



超表达 *AVP1* 基因提高甜菜的耐低磷和耐盐抗旱性

孙亚卿¹, 王晓娇^{1,2}, 刘雪¹, 李宁宁¹, 李国龙¹, 张少英^{1*}

(1 内蒙古农业大学 农学院, 呼和浩特 010019; 2 内蒙古自治区农牧业科学院, 呼和浩特 010031)

摘要: 为探讨 H^+ -焦磷酸酶编码基因对甜菜磷吸收和抗性的影响, 实现优良基因在甜菜基因工程中的利用, 研究在甜菜中超表达拟南芥液泡膜 H^+ -焦磷酸酶编码基因 *AVP1*, 对转基因甜菜分析其耐低磷、耐盐性和抗旱性。结果显示, *AVP1* 基因在甜菜植株的叶片和块根中表达, 且在逆境胁迫下增强表达量响应胁迫; 低磷处理条件下, 转基因甜菜与野生型甜菜相比具有更高的含磷量, 可提高甜菜对磷的吸收利用效率; 干旱、盐胁迫处理条件下, *AVP1* 基因在转基因甜菜中显著上升, 在盐胁迫或干旱处理条件下, 转基因植株的生长受抑程度相对较轻。随着盐和干旱胁迫的加剧, 转基因植株体内 MDA 含量与野生型植株相比较低而脯氨酸含量显著增加, *AVP1* 基因可通过减轻逆境对甜菜细胞膜的损伤及提高甜菜细胞的渗透调节能力, 进而增强甜菜对高盐和干旱胁迫的抗性。

关键词: 转基因甜菜; *AVP1* 基因; 磷吸收; 非生物胁迫; 抗性

中图分类号: Q789; S566.3 **文献标志码:** A

Overexpression of *AVP1* Gene Improved the Tolerance to Low Phosphorus, Salt and Drought Stress in Sugar Beet

SUN Yaqing¹, WANG Xiaojiao^{1,2}, LIU Xue¹, LI Ningning¹, Li Guolong¹, ZHANG Shaoying^{1*}

(1 College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China; 2 Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China)

Abstract: In order to explore the effect of H^+ -pyrophosphatase coding gene on phosphorus absorption and resistance of sugar beet, and to realize the utilization of excellent genes in sugar beet genetic engineering, *AVP1* gene encoding vacuolar membrane H^+ -pyrophosphatase of *Arabidopsis thaliana* was used to transform sugar beet, and the low phosphorus tolerance, salt tolerance and drought resistance of transgenic sugar beet were analyzed in this study. The results showed that *AVP1* gene could be expressed in the roots and leaves of sugar beet plants, and the expression level increased under stress. Under the condition of controlling phosphorus supply, the phosphorus content of transgenic sugar beet was significantly higher than that of wild type. Under drought and salt stress, *AVP1* gene increased significantly in transgenic sugar beet. Under 200 mmol/L NaCl treatment or 7 days after natural drought, the growth of sugar beet plants was inhibited, while the transgenic plants got less inhibited degree significantly. In addition, with the aggravation of salt and drought stress, compared with wild type plants, the MDA content of transgenic plants was lower and the proline content was significantly increased. *AVP1* gene could reduce the damage

收稿日期: 2023-02-07; 修改稿收到日期: 2023-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060507); 农业农村部糖料产业技术体系项目(CARS-170201)

作者简介: 孙亚卿(1978—), 女, 博士, 讲师, 主要从事甜菜生物技术与抗逆生理研究。E-mail: syaqing@imau.edu.cn

* 通信作者: 张少英, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事甜菜高产高糖生理基础与分子机制研究。E-mail: syzh36@aliyun.com

of stress to the cell membrane of sugar beet, improve the osmotic adjustment ability of sugar beet cells, thereby enhancing the salt tolerance and drought resistance of sugar beet.

Key words: transgenic sugar beet; *AVP1* gene; phosphorus absorption; abiotic stress; resistance

甜菜是中国重要的糖料作物,也是内蒙古地区具有地域优势的经济作物。得益于生产种植的规模化和机械化,近年来发展势头良好,其生产主要分布在北纬 40°以北各省区,而该区域盐碱、干旱土地集中,各种非生物胁迫是制约甜菜产业高质量发展的主要因素之一,因此提高甜菜的抗逆性、保证甜菜产质量稳定提升是保障甜菜生产可持续发展的重要基础^[1]。在传统育种的基础上,利用生物技术对其加以遗传改良,以培育出优质、高产、抗逆性强的新品种,对提高北方地区甜菜产量以及改良和利用大面积盐碱地和荒漠化土地有重要意义^[2-3]。多项研究证明, H^{+} -PPase(H^{+} -焦磷酸酶)基因的过表达可为液泡膜的次级转运系统提供能量,在多种非生物胁迫适应性中起着重要的作用,包括提高植物细胞对盐碱和干旱的耐受性。

通过过表达该基因,不仅可促进转基因植株的根系生长,还可通过分泌有机酸,提高植物根系对磷的吸收效率^[4-5]。可见, H^{+} -PPase 基因作为提高作物抗性的候选基因是一个非常具有潜力的有效基因。本研究在已有研究基础上,将拟南芥 H^{+} -PPase 基因 *AVP1* 对甜菜进行转化,对获得的转基因甜菜植株进行不同非生物胁迫处理(盐胁迫、低磷

和干旱),分析各处理条件下转基因甜菜的磷吸收能力和抗逆性能,为培育高产、高抗性的甜菜新品种提供参考。

1 材料和方法

1.1 转基因甜菜的获得

克隆于拟南芥的 *AVP1* 基因和经改造的携带 *AVP1* 基因的质粒 pCambia2301(图 1)由本课题组先期完成,参见王晓娇^[6]方法,利用农杆菌菌株 LBA4404,对甜菜品系 DF1031 进行遗传转化。将甜菜种壳打磨后采用 10% NaClO 和 0.1% HgCl₂ 各处理 10 min 的灭菌剂组合,MS 培养基培养获得无菌苗。甜菜子叶节置于 MS+1.0 mg/L 6-BA 的分化培养基上预培养 2~3 d,用 OD₆₀₀ 为 0.4~0.5 的菌液侵染 6~8 min,共培养 48 h 后,转入含 0.1 g/L 卡那霉素和 0.3 g/L 羧苄青霉素的分化培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA)上进行筛选培养。外植体分化出不定芽后,移到生根培养基(1/2 MS+2.0 mg/L NAA)上生根成苗。对得到的抗性苗随机取样不同部位,且经 PCR 和 RT-PCR 检测全部为阳性的植株,选取长势一致的植株用于进一步处理研究。

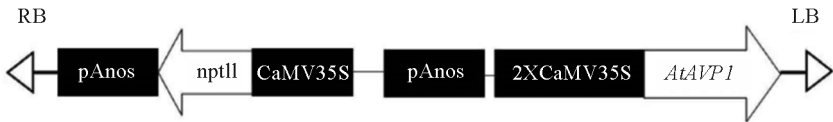


图 1 质粒 pCambia2301 示意图
Fig. 1 Schematic map of the plasmid pCambia1301

1.2 转 *AVP1* 基因甜菜的分子检测

1.2.1 转基因甜菜的 PCR 检测

根据所用植物表达载体序列合成引物(表 1),扩增长度为 600 bp 的片段,分别以质粒和野生型植株作为正负对照,用于抗性苗的基因整合鉴定。

1.2.2 转基因甜菜的 qRT-PCR 检测

采用 TRIzol 方法提取经 PCR 鉴定阳性甜菜植株组织 RNA,纯化后的 RNA 反转录合成 cDNA,步骤见王晓娇方法^[6]。用甜菜 *Actin* 基因当内参基因(表 1),进行荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR),分别计算不同培养条件(低磷、干旱、盐胁迫)下叶片和块根中 *AVP1* 基因的相对表达量。

表 1 研究所用引物序列
Table 1 The primer sequences

引物名称 Name of the primer	序列 Sequence	用途 Application
AVP-F	TGACGCACAATCCCACTATC	基因整合鉴定 Identification of gene integration
AVP-R	GCAATGATAAAAGCCTTCCCAAC	
ACT-F	CCAAGGCAAACAGGGAAG	内参基因 Reference gene
ACT-R	CCATCACCAGAGTCMGCACA	
A-F	TGACGCACAATCCCACTATC	表达分析 Expression analysis
A-R	GCAATGATAAAAGCCTTCCCAAC	

1.3 材料准备

对不同甜菜组育苗材料炼苗 3~4 d 后,将幼苗移入经高压灭菌过的珍珠岩/细砂/蛭石(1:1:1)

基质中,遮荫 3~4 d 后观察幼苗生长情况,然后逐渐去除遮荫网,自然光照射。每 2 d 浇入 1/2 霍格兰营养液,期间温度和湿度适宜。选取苗高、长势基本一致的植株作为试验材料。

1.4 不同磷浓度处理

挑选上述培养的 8 叶龄植株幼苗,设置低磷 P1 (0.05 mmol/L H_2PO_4^- 浓度)、低磷 P2 (0.1 mmol/L H_2PO_4^- 浓度)、正常磷 CK (1 mmol/L H_2PO_4^- 浓度)、高磷 P3 (2 mmol/L H_2PO_4^- 浓度) 4 个磷浓度处理,各处理设置 3 次重复。调节 pH 为 7.0~7.5 的 Hoagland 营养液配方浇灌 40 d 后取样。

1.5 干旱胁迫处理

挑选前期培养的长势基本一致的转基因和野生型植株幼苗,采用 25% PEG 6000 进行干旱胁迫,不胁迫为对照,3 个重复,在干旱胁迫处理期间,每 2 d 取 1 次样品测定相关指标,每个指标 6 次重复。

1.6 盐胁迫处理

挑选上述培养的转基因和野生型植株幼苗,用 1/8 霍格兰营养液浇灌(其中含 50 mmol/L NaCl),NaCl 浓度每隔 1 d 增加 50 mmol/L,最后达到终浓度 200 mmol/L。继续培养 7 d 后,取样测定相关指标,每个指标 6 次重复。

1.7 指标测定

土壤总磷量采用分光光度法定量测定^[7]。植株总磷量采用钼抗比色法^[8]。游离脯氨酸含量采用酸性茚三酮法。丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸(TBA)-分光光度法。

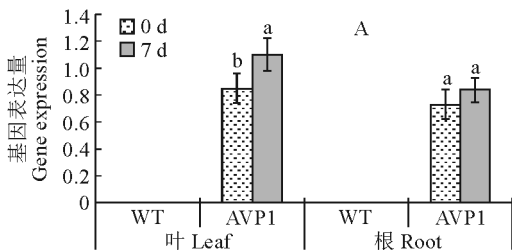
1.8 数据分析

所得数据应用 SAS 9.0 软件进行方差分析,利用 Excel 2003 进行作图。

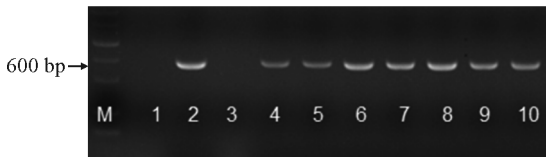
2 结果与分析

2.1 不同培养条件下转基因甜菜 *AVP1* 的表达差异

对经 PCR 检测鉴定为阳性(图 2)的植株材料,采用 qRT-PCR 分析其在不同培养条件下甜菜叶片和块根中 *AVP1* 基因表达量的差异。



结果显示,无论在不同磷处理(图 3)、高盐和干旱胁迫(图 4)条件下,野生型甜菜叶片和块根中 *AVP1* 基因均未表达,而转基因甜菜的叶片和块根中 *AVP1* 均有不同程度的表达,其中叶片中的表达量较强。与对照比较,低磷处理下,*AVP1* 基因在叶片和块根中的表达量均显著增加,而在高磷处理下,*AVP1* 基因的表达量却没有增加,在转基因甜菜叶片中 *AVP1* 基因具有表达优势。在胁迫条件后,*AVP1* 基因在转基因甜菜叶片和块根中的表达量均显著增强(图 4)。



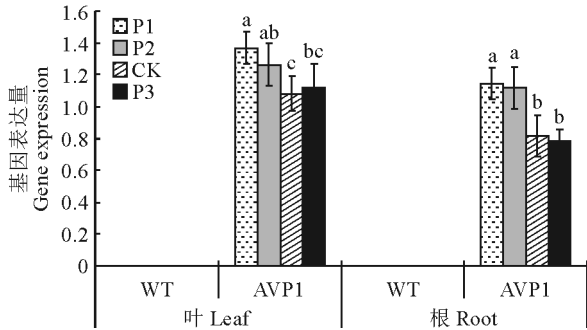
M. DL3000; 1. ddH₂O; 2. 质粒(CK⁺); 3. 野生型(CK⁻); 4-10. 转基因甜菜。

图 2 T₁ 代转 *AVP1* 基因甜菜 PCR 检测

M. DL3000; 1. ddH₂O; 2. Plasmid(CK⁺);

3. Wild-type(CK⁻); 4-10. Transgenic sugar beet.

Fig. 2 The PCR electrophoretogram of T₁ generation *AVP1* gene transgenic sugar beet



WT. 野生型; AVP1. 转基因植株; 不同小写字母代表处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图 3 不同磷浓度对转基因甜菜 *AVP1* 基因表达的影响
WT. Wild type; AVP1. Transgenic plants; Different normal letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level ($P < 0.05$). The same below.

Fig. 3 The effect of different P concentrations on the gene expression of wild and transgenic types

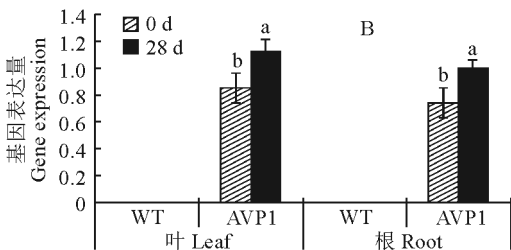


图 4 干旱(A)和高盐(B)胁迫下甜菜不同器官 *AVP1* 基因表达

Fig. 4 *AVP1* gene expression level under drought stress (A) or salt stress (B)

2.2 转 AVP1 基因提高甜菜磷素吸收能力的影响

如图 5,A 显示了在不同磷供给处理下的土壤磷含量,结果显示培养转 AVP1 基因甜菜的土壤磷含量均低于种植 WT 甜菜的土壤,且差异显著($P<0.05$)。在相同的磷含量供应和相同的处理方法下,转基因甜菜含磷量均高于野生型甜菜,其中在 CK 条件下,前者比后者高出 65%,可见转基因甜菜比野生型具有更高的磷吸收能力。

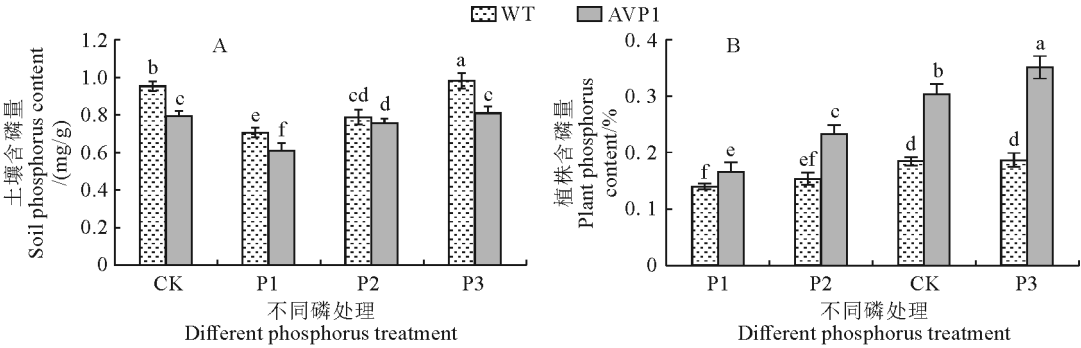


图 5 不同磷浓度对土壤和转基因甜菜植株含磷量的影响
Fig. 5 The phosphorus content of soil and plants under different P concentrations

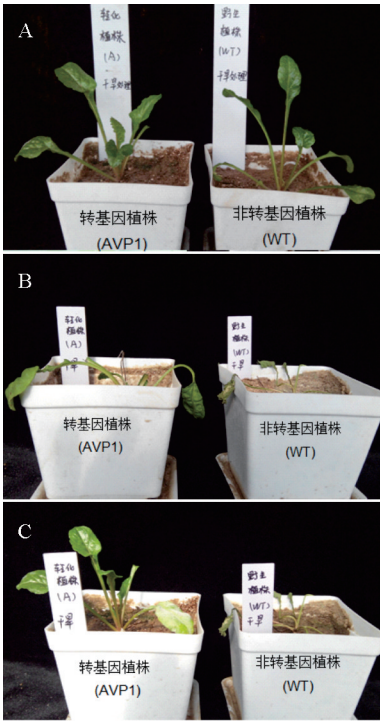
2.3 转 AVP1 基因甜菜抗旱性

野生型植株在正常生长条件与转基因植株在生长形态上基本一致,没有明显差别(图 6,A)。但随着干旱胁迫的持续,野生型植株的生长在处理第 5 天时首先出现萎蔫现象,生长受到抑制,而同时转基因植株仍然正常生长,直到第 7 天才发生萎蔫(图 6,B),而此时野生型植株表现受害程度更重;干旱处理第 8 天对所有植株做复水处理,2 d 后,转基因植株解除萎蔫并基本恢复正常生长,而野生型植株则发生永久萎蔫,最后死亡(图 6,C)。可见,AVP1 基因的超表达提高了转基因甜菜的抗旱性。

2.4 转 AVP1 基因甜菜耐盐性

选取植株生长形态基本一致的转基因和野生型植株(图 7,A)用 200 mmol/L NaCl 处理,1 周后二者的叶片均表现部分变黄,生长速度明显缓慢,但野生型植株表现相对较严重的失绿现象。盐胁迫处理期间,转 AVP1 基因材料的长势表现相对强于 WT 植株,总体受抑程度轻于野生型植株(图 7,B)。植株生物量测定结果显示,在 200 mmol/L NaCl 处理 14 d 后,无论是地上部还是地下部,转基因植株的生物量均显著高于野生型植株,如转基因植株的地上部鲜重是野生型植株的 1.4 倍(图 8)。可见,AVP1 转基因植株具有比野生型植株更强的耐盐性。

植株叶片内磷浓度取决于土壤磷供应水平,低磷条件(P1)下,虽转基因甜菜和野生型甜菜的磷含量与 CK 条件相比均显著降低,但转 AVP1 植株仍显著高于 WT 植株。转基因甜菜的含磷量随着磷供给的增加而增加趋势明显,而野生型植株在高磷条件(P3)下磷含量与 CK 条件无明显差异,可见转基因甜菜与野生型植株相比具有充分利用过量磷的吸收能力。



A. 干旱胁迫前; B. 干旱胁迫 7 d; C. 恢复灌水 2 d。

图 6 干旱胁迫对转基因植株与野生型植株形态变化的影响

A. Before drought stress; B. 7 days after drought stress;
C. 2 days after resuming irrigation.

Fig. 6 The effect of drought stress on the morphological changes of transgenic type and wild

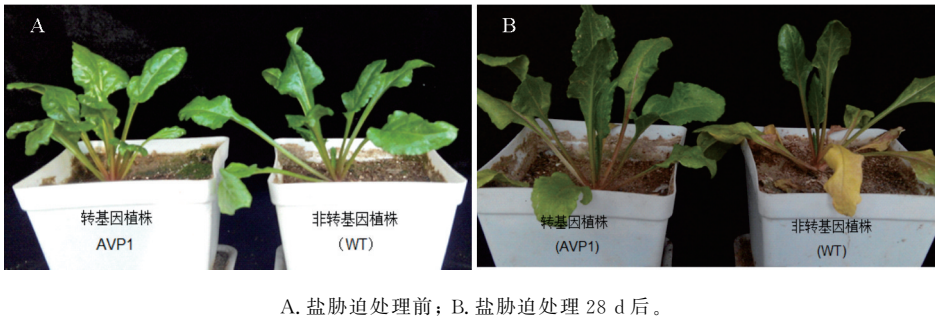
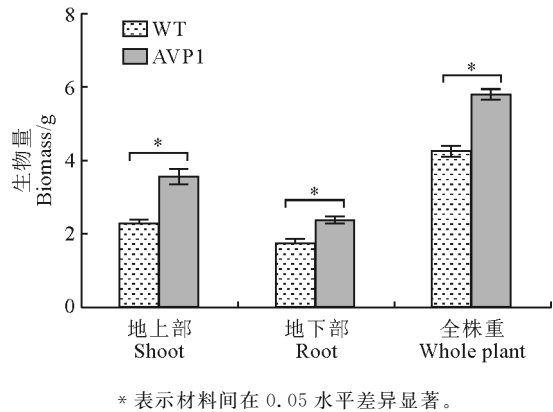


图 7 盐胁迫对野生型植株与转基因植株形态的影响

Fig. 7 The morphological changes of transgenic type and wild type under salt stress



* 表示材料间在 0.05 水平差异显著。

图 8 200 mmol/L NaCl 处理植株生物量

* represents significant difference between materials at 0.05 level.

Fig. 8 Biomass of plants treated with 200 mmol/L NaCl

2.5 转 *AVP1* 基因植株中细胞膜稳定性和渗透能力

植物器官在逆境伤害下往往发生膜脂过氧化作用,丙二醛(MDA)是细胞膜脂质过氧化作用的产物之一,其含量一定程度上可以反映遭受逆境伤害的程度^[9]。

本研究中,WT 植株与转 *AVP1* 基因植株叶片中 MDA 含量在胁迫处理前没有差异(图 9),但随着 NaCl 浓度的增加或干旱胁迫的加剧,二者植株

叶片 MDA 含量均呈增加趋势,但转基因甜菜表现较为缓慢的增加趋势,在盐处理 14 d 或干旱胁迫 5 d 后,二者的 MDA 含量开始表现明显差异,盐处理继续到 21, 28 d 时,WT 植株的 MDA 含量比转 *AVP1* 植株分别高出 24.5% 和 26.7%;而在干旱处理 5 d、7 d 后,则分别高出 15.6% 和 22.1%,由以上结果可见转 *AVP1* 基因植株具有较高细胞膜稳定性,因而比野生型植株表现较高抗盐和抗旱性。

由图 10 可知,在逆境条件下,植物体内具有较强水合能力的游离脯氨酸含量会显著增加,其通过稳定原生质胶体及组织内的代谢过程来提高植物的抗逆性。本试验中,转 *AVP1* 基因甜菜植株和 WT 植株在盐胁迫和干旱处理条件下,游离脯氨酸含量均高于处理前,但增加幅度表现为转 *AVP1* 基因甜菜植株大于 WT 植株。

盐胁迫 28 d 和干旱胁迫 7 d 后,前者游离脯氨酸含量比后者分别高出 27.1% 和 30.3%,均达到显著差异($P < 0.05$)。表明转基因甜菜比野生型植株具有较强渗透调节能力,从而可缓解高盐或干旱条件对植株造成的渗透胁迫,一定程度上缓解其造成的伤害。

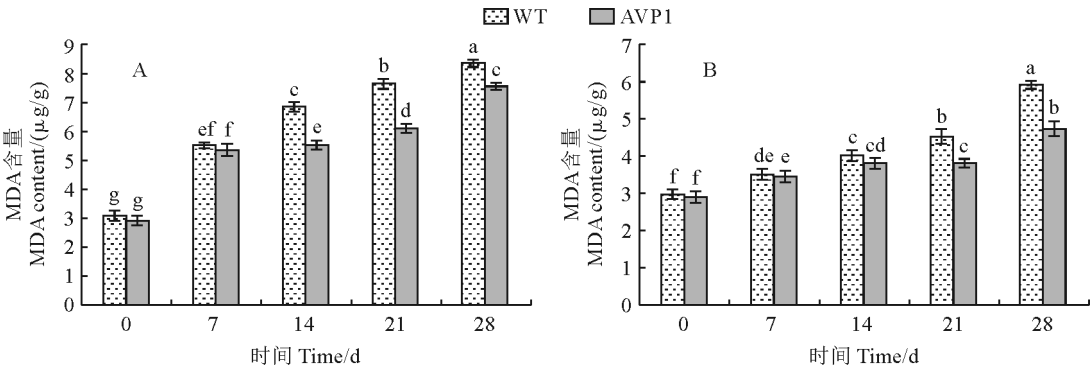


图 9 盐胁迫(A)和干旱条件(B)下甜菜植株叶片丙二醛含量

Fig. 9 MDA content in leaves of sugar beet plants under salt (A) and drought (B) stress

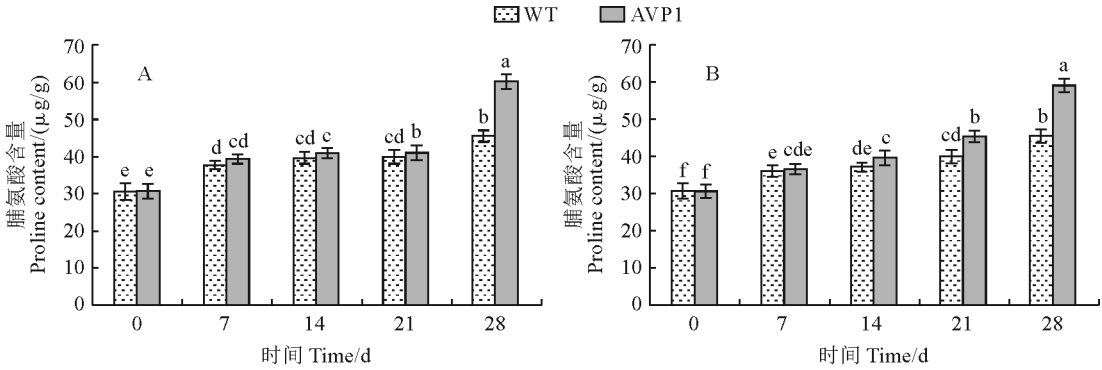


图 10 干旱(A)、盐胁迫(B)条件下甜菜植株叶片脯氨酸含量
Fig. 10 Proline content in leaves of sugarbeet plants under drought (A) and salt (B) stress

3 讨论

由于外源基因遗传具有不稳定性,在转基因植株体内表达水平相对较低,甚至靶基因丢失的现象时有发生^[10]。此外,研究发现,在相同的条件下,用同样的转化方法转化同一种外源基因,所获得的转基因植株间不仅外源基因表达水平差异很大,而且由于转基因的间接作用还可能使转基因植物出现额外的表型变异^[11],这可能是由于 DNA 插入位点不同而造成的,从而在一定程度上限制了转基因植物的商品化进程^[9]。本研究中采用 qRT-PCR 方法检测 *AVP1* 基因在甜菜中的表达特性,结果表明目的基因在甜菜继代培养植株中稳定存在,在转基因甜菜中正常表达,但在根和叶中的表达强度不同。在温室盆栽培养条件下,转 *AVP1* 基因甜菜与野生型植株生长表现无差异,说明该外源靶基因的插入并未对其生长发育产生不利影响。

甜菜对磷需求量大,但甜菜的主要产区的北方地区土壤普遍磷供应不足,因有效磷浓度低、磷肥利用率低等条件对甜菜生产造成一定的限制。土壤中磷素容易被固定,因此植物根系发育程度对磷的吸收起重要作用^[12]。研究表明 H^+ -焦磷酸酶编码基因的过表达可促进多种植物根系的生长和发育^[4-5]。本研究比较了转 *AVP1* 基因甜菜和野生型甜菜的低磷耐受性,研究结果表明利用生物技术手段在甜菜中过表达 *AVP1* 基因提高甜菜对磷的吸收,从而提高低磷条件下甜菜的产质量是可选择的有效途径。

干旱、高盐等是限制植物生长的主要非生物胁迫

因素,利用生物技术手段将与耐盐抗旱特性相关的外源基因引入植物中,进而选育耐盐抗旱新品种一直是植物抗逆研究的研究热点^[13]。不同非生物逆境条件可对植物细胞膜造成氧化伤害及引起渗透胁迫,进而影响相关生理代谢过程^[14]。本研究中通过分析转 *AVP1* 基因甜菜在干旱胁迫和盐胁迫下的生理生化指标表明,在相关逆境胁迫下 MDA 含量均有所增加,但与野生型植株相比,转基因材料具有较低 MDA 含量和较高游离脯氨酸含量。可见外源基因 *AVP1* 的表达一定程度上保护了细胞的膜系统,同时转基因甜菜可通过自身积累游离脯氨酸参与渗透调节,缓解相关逆境条件造成的渗透胁迫,增强转化植株对相关逆境胁迫的耐受性,从而可以更好地适应干旱或盐胁迫环境。

本研究以 *AVP1* 基因转化甜菜,结果显示 *AVP1* 基因可在甜菜地上、地下部表达,且逆境胁迫条件下表达量增强,转 *AVP1* 基因甜菜具有比野生型甜菜更高的磷素吸收利用效率;干旱、盐胁迫处理条件下,*AVP1* 基因在转基因甜菜中显著上升,与野生型植株相比,转基因植株体内 MDA 含量较低而脯氨酸含量显著增加,*AVP1* 基因可减轻逆境对甜菜细胞膜损伤,提高甜菜细胞渗透调节能力,由此可见 *AVP1* 基因过量表达一定程度上提高了转基因甜菜的磷素吸收能力和耐盐性、抗旱性,这对培育甜菜新品系创制了新的育种材料。随着对 H^+ -PPase 功能的逐渐了解,以及对植物抗逆分子机制的研究和生物技术不断完善,有望为培育高效、耐盐、抗旱同时具有高效磷吸收能力的甜菜新品种开辟新的途径。

参考文献:

[1] 贾也纯,陈润仪,贺泽霖,等. 甜菜抗非生物胁迫研究进展[J]. 中国农学通报, 2022, **38**(9): 33-40.
JIA Y C, CHEN R Y, HE Z L, *et al.* Research progress on sugar beet resistance to abiotic stress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, **38**(9): 33-40.

[2] 杨 真,王宝山. 中国盐渍土资源现状 & 改良利用对策[J]. 山东农业科学, 2015, **47**(4): 125-130.
YANG Z, WANG B S. Present status of saline soil resources and countermeasures for improvement and utilization in China [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2015, **47** (4): 125-130.

[3] LIU H, WANG Q Q, YU M M, *et al.* Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene, *At-NHX3*, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2008, **31**(9): 1 325-1 334.

[4] 张 晓. 磷酸盐转运蛋白 OsPT5/OsPT7 与质子焦磷酸酶 AVP1D 影响植物磷素吸收转运和生长发育的机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

[5] 程 星,王燕雯,包爱科,等. 超表达 AVP1 基因提高转基因百脉根的耐盐性和抗旱性[J]. 植物生理学通讯, 2010(8): 808-816.
CHENG X, WANG Y W, BAO A K, *et al.* Overexpression of AVP1 enhanced salt and drought tolerance of transgenic *Lotus corniculatus* L. [J]. *Plant Physiology Communications*, 2010(8): 808-816.

[6] 王晓娇. 农杆菌介导 AVP1 基因转化甜菜的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2011.

[7] 潘春龙,肖 姣. 微波消解-流动注射分光光度法测定土壤中的总磷[J]. 四川环境, 2012, **31**(3): 42-43.
PAN C L, XIAO J. Determination of total phosphorus in soil adopting microwave digestion-flow injection spectrophotometry [J]. *Sichuan Environment*, 2012, **31**(3): 42-43.

[8] 张 婷. 高产高糖甜菜磷代谢生理基础的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.

[9] 刘 雪. 转 AVP1 基因甜菜的分子检测和功能鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.

[10] 汪 由,吴 禹,王 岩,等. 5 种常用的植物转基因技术[J]. 杂粮作物, 2010, **30**(3): 186-189.
WANG Y, WU Y, WANG Y, *et al.* The five kinds of DNA transformation techniques[J]. *Rain Fed Crops*, 2010, **30** (3): 186-189.

[11] 刘苗苗. 通过转基因提高浮萍抗逆性及表达药物蛋白 IL-6 的研究[D]. 天津: 南开大学, 2014.

[12] HOLFORD I C R. Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants[J]. *Soil Research*, 1997, **35**(2): 227.

[13] 王 洁,王小平,张边江. 植物抗非生物胁迫机制及其基因工程研究进展[J]. 江苏农业科学, 2011, **39**(5): 17-19.
WANG J, WANG X P, ZHANG B J. Research progress on abiotic stress resistance mechanism and genetic engineering of plants[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, **39**(5): 17-19.

[14] HIPSKIND J D, PAIVA N L. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, **13**(5): 551-562.

(编辑:韦青侠)