

过量表达 *TaNHX2* 基因提高转基因棉花的抗旱耐盐性

张慧军¹, 张万科², 俞嘉宁³, 孔祥强⁴, 陈受宜², 王丹¹, 张国强¹, 董合忠^{4*}

(1. 山西省农业科学院棉花研究所, 山西 运城 044000; 2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 3. 陕西师范大学生命科学院, 西安 710119; 4. 山东棉花研究中心, 济南 250100)

摘要:液泡膜 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白在调节离子平衡, 提高植物耐盐耐旱方面起着重要功能。为了研究液泡膜 Na⁺/H⁺ 反向转运蛋白基因 *TaNHX2* 在棉花耐盐耐旱中的作用, 以晋棉 7 号为受体, 利用农杆菌介导法将克隆自小麦的 *TaNHX2* 基因转入棉花愈伤组织, 通过组织培养胚状体发生途径获得转基因再生植株。以 0.5% 卡那霉素对再生苗筛选后, 利用 PCR 和 RT-PCR 进行分子检测, 证实外源基因已导入棉花并正常表达。在温室盆栽条件下, 于 4 片真叶期对转 *TaNHX2* 基因棉花及其野生型对照施加 NaCl 或 PEG 胁迫处理, 处理 10 天后发现盐胁迫或干旱胁迫显著抑制了棉花光合作用, 提高了丙二醛(MDA)含量; 转 *TaNHX2* 基因棉花的光合速率(Pn)显著高于野生型, MDA 含量显著低于野生型; 转 *TaNHX2* 基因棉花在盐旱胁迫后, 叶片和根系中的 Na⁺ 含量显著低于野生型对照。这些结果说明: 在棉花中过量表达 *TaNHX2* 基因, 盐旱胁迫下可以降低转基因棉花的 Na⁺ 含量, 提高光合速率, 降低 MDA 含量, 从而提高转基因棉花的耐盐抗旱能力。

关键词:棉花; *TaNHX2*; 遗传转化; 耐盐性; 抗旱性

中图分类号: S562

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)01-0031-05

The Overexpression of *TaNHX2* Gene Can Improve Salt and Drought Tolerance of Transgenic Cotton

ZHANG Huijun¹, ZHANG Wanke², YU Jianing³, KONG Xiangqiang⁴, CHEN Shouyi², WANG Dan¹,

ZHANG Guoqiang¹, DONG Hezhong^{4*}

(1. Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000; 2. Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; 3. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119; 4. Cotton Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: Vacuole-type Na⁺/H⁺ antiporter can transport Na⁺ into vacuoles, which increase plant salt tolerance by averting the deleterious effects of Na⁺ in the cytosol and maintaining ionic balance. In order to reveal the function of *TaNHX2* from wheat in salt tolerance of cotton, the *TaNHX2* gene was transferred into the somatic cells of cotton (Jinmian 7) by agrobacterium-mediated transformation technology, and the transformed plants were regenerated through somatic embryogenesis in tissue culture. After selection with 0.5% kanamycin, the kanamycin-resistant regenerated plants were confirmed by PCR and RT-PCR that the *TaNHX2* gene was integrated into the genome of cotton and expressed normally. At the four true-leaf stage, transgenic cotton seedlings were treated with different concentrations of NaCl or PEG for 10 days under greenhouse conditions, the photosynthetic rate, MDA content, and Na⁺ content of cotton leaves were determined. The results showed that overexpression of *TaNHX2* reduced Na⁺ content in cotton, alleviated ion toxicity and improved salt and drought tolerance of transgenic cotton under salt drought stress.

Key words: Cotton; *TaNHX2*; Genetic transformation; Salt tolerance; Drought tolerance

收稿日期: 2020-01-26

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08005-018B); 山西省科技厅攻关项目(20150311004); 山西省农科院农业科技创新有机旱作农业研发专项(YCX2018421)

作者简介: 张慧军(1965-), 女, 副研究员, 硕士, 主要从事棉花生物技术研究。

通讯作者: 董合忠, 男, 博士, 研究员, E-mail: donghezhong@163.com

棉花是耐盐、抗旱性较强的农作物,利用棉花抗旱、耐盐的特性,积极发展盐碱地、旱地和瘠薄地植棉,是保障棉花有效供给的现实途径^[1-2]。但是,棉花的耐盐、抗旱能力也是有限的,利用基因工程手段获得抗旱、耐盐棉花种质,培育耐盐、抗旱棉花新品种是开发利用旱地和盐碱地植棉,减轻盐碱、干旱危害的有效途径。

盐胁迫条件下,首先产生渗透胁迫,植物通过吸收无机离子来对抗渗透胁迫,但是随着无机离子特别是 Na^+ 的大量积累又产生了离子毒害。为了在盐胁迫环境中更好生存,植物可通过降低细胞质中的 Na^+ 含量,减轻离子毒害^[3]。通过细胞膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(SOS1)把细胞质内的 Na^+ 外排到细胞外,通过液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(NHX)把细胞质内的 Na^+ 区隔化到液泡中,从而降低细胞质内 Na^+ 含量,减轻离子毒害^[4-6]。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(NHX)将细胞质中的 Na^+ 区隔化至液泡消除 Na^+ 毒害,同时促进 K^+ 的高亲和力吸收^[7],并且对维持盐胁迫植物细胞稳定的pH值和离子稳态起到重要作用^[8]。目前,已克隆了拟南芥、水稻、冰叶日中花等多个植物的液泡膜NHXs基因,在拟南芥、番茄和棉花中过量表达NHX1基因,均提高了转基因植株的耐盐性^[9],而NHXs基因失活突变体的耐盐性降低^[10],进一步说明液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白可提高植物的耐盐性。

Yu J N等^[11]发现小麦*TaNHX2*基因受盐胁迫、干旱、冷胁迫和ABA等诱导,在酵母中过量表达*TaNHX2*基因可提高酵母对盐胁迫、渗透胁迫和冷胁迫的抗性,说明小麦*TaNHX2*基因具有耐盐、抗旱功能。Cao Dong等^[12]在大豆中过量表达*TaNHX2*基因,发现转基因大豆在NaCl胁迫下的存活率、生物量、开花数均高于受体品种;在普那菊苣和玉米中过量表达*TaNHX2*,也都增强了转基因植株的耐盐性^[13-14]。但迄今未见*TaNHX2*基因转化棉花并提高耐逆性的报道。本项研究利用农杆菌介导法将*TaNHX2*基因转入棉花,获得过量表达*TaNHX2*基因的棉花,研究*TaNHX2*基因在棉花耐盐、抗旱中的作用。

1 材料和方法

1.1 植物材料、载体和菌种

受体材料为晋棉7号,*TaNHX2*基因的植物表达载体为pBin438(中国科学院遗传与发育生物学研究所陈受宜课题组提供),筛选标记基因为NPT II,转化所用农杆菌菌株为GV3101。

1.2 棉花的遗传转化与植株再生

挑选脱绒的饱满棉花种子用75%乙醇消毒1 min,再用30%过氧化氢浸泡4 h,之后用无菌水冲洗5~6遍后浸泡于无菌水中直至种子露白。在无菌条件下将露白的种子去除种皮种于1/2 MS+20 g/L蔗糖+2.5 g/L phytagel培养基上,置于25℃左右培养间,5天之后取无菌苗下胚轴切段作为外植体,按照张慧军等^[15-16]报道的方法,通过农杆菌介导转化技术转化棉花,获得棉花再生株。

将试管苗通过嫁接方法^[17-18]嫁接并移栽到大田。嫁接时选生长健壮的试管苗嫁接于根系发育旺盛、耐逆性强的砧木上,嫁接成活后移入大田,成熟吐絮后收获种子。

1.3 转基因植株大田抗性检测

将以上棉株收获的种子播种于大田,利用0.5%卡那霉素溶液涂抹3叶期的棉花幼苗,一周之后,叶片变黄或有黄斑严重的为非转化株;叶片呈现正常绿色的为转化株。选取叶色不变的转化株作进一步检测,并单株收取种子。

1.4 转基因棉花分子检测

选取适量的转基因再生株后代幼嫩叶片,利用植物基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN公司,DP305)提取总DNA;利用RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(TIANGEN公司,DP441)提取总RNA,然后取5 μg 总RNA,利用反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific, K1641)进行反转录,获得cDNA。分别以植物总DNA和cDNA为模板,利用普通PCR方法验证*TaNHX2*基因在棉花基因组上的整合情况和*TaNHX2*基因在转基因棉花中的表达情况。所用引物由上海生工公司合成。验证*TaNHX2*基因在基因组中整合的PCR引物为Ta-F1: 5'-GACGCACAATCCCACTATCC-3'和Ta-R1: 5'-AGCAGCTCTTCCAACCAGAACCA-3'。扩增条件为:94℃ 5 min,35个循环(94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min),72℃ 5 min。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳分离检测。验证*TaNHX2*基因表达量的引物为Ta-F2: 5'-ATGGGGTACCAAGTGGTGGCGG-3'和Ta-R2: 5'-ACTGTACAAAAGGGCGTCTCG-3';棉花*GhACT7*内参基因的引物为GhACT7-F: 5'-AATGCTGAAGGCTG-GTTTTGCT-3'和GhACT7-R: 5'-ACAATACCTGTC-GTCCGACCA-3'。扩增条件为:94℃ 5 min,28个循环(94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s),72℃ 5 min。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳分离检测^[19]。

1.5 温室棉苗培养和胁迫处理

选取饱满的转基因棉花材料种子 L1(168)和 L2(170)及其转化受体 CK(晋棉 7 号),播种在盛有育苗基质中熟料盆(直径 25 cm,高度 30 cm)中,待棉苗长出 2 片真叶后间苗,每盆只留 5 株棉苗。棉苗长出 4 片真叶时,选取生长一致的棉苗一部分用作盐胁迫处理,一部分用作干旱胁迫处理。盐胁迫处理如下:分别用含 150 mmol/L 和 300 mmol/L NaCl 的 hogland 营养液浇灌处理,以不加 NaCl 的营养液浇灌处理为对照。NaCl 处理液的浓度逐渐增加,从 75 mmol/L 浓度开始,每次处理递加 75 mmol/L 直到终浓度,每隔 1 d 处理一次,达到处理终浓度后,用相应浓度盐溶液继续处理 10 d。干旱处理如下:分别用含 10% 和 20% PEG 的 hogland 营养液浇灌处理,以不加 PEG 的营养液浇灌处理为对照。PEG 处理液的浓度逐渐增加,从 5% 浓度开始,每次处理递加 5% 直到终浓度,每隔 1 d 处理一次,达到处理终浓度后,用相应浓度溶液继续处理 10 d。每次浇灌量为培养基持水量的 3 倍,以保持盆中处理液浓度的恒定。每个处理重复 3 次。

1.6 耐盐、抗旱测定项目及方法

光合参数的测定:用 Li-6400 便携式光合测定仪(美国 LI-COR 公司生产),分别在 NaCl 和 PEG 处理后 10 d 9:00 ~ 11:00 测定各处理棉苗第 4 片真叶的光合参数。

Na⁺含量测定:棉苗根系和第 4 片真叶烘干,研磨后取 0.03 g 干样,加入 3 mL 消化液(60% 三氯乙酸:硝酸:浓硫酸=2:10:1),95℃ 水浴消化 20 ~ 30 min,冷却离心后,取上清液稀释 100 倍,用原子吸收光谱仪(普析通用公司生产)测定 Na⁺的含量。

MDA 含量测定:采用硫代巴比妥酸反应比色测定丙二醛(MDA)的含量。

2 结果与分析

2.1 转 *TaNHX2* 基因棉花的获得

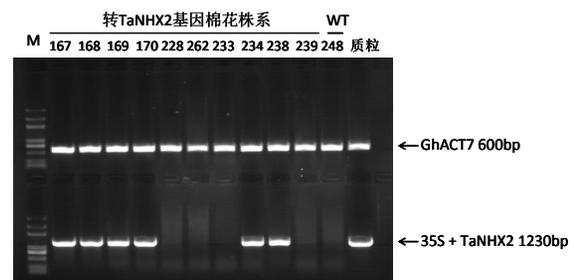
经共培养处理的棉花下胚轴在诱导筛选培养基中培养 1 ~ 2 个月,大部分感染块可诱导出抗性愈伤组织,抗性愈伤组织经继代培养后产生胚状体,将胚状体转移至分化培养基,继代 2 次后分化出再生苗。待再生苗长至 10 ~ 15 cm 后,将再生苗直接移栽或嫁接于根系发达耐逆性强的砧木上,成活后直接移入大田,获得生长健壮的转化再生植株,并单株收获种子。

收获的棉花种子播种在大田,待棉苗长出 3 ~ 4 片真叶后,利用 0.5% 卡那霉素溶液涂抹棉花

叶片。涂抹一周后观察,叶片没有变化,显示正常绿色的是抗卡那霉素的棉花,这类棉花可能是转基因棉花,叶片发黄干枯的为不抗卡那霉素的非转基因棉花。

2.2 转 *TaNHX2* 基因棉花的分子验证

提取涂抹卡那霉素后不变色的棉花幼嫩叶片 DNA,利用 PCR 检测 *TaNHX2* 基因是否整合到棉花基因组中。试验结果显示,转基因棉花中可以检测到 1 230 bp 的目的条带,而在阴性对照和非转化植株中检测不到目的条带。图 1 为部分转基



M: 分子粒标记; 转 *TaNHX2* 基因棉花株系: 不同的转基因株系; WT: 野生型对照; 质粒: 阳性对照

图 1 转 *TaNHX2* 基因棉花的 PCR 检测

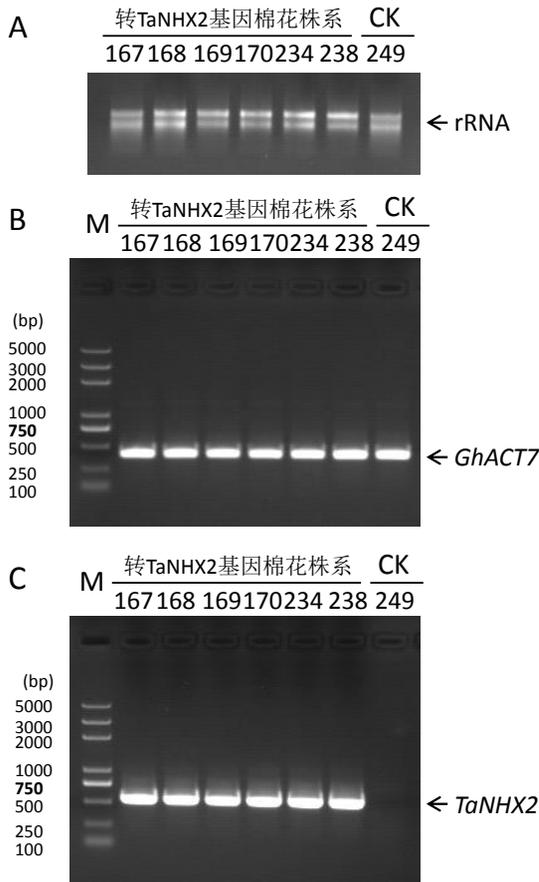
因棉花的 PCR 试验图片,株系 167、168、169、170、234 和 238 中检测到了目标基因 *TaNHX2*,为转基因材料;而 228、262、233、239 中未检测到目标基因 *TaNHX2*,为非转基因材料。然后,选取 6 个转基因材料,提取 RNA,利用 RT-PCR 验证这 6 个转基因材料的基因表达情况。发现在 6 个转基因棉花材料中,*TaNHX2* 基因都能正常表达(图 2)。

2.3 转 *TaNHX2* 基因棉花的耐盐和抗旱性

从上述 6 个转基因棉花株系中,选取 2 个转基因株系(168 和 170),以转基因受体材料晋棉 7 号为野生型对照(WT),进行耐盐性分析。在正常生长条件下转基因棉花株系 168 和 170 与野生型对照在生长、发育等方面没有显著差异。

正常条件下,转基因棉花株系 168 和 170 与野生型棉花根系和叶片中的 Na⁺ 含量没有显著差异;盐胁迫条件下,转基因棉花株系 168 和 170 与野生型棉花根系和叶片中的 Na⁺ 含量都显著增加,但转基因棉花株系 168 和 170 的叶片和根系中的 Na⁺ 含量显著低于野生型对照。在 300 mmol/L NaCl 处理 10 d 后,转基因棉花株系 168 和 170 叶片中 Na⁺ 含量分别比野生型低 8.4% 和 13.5% (图 3A),根系中 Na⁺ 含量分别比野生型低 7.9% 和 10.3% (图 3B)。

正常条件下,转基因株系和野生型对照的 Pn 和 MDA 含量没有显著差异;盐胁迫条件下,转基



M: 分子粒标记; 转 *TaNHX2* 基因棉花株系: 不同的转基因株系; CK: 野生型对照

图2 转 *TaNHX2* 基因棉花的 RT-PCR 检测

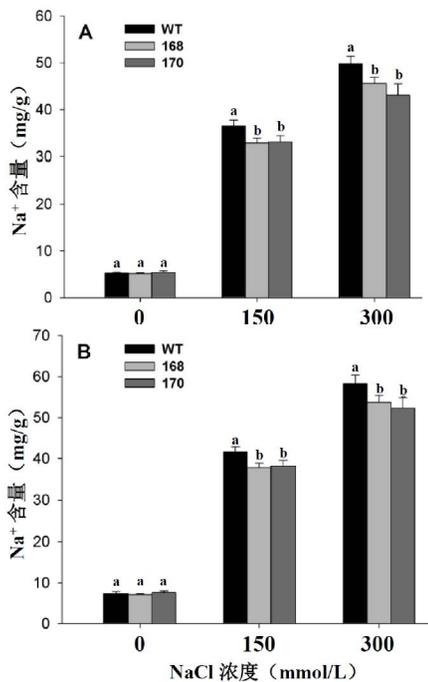


图3 盐处理对野生型和转基因棉花叶片(A)和根系(B) Na^+ 含量的影响

因株系和野生型棉花的 Pn 都降低, MDA 含量都升高(图4)。在 300 mmol/L NaCl 处理 10 d 后, 转基因

棉花株系 168 和 170 的 Pn 分别比野生型高 35.3% 和 33.8% (图 4A); 而转基因棉花株系 168 和 170 的 MDA 含量分别比野生型低 17.7% 和 19.5% (图 4B)。

与正常生长条件相比, 干旱胁迫条件下转基

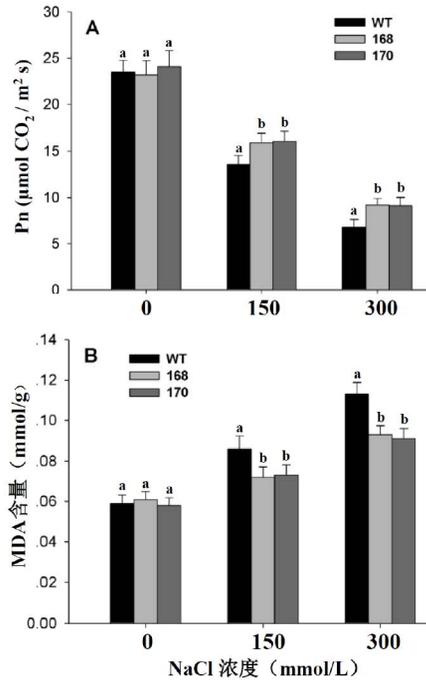


图4 盐处理对野生型和转基因棉花光合速率(Pn) (A) 和 MDA 含量 (B) 的影响

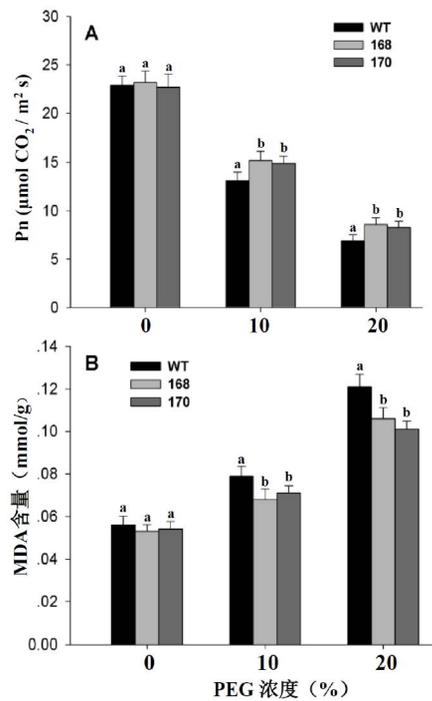


图5 PEG 处理对野生型和转基因棉花光合速率(Pn) (A) 和 MDA 含量 (B) 的影响

因株系和野生型棉花的 Pn 都显著降低, 但 MDA 含量都显著升高(图5)。在 20% PEG 处理 10 d 后,

转基因棉花株系 168 和 170 的 Pn 分别比野生型高 24.6% 和 20.3% (图 5A); 而转基因棉花株系 168 和 170 的 MDA 含量分别比野生型低 12.4% 和 16.5% (图 5B)。

3 讨论

盐胁迫导致植物细胞的离子均衡受到破坏, 植物体内 Na^+ 含量增加, 影响了植物对 K^+ 的吸收, 同时细胞质中过多的 Na^+ 对植物细胞代谢产生离子毒害, 导致细胞生长停止或死亡。把细胞质中大量的 Na^+ 区隔化到液泡中是维持细胞质内低 Na^+ 含量的有效途径^[3]。液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白是植物中 Na^+ 区隔化至液泡的关键因子, 它利用质子泵产生的驱动力, 将胞质中的 Na^+ 区隔化进液泡^[20]。研究发现, 在多种植物中过量表达 *NHX1* 基因都能提高转基因植物的耐盐性^[6,21-22]。Apse 等^[6]、Zhang 等^[21] 将拟南芥液泡膜 *ANHX1* 基因转化拟南芥、油菜和番茄, 发现转基因拟南芥、油菜和番茄均能够在 200 mmol/L NaCl 胁迫下生长。在水稻中过量表达滨藜 *AgNHX1* 后, 转基因水稻表现 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性是非转基因的 8 倍, 转基因水稻耐盐性显著增强^[22]。本研究发现, 在棉花中过量表达小麦 *TaNHX2* 基因, 也显著增强了转基因棉花的耐盐抗旱性。

液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白可将 Na^+ 区隔化到液泡中, 一方面降低渗透胁迫, 另一方面降低细胞质中的 Na^+ 浓度, 从而减轻离子毒害。本研究发现过量表达 *TaNHX2* 基因, 降低了盐胁迫条件下棉花叶片和根系中 Na^+ 含量。 Na^+ 含量的降低可能是转基因棉花耐盐性增强的重要原因。盐胁迫和干旱胁迫都能抑制植物光合作用, 提高 MDA 含量。干旱和盐胁迫条件下, 棉花的光合速率显著下降, 但是 MDA 含量显著上升, 从而抑制棉花生长^[23-24]。本研究发现, 无论是野生型还是转基因 *TaNHX2* 基因棉花, 在干旱和盐胁迫条件下, Pn 都显著下降, MDA 含量都显著升高。但是转基因棉花的 Pn 高于野生型对照, MDA 含量低于野生型对照。这些结果说明: 在棉花中过量表达 *TaNHX2* 基因, 盐胁迫下可以降低转基因棉花的 Na^+ 含量, 提高光合速率, 降低 MDA 含量, 从而提高转基因棉花的耐盐抗旱能力。

棉花抗旱耐盐性状是由多个基因控制的数量性状, 本研究获得了过量表达 *TaNHX2* 基因的棉花, 抗旱耐盐性得到一定程度的提高, 要在继续深化研究转单个抗旱耐盐基因基础上, 通过基因

工程技术、分子标记和常规育种技术有机结合, 获得聚合多个抗旱耐盐关键基因的种质材料, 为抗旱耐盐棉花品种培育服务。

4 结论

过量表达 *TaNHX2* 基因, 使转基因棉花细胞的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性增强, 盐胁迫下, 大量 Na^+ 被区隔化到液泡中, 维持了细胞内 Na^+ 的平衡, 减少了 Na^+ 对细胞质毒害, 降低了盐胁迫下转基因棉花细胞的渗透胁迫, 促进细胞吸收水分, 从而减轻了盐旱危害, 提高了转基因棉花的抗旱耐盐性。

参考文献:

- [1] 辛承松, 董合忠, 唐 薇, 等. 棉花盐害与耐盐性的生理和分子机理研究进展[J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 309-313.
- [2] 董合忠. 盐碱地棉花栽培学[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 270-278.
- [3] Apse Maris P, Blumwald Eduardo. Na^+ transport in plants [J]. FEBS Letters, 2007, 581(12): 2247-2254.
- [4] Shi H Z, Ishitani M, Kim C, et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6896-6901.
- [5] Chen X G, Lu X K, Shu N, et al. Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using The CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44304.
- [6] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis* [J]. Science, 1999, 285(5431): 1256-1258.
- [7] Leidi E O, Barraga N V, Rubio L, et al. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato [J]. The Plant Journal, 2010, 61(3): 495-506.
- [8] Pardo J M, Cubero B, Leidi E O, et al. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57: 1181-1199.
- [9] Yamaguchi T, Blumwald E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10: 615-620.
- [10] Apse M P, Sottosanto J B, Blumwald E. Vacuolar cation/ H^+ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter [J]. The Plant Journal, 2003, 36: 229-239.
- [11] Yu J N, Huang J, Wang Z N, et al. An Na^+/H^+ antiporter gene from wheat plays an important role in stress tolerance [J]. Journal of Biosciences, 2007, 32(6): 1153-1161.
- [12] Cao Dong, Hou Wensheng, Liu Wei, et al. Overexpression of *TaNHX2* enhances salt tolerance of 'composite' and whole transgenic soybean plants [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 107: 541-552.

- [1] 赵先丽,刘志恒,纪瑞鹏,等. 辽宁水稻主产区稻瘟病发生特征分析[J]. 气象与环境学报, 2014, 30(2): 88-92.
- [2] 潘俊峰,王 博,崔克辉,等. 氮肥对水稻节间和叶鞘非结构性碳水化合物积累转运特征的影响[J]. 中国水稻科学, 2016, 30(3): 273-282.
- [3] 高 军,陈莫军,孟凡梅,等. 增施穗肥对水稻产量和氮肥利用率的影响[J]. 东北农业科学, 2018, 43(2): 1-4.
- [4] Peng S B, Huang J L, Zhong X H, et al. Challenge and opportunity in improving fertilizer-nitrogen use efficiency of irrigated rice in China[J]. Agricultural Sciences in China, 2002, 1(7): 776-785.
- [5] 姜珊珊,庞炳坤,张敬沙,等. 减氮及不同肥料配施对稻田 CH₄ 和 N₂O 排放的影响[J]. 中国环境科学, 2017, 37(5): 1741-1750.
- [6] 许仙菊,马洪波,宁运旺,等. 缓释氮肥运筹对稻麦轮作周年作物产量和氮肥利用率的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(2): 307-316.
- [7] 陆 强,章连观. 稻腾、拿敌稳组合防治水稻病虫害与保产效果研究[J]. 中国稻米, 2010, 16(6): 47-48.
- [8] 李朝红. 水稻稻瘟病发生情况及防治对策[J]. 陕西农业科学, 2011, 57(5): 127-128.
- [9] 沈永安,夏景岐,高玉亮,等. 水稻纹枯病病情调查与损失估计[J]. 吉林农业科学, 1997, 22(2): 32-36.
- [10] 莫钊文,李 武,段美洋,等. 减氮对华南早晚兼用型水稻产量氮吸收利用的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(9): 83-90.
- [11] 莫钊文,李 武,段美洋,等. 减氮对华南早晚兼用型水稻源库特性的影响及其机理[J]. 华北农学报, 2013, 28(5): 206-212.
- [12] 王玉雯,韩九信,孙亚丽,等. 氮肥优化管理协同实现水稻高产和氮肥高效[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(5): 1157-1166.
- [13] 鲁艳红,聂 军,廖玉林,等. 不同控释氮肥减量施用对双季稻产量和氮素利用的影响[J]. 水土保持学报, 2016, 30(2): 155-174.
- [14] 杨 坚,陈恺林,李 超,等. 减氮增苗对抛秧晚稻稻曲病的影响[J]. 中国农学通报, 2015, 31(33): 284-290.
- [15] 王 杨,张淑颖,徐源辉,等. 4种杀菌剂防治水稻稻瘟病和纹枯病的田间药效比较[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(34): 16642-16643.
- [16] 陈 兰,张启武. 不同时期喷施拿敌稳对早稻产量结构因素的影响[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(7): 1070-1071.
- [17] 熊件妹,王旭明,李海霞. 拿敌稳和好力克防治水稻主要病害最佳施用时间和施用次数探索[J]. 江西植保, 2010, 33(3): 135-138.
- [18] 唐 旭,郑 毅,汤 丽,等. 不同品种间作条件下的氮硅营养对水稻稻瘟病发生的影响[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(6): 663-666.
- [19] 黄世文,王 玲,陈惠哲,等. 氮肥施用量和施用方法对超级杂交纹枯病发生的影响[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 104-109.
- [20] 杨秀娟,甘 林,阮宏椿,等. 氮肥对水稻苗 POD、SOD 活性及稻瘟病发生的影响[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(1): 8-12.

—————
 (上接第 35 页)

- [13] 张丽君,程林梅,杜建忠,等. 导入 *TaNHX2* 基因提高了转基因普那菊苣的耐盐性[J]. 生态学报, 2011, 31(18): 5264-5272.
- [14] 王小丽,赵欣梅,张欢欢,等. 盐胁迫对转基因 *TaNHX2* 基因玉米幼苗生长的影响[J]. 华北农学报, 2014, 29(2): 165-169.
- [15] 张慧军,王寰宇,石跃进,等. 雄性不育基因对棉花的遗传转化[J]. 棉花学报, 2007, 19(4): 261-266.
- [16] 张慧军,董合忠,石跃进,等. 山菠菜胆碱单加氧酶基因对棉花的遗传转化和耐盐性表达[J]. 作物学报, 2007, 33(7): 1073-1078.
- [17] 王 伟,陈宛新,朱 祯,等. 转基因棉花高效定植方法的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1072-1075.
- [18] 张慧军,王 丹,张国强. 提高棉花组培苗移栽成活率的技术措施[J]. 东北农业科学, 2017, 42(3): 6-8.
- [19] 陈受宜,朱立煌,洪 建,等. 水稻抗盐突变体的分子生物学鉴定[J]. 植物学报, 1991, 33(8): 569-573.
- [20] Leidi E O, Barragón V, Rubio L, et al. The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato[J]. The Plant Journal, 2010, 61(3): 495-506.
- [21] Zhang H X, Joanna N Hodson, John P Williams, et al. Engineering salt-tolerant Brassica 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.
- [22] Ohta M, Hayashi Y, Nakashima A, et al. Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gnelini* confers salt tolerance to rice [J]. FEBS Letters, 2002, 532(3): 279-282.
- [23] 唐 薇,罗 振,温四民,等. 干旱和盐胁迫对棉苗光合抑制效应的比较[J]. 棉花学报, 2007, 19(1): 28-32.
- [24] 王 涛,孔祥强,董合忠. NaCl 胁迫对棉花叶片衰老特征的影响及其生理机制[J]. 棉花学报, 2014, 26(1): 66-72.

(责任编辑:刘洪霞)