓度为 10 mg/L;2)对转化植株进行 PCR 检测,表明耐盐基因 *AINHX1* 已导入辽棉 19 号中;3)在盐胁迫下,转基因植株的电导率,渗透势都显著低于未转化植株。结果表明,通过筛选并优化转化体系,辽棉 19 号品种的耐盐性有较明显的提升,为沿海滩涂地区种植棉花提供了一定的参考。

关键词 棉花; Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; 农杆菌转化; 上胚轴外植体; 相对电导率; 细胞渗透势

中图分类号 S562; Q945.79 **文章编号** 1007-4333(2017)10-0036-09 **文献标志码** A

Research on transforming salt-tolerant gene *AINHX1* to cotton Liao19

FENG Ming, WANG Xuda, WANG He, ZHANG Gaohua*

(Biotechnology Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Dalian 116029, China)

Abstract Using *Agrobacterium* transformation method, the epicotyl explants of cotton Liao19 were transformed with *Aeluropus* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AINHX1* to improve its salt resistance. We have established and optimized a transformation system was established and optimized to study several important factors on cotton transformation. The results showed that: 1) The optimum *Agrobacterium* infection time was 90 s. In the co-culture medium, the optimum concentration of AS was 100 mg/L. The hygromycin optimal concentration of the cotton filter medium was 30 mg/L. The IBA optimal concentration of rooting medium was 10 mg/L; 2) For all the transformation cottons, PCR test results showed that the salt tolerance gene *AINHX1* was successfully transformed into cotton Liao19; 3) Physiological studies showed that the relative conductivity and osmotic potential of transgenic plants were all significantly lower than non-transgenic ones under the salt stress. This study confirmed that the cotton Liao19 obtained certain salt resistance by screening and optimizing the transformation system and provided reference for the cultivation of cotton in coastal beach area.

Keywords cotton; vacuolar Na^+/H^+ antiporter; *Agrobacterium* transformation; epicotyl explant; relative conductivity; osmotic potential

土壤盐碱化严重危害作物生长,造成耕地面积逐渐减少^[1-3]。目前,改良盐碱化土地有 2 种措施:一是通过工程的方式改良土壤环境来完成;二是通过生物工程的方式来完成。前者是我国治理土壤盐

渍化的主要手段,但耗资巨大,治理后的土地再次盐渍化率较高;后者是近些年开发利用盐碱地种植的首要方式,耗资少,见效快,可以在较大程度上解决土地盐渍化的开发利用问题。

收稿日期: 2016-08-25

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2014027023)

第一作者: 丰明,助理研究员,主要从事植物抗逆基因工程研究,E-mail:fengming820718@hotmail.com

通讯作者: 张高华,助理研究员,主要从事植物抗逆基因工程研究,E-mail:63310265@qq.com

通过基因工程方法将外源基因导入棉花是增强其抗逆能力、提高产量和改良棉纤维品质的有效手段^[4-5]。虽然花粉管通道法和基因枪转化法已被证明可以将外源基因导入棉花^[6-7],但农杆菌转化法仍是棉花转化最常用的方法,其转化机制清晰,转化效率高,在实验室更容易实现,并且棉花是双子叶植物,更易被农杆菌侵染^[8]。常用的转化材料多是棉花下胚轴外植体及胚性愈伤组织,但转化效率低,转化周期长,上胚轴外植体转化法^[9]由于转化周期较短,操作简单和重复性好而被越来越多地应用于棉花的转化抗逆研究。

植物的正常生理代谢以及维持细胞的正常膨压需要保持一个相对较高的 K^+/Na^+ 浓度比,而植物细胞在盐胁迫下, Na^+ 浓度过高会抑制植物对 K^+ 的有效吸收,有效降低植物细胞内 Na^+ 浓度是使植物减轻盐分伤害最直接有效的离子平衡调节方式。这一过程由液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白 (Vacuolar Na^+/H^+ exchanger, 简称 NHX) 来承担^[10-14]。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白将细胞质中过量的 Na^+ 外排以及区域化在液泡中^[15],具有防止 Na^+ 浓度过高对细胞质的毒害以及降低渗透压,维持细胞质内渗透平衡和调节 pH 的功能^[16-19]。獐茅 [*Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl] 是一种广泛生活在我国北方沿海地区内陆盐碱地上的禾本科盐生植物,叶片具有盐腺,固沙能力强,也是在滩涂海边放牧的优良牧草。獐茅可以在 3% 含盐量的土壤 中生长^[20],是一种典型的耐盐性植物。张高华等^[21] 将獐茅作为一种研究植物耐盐机理的有效材料,从其中分离并克隆了耐盐 *NHX* 基因 (*AlNHX1*, AY825361)。*AlNHX1* 基因 cDNA 全长 2 706 bp,其中 5' 非编码区 387 bp,3' 非编码区 696 bp,编码区

1 623 bp,编码 540 个氨基酸的蛋白。利用农杆菌介导的转化方法将 *AlNHX1* 基因组成型表达在烟草中,PCR、Southern 杂交和 Northern 杂交的结果表明 *AlNHX1* 基因已整合到烟草基因组中,并在转录水平上表达,转 *AlNHX1* 基因烟草的耐盐性明显提高^[22]。

辽宁地区棉花过去以传统育种方式为主,品种的耐盐性普遍不高,转基因棉花的研究相对滞后,因此选育一个耐盐性较高的棉花品种具有现实意义。辽棉 19 号是以新棉 33B 为父本,辽棉 205 为母本,经人工杂交系谱选育而成,在苗期、蕾期、花期和铃期等关键时期生长发育能力旺盛,特早熟,成熟时间短,在辽宁等特早熟棉区春播生育期仅为 130 d。该品种抗棉铃虫,高抗黄萎病和枯萎病,品质优良,在辽、冀、鲁以及新疆等地区大面积种植,但该品种抗盐性较差。本研究拟将耐盐 *NHX1* 基因转化到辽棉 19 号中,初步构建针对辽棉 19 号的转化体系并加以优化,旨在进一步验证该基因的功能,为辽宁特有棉花品种的耐盐转化提供参考和借鉴。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 棉花材料

辽棉 19 号,适宜在我国北方辽宁特早熟棉区种植,由辽宁省农业科学院提供。

1.1.2 植物表达载体的构建

将基因 *AlNHX1* 用 *Nco* I, *Nhe* I 双酶切后构建到植物表达载体 pCAMBIA1301 上,获得了植物表达载体 pCAMBIA1301-*AlNHX1*,质粒结构图谱见图 1。植物工程菌 EHA105-pCAMBIA1301-*AlNHX1* 为大连生物技术研究 所保存。

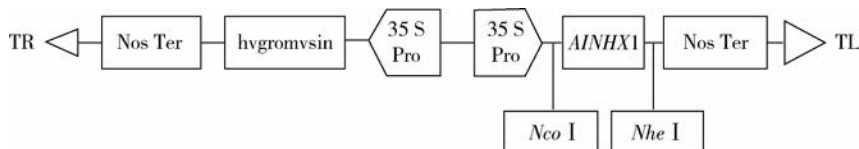


图 1 植物表达载体 pCAMBIA1301-*AlNHX1* 的结构图谱

Fig. 1 Structure of plant expression vector pCAMBIA1301-*AlNHX1*

1.1.3 试验用基础培养基

试验用基础培养基如表 1 所示。

1.2 试验方法

1.2.1 植物工程菌的活化

将实验室保存的植物工程菌 EHA105-

pCAMBIA1301-*AlNHX1* 在含有卡那霉素和利福平的 YEB 培养基上划线培养,28 °C 培养 18 h 活化待用。

1.2.2 农杆菌转化上胚轴外植体过程

农杆菌转化辽棉 19 号上胚轴外植体的方法参照阳立恒等^[9]的方法进行,并根据品种差异,选择影

表1 棉花转化基础培养基

Table 1 Culture media used in the cotton transformation

用途 Application	培养基成分 Medium composition
种仁预培养 Pre-culture of cotton seeds	1/2 MS+15 g/L 葡萄糖
外植体预培养 Pre-culture of explants	MSB+0.3 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA
共培养 Co-culture	1/2MS+AS
恢复培养 Recovery culture	MSB+0.3 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+500 mg/L Cb
筛选培养 Screening culture	MSB+0.3 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+500 mg/L Cb+ 30 mg/L Hyg
生根培养 Rooting culture	1/4MS+10 mg/L IBA+500 mg/L Cb

注:NAA,萘乙酸;MSB,MS培养基+B₅;6-BA,6-苄氨基腺嘌呤;AS,乙酰丁香酮;Cb,羧苄青霉素;Hyg,潮霉素。固体培养基凝固剂全部选用4g/L植物凝胶。

Note: NAA, naphthylacetic acid; MSB, medium MS + B₅; 6-BA, 6-benzylamino adenine; AS, acetosyringone; Cb, carbenicillin; Hyg, hygromycin. For each culture media 4 g/L plant gel was used as the coagulating agent.

响转化过程的关键要素(农杆菌侵染时间、共培养乙酰丁香酮的浓度、筛选培养潮霉素浓度和生根培养吲哚乙酸浓度)进行体系优化,使其对辽棉19号转化效率达到最佳。

1.2.3 棉花转化体系的优化

取辽棉19号饱满种子200粒,经预培养4~7d的上胚轴外植体分别置于OD₆₀₀值为0.3~0.5的农杆菌菌液侵染,考察不同侵染时间(5、10、15、20和25 min)时对转化效果的影响。

在确定侵染时间后,经过最优侵染条件得到的上胚轴外植体,于28℃条件下暗培养,考察共培养基中不同乙酰丁香酮(AS)的浓度(0、50、100、150和200 mg/L)对共培养效果的影响。统计经过筛选、分化、生根以后外植体和成活植株数目以此确定乙酰丁香酮的最适浓度。

在筛选培养基中进行潮霉素敏感性测试。选择不同的潮霉素浓度(0、15、30、45和60 mg/L),对经共培养得到的上胚轴外植体进行筛选,30 d后进行分化生根培养,统计出外植体和成活植株数目。

在确定潮霉素浓度后,经最优侵染条件及筛选条件下得到的抗性幼芽进行生根培养,选择诱导生根培养基中植物生长素吲哚乙酸(IBA)浓度分别为(0、5、10、15和20 mg/L)时,进行生根壮苗30 d,观察根部生长情况。

1.2.4 转基因棉花的PCR检测

随机选取生根壮苗后生长状况良好的转基因棉花植株,采用CTAB法提取组织DNA,根据基因全

长序列设计引物:

NHX-S(5'-TGCCATGGGCCCTGGCGTGGTG-3');
NHX-A(5'-CTGCTAGCTCACCGTCCCCAATG-AATGC-3')。

PCR反应条件为:94℃,5 min;94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,3 min;共进行30个循环,最后72℃延伸10 min。目的片段大小1 623 bp。

采用35 s启动子引物:

35s-F(5'-ATCTTCGTCAACATGGTGGAGCAC-3');
35s-R(5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC-3')。

PCR反应条件为:95℃,3 min;95℃,30 s;57℃,30 s;72℃,3 min;共进行30个循环,最后72℃延伸7 min。目的片段大小376 bp,PCR扩增出目的条带的为阳性植株。

1.2.5 转基因棉花苗期的生理检测

1.2.5.1 试验设计

选取生长相对一致并经PCR鉴定的已转化A1NHX1基因棉花株系N1,N6和N8,移植于蛭石中,用Hoagland培养液浇灌盆栽20 d。然后用含0、100、200和300 mmol/L NaCl的1/2 Hoagland营养液浇灌。连续处理30 d,期间每天换液1次以保持NaCl浓度恒定。分别取样进行生理指标的测定,同样处理的非转化棉花苗用于对照(CK)。各项处理均重复3次。

1.2.5.2 总生物量的测定

取样后将棉花洗净,装入袋中,烘箱110℃杀青30 min,然后85℃继续烘干至恒重,称重。试验重

复 3 次,取平均值。

1.2.5.3 叶片相对电导率的测定

称取经 NaCl 处理的转 *AtNHX1* 基因棉花新鲜叶片 1 g,加 10 mL ddH₂O,室温下浸泡 8 h,以非转基因棉花幼苗新鲜叶片作为对照组,采用 Sino measure LR-307A 电导仪测定其溶液电导率 R_1 。再将叶片和浸泡液共同置于沸水浴中加热 10 min,再次测定溶液电导率 R_2 ,相对电导率 $R = R_1/R_2 \times 100\%$,试验重复 3 次,取平均值。

1.2.5.4 细胞渗透势的测定

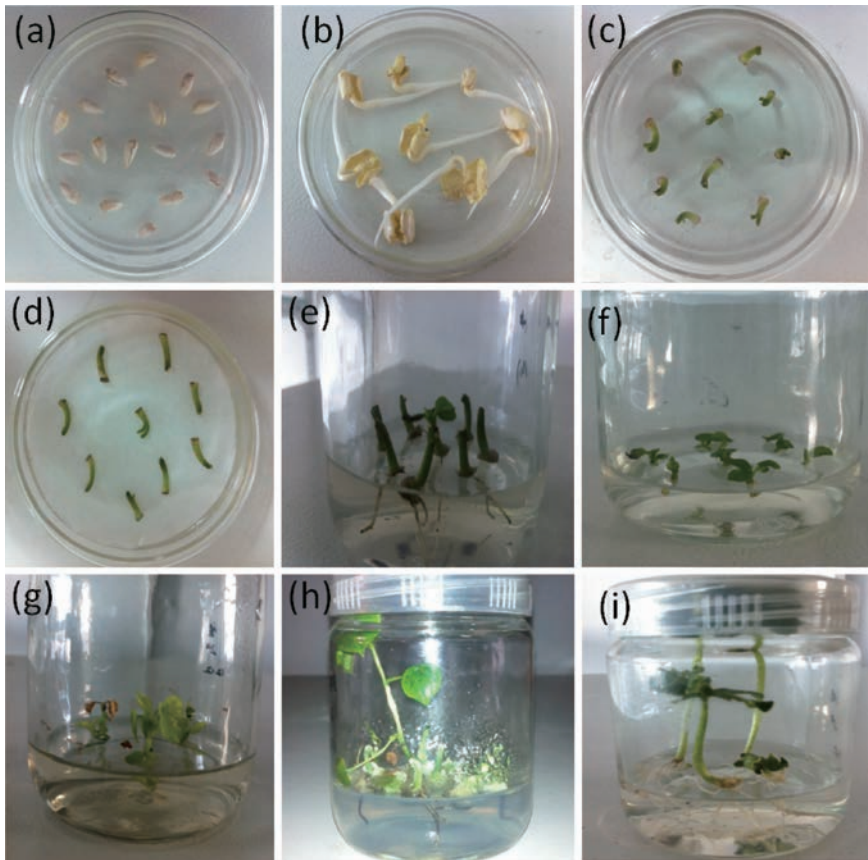
选用美国 Advanced-3320 冰点渗透压仪测定棉

花渗透势。取棉花同一部位叶片立即浸入去离子水中 10 h,取出后用去离子水冲洗干净并吸干表面水分,将经液氮浸泡变脆的组织置于医用注射器中,室温下静置融化,挤压注射器,挤出约 0.8 mL 汁液即可测定细胞溶质渗透摩尔浓度。试验重复 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 耐盐基因 *AtNHX1* 的遗传转化

通过棉花上胚轴外植体,将耐盐基因 *AtNHX1* 通过传统农杆菌转化法导入辽棉 19 号中,整体过程见图 2。



(a) 无菌棉花种仁的预培养;(b) 棉花无菌芽体;(c) 上胚轴外植体的预培养;(d) 农杆菌感染后共培养过程;(e) 筛选分化过程;(f)~(h) 炼苗过程;(i) 转化植株幼苗生根过程。

(a) Pre-incubation of sterile cotton seeds;(b) Sterile cotton buds;(c) Pre-culture epicotyl explants;(d) Co-culture process;(e) Process of the seedling hardening;(f)~(h) Hardening process;(i) Process of the rooting.

图 2 辽棉 19 号农杆菌转化过程

Fig. 2 The process of *Agrobacterium*-mediated transformation of the Cotton Liao19

2.2 影响遗传转化的因素分析

2.2.1 农杆菌感染时间的优化

侵染时间是影响农杆菌转化成败的重要因素。侵染时间过长会造成在共培养阶段抗生素无

法抑制过量繁殖的农杆菌,造成大面积的农杆菌依附在外植体及培养基周围,菌体大面积生长,造成转化的失败。侵染时间过短会导致农杆菌菌体无法充分接触外植体根部切口,使转化过程不充

分不彻底,切口处愈伤组织无法形成,即使有新生幼苗产生经检测也未成功转化目的基因 *AINHX1*。本研究发现侵染时间为 15 min 条件

下,农杆菌浓度 OD_{600} 为 0.3~0.5,得到的外植体数目及最后成活的植株数目最高,转化效果相对最好。

表 2 侵染时间对辽棉 19 号转化的影响

Table 2 Effects of infection time on the tranformation Liao 19

侵染时间/min Infection time	侵染上胚轴外植体数 Number of infection hypocotyls explants	抗性外植体数 Number of resistance explants	成活植株数 Number of plants to survive
5	200	4.8±1.2	0.2±0.4
10	200	34.4±4.3	17.8±3.2
15	200	58.4±5.0	42.2±5.8
20	200	20.2±3.1	10.8±1.9
25	200	0	0

2.2.2 共培养基乙酰丁香酮浓度的优化

植物(特别是单子叶植物)的农杆菌转化过程中,酚类化合物是必需的,它能够活化 *Vir* 区基因的表达,提高转化效率。根癌农杆菌经乙酰丁香酮预处理后,其毒性基因得到高效表达,而在共培养阶段添加适量浓度的乙酰丁香酮对外植体切口处细胞再生具有促进作用,转化效果更好。不同植物在农杆菌转化过程中的最适 AS 浓度也不尽相同。由表 3 可以看出,当 AS 浓度控制在较低水平

(<50 mg/L)时,侵染相同数量的上胚轴外植体,经后期平行处理后,得到的抗性外植体个数和成活植株个数变化不明显,呈较低水平,转化率偏低。当 AS 浓度超过 150 mg/L 时,幼芽的转化率和成活植株转化率显著下降,添加高浓度(>200 mg/L) AS 后,不会促进提高转化效率,反而会对农杆菌产生毒性作用。当 AS 浓度在 100 mg/L 时,外植体转化效果最好,植株成活数最高。所以,最适 AS 浓度选定为 100 mg/L。

表 3 不同乙酰丁香酮浓度对棉花外植体转化的影响

Table 3 Effects of acetosyringone (AS) concentration on transformed cotton explants

乙酰丁香酮浓度/ (mg/L) AS concentration	侵染上胚轴外植体数 Number of infection Hypocotyl explants	抗性外植体数 Number of resistance explants	成活植株 Number of plants to survive
0	200	57.4±6.0	17.0±2.8
50	200	58.6±5.9	10.2±3.2
100	200	86.6±6.4	34.8±5.7
150	200	32.2±4.1	13.2±4.0
200	200	11.8±2.8	0

2.2.3 筛选培养基潮霉素浓度的优化

以潮霉素作为选择抗生素,对辽棉 19 号的农杆菌转化,进行了浓度优化。根据相关文献,筛选培养基 MSB 中抑菌抗生素羧苄霉素(Cb)浓度普遍选用 500 mg/L。为了优化反应体系,提高转化效率,在平行条件下对筛选培养基中潮霉素的浓度进行了敏感性测试,浓度梯度设计为 0、15、30、45 和 60 mg/L

5 个梯度。在 10 个培养皿中,外植体 25~30 个/皿,每筛选培养 4~5 周继代 1 次。由表 4 可以看出,潮霉素浓度 >45 mg/L 时,上胚轴外植体难以适应过高的抗生素筛选压力,组织内累积毒素,几乎无法生长。潮霉素浓度 <15 mg/L 时,成活的外植体和植株的阳性率很低。潮霉素浓度为 30 mg/L 是比较适宜的筛选浓度,同时也没有影响转化植株的正常生长。

表 4 不同潮霉素浓度对棉花外植体转化的影响

Table 4 Effects of hygromycin B concentrations on transformed cotton explants

潮霉素浓度/(mg/L) Hygromycin B concentration	侵染上胚轴外植体数 Number of infection hypocotyls explants	抗性外植体数 Number of resistance explants	成活植株 Number of plants to survive
0	241	0	0
15	284	26.6±4.0	4.0±1.3
30	305	123.8±8.9	43.8±9.0
45	263	58.8±6.6	12.6±3.6
60	245	12.4±4.0	0

2.2.4 生根培养基吲哚乙酸 IBA 浓度的优化

从表 5 中可以看出,在幼苗生根培养后,随着吲哚乙酸 IBA 浓度的提高幼苗成活数逐步升高,当浓

度达到 10 mg/L 时,幼苗成活数最高,随着吲哚乙酸 IBA 浓度继续升高,则幼苗生根成活数逐步下降。

表 5 吲哚乙酸 IBA 浓度对棉花生根作用的影响

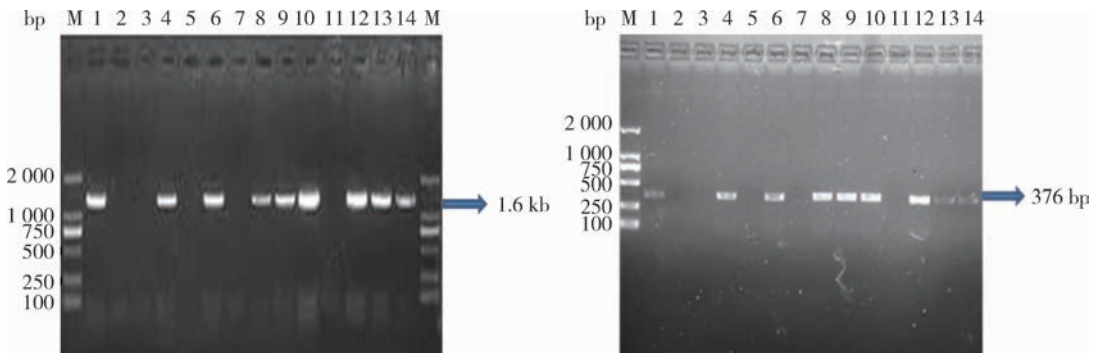
Table 5 Effects of IBA concentration on cotton root

吲哚乙酸 IBA 浓度/(mg/L) Concentration of IBA	转化棉花幼 Number of infection cotton epicotyl explants	幼苗生根成活数 Number of resistance epicotyl explants
0	200	35.2±8.0
5	200	111.0±8.7
10	200	153.6±8.4
15	200	88.6±8.9
20	200	42.6±5.4

2.3 转基因棉花的 PCR 鉴定

利用引物 *NHX-S* 和 *NHX-A* 进行 PCR 扩增

结果,见图 3(a),其中 8 个样品扩增出约 1.6 kb 的目的片段。利用引物 *35s-F* 和 *35s-R* 进行 PCR 扩



M, DL 2 000 Marker; 1. 阳性对照 Positive comparison; 2. H₂O 模板 H₂O template; 3. 阴性对照 Negative comparison; 4~14, 转化棉花植株 Transformed cotton

图 3 通过特异性引物 *NHX*(a)和启动子引物 *35s*(b)PCR 鉴定转化 *AINHX1* 基因棉花株系

Fig. 3 PCR analysis for *AINHX1*-transformed cotton by the specific primer *NHX*(a)and *35s* promoter primer(b)

增结果(如图3(b))所示,同样扩增出376 bp的目的片段,初步检测证明耐盐基因 *AtNHX1* 已经转入到辽棉19号中。

2.4 盐胁迫下不同 NaCl 浓度对转基因棉花总生物量的影响

NaCl 胁迫下,棉花的生长受到抑制,随着 NaCl

浓度的增加,各样本总生物量均呈下降趋势。其中对于 300 mmol/L 的 NaCl 胁迫,转基因棉花株系 N1、N6 和 N8 生物量分别降低 40.9%、48.4% 和 56.5%,而非转基因棉花的生物量降低了 76.2%,说明转基因植株 N1、N6 和 N8 具备了一定的耐盐性。

表 6 不同 NaCl 浓度棉花总生物量

Table 6 Total biomass of cotton under different concentration of NaCl

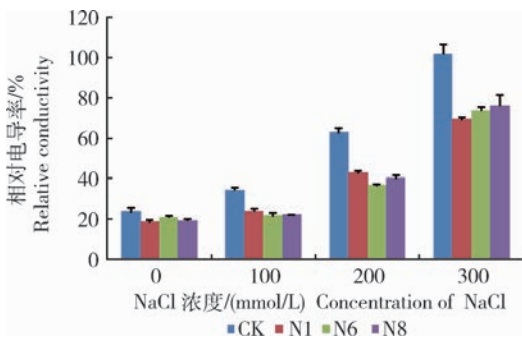
转基因株系 Transgenic line	NaCl 浓度/(mmol/L) Concentration of NaCl			
	0	100	200	300
CK	517.2±8.5	443.0±21.2	270.6±13.2	123.2±6.2
N1	535.5±3.5	512.4±9.5	401.0±16.7	316.5±17.8
N6	528.8±6.4	494.6±6.6	353.7±13.1	272.7±13.0
N8	516.6±7.1	455.4±7.0	337.9±12.8	224.5±15.8

2.5 盐胁迫下不同 NaCl 浓度对转基因棉花相对电导率的影响

电导率是衡量植物遭受逆境胁迫后生物膜受损程度的重要指标。结果如图4所示,在不受到外界盐胁迫的情况下,转基因棉花和非转基因棉花的相对电导率相差不大,维持在20%左右,但当盐胁迫程度逐渐增大接近300 mmol/L时,转基因棉花株系 N1、N6 和 N8 的相对电导率平均值在70%左右,明显低于非转基因棉花对照组(CK)的102%,表明转基因棉花在高盐胁迫下,其电解质外渗相对较少,生物膜的受伤害程度明显较少,说明转基因株系已经具备一定的抵御盐胁迫的能力。

2.6 盐胁迫下不同 NaCl 浓度对转基因棉花细胞渗透势的影响

当棉花处于高盐胁迫下时,其细胞内部会累积一些渗透保护物质来维持正常的渗透压水平,降低外界对其伤害。图5表明,在无盐胁迫或低盐100 mmol/L NaCl 胁迫时,转基因棉花与非转基因棉花(CK)无显著性差异($P>0.05$)。在200 mmol/L NaCl 胁迫下,转基因棉花株系 N1、N6、N8 与 CK 相比差异显著($P<0.05$),而在300 mmol/L NaCl 胁迫下,N1、N6 和 N8 与对照组 CK 相比同样差异显著($P<0.05$),这表明基因 *AtNHX1* 在棉花中表达可以使棉花以较低的渗透势从外界吸收水分来抵御盐胁迫所造成的伤害,耐盐性得到提高。



CK, 非转基因棉花株系; N1, N6, N8, 转基因棉花株系。图5同。
CK, Non-genetically modified cotton strain; N1, N6, N8, Genetically modified cotton strain. The same in Fig. 5.

图4 不同盐胁迫对各棉花株系相对电导率的影响

Fig. 4 Effects of salt stress on relative electrical conductivity of cotton plants

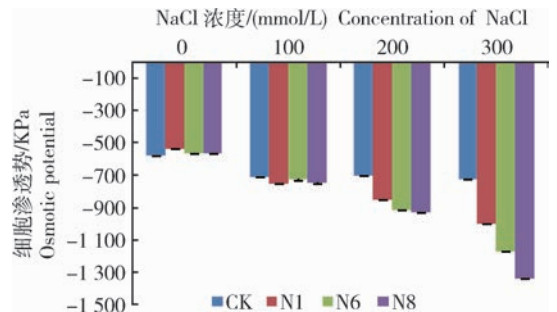


图5 不同盐胁迫对各棉花株系细胞渗透势的影响

Fig. 5 Effects of salt stress on osmotic potential of cotton plants

3 结论与讨论

农杆菌介导棉花转化通常采用的外植体有茎尖, 胚性愈伤或者下胚轴等, 但其成熟的转化体系并不适用于所有棉花品种的转化。转化外源基因能否成功, 不同的棉花受体材料的选择十分重要。对于辽宁品种辽棉 19 号, 本研究选择上胚轴外植体作为转化受体, 其再生体系与早前报道的相比有以下优点: 1) 上胚轴外植体细胞再生能力较强, 预培养时间较短, 转化材料获取相对容易; 2) 培养时间短, 棉花的组织培养胚芽发育成植株的周期长, 一直是困扰人们的难题, 利用上胚轴外植体获取转化植株的时间是 6~8 个月, 明显短于利用茎尖, 胚性愈伤以及下胚轴作为外植体的 9~12 个月的转化时间^[23]; 3) 上胚轴外植体在试验操作上相对容易。

通过优化某些关键因素可以提高辽棉 19 号的转化效率。结果表明, 最佳农杆菌侵染时间为 90 s, 共培养乙酰丁香酮的最适浓度为 100 mg/L, 棉花筛选培养基中潮霉素最适浓度为 30 mg/L, 诱导生根培养基 IBA 的最适浓度 10 mg/L。在该优化转化体系下, 辽棉 19 号成活植株数量最多。转化效率的提高有利于获取更多的耐盐棉花材料, 为下一步的工作奠定了坚实的基础。

采取了 PCR 分子鉴定的方法对转化 *AtNHX1* 基因的棉花植株进行鉴定。图 3 结果表明, 大部分成活植株能扩增出外源基因相对应的条带, 并利用 35s 启动子引物进一步进行验证, 排除假阳性的干扰。试验表明, *AtNHX1* 基因已经成功导入辽棉 19 号中。在今后的工作中我们将采用 Southern Blot 的方法进一步验证转化的可靠性, 排除假阳性的干扰, 并且最终确定转入的拷贝数。

在高盐胁迫时, 非转基因棉花生物量下降了 76.2%, 比转基因棉花下降明显。通过对转基因棉花相对电导率和细胞渗透势的检测发现, 转 *AtNHX1* 基因的棉花株系, 相对电导率和细胞渗透势明显低于非转基因株系。相关报道指出^[24], 在转化水稻 *OsNHX1* 基因的黑麦草和转化拟南芥 *AtNHX1* 基因的小麦中, 其相对电导率及细胞渗透势同样低于野生型^[25]。

关于植物耐盐性的研究是一个多因素影响的复杂生理过程, 通过耐盐机制和离子平衡互相结合来提高植物的耐盐性还有待于深入的研究。通过传统育种的方式来解决棉花的盐胁迫面临着诸多的困

难。近年来, 随着基因工程技术的迅猛发展, 植物耐盐基因工程研究取得了诸多成就, 在提高现有棉花栽培品种的耐盐性方面发挥了很重要的作用, 解决了诸多传统育种无法克服的问题, 并为今后应用培育抗逆新棉花品种提供了一定的参考。

参考文献 References

- [1] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66-71
- [2] 邓英淘. 中国土地危机[J]. 生态经济, 2002, 8(1): 5-9
Deng Y T. China land crisis[J]. *Ecological Economy*, 2002, 8(1): 5-9
- [3] 赵可夫, 李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京: 科学出版社, 1999
Zhao K F, Li F Z. *China Halophytes* [M]. Beijing: Science Press, 1999
- [4] Peir AKFJ, Deaton R W, Armstrong T A, Fuchs R L, Sims S R, Greenplate J T, Fishchhoff D A. Insect resistance cotton plants[J]. *Bio/Technology*, 1990, 8(1): 939-943
- [5] 朱乾浩. 棉纤维品质改良的分子生物学基础[J]. 棉花学报, 2000, 12(3): 159-163
Zhu Q H. Molecular biological basis for the improvement of cotton fiber quality[J]. *Cotton Journal*, 2000, 12(3): 159-163
- [6] Finer J J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L) via particle bombardment[J]. *Plant Cell Report*, 1990, 3(8): 886-889
- [7] Bajasekaran K, Hudspeth R L, Cary J W, DM Anderson. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures[J]. *Plant Cell Report*, 2000, 19(3): 539-545. 2005, 13(2): 162-166
- [8] Umbeck O, Johnson G, Barton k. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L) plants[J]. *Bio/Technology*, 1987, 5(1): 263-266
- [9] 阳立恒, 郝秀英, 曲延英. 农杆菌介导外源基因转化棉花上胚轴方法的研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 8006-8007, 8076
Yang L H, Hao X Y, Qu Y Y. Study on the transformation method of mediating exogenous gene into cotton eplcotyl by agrobacterium[J]. *Journal of Anhui Agricultral Science*, 2008, 36(19): 8006-8007, 8076 (in Chinese)
- [10] Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, Hamada A, Tanaka A, Nakamura T. Cloning and characterization of the Na^+/H^+ antiporter genes from the halophyte *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice[J]. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 2002, 532(1): 279-282
- [11] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5): 765-768
- [12] Rajagopal D, Agarwal P, Tyagi W, Singla S, Reddy M, Sopory S. Pennisetum glaucum Na^+/H^+ antiporter confers high level

- of salinity tolerance in transgenic *Brassica juncea* [J]. *Molecular Breeding*, 2007, 19(2):137-151
- [13] Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, Blumwald E. 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 USA*, 2001, 98(7):2832-12836
- [14] Xue Z Y, Zhi D Y, XUE G P, Zhang H, Zhao Y X, Xia G M. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yield in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ [J]. *Plant Science*, 2004, 167(6):849-859
- [15] 王勃, 杜世章, 刘君蓉. 植物耐盐机制中的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白[J]. 绵阳师范学院学报, 2006, 25(2):46-51
Wang B, Du S Z, Liu J R. Advances Na^+/H^+ antiporter in plants under salt stress[J]. *Journal of Mianyang Normal University*, 2006, 25(2):46-51 (in Chinese)
- [16] Viswanathan C, Andre J, Zhu J K. Understanding and improving salt tolerance in plants[J]. *Crop Science*, 2005, 45(7):437-448
- [17] 赵可夫, 李军. 盐浓度对3种单子叶盐生植物渗透调节剂及其在渗透调节中贡献的影响[J]. 植物学报, 1999, 41(12):1287-1292
Zhao K F, Li J. Effects of salinity on the contents of osmotica of Monocotyledenous Halophytes and their contribution to osmotic adjustment [J]. *Journal of Plant Science*, 1999, 41(12):1287-1292 (in Chinese)
- [18] Barhoumi Z, Djebali W, Smaoui A, Chaibi W, Abdely C. Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis* (Willd) Parl[J]. *Plant Physiol*, 2007, 164(7):842-850
- [19] 王旭达, 丰明, 张高华, 王鹤, 李怀梅. 獐茅液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(*AtNHX*)转化水稻的耐盐性的研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(2):13-17
Wang X D, Feng M, Zhang G H, Wang H, Li H M. Effects of transforming a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from *Aeluropus litoralis* on salt-tolerance in rice[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2012, 17(2):13-17 (in Chinese)
- [20] 杨月红, 孙庆艳. 植物的盐害和抗盐性[J]. 生物学教学, 2002, 27(11):1-2
Yang Y H, Sun Q Y. Salt and salt tolerance of plants[J]. *Biology Teaching*, 2002, 27(11):1-2 (in Chinese)
- [21] Zhang G H, Su Q, An L J, Wu S. Characterization and expression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene from the monocot halophyte *Aeluropus litoralis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46(2):117-126
- [22] Su Q, Feng S Y, An L J, Zhang G H. Cloning and functional expression in *Saccharomyces cereviae* of a K^+ transporter, *AtHAK1*, from the *Gramineous halophyte*, *Aeluropus litoralis*[J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29:1959-1963.
- [23] 刘方, 张保红. 棉花组织培养高效植株再生体系的建立[J]. 棉花学报, 2004, 16(2):117-122
Liu F, Zhang B H. Establishment of high frequency somatic embryogenesis and plant regeneration system of cotton[J]. *Cotton Science*, 2004, 16(2):117-122 (in Chinese)
- [24] 王红亮, 陈丽丽. 低温胁迫对9种绿化树木相对电导率的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4):167-169
Wang H L, Chen L L. Effect of low temperature stress on relative conductivity of 9 kinds of trees [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(4):167-169
- [25] 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
Li H S. *Principle and technology of plant physiology experiment*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000

责任编辑: 吕晓梅