

# 铁皮石斛外源 $lea3$ 基因的转化及耐盐性分析\*

杨雪飞<sup>1</sup> 王瑛<sup>2</sup> 罗建平<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>合肥工业大学生物与食品工程学院 合肥 230009)

(<sup>2</sup>河北大学生命科学学院 保定 071002)

**摘要** 利用基因枪法将来源于大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 的抗旱耐盐基因 $lea3$ 导入铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl) 的类原球茎 (PLBs) 中, 经膦丝菌素类除草剂PPT筛选2次获得抗性PLBs, 于无选择压下分化获得不定芽, 再经PPT筛选和生根壮苗培养获得转化植株. 对转化植株进行除草剂PPT叶片涂抹检测和 $lea3$ 基因的PCR检测, 表明 $lea3$ 基因已整合到6个株系7株铁皮石斛转化植株基因组中, 转化频率为1.05%. 与对照相比, 获得的转基因植株的耐盐胁迫能力明显增强, 表明遗传转化 $lea3$ 基因可用于石斛抗旱耐盐新品种的选育. 图4 表1 参23

**关键词** 铁皮石斛; 类原球茎 (PLBs);  $lea3$ 基因; 基因枪; 转化; 耐盐性

CLC S682.310.34

## Transformation of $lea3$ Gene into *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl for Enhancing Its Salt Tolerance\*

YANG Xuefei<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>2</sup> & LUO Jianping<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

(<sup>2</sup>College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China)

**Abstract** The present paper reports that the plasmid pBY520 containing  $lea3$  gene and  $bar$  gene was bombarded by gene gun transformation into Protocorm-like bodies (PLBs) from *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. After PPT screening, the obtained resistant PLBs were cultured on differentiation media without PPT to regenerate shoots. Then the resistant shoots were treated with PPT screening again and the finally regenerated plants were obtained on the rooting medium. PPT resistance tests and  $lea3$  gene PCR analysis showed that 6 putative transgenic lines had the  $lea3$  gene integrated. The transformation rate was 1.05%. Compared with control plants, the transgenic plants were more tolerant to salt stress (1.5% NaCl), suggesting that the transformation of the  $lea3$  gene could be used to select *Dendrobium* cultivars with enhanced tolerance to drought and salt stress. Fig 4, Tab 1, Ref 23

**Keywords** *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl; protocorm-like bodies (PLBs);  $lea3$  gene; particle bombardment; transformation; salt tolerance

CLC S682.310.34

石斛属 (*Dendrobium*) 是兰科中种类最多的一个大属, 全球约有1400多种, 其中多数种具观赏价值, 为四大观赏兰之一, 部分种兼具很高的药用价值<sup>[1]</sup>. 目前, 国际上最具商业价值的几个大属的兰花, 均存在着病虫害严重、栽培和养护环境苛刻、成花周期长、开花控制难度大、花色花形不丰富等普遍问题<sup>[2]</sup>, 然而传统的杂交育种周期长、繁殖率低、预见性差, 很难获得预期的新品种<sup>[3]</sup>. 近年来, 转基因技术为兰花品质改良开辟了一条新途径.

兰科植物转基因研究起步较晚, 为公认的较难进行遗传转化的单子叶植物. 迄今为止, 兰花转基因的研究仅在9属有过报道, 且多为转化体系的建立, 尚未达到应用阶段, 采用的转化方法主要为基因枪法和农杆菌介导法. 有关石斛遗传转化的报道不多, 主要考察转化体系建立的有关因素, 如转化方法选择<sup>[4]</sup>、转化条件优化<sup>[5]</sup>、标记基因选择等. 近来, 对改良石斛品质的遗传转化研究逐步展开. 卢毕生通过基因

枪法和农杆菌介导法将抗冻蛋白 (AFP) 基因转化石斛兰以期获得抗冻石斛品种<sup>[6]</sup>. Chang等获得了表达CymMV-CP基因的转化植株<sup>[7]</sup>. 潘丽晶等通过农杆菌介导法将苏云金芽孢杆菌 $aitA$ 基因导入石斛兰以期获得软腐病抗性新品种<sup>[8]</sup>.

石斛对生境的要求非常苛刻, 在栽培养护过程中对温度、光照、湿度以及栽培基质等要求高, 性喜湿润, 但水分过多又极易造成兰花生理性病害根腐病<sup>[9]</sup>; 石斛的规模化生产多采取温室设施栽培, 而设施栽培土壤易产生次生盐渍化<sup>[10]</sup>. 这些因素对石斛的生长和品质造成较大影响, 增加了人工规模化栽培石斛的管理难度. 干旱、盐碱等逆境胁迫因子严重制约植物的生长发育与产量, 植物受干旱、盐碱胁迫的适应性及机制的研究以及解决策略备受关注<sup>[11-12]</sup>, 培育和种植抗旱、耐盐碱植物品种不失为一种有效的解决途径. 研究显示, 抗旱耐盐碱基因 $lea3$ 转入水稻<sup>[13]</sup>、小麦<sup>[14]</sup>、苜蓿<sup>[15]</sup>等植物后, 转化子的抗旱耐盐碱能力均得到显著增强, 表明 $lea3$ 基因在基因工程改良植物抗旱耐盐碱方面具有广阔的前景.  $Bar$ 基因作为目的基因被转入多种农作物并早已实现商品化生产, 转 $bar$ 基因作物的食品安全性也被确认;  $bar$ 基因因筛选作用明显且检测方法灵敏也常被用作筛选基因, 既实现

收稿日期: 2010-06-23 接受日期: 2010-07-01

\*高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20060359006) Supported by the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20060359006)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: jianpingluo@yahoo.com.cn)

转化体的有效筛选又获得除草剂抗性转化子。Knapp等以 $bar$ 基因作为筛选基因对遗传转化的3种兰花实现了有效筛选<sup>[16]</sup>。至今,未见 $lea3$ 基因转化石斛以及其他兰花品种的报道。

本研究以 $bar$ 基因为筛选标记基因,用基因枪轰击石斛类原球茎进行转化实验,将来源于大麦(*Hordeum vulgare* L.)的抗旱耐盐碱基因 $lea3$ 导入铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl),获得转基因植株,以期培育出对逆境适应能力强、对栽培养护环境要求较粗放的抗旱耐盐碱石斛新品种,进而为其它兰花品种的环境抗逆性育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 以本研究室保存的铁皮石斛(*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl)试管苗诱导产生的类原球茎(PLBs)为转化受体。

1.1.2 质粒载体 质粒pBY520由美国Cornell大学Ray Wu教授惠赠,携带有来源于大麦的 $lea3$ 基因和 $bar$ 基因(膦丝菌素乙酰转移酶基因)。 $lea3$ 基因为目的基因,以水稻 $Act1$ 为启动子,马铃薯 $Pin2$ 为终止子。 $Bar$ 基因为筛选基因,由CaMV 35S和 $nos$ 调控(图1)。 $Bar$ 基因具抗膦丝菌素类除草剂(PPT)的抗性。

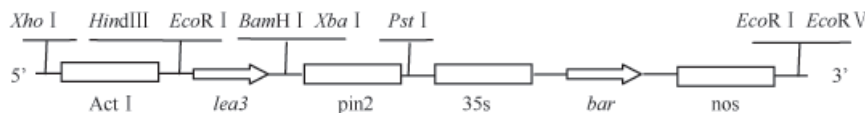


图1 pBY520质粒酶切图谱

Fig. 1 Restrictive digestion map of plasmid pBY520

1.1.3 试剂(盒)与培养基 PCR试剂盒和DL2000 marker购自大连TaKaRa公司,PCR引物由上海生工合成,Glufosinate(PPT含量为99%)购自Sigma-Fluka公司,NAA、6-BA为Sigma公司分装,亚精胺为Sigma公司原装,氨基青霉素为WDSS公司产品,其他生化试剂为国产分析纯试剂。继代培养基:MS+蔗糖30 g/L+琼脂5.5 g/L,pH 5.8;高渗培养基:MS+甘露醇0.4 mol/L+蔗糖30 g/L+琼脂5.5 g/L,pH 5.8;类原球茎筛选培养基:MS+PPT3.0 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂5.5 g/L,pH 5.8;分化培养基:MS+NAA 0.9 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂5.5 g/L,pH 5.8;不定芽筛选培养基:MS+PPT20 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂5.5 g/L,pH 5.8;生根壮苗培养基:MS+香蕉泥200 g/L+蔗糖30 g/L+琼脂5.5 g/L,pH 5.8。

### 1.2 方法

1.2.1 类原球茎(PLBs)的驯化培养 挑取从铁皮石斛试管苗根尖产生的类原球茎接种到继代培养基上,在(25±1)℃条件下暗处培养驯化,每30 d转接1次。

1.2.2 质粒DNA提取 菌种活化与培养:挑取保存于低温冰箱含质粒pBY520的*Escherichia coli*基因工程菌液在含氨基青霉素50 mg/L的LB平板上划线培养,活化后挑取单菌落接种到3 mL含氨基青霉素50 mg/L的LB液体培养基中,37℃、120 r/min振荡培养过夜,接着吸取过夜培养液1 mL接种至50 mL同上培养基中振荡培养至对数生长中后期用于提取质粒DNA。

质粒DNA提取:取对数生长中后期的 $lea3$ 基因工程菌

液,参照《分子克隆实验指南》<sup>[17]</sup>碱裂解抽提法制备质粒DNA。

1.2.3 基因枪转化 微弹制备程序参照Daniell(1993)等的方法<sup>[18]</sup>。轰击转化采用PDS-1000/He型基因枪(Bio-Rad公司生产)。分别选取暗处第3次继代培养25 d和继代15 d再移入光照14 h/d条件下继续培养10 d且生长良好、均一、粒径3~4 mm的类原球茎,转入高渗培养基均于暗处处理5 h,每皿60~70块,在平皿中心紧密排列成直径约4 cm的圆饼状,用基因枪轰击转化。基因枪转化参数为:真空度 28 inches-Hg,轰击距离9 cm,氦气压力1 100 psi,金粉颗粒直径1.0 μm,每枪金粉用量0.5 mg,每皿轰击1次。轰击后均继续于暗处高渗处理18 h,再转至继代培养基在(25±1)℃、光照14 h/d条件下分别过渡恢复培养0、10、20 d。以经历同样处理过程而未进行轰击的类原球茎为对照。

1.2.4 转化体筛选和植株再生 将轰击后恢复培养一定时间的类原球茎和对照转入类原球茎筛选培养基在PPT 3.0 mg/L压力下筛选培养,继代2次,每次30 d,然后将筛选所得抗性类原球茎转至无选择压的分化培养基分化培养45 d,接着将分化形成的不定芽转入不定芽筛选培养基在PPT 20 mg/L压力下再筛选培养1 mo,得到的抗性不定芽转入生根壮苗培养基进行生根壮苗培养。过渡恢复培养、筛选培养、

分化培养和壮苗生根培养均在(25±1)℃、光照14 h/d条件下进行。

1.2.5 叶片涂抹除草剂检测 将生根壮苗培养40 d的转化植株转入继代培养基于(25±1)℃、光照14 h/d条件下继续培养,20 d后用无菌棉签蘸取PPT 200 mg/L水溶液(含0.1% Tween-80)涂抹转化植株和对照(由于对照类原球茎经历PPT筛选、分化培养后未能成功再生植株,故叶片涂抹检测、PCR检测和耐盐性试验的对照采用继代培养的类原球茎在无PPT选择压下同步分化、壮苗培养获得的再生植株)中上部大叶片正反面各1次,10 d后观察叶片受害程度。

1.2.6  $lea3$ 基因PCR检测 采用CTAB法提取对照植株及PPT涂抹阳性植株叶片总DNA。据 $lea3$ 基因序列设计引物,P1:5'-TAGGTCCCAGGCAGCGTGCA-3';P2:5'-TACGTGAAGACCTGACCTTG-3',对 $lea3$ 基因片段进行扩增,扩增片段长度为549 bp。PCR反应体系为:10×PCR Buffer (free Mg<sup>2+</sup>) 2.3 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 1.5 μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.0 μL, 引物(0.1 μg/μL)各1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 13.3 μL, Taq酶(5 U/μL) 0.13 μL, DNA模板1.0 μL。反应条件为:94℃ 4 min, 94℃ 40 s, 53℃ 40 s, 72℃ 90 s, 36个循环, 72℃ 4 min。未转化植株作为阴性对照,质粒pBY520作为阳性对照。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳,分析 $lea3$ 基因在转化植株核基因组的整合情况。

1.2.7 耐盐性试验 将PCR阳性植株和对照转至继代培养基,在(25±1)℃、光照14 h/d条件下继续培养,30 d后转至含

NaCl 15 g/L的继代培养基上培养, 15 d后观察其耐盐胁迫能力, 再转至继代培养基上培养一段时间, 观察解除盐胁迫后的生长状况。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化体筛选及再生

**2.1.1 转化受体光照预分化处理对转化率的影响** 对暗处继代25 d和暗处继代15 d再转至光下预分化培养10 d的类原球茎进行轰击转化, 经过渡培养和PPT 3.0 mg/L筛选2次后, 抗性PLBs得率分别为8.7%和17.9%, 可见光照预分化处理能显著提高铁皮石斛的遗传转化效率, 可能由于预分化处理提高了受体细胞的活力和分裂增殖能力, 有利于外源DNA的整合。

**2.1.2 过渡培养时间对转化率的影响** 轰击后类原球茎在继代培养基上光下过渡恢复培养不同时间后, 经PPT 3.0 mg/L筛选2次获得抗性PLBs。过渡恢复培养0 d、10 d、20 d抗性PLBs得率分别为3.1%、10.3%和19.1%。未经过渡恢复培养, 抗性PLBs得率很低且增殖缓慢; 随着过渡培养时间的延长抗性类原球茎得率显著提高, 表明对轰击后的转化受体进行适当时间的过渡恢复培养有利于提高铁皮石斛的转化率。分析认为, 恢复培养一段时间有利于细胞修复损伤、整合外源DNA, 但恢复培养时间过长又易产生假阳性<sup>[19]</sup>。

**2.1.3 *lea3*基因导入、转化体筛选及再生** 轰击后的类原球茎转至继代培养基恢复培养20 d, 再转至类原球茎筛选培养基于PPT3.0 mg/L压力下进行筛选培养。观察发现, 20 d后对照和轰击后的PLBs大多褐化死亡, 约28~40 d左右, 在轰击后褐化PLBs表面逐渐产生新组织, 色泽鲜亮且具较高分裂增殖能力, 而对照类原球茎经筛选后极少存活且无光泽、无增殖。筛选2次后从570块轰击PLBs中获得95块抗性PLBs, 将其转至无选择压的分化培养基上进行分化培养, 约14 d左右开始形成绿色芽点, 45 d后共分化形成46个株系不定芽, 对照和部分抗性PLBs团块未分化形成不定芽。接着将不定芽转至筛选培养基于PPT20 mg/L压力下选择培养1mo, 进一步筛选、淘汰假阳性再生芽。发现未表达*bar*基因的非抗性芽在筛选过程中逐渐褐化、变白死亡, 转化抗性芽生长良好、较粗壮、颜色无变化, 筛选后共获得15个株系抗性不定芽, 将其分开后转至生根壮苗培养基生根壮苗, 约40 d后获得35株具根转化再生植株, 其茎较未转化植株粗壮。

### 2.2 转化植株除草剂抗性检测

由于所用质粒pBY520中*bar*基因同*lea3*基因构建为紧密连锁状态, 则认为二者在基因导入及整合过程中极少发生交换现象, 因此利用除草剂涂抹检测转化植株表达了*bar*基因具有的抗PPT特性可筛选出转*lea3*基因植株。蘸取PPT 200 mg/L水溶液涂抹培养瓶中35株转化植株和对照叶片, 10 d后观察显示, 7个株系完全无除草剂抗性, 叶片失绿褐化、部分发白坏死; 5个株系共7株均表现除草剂抗性, 3个株系部分植株具除草剂抗性(表1), 所有抗性植株叶片无变化(图2-A), 对照叶片失绿褐化、部分发白坏死(图2-B)。

### 2.3 转化植株*lea3*基因PCR检测

利用PCR方法, 分析*lea3*基因是否整合到转化植株基因组中。提取PPT涂抹阳性转化植株和对照植株叶片总DNA,

表1 铁皮石斛遗传转化结果

Table 1 Results of transformation of *D. candidum*

PPT抗性芽株系 PPT resistance shoot lines		PPT涂抹阳性 数(株)	<i>lea3</i> 基因PCR阳性 数(株)	耐盐性 Salt tolerance
编号 Number	数量(株) Amounts	PPT positive plants	<i>lea3</i> positive plants of PCR analysis	
01	5	0	0	
02	2	2	2	+
03	3	1	0	
04	1	0	0	
05	4	2	1	+
06	2	0	0	
07	3	1	1	+
08	1	1	1	+
09	3	0	0	
10	1	0	0	
11	4	0	0	
12	2	2	0	
13	1	1	1	+
14	2	0	0	
15	1	1	1	+

+: 具有一定的耐盐能力 +: With tolerance to salt stress



图2 转化植株(A)和对照植株(B)对PPT的抗性  
Fig. 2 Resistance of transgenic plant (A) and wild plant (B) to PPT

以此为模板进行PCR分析。对8个株系11株PPT涂抹阳性转化植株进行*lea3*基因PCR扩增鉴定, 获得同时整合*lea3*基因和*bar*基因的再生株系6个共7株, 仅整合*bar*基因的再生植株4株(图3, 表1)。本实验中共轰击转化类原球茎570块, 获得*lea3*基因PCR阳性株系6个共7株, 铁皮石斛基因枪介导*lea3*基因的遗传转化效率较低, 为1.05%。

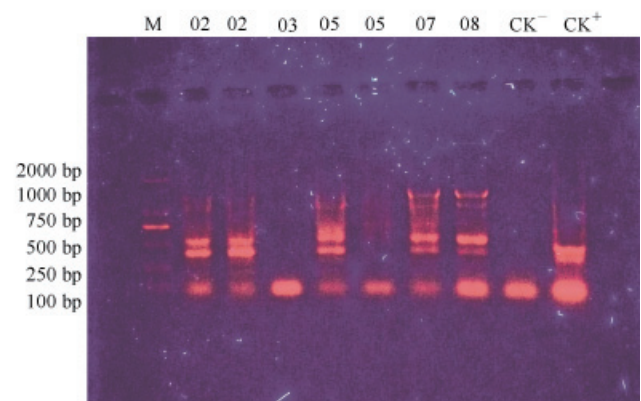


图3 *Lea3*基因PCR检测

Fig. 3 PCR analysis for *lea3* gene

CK<sup>-</sup>: 阳性对照(质粒pBY520); CK<sup>+</sup>: 阴性对照(未转化植株); M: DL2000; 02、03、05、07、08号株系PPT涂抹阳性转化植株  
CK<sup>+</sup>: Positive control (pBY520); CK<sup>-</sup>: Non-transgenic plant as negative control; M: DL2000; 02, 03, 05, 07 and 08 represent the transgenic plant lines with PPT resistance

## 2.4 转基因植株耐盐能力分析

由于石斛生长缓慢且获得的转基因植株数量有限, 所以对转化植株进行耐盐胁迫能力分析时仅进行了表观考察, 未测定相关生理生化指标. 将7株PCR阳性植株和对照转至含1.5% NaCl的继代培养基上培养15 d, 考察其耐盐胁迫能力. 观察发现: 5 d后对照植株叶片开始发黄, 15 d后全部失绿变白, 仅部分茎呈黄绿色、无光泽(图4-B), 转化植株叶片部分失绿发黄、茎黄绿色有光泽(图4-A), 解除盐胁迫培养一段时间后, 转化植株均恢复生长且萌发出侧芽, 对照植株茎发白死亡. 表1结果显示, 导入 *lea3* 基因的7株铁皮石斛转化植株均具有较强的耐盐胁迫能力, 说明转入 *lea3* 基因后铁皮石斛的耐盐能力明显增强.

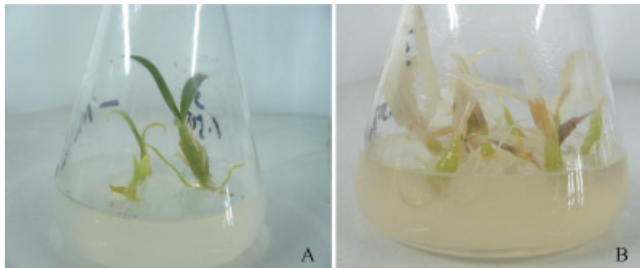


图4 转基因植株(A)和对照植株(B)的耐盐能力  
Fig. 4 Tolerance of transgenic plant (A) and wild plant (B) to salt stress

## 3 讨论

使用基因枪进行遗传转化效率的高低受多种因素影响, 基因型、受体材料类型和生长状态、微弹射程、轰击压力、轰击次数以及筛选程序等都是影响转化效率的重要限制因子. 一个高效的转化系统既要使受体有较高的转化效率, 同时也要避免使受体受到大的伤害, 以免影响受体的生理活力<sup>[5, 19-21]</sup>. 本实验结果表明, 选择对数生长期前期的类原球茎为转化受体, 转化前对其进行光照(14 h/d)预分化处理和过渡恢复培养一段时间, 有利于受体细胞活力提高和损伤修复, 促进外源DNA整合, 从而显著提高抗性类原球茎得率.

*Bar*基因编码的膦丝菌素乙酰转移酶(PAT), 可使膦丝菌素类除草剂(如PPT)失去活性. PPT是谷氨酰胺合成酶的一种强抑制剂, 抑制谷氨酰胺合成酶活力, 可导致氨的过量积累, 最终导致非转化体中毒死亡<sup>[22]</sup>. 适合的选择途径、PPT筛选浓度和筛选时间直接影响着转化的成功与否及转化频率的高低. 本研究先通过预实验确定PPT最佳筛选浓度和筛选时间, 再综合考虑PPT的毒性和对类原球茎分化的抑制作用, 确定转化类原球茎先经PPT抗性筛选, 接着于无选择压下分化培养, 再进行PPT抗性筛选的途径, 最终获得了转 *lea3* 基因植株.

本研究所用质粒pBY520中 *bar* 基因同 *lea3* 基因构建为紧密连锁状态, 认为二者在基因导入及整合过程中极少发生交换现象. 利用转化细胞和再生植株表达了 *bar* 基因具有的抗PPT特性, 理论上可筛选出转 *lea3* 基因植株. 本实验中转化类原球茎经PPT多次筛选和再生培养获得了较多再生植株, 但经PPT涂抹检测和 *lea3* 基因PCR检测发现, 有相当多再生植株未整合 *bar* 基因和 *lea3* 基因, 转化效率低, 仅为1.05%. 分析

可能原因: 1) 兰科植物类原球茎转化后易形成嵌合体<sup>[23]</sup>, 不利于鉴定筛选. 2) 非转化细胞由于未能充分接触选择剂或对PPT敏感性较低等产生选择逃逸, 出现假阳性类原球茎. 3) 尽管外源DNA起初确实整合到了宿主染色体上, 却在再生过程中丢失了 *bar* 基因, 致使再生植株失去对PPT的抗性, 涂抹检测时仅整合 *lea3* 基因的植株被去除. 4) 外源基因不适合的插入位点和拷贝数可能影响基因表达, 甚至导致基因沉默或失活. 通过PPT涂抹检测和PCR分析可排除假阳性转化植株. 从表1可看出, 经PPT涂抹检测后, 一半的假阳性株系被去除, PCR检测又进一步淘汰了少量假阳性植株. *lea3* 基因PCR阳性转化植株均具较强耐盐胁迫能力也进一步验证了PPT涂抹检测和PCR分析在排除假阳性方面的有效性. 采用PPT涂抹检测操作简单方便, 能对大量检测对象进行快速有效检测, 淘汰假阳性植株, 减少后续检测工作量, 且不会对转化植株造成伤害.

## References

- Lavarack B, Harris W, Stocke G. *Dendrobium* and its relatives. Portland, Oregon, USA: Timber Press, 2002. 14
- Li J (李杰), Huang MR (黄敏仁), Wang MM (王明麻), Cai R (蔡汝), Kuang PA (匡鹏安). Research and application on the biotechnique engineers in orchid. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed* (南京林业大学学报), 2006, **30** (2): 108-112
- He T (何涛), Chun Z (淳泽), Luo AX (罗傲雪), Fan YJ (范益军), Liu J (刘静), Hu MZ (胡明珠). Wild resources and conservation of *Dendrobium* in Sichuan. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (5): 710-715
- Zhang MB (张妙彬), Liang QZ (梁擎中), Xiao H (肖浩), Cen P (岑鹏), Fan GQ (范干群), Pan LJ (潘丽晶). Study on agrobacterium-mediated transformation of *Dendrobium*. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2008, **35** (4): 565-570
- Tee CS, Marziah M. Optimization of biolitic bombardment parameters for *Dendrobium* Sonia 17 calluses using GFP and GUS as the reporter system. *Plant Cell Tissue & Organ Cult*, 2005, **80** (1): 77-89
- Lu BS (卢毕生). Establishment of high efficient regeneration system and study on genetic transformation of AFP gene in *Dendrobium*: [Master Degree Dissertation]. Danzhou, China: South China University of Tropical Agriculture (儋州: 华南热带农业大学), 2005
- Chang C, Chen YC, Hsu YH. Transgenic resistance to Cymbidium mosaic virus in *Dendrobium* expressing the viral capsid protein gene. *Transgenic Res*, 2005, **14** (1): 41-60
- Pan LJ (潘丽晶), Zhang MB (张妙彬), Liang QZ (梁擎中), Fan GQ (范干群), Cheng P (程萍). Construction of vector carrying *aiiA* gene of *Bacillus thuringiensis* and transformation of *Dendrobium*. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报), 2009, **48** (1): 67-71
- Yang ZJ (杨志娟), Zhang X (张显), Zhang MJ (张孟锦), Zhu GF (朱根发), Wang BQ (王碧青). The research advance in *Dendrobium* study. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2006, **33** (6): 1389-1396
- Huan HF (郝恒福), Zhou JM (周健民), Duan ZQ (段增强), Wang HY (王火焰), Gao YF (高砚芳). Effects of oil cake manure application on soil nutrients, salts and salt composition in greenhouse soil affected by

- secondary salinization. *Soils* (土壤), 2008, **40** (4): 586~590
- 11 Wang HM (王红梅), Bao WK (包维楷), Li LF (李芳兰). Physiological and biochemical responses of two-years-old *Sophora davidii* seedling leaves to different water stresses. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (6): 757~762
- 12 Guo Y (郭英), Liu D (刘栋), Zhao L (赵蕾). Effect of extracellular phytase produced by *Bacillus Subtilis* T2 on salt tolerance of wheat seedlings. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2009, **15** (1): 039~043
- 13 Xu DP, Duan XL, Wang BY, Hong BM, Ho THD, Wu R. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*, 1996, **110** (1): 249~257
- 14 Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho TD, Qu R. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci*, 2000, **155** (1): 1~9
- 15 Wang Y (王瑛), Zhu BC (朱宝成), Sun Y (孙毅), Zhang LY (张琳宇), Luo JP (罗建平). Transformation of barley *lea3* gene into Alfalfa (*Medicago sativa* L.) for enhanced salt tolerance. *J Nuclear Agric Sci* (核农学报), 2007, **21** (3): 249~252
- 16 Knapp JE, Kausch AP, Chandless JM. Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep*, 2000, **19** (9): 893~898
- 17 Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing, China: Science Press, 2002. 27~30
- 18 Dure L III. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J*, 1993, **3** (3): 363~369
- 19 Yu ZH, Chen MY, Nie Y, Lu HF, Ming XT, Zheng HH, Qu LJ, Chen ZL. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. *Plant Cell Tissue & Organ Cult*, 1999, **88** (2): 87~92
- 20 Men S, Ming X, Wang Y. Genetic transformation of two species of orchid by biolistic bombardment. *Plant Cell Rep*, 2003, **21** (6): 592~598
- 21 Nan GL, Kuehnle AR. Factors affecting gene delivery by particle bombardment of *Dendrobium* orchids. *In Vitro Cell & Dev Biol -Plant*, 1995, **31** (3): 131~136
- 22 Kang L (康乐), Ye XG (叶兴国), Xu HJ (徐惠君), Du LP (杜丽璞). Transferring glucose oxidase gene into wheat by biolistic particle. *Acta Atron Sin* (作物学报), 2005, **31** (6): 686~691
- 23 Chia TF, Chan YS, Chua NH. The firefly luciferase gene as a noninvasive report for *Dendrobium* transformation. *Plant J*, 1994, **6** (3): 441~446

## 欢迎订阅2011年《分子植物育种》

《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志，也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于2003年创刊，创刊伊始即被美国化学文摘(CA)，中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库，中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库，中国核心期刊(遴选)数据库，中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。同时，《分子植物育种》已建立了全英文的期刊网站，定期发布学术动态、出版信息及期刊近期目录等，实现作者编者读者同步分享。

本刊设置固定栏目和随机栏目。固定栏目常设研究论文(An Article)和研究报告(A Letter)，主要发表最新的原始研究成果。随机栏目根据稿源可能设研究评述(A Review)、研究资源(A Resource)、数据分析(Analysis)、技术主题(Technology Feature)等栏目，还可能设置刊登有关科学新闻、科学简讯、专利、短评、书评等方面的栏目。本刊在栏目设置和文体格式上参照国际著名周刊《自然》及《自然遗传学》的刊发形式。主要围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等方面。《分子植物育种》已经成为植物育种及相关研究领域研究成果发表和交流的最重要学术平台，代表了目前中国分子植物育种的现实情况，是了解中国分子植物育种的一个重要窗口。

欢迎订阅《分子植物育种》，本刊单月28日出版，国内定价：¥40.00/期，¥240.00/年；国际定价：\$40.00/期，\$240.00/年。国内统一刊号：CN46-1068/S，国际标准刊号：ISSN 1672-416X，邮发代号：84-23。订户可到当地邮局订阅，或直接汇款至编辑部，免收邮费。

地址：海南省海口市海秀大道128号双岛公寓13B室 邮编：570206  
 联系电话：0898-68966415 传真：0898-68958180  
 E-mail: mpb@hibio.org, mpb@molplantbreed.org 网址: www.molplantbreed.org