

苜蓿耐盐碱转基因研究进展与展望

李会文¹, 麻冬梅², 许兴^{1,2}

(1. 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:土壤的盐碱化极大的影响苜蓿的生长, 该文综述了通过基因工程来提高苜蓿耐盐碱能力方面的研究进展和通过基因工程的方法获得的一些耐盐苜蓿新材料; 分析了当前耐盐碱转基因苜蓿研究中存在的一些问题; 展望了未来研究的方向。

关键词:苜蓿; 耐盐碱; 转基因; 进展

中图分类号:S 551. +7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2012)19—0184—05

苜蓿是世界范围内广泛种植的一种牧草, 占农业总种植面积的 2.5%^[1]。除了作为一种优质的牧草, 种植苜蓿还可以改良土壤, 减少化肥的使用, 对污染的土壤进行清洁。根据联合国教科文组织和粮农组织不完全统计, 全世界盐碱地的面积为 9.5438 亿 hm², 其中我国为 9 913 万 hm²。因此, 盐碱地是土地资源的重要组成部分, 随着可耕地面积的日益减少, 对盐碱地进行改良利用具有重要的意义。而在盐碱地上种植苜蓿, 不仅具有经济意义, 而且可以对土壤进行改良, 但是土壤的高

盐碱化严重抑制苜蓿的生长, 尤其影响苜蓿的幼苗期^[2], 提高苜蓿的耐盐碱性成为研究的重点。但是由于苜蓿复杂的基因型和自花授粉的限制, 对苜蓿的培育具有一定的挑战性。目前苜蓿的培育包括基因组学和转基因技术 2 个领域。基因的转化具有可控制性, 因此, 基因工程已经广泛的应用于苜蓿, 目前已经有许多苜蓿转基因的报道。

1 苜蓿耐盐碱转基因的方法

1972 年 Saunders 等^[3]研究发现, 苜蓿组织培养可以分化再生, 为苜蓿进行转基因研究打下了基础。1986 年 Deak 等^[4]将 NPTII 基因通过农杆菌转化法转入苜蓿获得抗性植株, 开启了苜蓿转基因研究的历程。此后, 有大量苜蓿转基因的报道, 一些其它的转化方法也用于苜蓿转基因, 如基因枪法、花粉管通道法、电击法等, 但主要还是以农杆菌法为主。

1.1 农杆菌介导法

农杆菌转化法是将目的基因插入到经过改造的

第一作者简介:李会文(1985-), 男, 甘肃武威人, 硕士, 现主要从事植物基因工程等工作。E-mail: lhw19851021@163.com.

责任作者:许兴(1959-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事作物逆境生理及生物技术育种等工作。

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2011BAC07B03); 国家“973 计划”子课题资助项目(2012CB114204); 宁夏自治区自然科学基金资助项目(NXIR2009-25)。

收稿日期:2012-05-28

Chestnut Resources Utilization on the Economic Development of Beijing's Mountainous Valley Areas

CAO Jun, WANG Le-le

(Institute of Agriculture Integrated Development, Beijing Academy of Agricultural and Forestry, Beijing 100097)

Abstract: Through the analysis of the economic development background of Beijing's mountainous valley areas, it was elucidated that the coordinate relationship between ecological and economic elements of the economic development of mountainous valley Areas; and the main achievements and the existing problems were elucidated. Based on society, ecology and production analysis about the economic of mountainous valley areas, it was summarized that the chestnut resource utilization should be an important work in the economic development of Beijing mountainous valley areas. As well as they were elaborated that the main problems of chestnut utilization, and some suggestions were given about how to efficiently utilize the chestnut resource and stimulate the economic development of Beijing mountainous valley areas.

Key words: Beijing; the economic of mountainous valley areas; chestnut resources; utilization

T-DNA 区,借助农杆菌侵染植物伤口进入细胞后,将 T-DNA 插入到植物基因组中,实现外源基因在植物细胞中的转移与整合,获得转基因植株的一种方法。1983 年首例由农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的转基因植株被报道,随后农杆菌介导法很快成为双子叶植物基因转导的主要方法。在苜蓿耐盐转基因方面,Winieov 等^[5]通过农杆菌介导法在苜蓿中过表达 *Alfin1* 转录因子,增强了苜蓿内源基因 *MsPRP2* 的表达,提高了植株的耐盐性。陈晨等^[6]利用农杆菌介导法进行紫花苜蓿遗传转化研究,将从盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)中克隆到的抗逆基因 *Dschr*(编码一种早期光诱导蛋白)导入紫花苜蓿栽培种“中苜一号”获得 52 个转化体系。梁慧敏等^[7]研究了影响根癌农杆菌 LBA4404 介导的苜蓿遗传转化的若干因素,获得了转 *BADH* 基因的植株。燕丽萍等^[8]进行生理检查,证明转入的 *BADH* 基因可以提高苜蓿的耐盐能力。马晖玲^[9]以不同紫花苜蓿品种为受体,将来自土壤枯草杆菌的果聚糖合成酶基因导入紫花苜蓿中获得转基因植株,随后晏石娟等^[10]对获得的转基因植株进行耐盐生长适应性研究,发现转基因植株比对照提高了耐盐能力。王强龙等^[11]用真空抽滤辅助的农杆菌转化法将耐盐基因 *AtNHX1* 转入苜蓿,并初步获得了抗性体胚。邓程君^[12]将乙烯信号传递因子(*NTHK1*)基因导入苜蓿并培育出了叶片增大并耐盐的转基因苜蓿,为改良苜蓿品质的育种研究开辟了一条潜在的途径。隋昕^[13]将碱蓬液泡型 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因 *SsNHXI* 转化紫花苜蓿,提高了转基因苜蓿的耐盐性。潘竟丽等^[14]通过根癌农杆菌 EHA105 介导的子叶浸染法将 *Cg-NXH1* 基因导入新疆大叶紫花苜蓿中。赵红娟等^[15]将犁苞滨藜 *NHX* 耐盐基因,通过根癌农杆菌 EHA105 介导法转化新牧 1 号杂花苜蓿(*Medicago varia* Martin. cv. Xinmu No.1)和新疆大叶苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Xinjiang Daye)无菌苗叶片和子叶获得耐盐性植株。盛慧等^[16]以黑龙江紫花苜蓿主栽品种:肇东苜蓿、敖汉苜蓿、公农 1 号和公农 2 号为受体材料,采用农杆菌介导法进行 *DREB2A* 基因遗传转化。李世林等^[17]利用根癌农杆菌介导法进行紫花苜蓿遗传转化研究,将从抗逆生物盐生杜氏藻中克隆得到的 *DsNRT2*(编码硝酸盐转运蛋白)导入紫花苜蓿“中苜一号”中,得到 7 株阳性苗。刘小琳等^[18]报道了以紫花苜蓿“中苜 1 号”7 d 龄无菌苗子叶为外植体,进行 *MsNHX1* 基因转化试验。

此前关于农杆菌介导的耐盐碱转基因苜蓿的研究多集中在再生体系的建立、载体构建、转化与再生、目的基因检测及表达效果的初步分析,而对转基因植株的耐盐性方面的研究很少。王玉祥等^[19]报道了转 *rstB* 基因的苜蓿,在一定的盐胁迫下,转入 *rstB* 基因苜蓿的发芽

率及根的长势都好于非转入 *rstB* 基因的苜蓿。Bao 等^[20]转入 *AVP1* 基因,经过生理监测发现转基因植株中 *AVP1* 基因的过表达增强了转基因苜蓿的耐盐性和耐旱性,并且转基因植株能够耐受 200 mM NaCl。Ramón Suárez 等^[21]报道将酵母 TPS1-TPS2 融合基因在苜蓿中表达,并分析了转基因植株的胁迫容忍性,结果表明,增强了苜蓿的耐干旱、高温、低温和盐的能力。Jin 等^[22]将大豆 *GmDREB1* 基因转入苜蓿,在盐胁迫下,转基因植株中 *GmDREB1* 基因在拟南芥 Rd29A 启动子控制下的表达,赋予转基因植株更高的耐盐性。Liu 等^[23]将 *BADH* 基因转入苜蓿中,通过 PCR、RT-PCR 分析和 POD、MDA、SOD 检测表明 *BADH* 基因在转基因植株中表达增强了苜蓿的耐盐性。Li 等^[24]将 *SsNHX1* 基因转入紫花苜蓿中提高了其耐盐性,在盐胁迫下转基因苜蓿能够在 400 mM NaCl 下生长超过 50 d。Ye 等^[25]用苜蓿子叶节作为外植体将 *GsSAMS2* 转入苜蓿,在压力诱导性启动子拟南芥 Rd29A 启动子下,*GsSAMS2* 基因的表达增强了苜蓿的耐盐性,经盐胁迫试验,发现转基因植株可以容忍 200 mM (NaCl)。

1.2 基因枪法

基因枪法是通过金属颗粒将 DNA 吸附在表面,制成 DNA 微弹,利用动力系统将带有基因的金属颗粒(金粒或钨粒),以一定的速度射进植物细胞,由于小颗粒穿透力强,故不需除去细胞壁和细胞膜而进入细胞或组织中,释放出 DNA 分子与植物基因组随即整合,从而实现稳定转化的目的。Pereira 等^[26]首次采用基因枪法转化苜蓿,将带有 *NPTII* 基因的质粒转入不同品种的苜蓿,在子代中检测到该基因的存在,并发现用该法对苜蓿进行转化无基因型依赖性。Ramaiah 等^[27]用基因枪法将携带报告基因 GUS 的 pBI121 质粒成功地导入苜蓿花粉中,并经检测发现该基因得到表达。王瑛等^[28]将来源于大麦的 *lea3* 基因通过基因枪法导入紫花苜蓿栽培品种“中苜一号”的胚性愈伤组织中,获得的转基因植株具有显著增强的耐盐能力。肖荷霞^[29]以苜蓿(*Medicago sativa*)品种“中苜一号”为试材,进行愈伤组织的诱导。通过基因枪法将来源于大麦的胚胎发生丰富蛋白基因 *lea3* 导入愈伤组织细胞,于 8 mg/L PPT 的选择压力下筛选 2 个月,获得了抗性愈伤组织及再生植株。由于基因枪转化法存在转化效率不高,基因插入往往是多拷贝的,常造成转基因的失活或沉默,轰击过程中可能造成外源基因的断裂,使插入的基因成为没有活性的片段,出现非转化体或嵌合体的可能性较高,可能导致植物本身的某些基因非正常表达,还有可能发生共抑制现象等。

1.3 花粉管通道法

花粉管通道法(Pollen-tube pathway, Ptt)是由周光宇等建立,该方法是利用开花植物授粉后花柱内形成的

花粉管通道,将外源 DNA 导入适当时期的胚囊,转化尚不具备正常细胞壁的卵、合子或早期胚胎细胞,实现遗传转化的外源 DNA 导入方法。牛一丁等^[30]以紫花苜蓿品种“阿尔冈金”为受体材料,以含 *gus* 基因的植物双元表达载体 pPZP221 为外源基因供体进行了花粉管通道法转基因研究,研究了最佳导入时间,结果表明,花粉管通道法在培育转基因紫花苜蓿上的应用是可行的,紫花苜蓿品种“阿尔冈金”最适宜的导入时间为授粉后 32 h。张立全等^[31]利用花粉管通道法将盐生植物红树总 DNA 导入紫花苜蓿,共导入 1 391 朵花,获得 894 粒 T0 代转化种子。T0 代种子种植在含有 225 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上,获得 12 株耐盐性强的植株。通过花粉管通道法转化法减少了农杆菌介导法培育耐盐转基因苜蓿的过程中,愈伤组织的诱导、分化和再生环节,解决了紫花苜蓿许多品种都存在着体细胞胚分化困难、分化率低、重复性差等问题。然而该方法的转化机制还不清楚,特别是裸露 DNA 如何进入生殖细胞,并最终整合到染色体上,另外存在转化频率低、转化工作的重复性差等问题^[32],所以在苜蓿的遗传转化中没有得到广泛使用。

1.4 其它直接法

其它直接法,如显微注射、激光微束穿刺、PEG 介导和电激法等对苜蓿进行遗传转化不受受体的限制,甚至可以避免组织培养和再生的困难,但是也存在转入的基因拷贝数是随机的,导入的外源基因易沉默、转化效率低等缺点^[33]。Reich 等^[34]用显微注射法将 Ti 质粒导入紫花苜蓿原生质体,得到转化的愈伤组织。Kuchuke 等^[35]用直接基因转移法将外源基因导入苜蓿属另 1 个物种 *Medicago borealis* 的叶肉原生质体获转基因植株。张建军等^[36]利用氩离子注入介导乌拉尔甘草总 DNA 在阿尔冈金紫花苜蓿中转化。通过直接法获得耐盐转基因苜蓿的报道很少。

2 苜蓿转基因的受体材料

植物基因工程中,接受外源基因的生命体系被称做受体。苜蓿基因工程中常用的受体有外植体(包括子叶、下胚轴、叶片、子叶节等)、愈伤组织、体细胞胚、原生质体或完整植株等。在苜蓿转基因中,以外植体、愈伤组织、胚状体作为受体通常都会经过再生过程,因此选择哪种作为受体,既要考虑受体的再生能力,又要考虑受体接受外源基因的能力。外植体由于取材方便、操作容易,在农杆菌转化中常作为受体,但是不同器官以及不同生理状态的外植体脱分化和再生能力差异很大。杨起简等^[37]认为,紫花苜蓿幼嫩的子叶、胚轴是理想的外植体,而胚轴优于子叶。Samac^[38]也认为下胚轴是苜蓿遗传转化中的较好外植体。Ye 等^[25]用子叶节作为外植体发现比传统的外植体具有更多的优点。苜蓿体细

胞胚作为转化的受体具有转化率高,再生周期短等优点,是农杆菌转化中较好的受体,黎茵等^[39]通过根瘤农杆菌介导的苜蓿体胚转化,认为体胚大部分细胞都处于旺盛分裂时期,因此十分有利于农杆菌的感染,同时又能很快地从不利于植物组织生长的感染条件中恢复过来。刘文婷等^[40]用苜蓿次级体细胞胚进行遗传转化,获得的转基因植株的转化率是 65.82%。苜蓿原生质体作为受体主要用在直接转化中,由于培养周期较长、难度较大,植株的分化率较低,是一种理想化的受体。苜蓿整株作为转化受体,其转化途径不需要经过愈伤组织分化过程,短时间内就能获得再生植株。王超^[41]用苜蓿整株作为受体,通过农杆菌介导法将碱蓬液泡膜 H^+ -ATPase 基因转入苜蓿,缩短了苜蓿遗传转化的周期。

3 苜蓿耐盐碱转基因的目标基因和筛选基因

到目前为止,常用的选择基因和报告基因仍然多作为苜蓿遗传转化的目标基因兼选择基因,这些基因主要有报告基因类的 *GUS*、*GFP* 基因;抗抗生素类的 *NPTII*、*Hpt* 和抗除草剂类的 *Bar* 基因。Anthony 等^[42]在苜蓿幼苗中发现了高水平的 kan 内源抗性对转化体的筛选效率很低。*Bar* 基因的利用即可以使苜蓿获得抗除草剂抗性,又可以筛选转化体,是一个很好的标记基因。抗生素和除草剂等抗性基因的使用虽然方便了转化体的筛选,但一旦转化成功,标记基因便不再有用,甚至对生态环境和食品安全存在潜在威胁^[43]。但是, Nicoletta Ferradini 等^[44]研究表明,无选择标记基因的转化方法是低效的,选择标记基因仍然是有效的苜蓿遗传转化所必须的。因此在苜蓿转基因研究中可以考虑使用比较安全的标记基因,如核糖醇操纵子(*rtl*)、6-磷酸甘露糖异构酶基因(*pmi*)、木糖异构酶基因(*xylA*)和谷氨酸-1-半醛转氨酶基因(*hemL*)等^[45]。

随着苜蓿耐盐机制的研究和一些耐盐基因的发现,已经将一些耐盐基因作为目标基因来转化苜蓿提高其耐盐性。目前,作为苜蓿耐盐转基因研究中的目标基因主要有:(1)合成渗透调节物质的基因。通过表达一些渗透调节物质,像甜菜碱、脯氨酸、可溶性糖以及一些多元醇等来维护细胞内的渗透平衡,已转入苜蓿中的有 *BADH*、*rstB*^[7,19]等。(2)调节离子平衡的基因。已转入苜蓿中的有 *AtNHX1*、*Cg-NXH1*、*NHX*、*MsNHX1*、*AVP1*、*SsNHX1* 基因^[11,13-15,20,24]等,这些基因的表达可以将 Na^+ 排出胞外和区域化,来维持细胞内的离子平衡。(3)信号转道相关基因。通过感知盐碱胁迫信号并将信号传递给受体来响应盐碱胁迫,例如在苜蓿中转入乙烯信号传递因子(*NTHK1*)基因提高耐盐性^[12]。(4)LEA 蛋白基因^[28-29]。LEA 作为一种脱水保护剂能够使植物较好的应对渗透胁迫、保护细胞膜系统及生物大分子的完整性。(5)其它一些耐盐相关基因。DREB 转录

因子,在植物的抗逆性中发挥重要作用。盛慧^[16]将 *DREB2A* 基因转入苜蓿,增强了苜蓿耐受盐的能力。随着耐盐机制的研究和一些耐盐基因的不断发现,将会有越来越多的耐盐基因被转入苜蓿来更大程度的提高苜蓿的耐盐性。

4 转基因苜蓿中外源基因的表达与检测

基因的表达需要合适的启动子去启动,在转基因植物中广泛应用于外源基因表达的启动子是 CaMV 35s。在苜蓿的遗传转化中普遍使用的也是 35S 启动子,它能使外源基因在苜蓿的各个部位得到表达。35S 启动子在多数双子叶植物中具有较高的活性,但是多数研究结果也表明它在苜蓿中活性不高^[46-47]。为了使外源基因在植物的特定部位表达,发挥其功能,一些诱导性启动子也开始使用。这样就可以减少外源基因的不专一表达,产生没有功能的蛋白而影响植物的代谢。Kasuga 等^[48]研究表明利用诱导性启动子 *rd29A* 诱导的响应盐胁迫基因的表达式,表现出更大的盐容忍性,并减少了对植物生长的影响。李望丰等也研究表明利用诱导性启动子 *rd29A* 控制 *SsNHX1* 基因在转基因苜蓿中的表达,在盐碱胁迫的条件下,*SsNHX1* 基因在转基因苜蓿中被诱导表达,而且转基因苜蓿植株有较高的耐盐能力^[21]。

外源目的基因在植物受体细胞中的转化往往是相当低的,还需要进行进一步的检测。目前在苜蓿转基因研究中,所使用的检测方法和其它植物遗传转化中所使用的一样,分为在整合水平上进行的检测,包括 PCR 检测、Southern blot 检测和染色体原位杂交检测等;在转录水平上进行的检测,包括 RT-PCR 检测、Northern blot 杂交检测等;在表达水平上进行的检测,包括组织化学染色检测、荧光蛋白检测、Western blot 检测、ELISA 检测、叶片退绿检测和叶片涂抹除草剂检测等。目前在耐盐转基因苜蓿的研究中,对外源基因的检测主要在整合水平进行检测,其中 PCR 检测是最基本的检测,初步对外源基因的整合进行检测。还需要检测外源基因的整合拷贝数,了解遗传特性,Southern blot 检测常被用来检测拷贝数,最近几年一些科学家使用半定量 RT-PCR 来分析基因表达量的多少。整合在转化植株基因组中的外源基因不一定都能表达,植物转化的最终目的是外源基因表达出响应的功能蛋白,来赋予转化植株一些特异的性状。所以,在蛋白质水平对获得的拟转基因植株进行分析鉴定是最具说服力,ELISA 以及 Western 杂交是经典的方法。

5 苜蓿耐盐基因转化存在的主要问题及展望

苜蓿耐盐转基因研究虽然已经取得一些进展,但还存在着许多有待解决的问题。目前已获得的许多耐盐转基因苜蓿新材料,大多数还停留在实验室阶段,没有

进入生产应用。这主要是由于外源基因的转化频率低、重复性差、随机性大。因此,如何提高转化效率,建立高效智能的基因转化系统仍然是一个难题。其次,获得遗传稳定的转基因植株以及培育真正耐盐的转基因苜蓿新品系,是苜蓿耐盐基因工程研究的最终目的。但在转基因进程中,不可避免都存在基因沉默和丢失现象,而这严重影响了苜蓿耐盐基因工程在实际中的应用效果,另外关于转基因苜蓿后代稳定性的研究很少,应加强这方面的研究,为获得稳定遗传的转基因苜蓿提供依据。随着植物耐盐基因工程研究的深入,越来越多的耐盐基因被导入苜蓿中而获得高抗逆性的苜蓿品种,但也随着耐盐机制的进一步研究,发现耐盐性状是数量性状并且由多基因控制,其机制研究存在一定的复杂性。而目前苜蓿耐盐转基因研究中使用的外源基因多数来自草本植物或微生物,且大都是转入控制单个性状的单基因。苜蓿自身存在的许多优良基因尚未得到有效的利用,多基因转化的研究也很少。因此,今后耐盐苜蓿转基因研究的重点是研究多基因转化和发掘苜蓿自身的优良耐盐基因资源。

参考文献

- [1] Sengupta-Gopalan C, Bagga S, Potenza C, et al. Alfalfa[J]. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 2007, 61: 321-335.
- [2] 梁云媚, 多立安, 李燕, 等. 不同盐分胁迫对苜蓿种子萌发的影响[J]. 草业科学, 1998, 15(6): 21-25.
- [3] Saunders J W, Bingham E T. Production of alfalfa plants from callus tissue[J]. Crop Sci, 1972, 12: 804-808.
- [4] Deak M, Kissv. Agrobacterium mediated gene transfer[J]. Plant Cell Rep, 1986(5): 97-100.
- [5] Winicov I, Bastola C R. Transgenic overexpression of the transcription Factor *Alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of Plants[J]. Plant Phys, 1990, 120: 473-480.
- [6] 陈晨, 乔代蓉, 白林含, 等. 农杆菌介导的杜氏盐藻 *Dschr* 基因转化紫花苜蓿的初步研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2005, 42(3): 567-570.
- [7] 梁慧敏, 夏阳, 孙仲序, 等. 根瘤农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 152-156.
- [8] 燕丽萍, 夏阳, 毛秀红, 等. 转 *BADH* 基因紫花苜蓿山苜 2 号品种的抗盐性鉴定及系统选育[J]. 植物学报, 2011(3): 63-71.
- [9] 马晖玲. 紫花苜蓿抗旱耐盐碱转基因植株选育的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2004.
- [10] 晏石娟, 马晖玲, 曹致中. 紫花苜蓿抗旱耐盐碱转基因抗性苗耐盐性研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 10(5): 91-94.
- [11] 王强龙, 王锁民, 张金林, 等. 根瘤农杆菌介导 *AtNHX1* 基因转化紫花苜蓿的研究[J]. 草业科学, 2006, 23(12): 55-59.
- [12] 邓程君. 农杆菌介导的 *NTHK1* 基因转化苜蓿增大叶片及提高耐盐性的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [13] 隋昕. 碱蓬液泡型 Na^+/H^+ 逆向运输蛋白基因的克隆及其向苜蓿中的转化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.
- [14] 潘竟丽, 张富春. 农杆菌介导灰绿藜 *Cg-NXH1* 基因转化新疆大叶苜蓿的研究[J]. 新疆农业科学, 2007, 44(4): 418-422.
- [15] 赵红娟, 张博, 李培英. 农杆菌介导犁苞滨藜 *NHX* 基因转化苜蓿的影响因素[J]. 草地学报, 2007, 15(5): 418-422.

- [16] 盛慧,朱延明,李杰,等. *DREB2A* 基因对苜蓿遗传转化的研究[J]. 草业科学,2007,24(3):40-45.
- [17] 李世林,杨舸,易秀莉,等. 根瘤农杆菌介导的盐生杜氏藻 *DsNRT2* 基因转化紫花苜蓿的初步研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),2008,45(2):409-412.
- [18] 刘小琳,康俊梅,孙彦,等. *MsNHX1* 基因转化紫花苜蓿及转基因植株的鉴定[J]. 草地学报,2008(2):115-120.
- [19] 王玉祥,王涛,张博. 转 *rstB* 基因苜蓿耐盐性初评(简报)[J]. 草地学报,2008,16(5):539-541.
- [20] Bao A K, Wang S M, Wu G Q, et al. Overexpression of the Arabidopsis *H⁺-PPase* enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Science, 2009, 176: 232-238.
- [21] Ramón Suárez, Cecilia Calderón, Gabriel Iturriaga. Enhanced Tolerance to Multiple Abiotic Stresses in Transgenic Alfalfa Accumulating Trehalose [J]. Crop Science, 2009, 49: 1791-1799.
- [22] Jin T C, Chang Q, Li W F, et al. Stress-inducible expression of *GmDREB1* conferred salt tolerance in transgenic alfalfa [J]. Plant Cell Tiss Organ Culture, 2010, 100: 219-227.
- [23] Liu Z H, Zhang H M, Li G L, et al. Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase [J]. Euphytica, 2011, 178: 363-372.
- [24] Li W F, Wang D, Jin T C, et al. The Vacuolar Na^+/H^+ Antiporter Gene *SsNHX1* from the Halophyte *Salsola soda* Confers Salt Tolerance in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Mol Biol Rep, 2011, 29: 278-290.
- [25] Hua Y, Zhang B X, Cai H, et al. Stress-inducible expression of *GsSAMS2* enhances salt tolerance in transgenic *Medicago sativa* [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(17): 4030-4038.
- [26] Pereira L F, Erickson L. Stable transformation of alfalfa by Particle bombardment [J]. Plant Cell Reports, 1995(2): 290-295.
- [27] Ramaiah S M, Skirmer D Z, Shashi M Ramaiah, et al. Particle bombardment: a simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Pollen transformation [J]. Current Science, 1997, 73(8): 674-682.
- [28] 王瑛,朱宝成,孙毅. 外源 *lea3* 基因转化紫花苜蓿的研究[J]. 核农学报, 2007, 21(3): 249-252.
- [29] 肖荷霞. 苜蓿转化再生体系的建立及 *LEA3* 基因研究[D]. 石家庄: 河北大学, 2005.
- [30] 牛一丁, 霍朝霞, 哈斯阿古拉, 等. 紫花苜蓿花粉管通道法转基因技术初探[J]. 中国草地学报, 2009, 31(1): 36-39.
- [31] 张立全, 牛一丁, 郝金凤, 等. 通过花粉管通道法导入红树总 DNA 获得耐盐紫花苜蓿 T0 代植株及其 RAPD 验证[J]. 草业学报, 2011(3): 292-297.
- [32] 刘明, 杨君, 安利佳. 花粉管通道法转化影响因素的分析[J]. 安徽农业科学, 2002, 35(12): 3483-3523.
- [33] 许仕珍. 紫花苜蓿不同再生体系的比较及农杆菌介导的 *AzNHX1* 基因转化研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [34] Reich T J, Lyster V N, Mikib L. Efficient Transformation of Alfalfa Protoplasts by the Intranuclear Microinjection of Ti-plasmids [J]. Bio Technology, 1986(4): 1001-1004.
- [35] Kuchuke N. Plant Genic Transfer [J]. Plant Cell Rep, 1990(8): 660-663.
- [36] 张建军, 金湘, 徐建辉, 等. 氩离子注入介导甘草总 DNA 在阿尔冈金紫花苜蓿中转化的初步研究[J]. 种子, 2008, 27(4): 57-59.
- [37] 杨起简, 周禾, 孙彦, 等. 紫花苜蓿的愈伤组织诱导及组织培养[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(2): 29-31.
- [38] Samac D A. Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1995, 43: 271-277.
- [39] 黎茵, 黄霞, 黄学林. 根瘤农杆菌介导的苜蓿体胚转化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2003, 29(2): 109-113.
- [40] 刘文婷, 段琦梅, 刘景玲, 等. 农杆菌介导的苜蓿次级体细胞胚的遗传转化[J]. 生物工程学报, 2012, 28(2): 203-213.
- [41] 王超. 农杆菌介导的碱蓬液泡膜 H^+/ATPase 基因转化苜蓿的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [42] Anthony T T, Stephen H B, Kardailsky V, et al. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedling or flowering plants with *Agrobacterium* [J]. Plant J, 2000, 22: 531-541.
- [43] 马忠强, 尹航. 转基因技术在作物育种中的应用[J]. 现代化农业, 2009(10): 25-26.
- [44] Ferradini N, Nicolai A, Capomaccio S, et al. Assessment of simple marker-free genetic transformation techniques in alfalfa [J]. Plant Cell Rep, 2011, 30(11): 1991-2000.
- [45] 王相春, 程在全, 曾千春, 等. 植物筛选标记基因应用进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22): 13290-13291, 13365.
- [46] Malik K, Wu K, Li X Q, et al. A constitutive gene expression system derived from the tCUP cryptic promoter elements [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 505-514.
- [47] Khoudi H, Vézina L P, Mercier J, et al. An alfalfa rubisco small subunit homologue shares cis-acting elements with the regulatory sequences of the *RbcS-3A* gene from pea [J]. Gene, 1997, 197: 343-351.
- [48] 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 Biotechnol, 1999, 17: 287-291.

Advance and Prospects on Salt-tolerant Transgene Alfalfa

LI Hui-wen¹, MA Dong-mei², XU Xing^{1,2}

(1. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Salinization of the soil greatly affects the growth of alfalfa. In this paper, the research progress through genetic engineering to improve the ability of alfalfa salinity and some new salt-tolerant alfalfa material obtained through genetic engineering methods were reviewed, and some problems in currently study of salinity tolerance of transgenic alfalfa were analyzed, the future research trend was prospected.

Key words: alfalfa; salt-tolerant; transgene; advance