

AtNHX1 基因对菊苣的转化和耐盐性研究

赵宇玮^{1,2}, 王英娟¹, 步怀宇¹, 郝建国¹, 贾敬芬^{1*}

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 中国科学院西安光学精密机械研究所
瞬态光学与光子技术国家重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要:用农杆菌介导法将 *AtNHX1* 基因导入菊苣中, 共获得 42 株卡那霉素(Kan)抗性再生植株。经过 PCR 检测、Southern 杂交和 RT-PCR 检测表明, *AtNHX1* 基因已成功整合到菊苣基因组中, 并且能够正常转录。野生型和转基因植株诱发的愈伤组织进行耐盐生长试验, 结果显示, 相同盐胁迫条件下, 转基因愈伤组织的相对生长率显著高于野生型愈伤组织。施加梯度 NaCl 胁迫后, 植株叶片 K^+ 和 Na^+ 含量测定结果显示, 转基因植株叶片比野生型积累更多的 Na^+ 和 K^+ , 维持较高的 K^+/Na^+ ; 叶片相对电导率测定结果表明, 转基因株系叶片相对电导率显著低于野生型。上述结果表明, *AtNHX1* 基因的导入和表达在提高菊苣耐盐性的同时减轻了盐胁迫对植物细胞膜的伤害。

关键词: *AtNHX1*; 菊苣; 农杆菌; 遗传转化; 耐盐性

中图分类号: Q943. 2; Q949. 783. 5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2009)03-0103-07

* 菊苣(*Cichorium intybus*)是菊科菊苣属多年生草本植物, 广泛分布于亚洲、欧洲、美洲及大洋洲, 在我国主要分布于“三北”地区。菊苣喜暖湿润性气候, 但耐寒性能良好, 抗病性强, 在整个生育期极少发生病虫害, 同时, 菊苣还具有一定的耐盐碱性, 可在 pH 值为 8. 2, 含盐量 0. 17% 的土壤中良好生长, 是一种高产优质的牧草^[1]。菊苣还是一种重要的经济作物和药材, 其根系含有丰富的菊糖和芳香族物质, 可提制代用咖啡(*Coffea stenophylla*), 根中提取的苦味物质可提高动物消化器官的活动能力^[2]; 菊苣地上部分、根和种子可入药, 是印度及我国维吾尔族和蒙古族的习用药材^[3]。开展菊苣的研究, 尤其是培育具有较高耐旱、耐盐碱能力的菊苣品系工作对西部地区水土保持和农业/畜牧业的发展具有一定的现实意义。目前, 菊苣的生物学研究主要集中在高产栽培技术研究^[4]、植株化学成分分析^[5]和药理学研究^[6]方面, 而采用基因工程技术对菊苣进行遗传改良的研究报道较少^[7~10]。20 世纪 90 年代以来用单一的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因转化番茄(*Solanum lycopersicum*)等植物^[11~15]的研究表明, 超量表达外源液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因能够显著提高受体植物的耐盐性。这预示着人们有可能通过向目标植物导入 1 个或少数几个基因就能得到新的耐盐植物种质资源。本研究以菊苣的叶片为外植体, 应用农杆菌介导法将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 导入菊苣, 并初步分析了 *AtNHX1* 基因在转基因植物基因组中的整合情况及转基因植物的耐盐性表达特性, 为培育耐盐牧草新品种(系)和进一步利用基因工程技术对菊苣进行遗传改良打下基础。

1 材料与方法

1.1 *AtNHX1* 基因的获得及农杆菌植物表达系统构建

以 100 mmol/L NaCl 处理 24 h 的拟南芥幼苗为试验材料, 通过 RT-PCR 克隆得到编码液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白长度为 1 617 bp 的 *AtNHX1* 基因完整 ORF, 进而将该 ORF 与 2E-CaMV35S 启动子, TMV RNA 5' UTR 中的 Ω 片段和 NOS polyA 终止子串连在一起构建完整的 *AtNHX1* 基因表达盒, 然后将该表达盒插入到双元植物表达载体 pNT 质粒 T-DNA 区的多克隆位点中, 构建重组双元植物表达载体质粒 pNT-*AtNHX1*(图 1)。用液氮冻融法将 pNT-*AtNHX1* 质粒导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞中, 获得可以用于植物遗传转化研究的工程农杆菌 LBA4404(pNT-*AtNHX1*)。

* 收稿日期: 2008-07-23; 改回日期: 2008-10-13

基金项目: 陕西省教育厅基金项目(No. JH06238), 陕西省重点实验室科学研究计划项目(No. 08JZ71)和陕西省自然科学基金(2007C104)资助。

作者简介: 赵宇玮(1977-), 男, 北京人, 讲师, 博士。E-mail: zhaoyw@nwu. edu. cn

* 通讯作者。E-mail: Jiajf38@nwu. edu. cn

1.2 植物材料

菊苣的种子经常规灭菌后接种到不添加外源激素的 MS 培养基上,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 16 h/d, $36 \mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 的光照条件下萌发产生无菌苗。

1.3 菊苣离体再生体系的建立

将萌发 7~14 d 的无菌苗叶片切成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 小块,接种到 MS_1 (附加 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 抗坏血酸 100 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%, pH 值 5.8~6.2 的 MS) 固体培养基上,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 和 16 h/d, $36 \mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 的光照条件下培养 28 d,诱导愈伤组织。愈伤组织在 MS_1 培养基上再次继代培养 14~28 d 分化出大量丛生不定芽。当不定芽 2~5 cm 高时,将其从愈伤组织上取下,插入到生根培养基 MS_2 (附加 IBA 0.2 mg/L + 蔗糖 3% + 琼脂 0.7%, pH 值 5.8~6.2 的 1/2MS 固体培养基) 上,壮苗并生根。再生苗形成发达根系后,炼苗 7~10 d,直接移栽到花卉营养土:沙:黄土=1:1:1 的混合土中,温室培养。

1.4 农杆菌 LBA4404(pNT-AtNHX1)对菊苣的遗传转化

农杆菌 LBA4404(pNT-AtNHX1)活化培养至对数生长期,于 4°C 8 000 r/min 离心 1 min,弃去培养液,用无菌的 MS_0 液体培养基重悬菌体稀释至 $\text{OD}_{600} = 0.5$ 。将菊苣叶片切块浸在添加 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的乙酰丁香酮(AS)的上述农杆菌菌液中侵染 10 min。农杆菌侵染后的外植体在添加 25 mg/L Kan 的 MS_1 培养基上,经历常规共培养和筛选培养,约 90 d 后获得卡那霉素(Kan)抗性愈伤组织。Kan 抗性愈伤组织分化出的绿色小苗生长到 6~8 cm 时,切下再生苗转接至添加 25 mg/L Kan 的 MS_2 培养基,16 h/d, $36 \mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 的光照条件下诱导生根,转基因幼苗长出发达根系后移栽至土壤中。

1.5 T_0 代转基因植物的初步鉴定

1.5.1 转基因植物的 PCR 检测

采用十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)微量法^[16]分别提取假定转基因植株和野生型菊苣基因组 DNA。PCR 检测 *npt II* 和 *AtNHX1* 基因在转基因植物基因组中的整合状况。*AtNHX1* 基因的 PCR 引物序列如下,上游引物:5'-CgggATCCACCATggTggATTCTCTAgTgTCg-3',下游引物:5'-ACgCgTCgACTCAAAGCCTTACTAAgATCAgg-3'。PCR 扩增体系 20 μL ,扩增程序为:94 $^\circ\text{C}$ 4 min;94 $^\circ\text{C}$ 1 min,60 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 1.5 min,35 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。*npt II* 基因保守序列 PCR 引物序列如下,上游引物:5'-TCCggCCgCTTgggTggAgAg-3';下游引物:5'-CTggCgCgAgCCCCTgATgCT-3'。PCR 扩增体系 20 μL ,扩增程序为:94 $^\circ\text{C}$ 3 min;94 $^\circ\text{C}$ 1 min,63.6 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 45 s,33 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,由 BiocaptMW 凝胶成像系统记录结果。

1.5.2 转基因植物的 Southern blot 杂交检测

分别提取 30~40 μg 假定转基因植株和野生型菊苣基因组 DNA,以 *AtNHX1* 基因中间 510 bp 特异性序列为探针,按 Roche 公司的 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒使用说明进行 Southern blot,质粒和基因组 DNA 均使用购自 Takara 公司的 EcoR I 酶切。

1.5.3 转基因植物的 RT-PCR 检测

分别提取菊苣转基因植株和野生型植株总 RNA,用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行逆转录。以 cDNA 的第一链为模板,PCR 扩增目的基因 *AtNHX1*,所用引物、反应体系、PCR 程序同 1.5.1。

1.5.4 转基因植物愈伤组织对 NaCl 胁迫的抗性试验

从不同转基因株系诱导的愈伤组织(愈伤组织编号与其外植体转基因株系编号相同)和野生型愈伤组织经过 2 次传代培养后,分别接种到含不同浓度(0, 50, 100, 150, 200 和 250 mmol/L)NaCl 的 MS_1 培养基。每组处理 25 块,设 3 组重复。在 16 h/d, $36 \mu\text{mol}/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$ 光照, $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下培养 28 d,统计愈伤组织相对生长量。

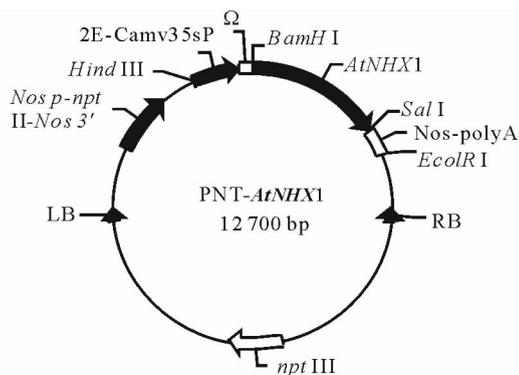


图 1 植物双元表达载体 pNT-AtNHX1 质粒结构示意图

Fig. 1 Sketch map of the expression vector plasmid of pNT-AtNHX1

1.5.5 转基因植物在 NaCl 胁迫下的叶片 Na⁺、K⁺ 含量测定 取生长 4 周,高 7~8 cm,具有 4~6 片真叶的转基因及野生型菊苣组培苗于培养皿中,用含不同浓度(0,50,100,150 和 200 mmol/L)NaCl 的 MS₀ 液体培养基对其进行浇灌。为了消除外源盐胁迫诱导菊苣自身抗逆基因的短时应激性表达对试验结果的影响(外源导入的 *AtNHX1* 基因为组成型表达),盐液浇灌 24 h 后,剪取试验材料的叶片 45℃ 烘至恒重,参照王宝山和赵可夫^[17] 的方法,使用岛津 AA6300 原子吸收分光光度计测定供试材料中的 Na⁺、K⁺ 含量。

1.5.6 转基因植物在 NaCl 胁迫下的叶片电导率测定 分别取同 1.5.5 处理转基因菊苣及野生型组培苗新鲜叶片 0.5 g,加 30 mL 超纯水。1 份于 25℃、150 r/min 振荡 4 h,另一份煮沸 5 min,然后分别用电导率仪 DDB-303A 测定 2 份溶液的电导率^[11]。前者定义为 *R_c*,后者定义为 *R_c'*,相对电导率=*R_c*/*R_c'*×100%。

2 结果与分析

2.1 转 *AtNHX1* 基因菊苣再生植株的获得

农杆菌侵染的外植体于 MS₀ 固体培养基上共培养 3~7 d 后,置于含 Kan 25 mg/L+Cef 250 mg/L 的 MS₁ 选择培养基上诱导 Kan 抗性愈伤组织。培养 7~10 d,外植体边缘开始形成大量愈伤组织(图 2A),但这些愈伤组织中的绝大多数在含 Kan 25 mg/L 的 MS₁ 培养基上继代培养过程中逐渐黄化或褐化,只有少数愈伤组织可以分化出再生苗(图 2B)。待再生绿苗生长到 6~8 cm 高时,将其从母体愈伤组织上切下,随即插入附加 25 mg/L Kan 生根培养基 MS₂ 上诱导生根(图 2C)。3 周左右可形成生长健壮的 Kan 抗性再生植株(图 2D),经过炼苗,即可移栽到土壤中(图 2E)。

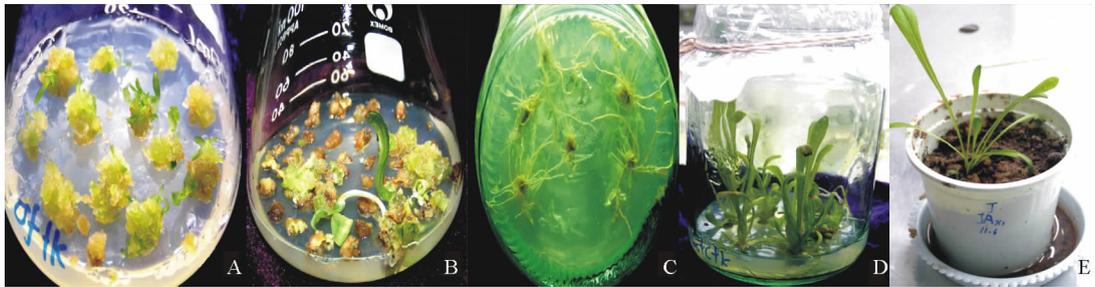


图 2 农杆菌介导转 *AtNHX1* 基因菊苣的获得

Fig. 2 Transgenic *Cichorium intybus* obtained via *Agrobacterium* mediated transformation

A: 外植体转化得到的 Kan 抗性愈伤组织 Kan-resistant calli derived from transformed explants; B: Kan 抗性细胞系分化得到的再生芽 The regenerated plantlets from Kan-resistant calli; C: Kan 抗性植株生根 Rooting of the regenerated Kan-resistant plantlets; D: Kan 抗性再生植株 The regenerated Kan-resistant plantlets; E: 移栽的 Kan 抗性再生苗. Kan-resistant plantlets transplanted to soil

2.2 转基因植株的分子生物学鉴定

2.2.1 转基因植株的 PCR 检测 分别以卡那霉素抗性筛选标记基因 *npt II* 保守区(491 bp)和目的基因 *AtNHX1*(1 617 bp)作为检测的靶 DNA 进行 PCR 反应。在 42 个假定 T₀ 代转基因植株中,11 个植株的基因组 DNA 能够扩增出预期的 2 种产物;另 7 个植株基因组 DNA 中只能检测到 *npt II* 基因的整合,而检测不到 *AtNHX1* 基因(部分试验结果见图 3);其余植株为假转化子。

2.2.2 转基因植株的 Southern blot 检测 分别制备野生型及 2 个经 PCR 检验初步确定为转基因株系的菊苣植株基因组 DNA 用 *EcoRI* 完全酶解后,进行 Southern blot 试验(图 4)。结果表明,野生型

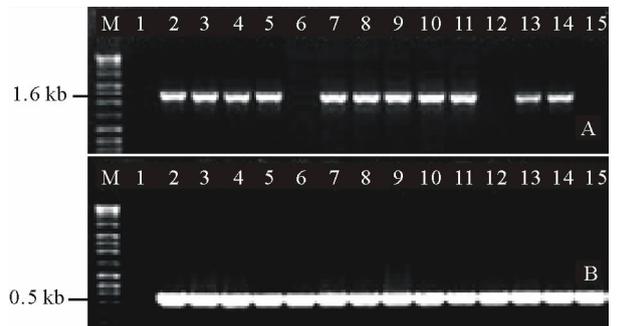


图 3 部分 T₀ 代转基因植株的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detecting of some T₀ generation transgenic plants

A: *AtNHX1* 基因扩增结果 Amplify of *AtNHX1*; B: *npt II* 基因扩增结果 Amplify of *npt II*; M: 1 kb plus DNA Marker; 1: 野生型植株 Wild-type plants; 2~15: 1~14 号 T₀ 代转基因植株 T₀ generation transgenic plants No. 1—No. 14

植物基因组 DNA 没有阳性信号;2 个 Kan 抗性株系的基因组 DNA 中,均出现阳性杂交信号。这初步表明所检验的 2 个假定转基因株系均是真实的转基因植株,各有 1 个拷贝的 *AtNHX1* 基因整合到菊苣的基因组中。

2.2.3 转基因植株的 RT-PCR 检测 RT-PCR 检测转基因植株中 *AtNHX1* 基因的表达状况,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 5)显示,野生型植株总 RNA 的反转录产物没有特异性的扩增信号,2 个转基因株系总 RNA 的反转录产物都能够扩增出预期的 1.6 kb 目标产物。这一结果说明目的基因 *AtNHX1* 可以在所检测的转基因植株中正常地转录。

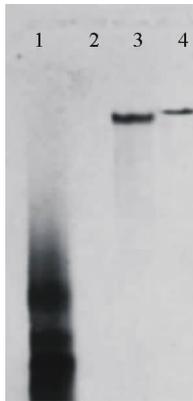


图 4 部分 T₀ 代转基因植株的 Southern blot 分析

Fig. 4 Southern blot analysis of some T₀ generation transgenic plants

1: pNT-*AtNHX1* 质粒 DNA DNA of plasmid pNT-*AtNHX1*;
2: 野生型植株 Wild-type plants; 3~4: 1~2 号 T₀ 代转基因植株 T₀ generation transgenic plants No. 1-No. 2

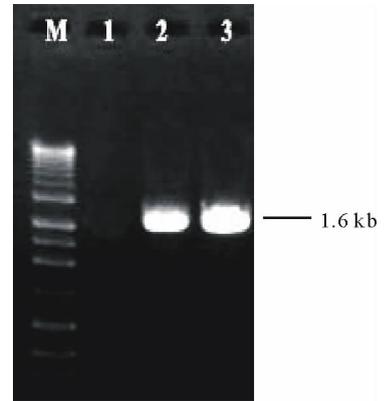


图 5 部分 T₀ 代转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR detecting of some T₀ generation transgenic plants

M: 1 kb plus DNA Marker; 1: 野生型植株 Wild-type plants;
2~3: 1~2 号转基因株系 T₀ generation transgenic plants No. 1-No. 2

2.3 转基因植株耐盐性的初步生理鉴定

2.3.1 转基因植株愈伤组织对 NaCl 胁迫的耐受性分析 1 和 2 号转基因株系诱发的愈伤组织(分别编号为 1 和 2 号转基因愈伤组织)和野生型菊苣愈伤组织在含不同浓度 NaCl(0, 50, 100, 150 和 200 mmol/L)的 MS₁ 培养基上的耐盐试验结果如图 6 所示。随 NaCl 胁迫浓度升高,转基因和野生型菊苣愈伤组织的相对生长率均下降,但转基因愈伤组织表现出显著高于野生型的相对生长。当培养基中 NaCl 浓度达到 150 mmol/L 时转基因愈伤组织的相对生长率为野生型愈伤组织的 4.0~4.5 倍;而当 NaCl 胁迫浓度提高到 250 mmol/L 时,野生型愈伤组织停止生长,而转基因愈伤组织仍然表现出 5.2%~7.2% 的相对生长率。

2.3.2 转基因植株在 NaCl 胁迫下的叶片 Na⁺/K⁺ 含量 随着培养基中 NaCl 浓度的提高,野生型和转基因植株的 Na⁺ 含量都上升(图 7);而两者叶片中的 K⁺ 含量则随培养基中 NaCl 浓度的提高,表现出先上升,后下降的趋势,拐点出现在 NaCl 浓度达到 250 mmol/L 时(图 8)。同时,在相同的 NaCl 胁迫条件下,转基因植株叶片中 Na⁺ 和 K⁺ 含量均明显高于野生型植株。对植株叶片 K⁺/Na⁺ 的统计结果(表 1)进一步显示,在相同浓度的 NaCl 胁迫下,转基因植株叶片不仅比野生型植株积累更多的 Na⁺ 和 K⁺,同时维持较高的 K⁺/Na⁺。

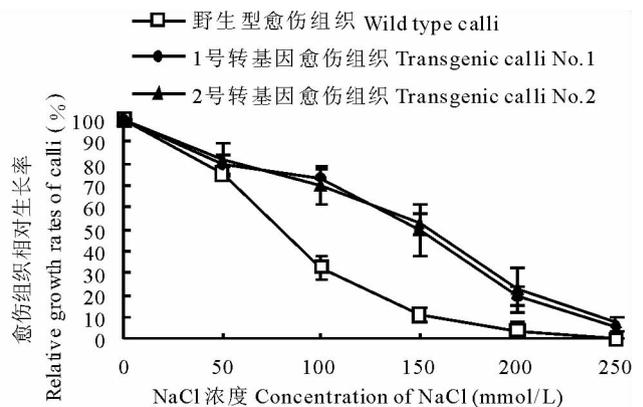


图 6 转基因愈伤组织在 NaCl 胁迫下的相对生长率测定

Fig. 6 Relative growth rate of the transgenic calli under the stress of NaCl

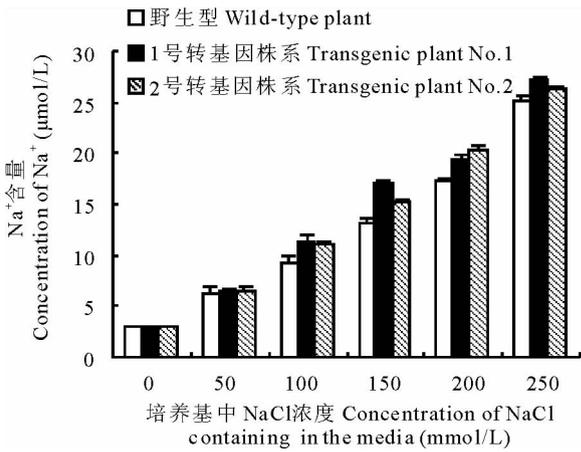


图 7 菊苣叶片 Na⁺ 含量测定

Fig. 7 Detecting of the Na⁺ concentration in leaves of *C. intybus*

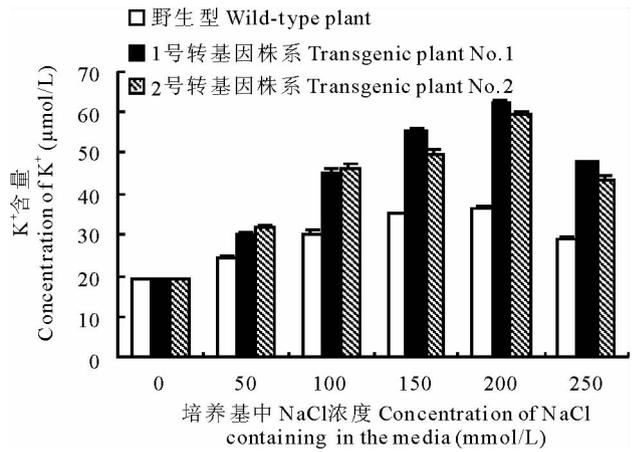


图 8 菊苣叶片 K⁺ 含量测定

Fig. 8 Detecting of the K⁺ concentration in leaves of *C. intybus*

表 1 NaCl 胁迫对菊苣叶片 K⁺/Na⁺ 的影响

Table 1 Effects of NaCl stress on the K⁺/Na⁺ in the leaves of *C. intybus*

NaCl 浓度 Concentration of NaCl (mmol/L)	菊苣叶片 K ⁺ /Na ⁺ K ⁺ /Na ⁺ in the leaves of <i>C. intybus</i>		
	Wt	T ₁	T ₂
0	6.54	6.40	6.49
50	3.89	4.73	5.00
100	3.26	4.00	4.21
150	2.41	3.21	3.26
200	2.11	3.22	2.90
250	1.16	1.75	1.65

Wt:野生型菊苣 Wild type *C. intybus*; T₁:1 号转基因株系 Transgenic plants No. 1; T₂:2 号转基因株系 Transgenic plants No. 2.

2.3.3 转基因植株在 NaCl 胁迫下的叶片电导率

野生型植株与转基因植株的叶片相对电导率均随 NaCl 胁迫浓度的提高而增加(图 9),但在相同 NaCl 胁迫浓度下,转基因株系的叶片相对电导率低于野生型株系,随着盐胁迫程度的增加,野生型植株的叶片相对电导率的增长幅度大于转基因植株。在 250 mmol/L NaCl 胁迫下,野生型菊苣植株的相对电导率增加到未受胁迫时的 4.4 倍;而此条件下转基因植株的平均相对电导率只增加 3.2 倍。

3 讨论

3.1 转 *AtNHX1* 植株细胞水平耐盐性分析

有较多的研究报告表明,通过基因工程手段将液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因在植物中的表

达上调,可以显著提高植物的耐盐性,而且这种提高与液泡膜 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的来源无关^[18~20]。与之类似,对转 *AtNHX1* 基因的菊苣细胞系进行了盐胁迫耐受能力检测,结果表明在不同浓度的盐胁迫下,转基因愈伤组织的相对生长率均明显高于野生型愈伤组织,可见, *AtNHX1* 基因的导入能够显著提高转基因菊苣细胞水平上的耐盐性。

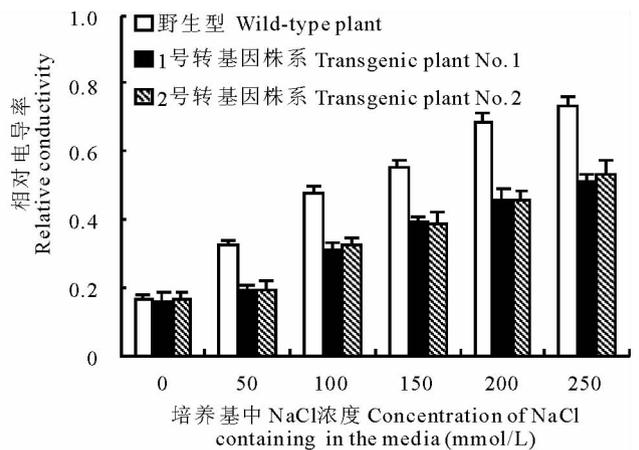


图 9 菊苣叶片相对电导率测定

Fig. 9 Detecting of relative conductivity in the leaves of *C. intybus*

3.2 转 *AtNHX1* 基因植株叶片 K^+ , Na^+ 含量及相对电导率分析

菊苣叶片 K^+ , Na^+ 含量测定结果显示, 同等盐胁迫条件下, 转基因植株积累了较多的 Na^+ , 这可能是由于与野生型细胞相比, 外源 *AtNHX1* 基因组成型表达的产物增强了转基因植株细胞的 Na^+ 区域化能力, 能够把更多渗透到胞质中的 Na^+ 转运进液泡内储存起来。转基因植物细胞这种增强了的 Na^+ 区域化能力, 能够使细胞积累较多的 Na^+ , 但由于这些 Na^+ 主要被区域化到液泡中, 与野生型细胞相比其细胞基质中的 Na^+ 反而较少。通常认为细胞通过质膜对 Na^+ 和 K^+ 的吸收是相互抑制的, 胞质 Na^+ 浓度的相对降低导致了更多的 K^+ 内流。细胞内 K^+ 含量经历峰值后明显下降的可能原因是, 随环境中盐胁迫的进一步加剧, 细胞膜破坏程度加大, 细胞膜两侧电化学梯度难以保持, 导致 K^+ 内流减少而外泄增加。有报道认为 $NaCl$ 胁迫下, 细胞内 K^+ / Na^+ 的高低与植物细胞水平的耐盐性呈正相关^[21]。本试验所测试的各个浓度 $NaCl$ 胁迫下, 转基因株系细胞内 K^+ / Na^+ 始终高于野生型, 这表明 T₀ 代转基因菊苣的耐盐能力比野生型植株有了显著提高。在盐胁迫下, 植株的相对电导率 (R_c / R_c') 反映的是细胞膜在渗透胁迫下受到伤害的程度, 常被作为细胞膜在逆境胁迫下是否具有生理活性的重要指标之一。植物在遭受到盐胁迫时, 相对电导率越低, 表明细胞质电解液外渗的越少, 细胞膜受到破坏的程度越低, 细胞受到的伤害也越小, 该植物抗盐胁迫能力越强^[22,23]。本研究发现相同浓度 $NaCl$ 胁迫下转基因株系的叶片相对电导率显著低于野生型株系, 表明外源 *AtNHX1* 基因的导入提高了植株的耐盐性, 使盐胁迫条件下转基因株系细胞膜受伤害程度减轻。

参考文献:

- [1] Scharenberg A, Arrigo Y, Gutzwiller A, *et al.* Palatability in sheep and in vitro nutritional value of dried and ensiled sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), and chicory (*Cichorium intybus*) [J]. Archives of Animal Nutrition, 2007, 61(6): 481-496.
- [2] Wiele T V, Boon N, Possemiers S, *et al.* Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 51(1): 143-153.
- [3] Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used Indian medicinal plants [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2007, 29(2): 79-92.
- [4] François I M, Marien E, De Proft M. Influence of harvest date on the yield and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) [J]. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 2006, 71(1): 145-149.
- [5] Ahmed B, Khan S, Masood M H, *et al.* Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside, a sesquiterpene glycoside from the seeds of *Cichorium intybus* [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2008, 10(3): 218-223.
- [6] Juśkiewicz J, Asmianskaite L, Zduńczyk Z, *et al.* Metabolic response of the gastrointestinal tract and serum parameters of rabbits to diets containing chicory flour rich in inulin [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2008, 92(2): 113-120.
- [7] 程林梅, 孙毅, 王亦学, 等. 菊苣农杆菌介导转化受体系统的研究 [J]. 草业学报, 2008, 17(1): 130-134.
- [8] Legrand S, Hendriks T, Hilbert J L, *et al.* Characterization of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L [J]. BMC Plant Biology, 2007, 6(7): 27-39.
- [9] Asad M. RNA interference (RNAi) as a tool to engineer high nutritional value in chicory (*Chicorium intybus*) [J]. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 2006, 71(1): 75-78.
- [10] 宋书锋, 曹凤, 杨培志, 等. 普那菊苣高效再生体系建立和遗传转化研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(4): 565-570.
- [11] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(6): 765-768.
- [12] Zhang H X, Hodson J N, Williams J P, *et al.* Engineering salt-tolerant brassica plant: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increase vacuolar sodium accumulation [J]. Proceedings of National Academy of Sciences of USA, 2001, 98(22): 12832-12836.
- [13] 尹小燕, 杨爱芳, 张可炜, 等. 转 *AtNHX1* 基因玉米的产生及其耐盐性分析 [J]. 植物学报 (英文版), 2004, 46(7): 854-867.
- [14] Xue Z Y, Zhi D Y, Xue G P, *et al.* Enhanced salt tolerance wheat (*Triticum aestivum* L) expressing a vacuolar Na^+ / H^+ an-

- tiporter 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.
- [15] 赵宇玮,步怀宇,郝建国,等. *AtNHX1* 基因对草木樨状黄芪的转化和耐盐性表达研究[J]. *分子细胞生物学报*, 2008, 41(3):213-221.
- [16] Clark M S. 植物分子生物学——实验手册[M]. 顾红雅,瞿礼佳,编译. 北京:高等教育出版社,1998. 6-7.
- [17] 王宝山,赵可夫. 小麦叶片中 Na^+ 、 K^+ 提取方法的比较[J]. *植物生理学通讯*, 1995, 31(1):50-52.
- [18] 王艳,曾幼玲,贺宾,等. 农杆菌介导 *NHX1* 基因转化甘蓝型油菜的研究[J]. *作物学报*, 2006, 32(2):278-282.
- [19] 刘晶,周树峰,陈华,等. 农杆菌介导的双价抗盐基因转化番茄的研究[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(8):1636-1644.
- [20] 薛哲勇,支大英,夏光敏,等. 根癌农杆菌介导 *AtNHX1* 基因转化小麦[J]. *山东大学学报(理学版)*, 2003, 38(1):106-109.
- [21] 毛桂莲,许兴,徐兆桢. 植物耐盐生理生化研究进展[J]. *中国农业生态学报*, 2004, 12(1):432-461.
- [22] 薛延丰,刘兆普. 外源钙离子缓解海水胁迫下菊芋光合能力下降的研究[J]. *草业学报*, 2007, 16(6):76-80.
- [23] 许桂芳. PEG 胁迫对 2 种过路黄抗性生理生化指标的影响[J]. *草业学报*, 2008, 17(1):66-70.

Transformation of *Cichorium intybus* with the *AtNHX1* gene and salinity tolerance of the transformants

ZHAO Yu-wei^{1,2}, WANG Ying-juan¹, BU Huai-yu¹, HAO Jian-guo¹, JIA Jing-fen¹

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. State Key Laboratory of Transient Optics and Photonics, Xi'an 710069, China)

Abstract: The *AtNHX1* gene was transferred into *Cichorium intybus* using *Agrobacterium* and 42 regenerated plants resistant to Kanamycin (Kan) were obtained. Incorporation and expression of the *AtNHX1* gene in the transformants were confirmed by PCR, Southern blot, and RT-PCR. Under the same salt stress conditions, the transgenic calli with NaCl resistance, that were induced from transgenic plants, had considerably higher relative growth rates than the wild-type calli. Under the stress of different concentrations of NaCl, the K^+/Na^+ ratio in the transgenic plant cells was always higher than that in the wild-type, whereas the relative conductivity was the opposite. The transformation of the *AtNHX1* gene not only enhanced the salt tolerance of transgenic *C. intybus*, but also reduced cell membrane damage induced by salinity.

Key words: *AtNHX1*; *Cichorium intybus*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; salt-stress resistance