

转基因与常规杂交相结合改良水稻耐盐性

郭龙彪^{1,3,#} 薛大伟^{1,#} 王慧中¹ 陈受宜² 卢德赵¹ 曾大力¹ 高振宇¹ 颜美仙¹
黄大年¹ 钱 前^{1,*}

(¹中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室,浙江 杭州 310006 ;²中国科学院 遗传与发育生物学研究所,北京 100101 ;³浙江大学 生命科学学院,浙江 杭州 310029 ;# 共同第一作者 ; * 通讯联系人 , E mail : qianqian188@hotmail . com)

Improvement of Rice Salt Tolerance by Using an Integrated Method of Gene Transformation and Traditional Breeding

GUO Long biao^{1,3,#} , XUE Da wei^{1,#} , WANG Hui zhong¹ , CHEN Shou yi² , LU De zhao¹ , ZENG Da li¹ , GAO Zhen yu¹ ,
YAN Mei xian¹ , HUANG Da nian¹ , QIAN Qian^{1,*}

(¹ State Key Laboratory of Rice Biology , China National Rice Research Institute , Hangzhou 310006 , China ;² Institute of Genetics and Developmental Biology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China ;³ College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China ;# These authors contributed equally to this paper ; * Corresponding author , E mail : qianqian188@hotmail . com)

Abstract : The genes encoding enzymes responsible for synthesizing some low molecular weight metabolites , such as beta ine , polyamines , and mannitol , were transformed into rice plants to enhance the salt tolerance . The improvement of rice salt tolerance with five target genes (*BADH* , *CMO* , *mtlD* , *gutD* and *SAMDC*) was conducted through gene transformation and traditional breeding approaches . Results indicated that the genes were successfully transformed into rice by particle bombardment or mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and integrated into the genome of the transgenic plants by using PCR detections . The salt tolerance of the transgenic plants and their progenies with 1 - 5 genes was significantly enhanced and stably maintained in the salt stress fields . Nine elite rice transgenic lines such as Pin 3 , Pin 6 and Pin 7 from Xiushui 11 were obtained , which grew normally in the salt pool containing 0 . 5% - 1 . 0% NaCl .

Key words : genes related to salt tolerance ; transformation ; traditional breeding ; elite germplasm ; rice (*Oryza sativa*)

摘 要 : 通过农杆菌介导法和基因枪法将 *CMO*、*BADH*、*mtlD*、*gutD*和 *SAMDC* 基因以单价或双价的形式导入水稻常规品种中 , 再结合常规杂交育种 , 选育 5 价强耐盐性的转基因水稻植株。1~5 价 9 类组合的水稻品系 , 经 PCR 分子检测 , 在转基因后代中多价目的基因聚合 , 遗传稳定 , 且分子检测与田间耐盐性的表现一致。转基因植株在盐碱地中能正常生长 , 拓展了水稻常规品种耐盐性。并已获得耐 0 . 5% ~ 1 . 0% NaCl 的 T 秀水 11——品 3、品 6 和品 7 等 9 份优良株系或中间材料。

关键词 : 耐盐相关基因 ; 遗传转化 ; 常规杂交 ; 新种质 ; 水稻

中图分类号 : Q943 . 1 ; S511 . 034

文献标识码 : A

文章编号 : 1001-7216(2006)02-0141-06

盐胁迫是作物生产的重要限制因素之一。盐碱地种植水稻一般都会减产 , 严重的不能完成生活史。全球有盐碱地 9 . 6 亿 hm^2 , 中国也有 3700 万 hm^2 ^[1]。培育和推广具有广泛适应性的水稻耐盐品种 , 是利用盐碱地的一条经济有效的途径。

植物抗盐性可分为对盐分诱导的水分胁迫的抗性(渗透调节、有机溶质积累与细胞膜和酶保护)和对盐分诱导的离子毒害的抗性(拒盐性、细胞分室效应、排盐性和稀释作用)。植物细胞通常积累一些小分子有机物如甜菜碱、甘露醇、山梨醇和多胺^[2] , 参与细胞渗透调节和提高植物耐盐能力。Tarczynski 等^[3]和 Prakash 等^[4]将来自大肠杆菌的 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因 (*mtlD*) 和 6-磷酸山梨醇脱氢酶单价基因 (*gutD*) 分别转入烟草 , 获得了抗 250 mmol/L

L NaCl 的烟草 ; 刘风华等^[5]将甜菜碱醛脱氢酶基因 (*BADH*) 转入草莓和烟草 ; 刘俊君等^[6]和刘岩等^[7]分别将胆碱单氧化酶基因 (*CMO*) 和 *gutD* 基因转入玉米 ; 苏金等^[8]将 *gutD* 基因转入水稻 , 均获得耐盐能力增强的转基因植株。S-腺苷蛋氨酸脱羧酶基因 (*SAMDC*) 参与合成的多胺也与植物耐盐胁迫密切相关^[9]。王慧中等^[10]发现以 *CMO/BADH* 双价基因转入水稻 , 耐盐能力更强。

收稿日期 : 2005-01-08 ; 修改稿收到日期 : 2005-09-27。

基金项目 : 国家 863 计划资助项目 (JY03-B-8) ; 国家自然科学基金资助项目 (302376)。

第一作者简介 : 郭龙彪 (1963 -) , 男 , 副研究员 ; 薛大伟 (1978 -) , 男 , 博士研究生。

为了进一步开辟盐碱荒地和提高盐碱地或干旱地区的水稻产量,1998 年始,我们利用农杆菌介导法和基因枪法,将 5 个耐盐相关基因 *CMO*, *BADH*, *mtlD*, *gutD* 和 *SAMDC* 转入常规粳稻秀水 11、中花 11 和籼稻特青、杂交稻恢复系明恢 63 等品种,并结合常规杂交选育,聚合 5 价耐盐基因。选育出一批具有强耐盐性的优良株系,在浙南沿海地区进行综合评价和利用研究。

1 材料与方 法

1.1 植物材料、细菌菌株与质粒

水稻品种秀水 11、中花 11、特青和明恢 63 等品种由本实验室提供,本文以秀水 11 为例。根癌农杆菌菌株 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 和双元表达质粒 pBIGM 均由中国科学院遗传与发育研究所陈受宜研究员提供。

1.2 转基因纯系选育

1998 年始分别利用农杆菌介导法和基因枪法将 *CMO*, *BADH*, *mtlD*, *gutD* 和 *SAMDC* 单价基因、*CMO/BADH* 和 *mtlD/gutD* 双价基因及 *CMO/BADH* 与 *SAMDC* 共转化,以 8 种基因型转入水稻。水稻转化及培养按文献[10]的方法进行。系谱法选育转基因后代, T_4 代获得 8 种 1~3 价转基因稳定纯系,并直接利用其耐盐的纯系后代。 T_4 代转 *CMO/BADH* 基因和转 *mtlD/gutD + SAMDC* 基因的秀水 11 用作下一步常规杂交的亲本。

1.3 常规杂交选育

2000 年在杭州田间和温室,以 T_4 代转 *CMO/BADH* 基因和 T_4 代转 *mtlD/gutD + SAMDC* 基因的秀水 11 (分别以 $T_4^{CMO/BADH}$ 10 3 9 秀水 11 和 $T_4^{mtlD/gutD + SAMDC}$ 16 4 9 秀水 11 表示) 纯系为亲本,进行田间常规杂交配组, $F_2 \sim F_4$ 混合法选育, F_5 始用系谱法选育。各代株系 4 叶龄的幼苗移植到 0.75% NaCl 盐池中,每隔 7 d 观察盐胁迫下植株的生长情况,自然淘汰杂交各世代分离的耐盐能力低

的植株。在田间,后代选育表型以秀水 11 为参照,选育在高盐度下成活的耐盐能力强的优良株系。9 种基因型的秀水 11 株系,各选 1 个最佳株系,共获得 9 个品系(8 个 1~3 价的转基因品系和 1 个 5 价的杂交品系,其表型皆类似于秀水 11,编号分别为 TX_4^{CMO} -4 13 6、 TX_4^{mtlD} -5 9 12、 TX_4^{BADH} -12 3 7、 TX_4^{gutD} -14 9 7、 TX_4^{SAMDC} -11 3 8、 $TX_4^{CMO/BADH}$ -10 3 9、 $TX_4^{mtlD/gutD}$ -7 9 14、 $TX_4^{mtlD/gutD + SAMDC}$ -16 4 9 和 $FX_5^{5价}$ -3 7),进一步作耐盐性和分子鉴定。

1.4 耐盐性 PCR 鉴定

CMO, *BADH*, *mtlD*, *gutD* 和 *SAMDC* 5 个基因的 PCR 引物设计参照文献[10~13]的方法,PCR 反应条件和程序参照文献[11]。扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测,检测 1~3 价转基因植株和杂交后代中 5 价的目的基因。5 个基因的引物序列见表 1。

1.5 耐盐性评价

取 9 个品系的 4 叶龄幼苗在含 0.25%、0.50%、0.75%、1.00% 和 1.20% NaCl 的盐池中进行耐盐试验,盐池含盐量基于干质量比例计算,盐池和田间的水位尽量保持相同。确保盐池和田间的含盐量不超过最初设定的盐浓度,评价各株系的耐盐性以最初设定的为标准。转基因植株的最高耐盐能力是指在盐胁迫下仍能存活的最高的盐浓度。4 叶期,对照秀水 11 的耐盐度为 0.25%。

1.6 耐盐优良品系的品比试验

2001 - 2003 年,对 3 个 T_4 *CMO*, *BADH* 和 *SAMDC* 单价基因的优良品系在萧山舒兰农场、宁波北仑区田洋村盐碱地(已种植作物多年)和中国水稻研究所进行环境释放试验。2003 年,1 份 5 价的其他 8 份 1~3 价的优良品系(即与分子检测和耐盐性鉴定相应的 9 个品系)在杭州进行了品比试验。5 月 22 日播种,6 月 10 日移栽,随机区组排列,3 次重复,小区面积 30m²,以原始受体亲本秀水 11 为

表 1 5 个基因的引物序列

Table 1. The primer sequences for the five genes.

基因 Gene	5'端引物序列 5'-end primer	3'端引物序列 3'-end primer
胆碱单氧化酶 <i>CMO</i>	GCAACAACAATGTTGCTAA	AACCAGCAGTGGAAATGGT
甜菜碱醛脱氢酶 <i>BADH</i>	ATCGATCACACGATAGCCTTAAGTT	TAGGTCGCGGAAGCATTATATGGGTGT
1 磷酸甘露醇脱氢酶 <i>mtlD</i>	AGGATCCATGAAAGCATTACATTTTGGCG	TGTCGACATTATTGCATTGCTTTATAAGC
6 磷酸山梨醇脱氢酶 <i>gutD</i>	AGGATCCATGAATCAGGTTGCCGTTGT	TGTCGACGGAAGTCCTGTATGCCTG
S 腺苷蛋氨酸脱羧酶 <i>SAMDC</i>	CAACTGCGCGAAGAAGCCATCCTG	CGAAGCCCACGACCTCATAACTG

表 2 秀水 11 的转化频率

Table 2 . Transformation frequency of japonica rice Xiushui 11 .

外源基因 Gene	转化方法 Transformation method	接种幼胚 或愈伤数 No . of inoculated immature embryo	产生抗性 愈伤块数 No . of resistant calli	转化率 Transformation frequency /%	抗性 植株数 No . of resistant plants	PCR 阳性 植株数 No . of PCR- positive plants	PCR 阳性率 Rate of positive PCR result /%
<i>CMO</i>	基因枪 Particle bombardment	1987	269	13.5	99	86	86.9
<i>BADH</i>	农杆菌介导 <i>Agrobacterium mediated</i>	2028	282	13.9	197	171	86.8
<i>mtlD</i>	基因枪 Particle bombardment	1442	247	17.1	136	123	90.4
<i>gutD</i>	基因枪 Particle bombardment	1237	212	17.1	138	135	97.8
<i>SAMDC</i>	基因枪 Particle bombardment	1010	126	12.5	72	59	81.9
<i>mtlD/gutD</i>	基因枪 Particle bombardment	1425	193	13.5	109	99	90.8
<i>CMO/BADH</i>	基因枪 Particle bombardment	2196	169	7.7	45	28	62.2
<i>CMO/BADH+ SAMDC</i>	基因枪 Particle bombardment	2930	139	4.7	32	9	28.1

对照 种植密度 16.6 cm × 20.0 cm 单本插。按常规栽培管理。田间记载株高、生育期、分蘖数、穗长等农艺性状,室内进行考种和米质分析。记载和考种按中国稻种资源评价标准^[14]进行。

2 结果与分析

2.1 水稻耐盐植株的获得

运用基因枪法和农杆菌介导法转化水稻,获得了转 5 个 *CMO*、*BADH*、*mtlD*、*gutD* 和 *SAMDC* 单价基因、2 个 2 价和 1 个 3 价的 8 个不同基因组合的 T₀代秀水 11 植株(表 2)。系谱法选育 T₄转基因材料 100 余份,其中 TX₄^{*CMO*} 4 13 6、TX₄^{*mtlD*} 5 9 12、TX₄^{*BADH*} 12 3 7、TX₄^{*gutD*} 14 9 7、TX₄^{*SAMDC*} 11 3 8、TX₄^{*CMO/BADH*} 10 3 9、TX₄^{*mtlD/gutD*} 7 9 14 和 TX₄^{*mtlD/gutD+SAMDC*} 16 4 9 等 8 个株系遗传稳定、产量高,表现最佳。

另外, TX₄^{*CMO/BADH*} 和 TX₄^{*mtlD/gutD+SAMDC*} 杂交的 F₁代植株 36 株,于 F₂~F₄ 每代混收 2000 颗种子,播种后成秧率分别为 56.20%、58.40% 和 64.15%,秧苗数分别为 1124、1168 和 1263 株。取各代株系 4 叶龄的幼苗 400 株,移植在 0.75% NaCl 盐池中,自然淘汰各分离世代中耐盐能力低的植株。F₂~F₄ 每代成活的植株分别只有 11、16 和 23 株。F₅ 起进行系谱法选育,获表现最佳的 FX₅^{5价} 3 7 株系。

2.2 转基因植株的 PCR 检测

对以上 9 个品系的水稻植株及 F₁ 和对照进行分子检测,结果皆能扩增到相应的 DNA 片段,与从各对应质粒中扩增得到的特征 DNA 带相符。特异的 DNA 片段未能在非转化水稻植株秀水 11 的 DNA 中出现,说明上述各个目的基因已整合进水稻

基因组中(图 1)。

2.3 不同目的基因组合的植株的耐盐性

取 T₄代不同基因组合转基因植株的 4 叶期幼苗移栽在人工盐池中进行耐盐性试验。3 周后,全部单价、双价、3 价和 5 价转基因植株在含 0.50%、0.75% 和 1.00% NaCl 的盐池中均正常生长;而对对照秀水 11 秧苗在 0.50% NaCl 的盐池中生长 7 d,叶片便开始变黄,生长停止,2 周后整个植株开始发黄,3 周后死亡;或对照在含 0.75% 以上 NaCl 的盐池中 10 d 后死亡。耐盐能力强的转基因植株在相应的盐池中生长良好,而同时移植的对照,则叶片发黄,发育停滞;在 1.20% 的盐浓度下,所有转基因植

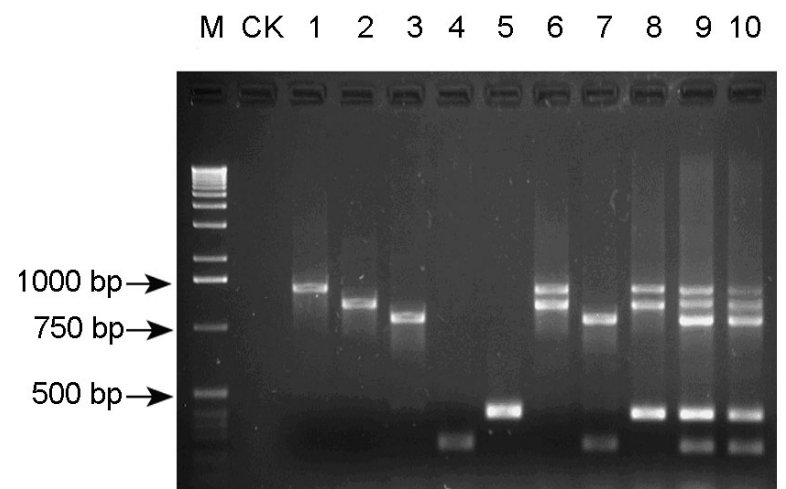


图 1 不同基因组合秀水 11 转基因植株的 PCR 检测

Fig.1 PCR detection of different target genes in transgenic Xiushui 11 plants .

M - 标准分子量(1 kb); CK - 非转基因对照(秀水 11); 1~5 - 转 *CMO*、*BADH*、*mtlD*、*gutD* 和 *SAMDC* 基因的植株; 6~8 - 转 *CMO/BADH*、*mtlD/gutD* 和 *mtlD/gutD+SAMDC* 基因的植株; 9~10 - TX₄^{*CMO/BADH*} 和 TX₄^{*mtlD/gutD+SAMDC*} 的杂交后代 F₁ 和 F₆ 植株。

M, 1 kb marker; CK, Non transgenic Xiushui 11; Lanes 1 to 5, Transgenic plants with *CMO*, *BADH*, *mtlD*, *gutD* and *SAMDC* genes, respectively; Lanes 6 to 8, Transgenic plants with *CMO/BADH*, *mtlD/gutD* and *mtlD/gutD+SAMDC* genes, respectively; Lanes 9 and 10, F₁ and F₆ generations derived from a cross between TX₄^{*CMO/BADH*} and TX₄^{*mtlD/gutD+SAMDC*} plants .

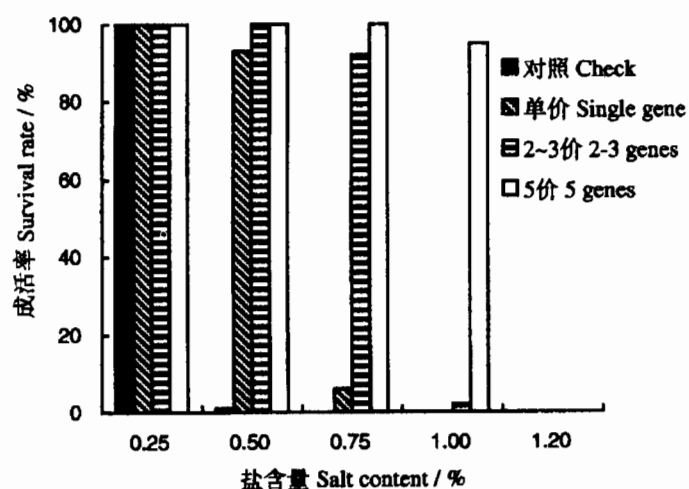


图2 不同目的基因组合的转基因和杂交后代植株的耐盐性
Fig. 2. Salt tolerance of the transgenic plants and their derived progenies from japonica rice Xiushui 11.

株均不能正常生长,叶片发黄并死亡。转基因水稻的耐盐能力表现出不同程度的提高。其中转双价基因的耐盐能力高于转单个基因的耐盐能力,转3价基因的耐盐能力又高于转双价基因的耐盐能力,5价基因聚合的植株耐盐能力最强(图2)。在非胁迫情况下,所有转基因植株与对照秀水11有类似的表

型。

经对不同世代($T_0 \sim T_7$)植株进行耐盐性跟踪分析,各世代转基因植株表现出一致的耐盐性,可以稳定遗传。单价转基因植株 $T_0 \sim T_7$ 的耐盐能力(指可忍耐的 NaCl 浓度)均为 0.50%,而双价转基因植株均为 0.75%,5价转基因植株可达 1.00%。

2.4 转基因和杂交后代植株的农艺、产量和米质性状

由于后代以秀水11为参照进行表型选择,所以9个品系的重要农艺性状(表3)、产量性状和米质与非转基因水稻秀水11基本一致。

依据农业部部颁标准 NY122-86《优质食用稻米》要求,农业部稻米及制品质量监督检验测试中心对9个品系进行了米质测定。转基因秀水11的12项米质指标和非转基因亲本米质基本相似,经F测验,均未达显著差异。品7的糙米率、精米率、碱消度、胶稠度、直链淀粉含量和蛋白质含量分别为83.3%、75.6%、7.0级、70 mm、17.7%和9.1%。其余8个品系的米质也与非转基因的秀水11米质类似,均达到部颁优质米二级标准。

2003年,9个品系在杭州盐碱地进行了试验,其

表3 T秀水11优异转基因和杂交后代的农艺性状

Table 3. Agronomic traits of the transgenic plants and their derived progenies from japonica rice Xiushui 11.

品系(基因) Line(Gene)	种植地 Site	株高 Plant height/cm	单株有效穗数 No. of effective panicles per plant	每穗实粒数 No. of filled grains per panicle	结实率 Seed setting rate / %	千粒重 1000-grain weight/g	单株产量 Grain weight per plant/g
品3 Pin 3 (CMO)	杭州 Hangzhou	96.4	9.7	90.3	95.8	28.4	24.9
	萧山 Xiaoshan	94.3	9.2	82.7	89.7	26.7	21.3
	宁波 Ningbo	87.6	8.6	80.3	86.4	26.3	19.7
品6 Pin 6 (BADH)	杭州 Hangzhou	95.2	10.2	91.4	94.7	27.4	24.7
	萧山 Xiaoshan	92.3	9.3	79.7	91.4	27.6	20.4
	宁波 Ningbo	90.4	9.5	80.9	82.0	27.1	18.9
品1 Pin 1 (mt1D)	杭州 Hangzhou	97.6	8.7	87.4	85.7	27.6	20.3
品2 Pin 2 (gutD)	杭州 Hangzhou	94.3	12.3	81.9	85.0	25.7	24.6
品4 Pin 4 (SAMDC)	杭州 Hangzhou	92.7	11.7	83.4	87.9	26.7	25.4
品7 Pin 7 (CMO/BADH)	杭州 Hangzhou	96.3	10.7	86.7	94.4	27.6	25.1
	萧山 Xiaoshan	91.7	9.6	78.4	91.2	27.4	21.5
	宁波 Ningbo	86.4	9.7	80.6	87.3	26.6	20.3
品5 Pin 5 (mt1D/gutD)	杭州 Hangzhou	94.3	10.6	83.3	88.4	27.4	22.1
品8 Pin 8 (mt1D/gutD + SAMDC)	杭州 Hangzhou	93.9	10.2	81.2	88.4	25.7	23.6
品9 Pin 9 (mt1D/gutD + CMO/BADH + SAMDC)	杭州 Hangzhou	95.7	11.3	80.7	89.7	26.9	24.7
秀水11 (CK)	杭州 Hangzhou	93.6	9.6	81.4	89.7	27.4	21.7
Xiushui 11(CK)	萧山 Xiaoshan	92.7	8.7	79.3	87.6	26.1	19.4
	宁波 Ningbo	87.6	8.9	76.4	83.0	26.3	18.9

中3个转基因品系品3、品6、品7 2001-2003年在杭州、萧山和宁波盐碱地同时进行了试验。在杭州、萧山和宁波3个点,单株产量比对照秀水11分别增加14.70%~17.05%、5.15%~10.82%和4.23%~7.41%,田间表现、产量、米质、抗性方面表现良好,在浙南沿海双季稻地区具有推广和应用价值。

3 讨论

本研究通过转基因技术获得1~3价转基因水稻,结合常规杂交技术,获得了5价基因聚合的耐盐植株,创造了一系列新种质,提高了水稻耐盐性。利用不同方法,选育和推广耐盐性强的水稻品种,对于中国这样一个耕地资源有限的人口大国来说,意义重大。

3.1 转基因技术结合常规育种技术是创制新种质的有效途径

将来自山菠菜的 *BADH* 基因、来自菠菜的 *CMO* 基因、来自大肠杆菌的 *mtlD* 基因、*gutD* 基因和 *SAMDC* 基因分别转入了无耐盐性的水稻商业品种,并结合常规育种,获得了1~5价的9种不同基因组合的秀水11新种质60余份,能在0.5%~1.0% NaCl 的盐池中正常生长。加上中花11、特青和明恢63等水稻品种作为受体的耐盐转基因植株,创造耐盐新种质200多份,其中3份优良品系在浙南沿海地区、9份优良品系在杭州盐碱地进行了安全释放试验。在盐碱地种植表现增产,值得利用。

3.2 多价基因聚合可提高耐盐性

本研究不仅获得了1~3价基因的耐盐转基因植株,而且还获得了5价杂交聚合的耐盐植株,后代遗传稳定,将水稻当家品种的耐盐性,从原来的耐盐浓度0.2%提高到0.5%~1.0%,耐盐性明显增强。转 *CMO/BADH* 或 *mtlD/gutD* 双价基因的水稻植株,耐盐能力明显高于转单个基因水稻的耐盐能力(均能耐0.5%的NaCl),而对照植株在0.5% NaCl 盐胁迫下生长受阻并最终枯萎。这说明耐盐性是由转基因所致,而不是对盐胁迫的适应,这与郭岩等^[9]、Mika等^[15]利用转基因技术提高水稻的耐盐性的结果相吻合。另外,我们通过Southern杂交发现,各组合植株的DNA经酶切后均在预期的位置出现杂交信号(图未列出),说明5个目的基因已整合进水稻基因组中,这也与PCR的结果及耐盐性一致。

不同时期的水稻植株的耐盐性有所不同。1、2叶期最敏感,渐渐地有所提高(具体数据未罗列)。

另外,还测定了盐胁迫下的种子发根力。转基因植株在0.5% NaCl 的琼脂培养基中,培养10 d,最多侧根数达14条,而对照秀水11只有3条。由于组织培养的影响,转基因当代,农艺性状有所改变,尤其表现为结实率下降。但在T₁代开始产生分离,经过选择,可以选出在结实率和单株产量等重要农艺性状上与对照相仿的单株。

植物的耐盐性是多种抗盐生理性状的综合表现,由位于不同染色体上的多个基因控制。因此,采用复合基因策略有利于获取高度耐盐转基因植株。本试验采用双价基因共转化和杂交选育的方法聚合了2~5价的耐盐基因,得到了不同耐盐能力的转基因植株。戴顺洪等^[16]应用基因枪法获得了3价基因转水稻植株。Chen等^[17]应用基因枪法将13个质粒同时导入水稻,获得了不同质粒数目的转化体。最近,刘耀光等^[18]利用将不同目的基因构建到同一质粒中,然后进行转化的策略,获得了成功,大大提高了转化效率。此外,外源基因在转化植株中并非以游离形式存在,而是整合到了基因组中。整合位点对外源基因表达效率是至关重要的^[8],但外源基因整合到植物中的拷贝数和整合位点都是不可预测的,整合的位点及多个外源基因的互作和表达效率尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 宋杰,范海,赵可夫.试论可持续的盐地农业.山东师范大学学报:自然科学版,2000,15(4):450-453.
- [2] Sivakumar P, Sharmila P, Pardha S P. Prolines suppresses rubisco activity in higher plants. *Biochem Biophys Res Comm*, 1998, 252: 428-432.
- [3] Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 1993, 259: 508-510.
- [4] Prakash K S, Padayatty J D. Transfer of saline tolerance from one strain of rice to another by injection of DNA. *Curr Sci*, 1989, 58(17): 991-993.
- [5] 刘凤华,郭岩,谷冬梅,等.转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究.遗传学报,1997,24(1):54-58.
- [6] 刘俊君,黄绍兴,彭学贤,等.高度耐盐双价转基因烟草的研究.生物工程学报,1995,11(4):384-384.
- [7] 刘岩,王国英,刘俊君,等.大肠杆菌 *gutD* 基因转入玉米及耐盐转基因植株的获得.中国科学:C辑,1998,28(6):542-547.
- [8] 苏金,陈丕铃,吴瑞.甘露醇 1-P 脱氢酶转基因表达对转基因水稻幼苗抗盐性的影响.中国农业科学,1999,32(6):101-103.
- [9] Walden R, Cordir A, Tiburcio A F. Polyamines: small mole

- cules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol*, 1997, 113 : 1009-1013.
- [10] 王慧中, 黄大年, 鲁瑞芳, 等. 转 *mtlD/gutD* 双价基因水稻的耐盐性. *科学通报*, 2000, 45(7) : 724-728.
- [11] 郭岩, 张莉, 肖岗, 等. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究. *中国科学: C 辑*, 1997, 27(2) : 151-155.
- [12] 沈义国, 杜保兴, 张劲松, 等. 山菠菜胆碱单氧化物酶基因 (*CMO*) 的克隆与分析. *生物工程学报*, 2001, 17(1) : 1-6.
- [13] Li Z Y, Chen S Y. Differential accumulation of the S adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(5) : 782-788.
- [14] 应存山. 中国稻种资源. 北京: 中国农业科技出版社, 1993: 530-539.
- [15] Mika N, Manabu I, Teruhiro T, et al. *Synechococcus* sp. *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli bet* genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol*, 1995, 107(3) : 703-708.
- [16] 戴顺洪, 李良材, 丁月云, 等. 水稻基因枪法多基因转化研究. *遗传学报*, 1998, 25(4) : 345-350.
- [17] Chen L, Marmet P, Taylor J N, et al. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Biotechnology*, 1998, 16(11) : 1060-1064.
- [18] Lin L, Liu Y G, Xu X P, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(10) : 5962-5967.