

# 耐盐性植物转基因工程的研究进展

胡忠\*, 曹军, 庄东红

(汕头大学生物学系, 广东 汕头 515063)

**摘要:** 随着分子生物学的迅速发展, 已经发现了一系列与植物盐胁迫相关的基因。根据这些基因产物的作用, 可以分为两大类: 效应分子基因和调控分子基因。根据近年来采用基因工程方法提高植物耐盐性的策略和研究进展进行了概述, 同时探讨了目前还存在的一些问题。

**关键词:** 综述; 盐胁迫; 耐盐性; 转基因植物; 基因工程

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)02-0169-10

## Advances in the Study on Transgenic Plants for Salt Resistance

HU Zhong, CAO Jun, ZHUANG Dong-hong

(Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

**Abstract:** With the rapid development of molecular biology, series of genes including effective and regulatory genes that respond to salt stress have been found. This paper summarizes progress in the study on improving plant salt resistance by genetic engineering in recent years and some problems that wait to be resolved.

**Key words:** Review; Salt stress; Salt tolerance; Transgenic plant; Genetic engineering

土壤盐渍化是影响农业生产和生态环境的严重问题。据联合国教科文组织 (UNESCO) 和粮农组织 (FAO) 不完全统计, 全世界盐渍土面积约  $10^9 \text{ hm}^2$ <sup>[1]</sup>。我国也有着大面积的盐碱地, 仅海岸带、滩涂就多达  $6.7 \times 10^6 \text{ hm}^2$ , 且有逐年增加的趋势; 此外我们国家的淡水资源也日趋紧缺。

盐胁迫对植物的危害主要在渗透压胁迫和离子胁迫等方面, 它们破坏植物细胞膜结构, 影响许多酶的活性和光合作用器官的功能, 还在植物体内产生活性氧, 进而引起氧化胁迫, 使农作物生长受阻, 造成减产甚至死亡<sup>[2-4]</sup>。

面对人口不断增加、耕地日趋减少和淡水资源严重不足的现实, 如何利用大面积的盐碱地和丰富的海水资源, 这是人类迫切需要解决的重大课题。人们曾试图通过合理灌溉、淡水洗涤和施用化学改良剂等方法来改造盐碱地, 但因耗资大、见效慢而

难以推广。通过传统育种方法至今未能选育出真正的耐盐品种。随着生物技术的发展, 人们寄希望于基因工程育种, 即通过直接导入耐盐基因, 使转基因作物获得耐盐性<sup>[5]</sup>, 实现在盐碱地或海滩上用海水浇灌种植农作物的愿望。

### 1 耐盐基因的分类

盐胁迫可以诱导许多植物基因的表达<sup>[6]</sup>, 根据这些基因产物的作用, 可以分为两大类<sup>[7,8]</sup>。

一类基因的产物为效应分子, 包括: 渗透保护剂 (如甜菜碱、甘露醇、海藻糖及脯氨酸等) 的合成酶; 维持离子平衡的蛋白质 (如  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白等); 参与氧化胁迫保护、清除活性氧的酶 (如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和促分裂原活化蛋白激酶等); 直接保护细胞

收稿日期: 2005-07-22 接受日期: 2005-12-16

基金项目: 广东省教育厅科学研究基金 (0141), 汕头市科委基金项目资助

\* 通讯作者 Corresponding author

免受盐胁迫伤害的功能蛋白(如胚胎发生晚期丰富蛋白、伴侣蛋白和水通道蛋白等)。

另一类基因的产物为调控分子,包括调控基因表达的转录因子,如 DREB(dehydration responsive element binding protein) 转录因子、MYB 转录因子、MYC 转录因子及 bZIP (basic leucine zipper) 转录因子等;以及感受和传导胁迫信号的 SOS 途径、钙神经元 (CaN)途径、蛋白激酶等。

## 2 耐盐基因工程的策略

目前,耐盐基因工程的策略可以分为:导入(或改良)效应分子基因和改良(或增强)调控分子基因两方面。

### 2.1 导入或改良效应分子基因

效应分子直接参与代谢变化等生化应答过程,从而产生耐盐效应,其具体功能研究得比较透彻,相关的报道很多。以下就利用甜菜碱合成酶基因、甘露醇合成酶基因以及  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白基因等进行转化,获得的一些耐盐性状得到改善的转基因植物做一简要介绍。

#### 2.1.1 提高植物体内渗透保护剂的含量

有些植物(山菠菜 *Atriplex hortensis*、菠菜 *Spinacia oleracea* 等)在受到盐胁迫时,会在体内合成和积累一定浓度的小分子量、无毒性的渗透保护剂(如甜菜碱、脯氨酸、海藻糖及甘露醇等),来提高细胞内渗透压,降低  $\text{Na}^+$  对酶活性的抑制<sup>[9]</sup>,增加酶的热稳定性<sup>[10]</sup>,阻止酶复合物的解离<sup>[11]</sup>。这些渗透保护剂还可以清除活性氧<sup>[12]</sup>,从而有助于植物耐冷害、冻害、高温及干旱等胁迫<sup>[13]</sup>。然而有些植物(如大部分水果和蔬菜),缺乏此类渗透保护剂的合成或含量很低,可以通过基因工程的方法,在这类植物中超量表达甜菜碱、脯氨酸及甘露醇等渗透保护剂,从而提高其耐盐胁迫能力<sup>[14]</sup>。

在植物应对渗透胁迫而累积可溶性渗透物质中,脯氨酸是分布最广的渗透剂。早期的研究认为,脯氨酸的合成是通过两条途径即谷氨酸途径和鸟氨酸途径进行的<sup>[15]</sup>。Delauney 等<sup>[16]</sup>发现,在渗透胁迫条件和低氮条件下谷氨酸途径占主导地位,而在非胁迫条件及高氮条件下鸟氨酸途径又居于主导地位。

在植物中,谷氨酸途径是从谷氨酸经过两步连续的还原后合成脯氨酸,1-吡咯啉-5-羧酸(P5C)为

中间产物;催化反应的酶为 P5C 合成酶— $\Delta^1$ -吡咯啉-5-羧基合成酶(P5CS, EC2.7.2.11/1.2.1.4)和 P5C 还原酶(P5CR, EC1.5.1.2)。Kishor 等<sup>[16]</sup>使用 CaMV35S 启动子连接乌头叶豇豆(*Vigna aconitifolia*)的 P5CS 基因并导入烟草(*Nicotiana tabacum*)中,发现转基因烟草中的脯氨酸含量比对照高 10–18 倍。在干旱胁迫下,对照烟草中脯氨酸含量由  $0.08 \text{ mg g}^{-1}$  鲜叶重增加到  $3 \text{ mg g}^{-1}$ ;而转基因烟草脯氨酸含量由  $1 \text{ mg g}^{-1}$  增加到  $6.5 \text{ mg g}^{-1}$ 。在干旱胁迫下,转基因烟草落叶少且迟,根长比对照长 40%,生物量比对照增加 2 倍。Zhu 等<sup>[17]</sup>利用 P5CS 基因转化获得的转基因水稻(*Oryza sativa*),在干旱和盐胁迫下生物量都有增加,外源基因的表达可以减缓氧化胁迫。

Hong 等<sup>[18]</sup>运用定点突变技术将 P5CS 的第 129 位的苯丙氨酸换成丙氨酸残基,突变之后的酶(P5CS F129A)不再受到脯氨酸的反馈抑制,这样表达 P5CS F129A 的转基因烟草植株体内脯氨酸含量是野生型植株的 2 倍,并降低了游离自由基的水平。脯氨酸脱氢酶(ProDH)催化的反应是 P5CS9 催化反应的逆转,Nanjio 等<sup>[19]</sup>运用反义 RNA 技术降低脯氨酸的降解速度,相应提高了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)体内的脯氨酸含量,使得转基因拟南芥能耐受冻害( $-7^\circ\text{C}$ )和盐害( $600 \text{ mmol/L NaCl}$ )。

在脯氨酸合成的鸟氨酸途径中,鸟氨酸是在鸟氨酸  $\delta$ -氨基转氨酶(ornithine- $\delta$ -aminotransferase,  $\delta$ -OAT)的作用下丢失  $\delta$ -氨基基团,生成 P5C,然后再还原成脯氨酸。Roosens 等<sup>[20,21]</sup>以拟南芥为材料,构建 cDNA 文库并克隆了  $\delta$ -OAT 基因,其推测的氨基酸序列与细菌、酵母、及其它植物中的  $\delta$ -OAT 序列有很高的同源性。之后,进一步利用  $\delta$ -OAT 基因转化烟草。在无胁迫时,转化后代合成的脯氨酸含量比对照高 3 倍,而组成性超量表达  $\delta$ -OAT 并没有影响植物的正常生长;在  $0.2 \text{ mol/L NaCl}$  或等渗的甘露醇胁迫下,转基因株系累积的脯氨酸含量比对照高 1.5 倍,而且还有更高的生物量和萌发率。吴亮其等<sup>[22]</sup>采用基因枪法将拟南芥  $\delta$ -OAT 基因导入粳稻品种中作 321,该基因插入到水稻染色体中并得到超量表达。抗盐抗旱检测的结果表明,水稻在受到渗透胁迫时会大量积累脯氨酸,各种条件下转基因水稻积累的脯氨酸是对照的 5–15 倍;同等胁迫条件下转基因株系相对生长更快,苗与根的生物产量都要高于对照,最后种子产量也显著高于对

照,如在 0.1 mol/L NaCl 胁迫下转基因株系相对产量提高了 16%–41%,说明  $\delta$ -OAT 基因超量表达并积累脯氨酸在抗渗透胁迫中有着重要作用。

一些植物(如菠菜、甜菜和棉花等)在盐胁迫环境下,会在细胞内积累一定浓度的甜菜碱(Betaine),起到保护细胞膜和蛋白质、维持胞内正常渗透压的作用<sup>[23]</sup>,同时使许多代谢中的重要酶在胁迫下保持活性<sup>[24]</sup>。在许多种植物中甜菜碱被证明起着主要的耐渗透胁迫作用<sup>[25]</sup>,因此克隆甜菜碱合成途径中的关键酶基因,导入盐敏感农作物中并使之超量表达,可以提高农作物的耐盐胁迫能力。植物甜菜碱的生物合成在叶绿体中进行,由胆碱→甜菜碱醛→甜菜碱二步氧化反应完成,第一步反应由胆碱单氧化物酶(CMO)催化<sup>[26]</sup>,第二步反应由甜菜碱醛脱氢酶(BADH)催化<sup>[27]</sup>。大肠杆菌中甜菜碱合成与植物的相似,也是由二步氧化反应合成的,但第一步反应由胆碱脱氢酶(CDH)催化<sup>[28]</sup>。而球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)的甜菜碱合成仅由胆碱氧化酶(COD)一种酶(由 *codA* 基因编码)催化合成<sup>[29]</sup>。

目前,研究人员已把 CMO、BADH、CDH 和 *codA* 基因转入许多缺乏甜菜碱合成的农作物中,并获得了耐盐能力提高的作物。Nuccio 等将菠菜(*Spinacia oleracea*)的 CMO 基因转入烟草叶绿体中并表达,结果在盐胁迫条件下,转基因烟草的 CMO 蛋白的含量与活性都有提高,但是甜菜碱的含量却没有提高,用同位素示踪实验证明是低含量的内源胆碱限制了甜菜碱的合成<sup>[30]</sup>,所以还应该注意提高植物内源性胆碱的含量。沈义国等从山菠菜(*Atriplex hortensis*)中克隆了 CMO 基因,并进行了烟草的转基因研究,获得的具有一定耐盐性状的转 CMO 烟草在 1.2% NaCl 的盐浓度下生长良好<sup>[31]</sup>。Rathinasabapathi 等将菠菜和甜菜 BADH 基因转入烟草,并获得了表达<sup>[32]</sup>。Holmstrom 等人将大肠杆菌的 BADH 基因转入烟草也获得了抗胁迫能力提高的转基因烟草<sup>[33]</sup>。郭岩等将山菠菜 BADH 基因用基因枪法导入水稻,获得的转 BADH 水稻能在含 0.5% NaCl 的盐池中基本正常生长<sup>[34]</sup>。Hayashi 和 Prasad 等分别将 *codA* 基因导入拟南芥和芥菜(*Brassica juncea*)中,都获得了耐盐能力提高的转基因植株<sup>[35,36]</sup>。

糖醇(甘露醇、山梨醇)是一种多元醇,含有多个羟基,亲水能力强,能有效维持细胞内的水活度,但

其生物学作用目前还不清楚。据推测,糖醇可能在渗透调节和渗透保护中起重要作用<sup>[37]</sup>。大肠杆菌中甘露醇合成过程中起关键作用的酶为甘露醇-1-磷酸脱氢酶,编码基因为 *mtlD*。山梨醇合成过程中起关键作用的酶为山梨醇-6-磷酸脱氢酶,编码基因为 *gutD*<sup>[37]</sup>。

Tarczynski 等将大肠杆菌的 *mtlD* 基因转入烟草,使转基因烟草超量合成和积累甘露醇,能对 250 mmol/L (约 1.45%) NaCl 产生抗性,通过检测发现转基因烟草叶片中甘露醇的含量高达可溶性碳水化合物总量的 25%,而对照植株叶片中没有检测到甘露醇,这表明了外源 *mtlD* 基因的导入并超量表达而使烟草的耐盐胁迫能力提高<sup>[37]</sup>。刘岩等用基因枪法将大肠杆菌 *gutD* 基因导入玉米 (*Zea mays*),在盐胁迫下(200 mmol/L NaCl),转基因玉米的耐盐性状明显高于对照<sup>[38]</sup>。

#### 2.1.2 超量表达重建细胞离子平衡的基因

盐胁迫时,Na<sup>+</sup> 通过 K<sup>+</sup> 通道等涌入植物细胞内,破坏了正常条件下细胞内较高的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 浓度比,而细胞内维持较高的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比对植物的正常生长很重要<sup>[2]</sup>。植物通过细胞膜质子 ATP 酶、液泡膜质子 ATP 酶(V-ATPase)、液泡膜质子焦磷酸化酶(V-PPase)与 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反转运蛋白等的协调工作,以驱动 Na<sup>+</sup> 的外排或运入液泡,最终形成胞外、胞质和液泡三者间的离子平衡,从而恢复细胞内较高的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比。细胞膜质子 ATP 酶、液泡膜质子 ATP 酶和液泡膜质子焦磷酸化酶的功能是建立和维持细胞质膜和液泡膜的质子跨膜电化学梯度,后者驱动各种二级转运和电解质的出入,如 Na<sup>+</sup> 向液泡内转运和 K<sup>+</sup> 等营养物质向胞质中的被动运输等<sup>[3,39]</sup>。目前认为 Na<sup>+</sup> 的外排和进入液泡的“仓储”过程是由 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向转运蛋白完成的<sup>[39]</sup>。Na<sup>+</sup> 在液泡中的仓储不但可以避免 Na<sup>+</sup> 在细胞质中的超量积累而造成的毒害作用,而且它在液泡中作为一种渗压剂来维持渗透平衡<sup>[40]</sup>。

Apse 等<sup>[41]</sup>应用基因工程方法使拟南芥超量表达 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向转运蛋白(*AtNHX1*),转基因植株中 *AtNHX1* 基因转录与翻译水平都显著高于正常水平,能在用 200 mmol/L NaCl 浇灌的土壤中正常生长。进一步将 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 反向转运蛋白基因 *AtNHX1* 导入番茄(*Lycopersicon esculentum*)及芥菜中并超量表达,获得的转基因植株同样能在 200 mmol/L NaCl

处理下生长、开花和结果。更有意义的是转 *AtNHX1* 番茄的叶片中积累了高浓度的  $\text{Na}^+$ , 但果实中的  $\text{Na}^+$  含量却很低; 而转 *AtNHX1* 油菜的  $\text{Na}^+$  含量高达植株干重的 6%, 但油菜籽的质量和产量未受影响。这意味着这类转基因作物可以应用于实际生产中<sup>[42,43]</sup>。Gaxiola 等用 *V-PPase* 基因进行转基因研究, 获得了耐 250 mmol/L NaCl 的转基因拟南芥, 检测发现叶片中液泡的阳离子吸收能力提高了, 这表明液胞膜质子焦磷酸化酶的作用为  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白发挥功能提供了动力<sup>[44]</sup>。最近有人报道用一种耐盐蓝藻的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白基因 (*ApNhaP*) 转化淡水蓝藻(聚球藻 *Synechococcus* sp.), 获得耐盐能力较强的转基因聚球藻, 它能在含 0.5 mol/L NaCl (与海水盐度相似) 的培养液中生长<sup>[45]</sup>。

酵母中, *HAL1* 和 *HAL3* 基因分别参与调节  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  的转运, 可以显著增强酵母对盐的耐受性, 它们在转基因番茄和黄瓜中的表达也具有同样作用<sup>[46,47]</sup>。Rus 等<sup>[48]</sup>的研究结果表明, 表达酵母 *HAL1* 基因的番茄在营养生长期和果实成熟过程中对盐耐受性增加, 果实产量也得到提高。

### 2.1.3 超量表达与抗氧化相关的酶基因

植物的耐盐性常与其有效的抗氧化系统有关。盐生植物在长期的自然选择中形成了一套有效的活性氧清除机制, 分为酶促和非酶促 2 类。其中酶促保护机制中参与抗氧化保护反应的酶类主要有超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPOX)、谷胱甘肽转移酶 (GST)、单脱氧抗坏血酸还原酶 (MDAR) 等。因此, 克隆编码这些酶的一些关键基因, 并通过基因工程手段获得高效表达的转基因植株, 提高植物体内的抗氧化酶类活性和增强抗氧化代谢的水平成了增强植物耐盐性的途径之一。

从植物中克隆得到的一些 *SOD* 基因已被用来转化不同的植物, 最终获得了 *SOD* 活性增强的转基因植株<sup>[49]</sup>。在转基因苜蓿 (*Medicago sativa*)、烟草、棉花 (*Gossypium hirsutum*) 和土豆 (*Solanum tuberosum*) 叶绿体中过量表达 *SOD* 基因, 提高了植株对氧化胁迫的耐性, *SOD* 在苜蓿线粒体和土豆细胞质中的过量表达也有同样的效果<sup>[50]</sup>。酵母线粒体 *Mn-SOD* 在水稻叶绿体中的过量表达提高了转基因植株对盐胁迫的耐受性, 而且盐胁迫下转基因植物中 *SOD* 和 *APX* 的活性都较对照植株提高了 15–20 倍,

*CAT* 活性降低的程度小于对照株<sup>[51]</sup>。然而, 转基因烟草叶绿体中 *Fe-SOD* 基因的过量表达尽管增强了对除草剂引起的氧胁迫的抵抗能力, 但并不能提高其对冷害和盐胁迫的耐受性<sup>[52]</sup>。

早期的研究表明, 转基因烟草幼苗在盐胁迫条件下, 较非转基因烟草含有较多的氧化态的谷胱甘肽 (GSSG)。GSSG 的积累可能意味着 *GST* 依赖于 *GPX* 的过氧化物清除作用得到了加强。在 Roxas<sup>[53]</sup> 所进行的 *GST/GPX* 基因转化烟草的实验中, 过量表达 *GST/GPX* 基因的后代种子的萌发和幼苗的生长在盐胁迫条件下都得到了显著的提高。进一步实验<sup>[54]</sup>还发现, 过量表达 *GST/GPX* 的转基因烟草, 无论是在胁迫条件下还是对照条件下都可以促进烟草的生长。

拟南芥中存在一种编码过氧化物酶的 *RCI3* 基因 (rare cold inducible gene 3), 将它克隆后进一步转化拟南芥, 可以明显增强转化后代对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[55]</sup>。

到目前为止, 还获得了不少转其它抗氧化酶类基因的植株, 但是与盐胁迫耐受性直接相关的报道很少。而且, 目前存在一个困惑, 即: 过量表达单个抗氧化酶类基因并不能有效提高转化植物对胁迫的耐受性, 其中也包括耐盐性。对此, 目前至少存在两种解释。活性氧的清除本身就涉及一系列细胞代谢和酶促反应过程, 而单个酶基因的过量表达可能会打破抗氧化酶之间的酶活性平衡, 最终影响到超氧化物阴离子有效转变为水和分子氧。或者说抗氧化酶类都是多基因编码的小基因家族, 位于多个亚细胞结构上, 单个基因的过量表达可能还不足以为细胞提供保护。

尽管如此, 通过转基因技术来调控抗氧化酶在植物体内的表达活性, 使人们对于这些酶在植物中的角色有了较为深入的认识。因此我们计划在以后的研究中通过同时表达二个或二个以上的抗氧化酶类, 通过协同作用来提高胁迫环境中植物体内的自由基清除能力, 期望能有效地提高植物的耐盐性。

## 2.2 改良或增强调控分子基因

调控分子位于效应分子上游, 介导信号传递和基因调控, 包括转录因子和位于信号级联系统中的各种激酶。植物对逆境反应的转录调控及信号转导的机制是目前研究的热点。

Jaglo-Ottosen 等<sup>[56]</sup>使拟南芥超量表达转录因子 *CBF1* (CRT/DRE binding factor 1), 进而诱导了许多种 *COR* (cold-regulated genes) 基因的表达, 结果获得了耐冻能力显著改善的拟南芥, 而以往实验中仅超量表达一种 *COR* 基因, 对提高植物耐冻能力的作用不大。这是首次把转录因子用于植物的耐胁迫转基因研究, 并且证明了这种方法的可行性。

拟南芥 *rd29A* 基因编码一种与 LEA 蛋白相似的亲水性很强的蛋白, 该基因的表达受干旱、高盐及低温的诱导。Kasuga 等<sup>[57]</sup>在 35S CaMV 启动子或胁迫诱导的 *rd29A* 启动子的下游接上转录因子 *DREB 1A* 的 cDNA 进行拟南芥的转化, 获得的转基因植株的耐盐、耐旱和抗冻能力都有显著提高。研究表明在获得的转基因植株中, *DREB 1A* 的超量表达使 *rd29A*, *rd17*、*kin1*、*cor6.6*、*cor15a* 以及 *erd10* (这些基因的产物都与植物的高盐、高温及低温胁迫耐性有关) 在正常条件和胁迫条件下的表达量显著提高, 植物对高盐、干旱及低温的耐性也随之增强。虽然用 *rd29A* 基因进行转化, 也能使转基因植株的耐盐胁迫能力提高<sup>[58]</sup>, 但没有利用 *DREB* 转录因子基因所获得的效果好。Winicov 等在 35S CaMV 启动子下游接上转录因子 *Atfin1* 的 cDNA 转化苜蓿, 同样使转基因植株的耐盐能力显著提高<sup>[59]</sup>。

EREBP/AP2 类蛋白是一个仅存在于植物中的 DNA 结合蛋白(DBP)大家族。Shen 等<sup>[60]</sup>构建了高盐浓度处理下的盐生植物山菠菜 cDNA 文库, 并从此文库中分离得到了一个编码 EREBP/AP2 类蛋白的基因 *AhDREB1*。将 *AhDREB1* 置于 CaMV 35S 启动子下转入烟草, *AhDREB1* 的组成性表达显著提高了转基因烟草的耐盐能力, 这可能是由于其激活了一些具有抗盐效应的下游基因。

在水稻中, *OsZFP1* (水稻锌指蛋白 1) 基因的表达受盐胁迫负调控。2004 年 Kong 等<sup>[61]</sup>构建了以 35S 为启动子的 *OsZFP1* 基因的植物表达载体, 并将其转入拟南芥和水稻, 过量表达 *OsZFP1* 基因的转基因拟南芥植株和水稻愈伤组织对盐处理的敏感性都比野生型要高。这一结果表明 *OsZFP1* 基因可能编码一种负调控蛋白, 它可能抑制某些盐诱导基因的表达。

植物 MAP (mitogen-activated protein) 激酶涉及植物的生长发育、对内源和外界环境刺激的反应,

能将胞外感受器引起的刺激传递到胞内引起细胞的反应<sup>[62]</sup>。目前已经从模式植物拟南芥和其它植物中分离出大量的 MAP 激酶基因并将它们进行了分类, 虽然尚无将 MAP 激酶基因导入植物的报道, 但是很多研究表明 MAP 激酶基因的表达与植物的抗渗透胁迫反应密切相关<sup>[63,64]</sup>。现已在水稻中发现, 在高盐、低温条件下 *osMAPK4* 基因的表达迅速上调<sup>[65]</sup>, 而另一种 MAP 激酶基因 *osMAPK2* 的表达则受多种条件, 如机械损伤、高盐、干旱、低温等调控<sup>[66]</sup>, 进一步证实了 MAP 激酶基因在胁迫信号传导中的重要地位。因此, 如能将 MAPK 基因导入植物, 可望提高植物对环境胁迫的综合抗性。

## 3 展望

### 3.1 加强植物耐盐机制的研究

植物耐盐胁迫的分子机理是进行基因工程育种的基础, 但是与植物的抗虫和抗病机制相比, 一般认为植物耐盐性状是数量性状<sup>[67]</sup>, 耐盐机制要复杂得多, 至今尚未能弄清楚。对于植物如何感受、传递胁迫信息, 如何诱导、调控基因表达, 如何将体内过多的盐分排出体外, 如何保持离子平衡等问题都有待于进一步研究。此外, 虽然目前已获得一些耐盐性状得到一定改善的转基因植物, 但是对于这些基因的产物是如何参与渗透调节, 如何与植物本身的耐盐机制相互作用等问题还不十分清楚, 这些都限制了基因工程的进一步应用。此外, 目前所克隆的耐盐基因, 高等植物来源的较少, 中国自主知识产权的基因较少。

随着多种植物基因组测序的完成和生物信息学的发展, 使在基因组水平上对盐胁迫耐受机制进行整体性研究成为可能。近年来进行了植物耐盐胁迫功能基因组的研究, 即利用盐胁迫特异性的表达序列标签 (EST) 和 cDNA 微阵列 (或基因芯片) 技术筛选胁迫相关基因, 然后在拟南芥中超量表达或通过基因敲除等技术对初步筛选的基因进行功能研究, 再利用酵母双杂交等技术对基因间相互关系及基因产物间的相互作用做进一步研究。通过这些研究可以发现重要的耐盐基因, 比较全面地了解植物盐胁迫耐受机制, 从而为合理利用基因工程方法培育耐盐作物奠定基础<sup>[6]</sup>。

### 3.2 进行多功能基因、主效功能基因和调控基因转化的研究

当前大多数研究都是利用单个效应分子基因(如甜菜碱合成酶基因)进行转化,虽在一定程度上改善了植物的耐盐性,但不能使植物的耐盐性状得到较为理想的综合改良。大多数仅处于在实验室研究阶段,真正能应用于实际生产的很少。目前通常认为植物的耐盐性状是受多个基因控制的,所以要使植物的耐盐性状得到显著改善,可以从以下两方面着手。

第一,将多个耐盐基因同时转入同一植物中,即采用复合基因转化策略<sup>[68,69]</sup>。这一策略已在植物抗病、抗虫基因工程中取得成效,在耐盐基因工程中也有成功的例子,如刘俊君等将 *MtD* 和 *GutD* 同时转入烟草,获得的转基因烟草的耐盐能力大于转化单个基因的(*MtD* 或 *GutD*)耐盐能力<sup>[70]</sup>。*Gaxiola* 也指出同时超量表达 *V-PPase* 基因和 *AtNHX1* 的转基因植物应比仅仅超量表达其中一种基因的具有更高的耐盐胁迫能力<sup>[44]</sup>。如能在作物中同时超量表达渗透保护剂和  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反转运蛋白,有可能会获得耐盐能力显著提高的农作物。

水稻中 *RHL* cDNA 表达一个 40 kD 蛋白,可能是 3'(2'),5'-二磷酸核苷 3'(2')-磷酸脱氢酶,它在盐胁迫时的超量表达能有效地控制激活核还原过程中产生的中间产物浓度,使其不至于产生毒害。但是水稻固有的 *RHL* 基因的表达不受盐胁迫诱导,*RHL* 蛋白活性受  $\text{Na}^+$  抑制,可被  $\text{K}^+$  激活<sup>[71]</sup>。而在盐胁迫时,细胞内的  $\text{Na}^+$  增加是不可避免的。李荣田等<sup>[72]</sup>将从水稻文库中分离的 *RHL* 基因构建的表达框架又成功地导入了水稻,使其苗期和孕穗期的耐盐性均有所增强,但在含盐 222 mmol/L 培养基上转基因水稻幼苗生长仍受到严重抑制,孕穗期 1.0%NaCl 溶液灌溉时不能结实,离真正的耐盐品种尚有相当距离。鉴于从拟南芥中克隆的 *AKT1* 基因<sup>[73]</sup>和从酵母中克隆的 *HAL1* 基因<sup>[74]</sup>均可增加盐胁迫时吸收  $\text{K}^+$  的能力,有人认为,如果将 *RHL* 基因和 *AKT1* 基因或 *HAL1* 基因聚合,使在水稻中表达的 *RHL* 蛋白数量大、活性强,可有效清除某些有毒硫化物,再加上较低的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  比率,这样的转基因水稻有可能具有明显的耐盐性。

在目前识别和分离耐盐基因以及同时操作多个基因有困难的情况下,通过花粉管通道法<sup>[75]</sup>转移

基因组 DNA,有可能同时导入多个耐盐基因,从而获得转基因耐盐植株。林栖凤等将盐生植物—红树(*Rhizophora apiculata*)的基因组 DNA 通过花粉管通道导入辣椒(*Capsicum annuum*)和茄子(*Solanum melongena*)等作物中,获得了耐盐能力显著提高的后代,在海滩上试种,用含盐 2.5%的海水浇灌,大部分的转化株能开花,而对照株全部死亡<sup>[76,77]</sup>。我们也利用花粉管通道法将秋茄(*Kandelia candel*)和海边月见草(*Oenothera littoralis*)基因组 DNA 导入花生(*Arachis hypogaea*),转基因花生种子( $T_2$ 代)在 140 mmol/L NaCl 溶液处理下的萌发率有明显的提高。这些结果表明,通过花粉管通道导入盐生植物总 DNA 可能是进行耐盐植物分子育种的一种快速、有效的途径(未发表)。

值得注意的是,在实施复合基因转化时也应注意多个基因同时转入植株,表达时可能会引起代谢紊乱<sup>[68]</sup>。

第二,导入主效功能基因、转录因子基因的策略<sup>[78]</sup>。如果采用单基因策略,只有导入主效功能基因或调节基因,作用才可能明显。一个转录因子可以同时调控多个耐盐相关基因的表达,所以,与导入或改良个别效应分子基因来提高植物耐盐性的方法相比,从导入或增强一个关键的转录因子的调控能力着手,可能是提高植物耐盐性的一种更为有效的途径。目前的一些研究已证明了这种方法的有效性<sup>[57,59]</sup>。

### 3.3 注意耐盐基因的超量表达对转化植株的影响

启动了是影响外源基因在受体基因组中表达的重要因素。为实现耐盐基因的超量表达,目前大部分转基因植株都用组成性表达的 35S CaMV 启动子,而水稻激动蛋白启动子 *Act1*、玉米泛蛋白启动子 *Ubi*、*E12* 等也常应用于单子叶植物中外源基因的高效表达。但是耐盐基因的超量表达也影响到转化植株的正常生长。虽然有的耐盐基因的表达促进了转基因植株的生长,如 Winicov 获得的转 *Alfin1* 基因苜蓿植株的耐盐能力显著提高的同时,植株根的生长也受到明显促进<sup>[79]</sup>;但在大多数实验中发现耐盐基因的表达对转化植株产生了不利影响。郭岩等获得的转 *BADH* 水稻中就有不育现象发生,他们在温室盐池中移栽了 99 株转基因水稻,只有 19 株结实,结实率仅为 10%<sup>[84]</sup>。Kasuga 获得的转

35S-*DERBIA* 基因拟南芥的生长迟缓<sup>[57]</sup>, 研究发现 *DREBIA* 基因在正常情况下不表达, 仅在低温下受诱导表达。与此相似, 在转基因植株中组成型超量表达原本仅在低温时表达的 *CBFI* 基因, 也发现了植株发育迟缓, 生长受阻的现象<sup>[56]</sup>。

鉴于外源基因的高水平组成性表达往往会严重影响转基因植株的生长发育, 在植物的耐盐基因工程中选用组织特异型启动子或诱导性启动子是非常必要的。根是植物与外界环境进行信息核物质交换的主要器官, 在盐胁迫下最先受到影响的器官也是根, 将根部特异启动子应用于植物耐盐胁迫基因工程中, 使相关基因在根中特异表达; 另一方面盐胁迫诱导特异启动子的应用也非常重要, 可以使外源基因在逆境来临时才表达。这些启动子的应用可大大降低能量消耗, 使转基因植物在获得耐盐性的同时, 又不影响正常的生长发育。

目前大部分转基因植株都用组成性表达的 35S CaMV 启动子, 可以考虑选用组织特异性或诱导性启动子用于转基因的表达, 例如用胁迫诱导的 *rd29A* 启动子表达的转 *DREBIA* 拟南芥植株生长正常<sup>[57]</sup>。

Wu 等以组成型启动子 *Act1* 和干旱诱导启动子驱动 *P5CS* 基因转化水稻, 水稻胁迫处理 72 h 后脯氨酸积累提高了 7 倍, 根系的生长量却不一样, 组成型转化的比对照提高 44%, 诱导型启动子转化的比对照提高 124%<sup>[80]</sup>。转 CaMV 35S 启动子调控的 *DREBIA* 基因的拟南芥植株在获得耐旱、耐盐等特性的同时, 植株的生长也受到严重抑制; 而利用逆境诱导特异启动子 *rd29A* 代替 35S 启动子调控 *DREBIA* 基因, 对植株生长的影响很小, 抗逆性更高<sup>[57,81,82]</sup>。

目前有关植物包括盐胁迫在内的抗逆性研究所取得的成就大部分是在模式植物中获得的, 但在特殊生境中植物的抗逆性机制与模式植物是否一致还有待于深入探索。随着植物基因组计划的不断深入、盐胁迫下植物信号受体和胁迫反应蛋白基因的分离及其结构功能的分析以及基因表达调控机制的研究, 将会用更有效的方法去提高植物的耐盐性。例如, 将抗氧化酶与渗透调节剂的关键基因合理结合、不同抗氧化酶基因之间或者其它基因之间的有效结合同时应用到转基因研究中, 并在表达时间、空间和强度方面对外源转基因加以控制, 相信植物耐盐基因工程会取得更大的突破。

## 参考文献

- [1] Flowers T J, Yao A R. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1995, 22:875-884.
- [2] Glenn E P, Brown J J, Blumwald E. Salt tolerance and crop potential of halophytes [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1999, 18:227-255
- [3] Niu X, Bressan R A, Hasegawa P M, et al. Ion homeostasis in NaCl stress environments [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109:735-742.
- [4] Yeo A R. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology [J]. *J Exp Bot*, 1998, 49:915-929.
- [5] Cushman J C, Bohnert H J. Genomics approaches to plant stress [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(2):117-124
- [6] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought and cold stress [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, 7:161-167.
- [7] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115:327-334.
- [8] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2002, 53:247-273.
- [9] Solomon A, Beer S, Waisel Y, et al. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes [J]. *Plant Physiol*, 1994, 90:198-204.
- [10] Galinski E A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection [J]. *Experientia*, 1993, 49:487-496.
- [11] Papageorgiou G, Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex [J]. *Photosynth Res*, 1995, 44:243-252.
- [12] Shen B, Jensen R G, Bohnert H J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:1177-1183.
- [13] Kalir A, Poljakoff-Mayber A. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Halimione portulacoides* L. Allen exposed to high sodium chloride concentration [J]. *Ann Bot*, 1981, 47:75-85.
- [14] Rontein D, Basset G, Hanson A D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants [J]. *Metab Eng*, 2002, 4(1):49-56.
- [15] Delauney J, Hu C A A, Kishor P B K, et al. Cloning of ornithine-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268:18673-18678.
- [16] Kishor P B K, Hong Z L, Miao G H, et al. Overexpression of delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:1387-1394.
- [17] Zhu B C, Su J, Chan M C, et al. Overexpression of a delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt- stress in transgenic rice [J]. *Plant Sci*, 1998,

- 139:41–48.
- [18] Hong Z, Lic L K, Zhang Z M, et al. Removal of feedback inhibition of delta (1)-pyrroline-5- carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122:129–1136.
- [19] Nanjio T, Kobayashi T M, Yoshida Y, et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 1999, 461:205–210.
- [20] Roosens N H C J, Thu T T, Iskandar H M, et al. Isolation of ornithine-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:263–271.
- [21] Roosens N H, Bitar F A, Locnders K, et al. Overexpression of ornithine- $\delta$ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants [J]. *Mol Breed*, 2002, 9:73–80.
- [22] Wu L Q(吴亮其), Fan Z M(范战民), Guo L(郭蕾), et al. Overexpression of an *Arabidopsis*  $\delta$ -*OAT* gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2003, 48(19):2050–2056. (in Chinese)
- [23] Carpenter J F, Grove J H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes [J]. *Cryobiology*, 1988, 25:244–255.
- [24] McCue K F, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application [J]. *Trends In Biotechn*, 1990, 8: 358–362.
- [25] Saneoka H, Nagasaka C, Hahn D T, et al. Salt tolerance of glycinebetine-deficient and containing maize lines [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:631–638.
- [26] Brouquisse R, Weigel P, Rhodes D, et al. Evidence for a ferredoxin-dependent choline mono-oxygenase from spinach chloroplast stroma [J]. *Plant Physiol*, 1989, 90:322–329.
- [27] Weigel P, Weretilnyk E A, Hanson A D. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1986, 82: 753–759.
- [28] Landfald B, Ström A R. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1986, 165:849–855.
- [29] Ikuta S, Mamura S, Misaki H, et al. Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis* [J]. *J Bacteriol*, 1977, 82:1741–1749.
- [30] Nuccio M L, Russell B L, Nolto K D, et al. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing cho-line monooxygenase [J]. *Plant J*, 1998, 16:487–498.
- [31] Shen Y G(沈义国), Du B X(杜保兴), Zhang J S(张劲松), et al. Cloning and characterization of CMO gene from *Atriplex hortensis* [J]. *Chinese J Biotech (生物工程学报)*, 2001, 17(1):1–5. (in Chinese)
- [32] Rathinasabapathi B, McCue K F, Gage D A, et al. Metabolic engineering of glycine betaine biosynthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance [J]. *Planta*, 1994, 193:155–162.
- [33] Holmstrom K O, Somersalo S, Mandal A, et al. Improved tolerance to salinity and low temperatures in transgenic tobacco producing glycine betaine [J]. *J Exp Bot*, 2000, 51:177–185.
- [34] Guo Y(郭岩), Zhang L(张莉), Xiao G(肖岗), et al. Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene and salinity tolerance in rice transgenic plants [J]. *Sci Chin Ser C Life Sci (中国科学 C 辑, 生命科学)*, 1997, 27(2):151–155. (in Chinese)
- [35] Hayashi H, Alia K Y, Mustardy L, et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *conA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress [J]. *Plant J*, 1997, 12:133–142.
- [36] Prasad K V S K, Sharmila P, Kumar P A, et al. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern. with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress [J]. *Mol Breed*, 2000, 6:489–499.
- [37] Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J, et al. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol [J]. *Science*, 1993, 259:508–510.
- [38] Liu Y(刘岩), Wang G Y(王国英), Liu J Y(刘俊君), et al. Transfer of *E. coli gutD* gene into maize and regeneration of salt-tolerant transgenic plants [J]. *Sci Chin Ser C Life Sci (中国科学 C 辑, 生命科学)*, 1998, 28(6):542–547. (in Chinese)
- [39] Binzer M L. NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in tomato [J]. *Physiol Plant*, 1995, 94:722–728.
- [40] Bumwald E, Poole R J. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiol*, 1985, 78:163–167.
- [41] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 285:1256–1258.
- [42] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. *Nat Biotechn*, 2001, 19:765–768.
- [43] Zhang 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(22):12832–12836.
- [44] Gaxiola R A, Li J, Underranga S, et al. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the *AVP1* H<sup>+</sup> pump [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20):11444–11449.
- [45] Waditee R, Hibino T, Nakamura T, et al. Overexpression of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5):4108–4114.
- [46] Bord M, Montesinos C, Dabauza M, et al. Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance [J]. *Transgenic Res*, 1997, 5:1–10.



- [47] Gisbert C, Rus A M, Carmen M B, et al. The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123:393-402.
- [48] Rus A M, Estan M T, Gisbert C, et al. Expressing the yeast *HAL1* gene in tomato increases fruit yield and enhances K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity under salt stress [J]. *Plant Cell Environ*, 2001, 24:875-880.
- [49] Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants [J]. *Eur Mol Biol Organ J*, 1991, 10: 1723-1732.
- [50] Perl A C, Perl-Treves R, Galili S, et al. Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expression tomato Cu/Zn superoxide dismutase [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85:568-576.
- [51] Kazuo T, Kyoko K. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:1195-1206.
- [52] Van Camp W, Capiou K, Montagu M V et al. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproduction Fe-superoxide dismutase in chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:1703-1714.
- [53] Roxas V P. Overexpression of glutathione S-transferase-glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress [J]. *Nat Biotech*, 1997, (15):988-991.
- [54] Roxas V P, Lodhi S A, Garrett D K, et al. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase /glutathione peroxidase [J]. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41:1229-1234.
- [55] Llorente F, Lopez-Cobollo R M, Catala R, et al. A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, *RC13*, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance [J]. *Plant J*, 2002, 32 (1):13-24.
- [56] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, et al. *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance [J]. *Science*, 1998, 280:104-106.
- [57] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Nat Biotech*, 1999, 17:287-291.
- [58] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:251-264.
- [59] Winicov I, Bastola D R. Transgenic overexpression of the transcription factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120:473-480.
- [60] Shen Y G, Yan D Q, Zhang W K, et al. Novel halophyte *EREBP/AP2*-type DNA binding protein improves salt tolerance in transgenic tobacco [J]. *Acta Bot Sin*, 2003, 45(1):82-87.
- [61] Kong J, Cao W H, Zhang J S, et al. Transgenic analysis of a salt-inhibited *OsZFPI* gene from rice [J]. *Acta Bot Sin*, 2004, 46 (5):573-577.
- [62] Yu SW, Tang K X. MAP kinase cascades responding to environmental stress in plants [J]. *Acta Bot Sin*, 2004, 46(2):127-136.
- [63] Kiegerl S, Cardinale F, Siligan C, et al. SIMKK, a mitogen-activated kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK [J]. *Plant Cell*, 2000, 12:2247-2258.
- [64] Yang KY, Liu Y, Zhang S. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:741-746.
- [65] Fu S F, Chou W C, Huang D D, et al. Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, *osMAPK4*, in response to environmental stresses [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(8):958-063.
- [66] Agrawal G K, Rakwal R, Iwahashi H. Isolation of novel rice multiple stress responsive MAP kinase gene, *osMAPK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(5):1009-1016.
- [67] Foodlad M R, Jones R A. Mapping salt-tolerance genes in tomato using trait-based marker analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 87: 184-192.
- [68] Holmberg N, Bufow L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer [J]. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(2):61-66.
- [69] Bolmert H J, Jansen R G. Metabolic engineering for increased salt tolerance-the next step [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1996, 23: 661-667.
- [70] Liu J J(刘俊君), Peng X X(彭学贤), Wang H Y(王海云), et al. Cloning, sequencing and high level expression of *mtlD* gene and *gutD* gene from *Escherichia coli* [J]. *Chin J Biotech(生物工程学报)*, 1995, 11(4):381-384. (in Chinese)
- [71] Peng Z L, Verma D P S. A rice HAL2-like gene encodes a Ca<sup>2+</sup>-sensitive 3' (2'), 5'-diphosphonucleoside 3' (2')-phosphohydrolase and complements yeast met22 and *E. coli* cysQ mutations [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(49):29105-29110.
- [72] Li R T(李荣田), Zhang Z M(张忠明), Zhang Q F(张启发). Transformation of *japonica* rice with *RHL* gene and salt tolerance of the transgenic rice plant [J]. *Chin Sci Bull(科学通报)*, 2002, 47(8): 613-617. (in Chinese)
- [73] Sentenae H, Bonneaud N, Minet M, et al. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system [J]. *Science*, 1992, 256:663-665.
- [74] Gaxiola R, de Larrinoa I F, Villalba J M, et al. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast [J]. *Eur Mol Biol Organ J*, 1992, 11(2):3157-3164.
- [75] Zhou G Y, Weng J, Zeng J, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. *Meth Enzymol*, 1983, 101:433-448.
- [76] Lin Q F(林栖凤), Deng YC(邓用川), Wu D G(吴多桂), et al. Molecular breeding of salt-resistant *Capsicum annuum* [J]. *Prog Biotech(生物工程进展)*, 1999, 19(5):19-24. (in Chinese)

- [77] Lin Q F(林栖风), Deng YC(邓用川), Huang W(黄薇), et al. Introducing total DNA of *Rhizophora apiculata* to *Solanum melongena* to generate salt-tolerant progenies [J]. *Prog Biotech* (生物工程进展), 2001, 21(5):40-44. (in Chinese)
- [78] Winicov I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plant [J]. *Ann Bot*, 1998, 82:703-710.
- [79] Winicov I. *Atfin1* transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa [J]. *Planta*, 2000, 210:416-422.
- [80] Bajaj S, Targolli J, Liu L F, et al. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants [J]. *Molecular Breed*, 1999, 5(6):493-503
- [81] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10:1391-1406.
- [82] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. *Novartis Found Symp*, 2001, 236:176-869.