

m tD /gu tD 双价耐盐基因转化秦美猕猴桃的研究*

樊军锋¹, 李嘉瑞², 韩一凡³, 李玲³, 彭学贤⁴

(1 西北农林科技大学 林学院; 2 园艺学院, 陕西 杨陵 712100;

3 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091; 4 中国科学院 微生物研究所, 北京 100080)

[摘要] 在已建立的秦美猕猴桃叶片最佳再生系统的基础上, 利用叶盘法和基因枪相结合的方法进行了秦美猕猴桃双价耐盐基因 m tD /gu tD 的转化研究, 经诱导不定芽及诱导生根阶段卡那霉素(选择性抗生素)连续筛选, 获得了 20 株卡那霉素抗性转化植株。抗性植株经 PCR 检测, 有 6 株呈阳性。耐盐试验表明 4 株阳性植株抗 Na-Cl 能力比对照均有不同程度提高。PCR 及耐盐试验初步证明耐盐基因转化获得成功。

[关键词] 秦美猕猴桃; m tD /gu tD 双价耐盐基因; 转化研究; 耐盐测定

[中图分类号] S663 403 6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)03-0053-06

秦美猕猴桃原生长于秦岭山地微酸性土壤上, 因对水分需求较高, 陕西人工栽培区域主要集中在渭河南岸较湿润地区, 以河滩地居多。河滩地土壤盐碱含量较高, 不少植株栽后严重黄化, 生长不良, 产量低^[1], 因此, 提高秦美猕猴桃抗盐性具有一定的生产意义。盐生植物耐盐机理研究发现, 在高盐条件下植物体内脯氨酸、甜菜碱、糖醇等相溶性小分子物质的增加, 可大大提高植物耐盐性^[2]。m tD 为 1-磷酸甘露醇脱氢酶基因, gu tD 为 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因, 将其转入植物体内, 可增加植物体内糖醇含量, 从而提高植物耐盐能力。Tarczynski 等^[3], Michell^[4], 刘俊君等^[5-7]将 m tD, gu tD 基因导入烟草, 转基因烟草的抗盐能力大大提高, 且 m tD /gu tD 双价基因作用效果优于单价基因。受此启发, 2001 年作者采用叶盘法和基因枪相结合的方法, 首次开展了秦美猕猴桃 m tD /gu tD 双价耐盐基因转化研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 抗盐基因、植物表达载体及农杆菌菌株的来源

抗盐基因为 m tD /gu tD 双价基因, m tD 和 gu tD 分别克隆自大肠杆菌 K12 菌株。植物双价双元表达载体为 pB IGM, 由植物双元表达载体 pBin438 构建而成。农杆菌菌株选用 LBA 4404, pB IGM 双价双元表达载体构建好后采用直接转化法转入 LBA 4404 中。基因克隆、表达载体的构建及

向农杆菌转化均由中国科学院微生物研究所完成。pB IGM 上含有双价抗盐基因 m tD /gu tD、双重增强的 35S 启动子和 TMV “Ω”片段的翻译增强子及 NPT-II 卡那霉素抗性标记基因^[6]。NPT-II 标记基因可使卡那霉素等氨基糖苷类抗生素发生磷酸化而失活, 含有 NPT-II 标记基因的转化植株, 可在含卡那霉素选择性抗生素的培养基上正常生长。

1.2 转化受体系统的建立

1.2.1 叶片再生系统的建立 采用 4 组 L₉(3⁴) 正交试验设计, 共 36 个处理, 用于筛选叶片外植体最佳不定芽诱导培养基及激素配比。设计 5 个处理, 用于筛选不定芽生根培养基及激素配比。详细设计见参考文献[8]。

1.2.2 卡那霉素敏感性试验 (1) 叶片不定芽诱导卡那霉素敏感性试验。将叶片用手术刀切成 3 mm × 3 mm 的叶盘, 放入含有不同卡那霉素质量浓度的不定芽诱导培养基 MS + 6 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA^[8] 中培养。每 15 d 换 1 次培养基。2 个月后根据叶盘上不定芽分化及生长状况筛选叶盘卡那霉素临界耐受质量浓度。

(2) 生根诱导卡那霉素敏感性试验。将长度约 2 cm 的不定芽放入含有不同卡那霉素质量浓度的生根培养基 1/2 MS + 0.01 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA + 1 mg/L GA^[8] 中培养。2 个月时, 根据不同质量浓度下生根状态, 筛选适宜的 不定芽生根诱导卡那霉素临界耐受质量浓度。

* [收稿日期] 2002-01-06

[作者简介] 樊军锋(1962-), 男, 陕西扶风人, 副研究员, 在读博士, 主要从事树木育种及引种研究。

1.2.3 农杆菌敏感性试验 在猕猴桃嫁接苗茎基部,偶尔可以看到由于野生农杆菌侵染而形成的冠瘿瘤,说明农杆菌对猕猴桃有一定的天然侵染力^[9]。不同农杆菌菌株对猕猴桃侵染力有一定的差异,A 281 略好于 C58, EHA 101 和 LBA 4404^[10]。但由于 LBA 4404 广谱性好,对多种植物均有较好侵染力,且易于保存繁殖,故选用 LBA 4404 菌株作为双价耐盐基因载体菌开展猕猴桃基因转化研究。

1.3 转化及筛选

采取叶盘法^[11]和基因枪相结合的方法开展猕猴桃基因转化,具体操作步骤如下。

1.3.1 基因枪转化所用基因的提取 采用 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System 试剂盒从农杆菌 LBA 4404 中提取质粒 DNA,其质粒中双价双元载体上含有 *mtD/guT* 双价基因。

1.3.2 携带基因的微弹制备 取 30 g/L 的钨粉悬浮液 50 μ L 放入 eppendorf 管中,加入 25 μ L 质粒 DNA 提取液,50 μ L 2.5 mol/L $CaCl_2$ 悬浮液及 20 μ L 0.1 mol/L 亚精胺悬浮液,静置 1 min,2 000~3 000 r/min 离心 25 s 后,去上清液。加体积分数 75% 乙醇 150 μ L,静置 1 min 后,去掉乙醇。再加入无水乙醇 150 μ L,静置 1 min 后,去掉乙醇。最后加入 60 μ L 无水乙醇,静置 1 min 并充分悬浮后,取 6 μ L 加在无菌子弹上备用。

1.3.3 转化、筛选及再生 取秦美猕猴桃叶片若干,用无菌手术剪剪成 3 mm \times 3 mm 的叶盘后放入样品皿中。将样品皿和其上携带的 *mtD/guT* 双价基因子弹分别装在基因枪样品室和弹室内,充电、点火、轰击。轰击过的叶盘放入用 30 倍 MS 稀释的 LBA 4404 (其上携带有 *mtD/guT* 双价基因) 菌液中,浸泡 2~3 min 后取出,放入不含任何抗生素的不定芽诱导培养基 MS+6 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 上,装入暗盒,(25 \pm 2) 培养间培养。3 d 后,将叶盘转入含有 500 mg/L 羧苄青霉素(用于杀死过量农杆菌)的不定芽诱导培养基中培养,每 10 d 换 1 次培养基。28 d 左右,切口出现芽点时,将叶盘转入加有 50 mg/L 卡那霉素及 500 mg/L 羧苄青霉素的芽诱导培养基中继续培养。转化不定芽因体内含有 NPT-II 抗性标记基因,能在含有卡那霉素的培养基上继续生长,未转化不定芽因体内不含有 NPT-II 抗性标记基因,在含有卡那霉素的培养基上会逐渐死亡。2 个月左右,存活转化芽长度达 1~2 cm 时,将其转入加有 40 mg/L 卡那霉素的生根培养基

1/2 MS+0.01 mg/L NAA+0.5 mg/L BA+1 mg/L GA 中继续筛选。2 个月后,选择存活生根卡那霉素抗性植株作为初选转化植株,将其放入芽增殖培养基 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ZT+1.0 mg/L GA^[12] 中扩繁成若干个不定芽后用于 PCR 检测及耐盐性测定。

1.4 初选转化植株的 PCR 检测

1.4.1 DNA 提取 (1) 秦美猕猴桃 DNA 提取。依据参考文献[13],采用下述步骤提取秦美猕猴桃 DNA。取 250 mg 叶片,放入 eppendorf 管中,加入提取缓冲液 500 mL,充分研磨后,60 恒温水浴 1 h。加入 500 mL 氯仿、异戊醇混合液(24:1)充分振荡抽取后,6 000~10 000 r/min 离心 5 min。取上清液,放入另一 eppendorf 管中,加入 0.1 倍体积 3 mol/L 醋酸钠及 2 倍体积纯冷乙醇,-20 冰箱沉淀 30 min 后,12 000 r/min 离心 10 min。倒掉上清液,在管壁底可见小米粒大小白色 DNA 沉淀。用 500 μ L 体积分数 70% 乙醇洗涤 2 次,气干后加 50 μ L 双蒸水溶剂,4 冰箱保存备用。

提取缓冲液配方:2 \times [10 g/L CTAB, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 5 g/L PVP, 1 g/L 新鲜巯基乙醇(用前加入)]。

(2) 阳性对照质粒 DNA 提取。含有 *p^{MTD}* (其中含 *mtD* 基因) 及 *p^{GU}* (其中含 *guT* 基因) 阳性对照质粒的大肠杆菌 DH5 α 由中国科学院微生物研究所提供,其质粒 DNA 的提取采用 Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System 试剂盒提取。

1.4.2 PCR 扩增及检测 引物由北京鼎国生物技术发展中心合成,其序列见参考文献[14]。PCR 反应体系中 dNTP, tag 酶和反应缓冲液均购自北京鼎国生物技术发展中心。操作程序如下:取秦美猕猴桃样品及阳性对照 DNA 各 4 μ L,加入放有 2.5 μ L 反应缓冲液,0.5 μ L dNTP,0.25 μ L 3 引物和 0.25 μ L 5 引物的微量离心管中。再加入 17 μ L 双蒸水及 0.5 μ L tag 酶(2 U/ μ L),使反应液总体积达 25 μ L。反应条件为 94 变性 30 s,55 退火 30 s,72 延伸 45 s,共 35 个循环。反应前可预变性 2 min,反应结束后 72 延伸加时 5 min。反应结束后取反应混合液 5 μ L,放在 8 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳。凝胶经 EB 染色后,用自动成像系统检查 PCR 电泳结果并拍照。

1.5 转基因植株抗盐性测定

取 PCR 检测呈阳性的秦美猕猴桃卡那霉素抗性植株及秦美猕猴桃未转基因植株各 50 株,放在加

有 5 种不同 NaCl 质量浓度的生根培养基中培养。2 个月时根据不同质量浓度下植株存活率, 判别其抗盐能力。

2 结果与分析

2.1 转化系统的建立

2.1.1 再生系统的建立 通过系统正交等试验, 筛选出秦美猕猴桃叶片的最佳不定芽诱导培养基及激

素配比为 MS+ 6 mg/L 6-BA+ 0.1 mg/L NAA, 最佳不定芽生根培养基及激素配比为 1/2MS+ 0.01 mg/L NAA+ 0.5 mg/L BA+ 1 mg/L GA。详细试验报告见参考文献[8]。

2.1.2 卡那霉素敏感性试验 (1) 叶片不定芽诱导卡那霉素敏感性试验。设计了 5 种不同质量浓度卡那霉素敏感性试验, 结果见表 1。

表 1 秦美猕猴桃叶盘不定芽诱导卡那霉素敏感性试验结果

Table 1 The result of kanamycin susceptibility test of induced shoots for leaf discs of kiwifruit (Q in mei)

卡那霉素 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Kanamycin concentration	叶盘数 Number of leaf discs	20 d		30 d		60 d	
		叶盘不定芽 诱导率/% Percentage of induced shoots	叶盘及 不定芽状态 Discs and induced shoots stage	叶盘不定芽 诱导率/% Percentage of induced shoots	叶盘及 不定芽状态 Discs and induced shoots stage	叶盘不定芽 诱导率/% Percentage of induced shoots	不定芽 长度/cm Length of induced shoots
0(对照) Control	10	20	叶盘出现愈伤及芽 点 Callus and shoots emerged	50	不定芽长 0.3~0.5 cm Shoot 0.3-0.5 cm length	70	1.0~1.5
20	10	-	叶盘四周出现愈伤 Callus emerged	40	出现芽点 Shoots emerged	70	1.0~1.5
30	10	-	叶盘四周出现愈伤 Callus emerged	40	出现芽点 Shoots emerged	50	1.0~1.2
40	10	-	叶盘四周出现愈伤 Callus emerged	50	出现芽点 Shoots emerged	40	0.8~1.2
50	10	-	叶盘四周出现愈伤 Callus emerged	10	出现芽点 Shoots emerged	10	0.3~0.5, 接 近死亡 Nearly dead
60	10	-	-	0	-	0	-

从表 1 可知, 对照秦美猕猴桃 20 d 时, 叶切口出现芽点, 叶盘不定芽诱导率为 20%; 30 d 时, 不定芽长至 0.3~0.5 cm, 叶盘不定芽诱导率为 50%; 60 d 时不定芽长度达 1.0~1.5 cm, 叶盘不定芽诱导率达 70%。加入卡那霉素后, 不定芽诱导及生长受到一定程度抑制。卡那霉素质量浓度在 40 mg/L 以下, 芽点出现时间虽滞后 10 d 左右, 但生长基本正常, 60 d 时长度约 0.8~1.2 cm, 叶盘不定芽诱导率

大于 40%。卡那霉素质量浓度在 50 mg/L 以上, 愈伤诱导及芽分化受到完全抑制, 切口不出现或出现极少量愈伤及芽点, 60 d 后, 叶片发褐, 逐渐死亡。故秦美猕猴桃叶片不定芽诱导卡那霉素临界耐受质量浓度为 50 mg/L。

(2) 不定芽生根诱导卡那霉素敏感性试验。设计了 20, 40, 60 mg/L 3 种卡那霉素敏感性试验, 结果见表 2。

表 2 不定芽生根诱导卡那霉素敏感性试验结果

Table 2 The result of kanamycin resistance test for rooted shoots

卡那霉素 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) Kanamycin concentration	不定芽数 Number of induced shoots	生根率/% Percentage of rooted shoots			60 d 时根长/cm Root length after 60 d growing	60 d 时叶片及不定芽状态 Leaves and induced shoots growing stage after 60 d
		15 d	30 d	60 d		
0(对照) Control	10	30	60	70	1.5~2.0	叶片深绿, 生长健壮 Dark green, growing very well
20	10	30	60	60	1.0~1.5	叶片深绿, 生长正常 Dark green, growing normally
40	10	20	40	10	0.3	叶片发黄, 接近死亡 Yellow green, nearly dead
60	10	10	10	0	-	叶片发黄, 完全死亡 Yellow green, nearly dead

从表 2 可知,卡那霉素对秦美猕猴桃不定芽生根诱导也有很大影响。对照 60 d 时,生根率达 70%,根长约 1.5~2.0 cm。卡那霉素质量浓度为 20 mg/L 时,第 60 天生根率为 60%,根长约 1.0~1.5 cm,生长正常。卡那霉素质量浓度达 40 mg/L 时,生根率、根系及不定芽生长均受到严重抑制,60 d 时,生根率仅 10%,长度约 0.3 cm,绝大部分不定芽因不能

生根而逐渐发黄死亡。卡那霉素质量浓度达 60 mg/L 时,第 60 天生根率为 0,且叶片全部发黄死亡。故秦美猕猴桃不定芽生根诱导卡那霉素临界耐受质量浓度为 40 mg/L。

2.2 转化及筛选

共设计了 2 个处理,转化叶盘 70 片,结果见表 3。

表 3 秦美猕猴桃转化试验结果

Table 3 The result of transformation experiment for kiwifruit (Q in mei)

处理 Treatment	叶盘数 Number of leaf discs	卡那霉素加入时间/d Days for adding kanamycin	分化叶盘数 Number of differentiated leaf discs	叶盘分化率/% Percentage of differentiated leaf discs	不定芽数 Number of induced shoots	每个叶盘平均产生不定芽数 Average shoots per disc	生根不定芽数 Number of rooted shoots	不定芽生根率/% Percentage of induced shoots	每个叶盘平均产生生根不定芽数 Average rooted shoots per disc
1(对照) Control	30	-	21	70	25	0.9	20	80	0.7
2(转化) Transgenic	70	20	42	60	43	0.6	20	47	0.3

从表 3 可知,对照秦美猕猴桃叶片放在不含任何抗生素的不定芽诱导及生根培养基上,叶片分化率及不定芽生根率分别为 70% 和 80%,平均每个叶盘产生生根不定芽 0.7 个,说明秦美猕猴桃叶片再生系统比较成熟,再生效率较高。接菌转化叶片在含卡那霉素的培养基上培养筛选,叶盘分化率及不定芽生根率分别为 60% 和 47%,平均每个叶盘仅产生生根抗性植株 0.3 个,说明选择卡那霉素对秦美猕猴桃转化选择作用效果非常显著,抑制或杀死了大量非转化不定芽,避免了大量非转化植株的产生,减少了后继 PCR 检测工作量。

间对转化作用影响很大。共培养后,若立即加入卡那霉素,因转化细胞内 NPT-II 基因表达量有限,细胞很难在含有高质量浓度的卡那霉素培养基上存活并诱导成芽,导致转化失败。共培养 20 d,叶切口出现愈伤及芽点后加入卡那霉素,增加了部分假转化植株出现频率,却获得了一定数量的卡那霉素抗性不定芽,为进一步筛选奠定了基础。

2.3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

对所得 20 株卡那霉素抗性植株均作了 PCR 检测,其中 6 株呈阳性。6 株阳性植株 PCR 结果见图 1。

同时,在转化预备试验中发现,卡那霉素加入时

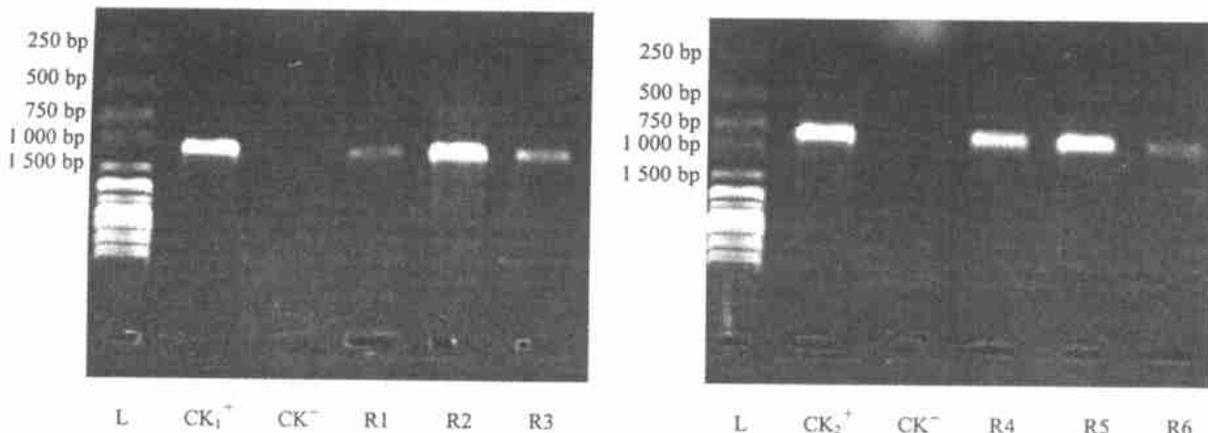


图 1 6 株卡那霉素抗性植株 PCR 扩增产物电泳结果

L. 1 000 bp Ladder; CK1+. mtD 阳性对照(1 150 bp); CK1-. guD 阳性对照(880 bp); CK2-. 阴性对照; R1~ R6 卡那霉素抗性植株

Fig. 1 PCR analysis of kanamycin-resistant rooted shoots

L. 1 000 bp Ladder; CK1+. mtD positive control(1 150 bp); CK1-. guD positive control(880 bp); CK2-. negative control; R1- R6 kanamycin-resistant rooted shoots

从图 1 可知, R1, R2, R3 均出现 1 条与阳性对照 CK⁺ (mtD 基因, 约 1 150 bp) 大小一致的条带, 初步说明 mtD 基因转入到 R1, R2, R3 植株中。R4, R5, R6 均出现 1 条与阳性对照 CK⁺ (guD 基因, 约 880 bp) 大小一致的条带, 初步说明 guD 基因整合到 R4, R5, R6 植株中。在双价基因构建中, guD 与 mtD 基因连在一起, mtD, guD 二者中任何一个的转化成功可说明 guD/mtD 双价基因转化成功。

由于植物基因组很复杂, 其上可能含有拟转化

基因的同源序列或相近序列, 同源序列或相近序列的存在可导致 PCR 扩增出现假阳性, 故 PCR 结果呈阳性并不能完成证明耐盐基因转化已获成功。为进一步证明耐盐基因已转化成功, 需继续做耐盐等测定。

2.4 阳性卡那霉素抗性植株抗盐性测定

R1~R6 的 PCR 结果均呈阳性, 以未转化植株为对照进行抗盐性试验, 结果见表 4。

表 4 阳性卡那霉素抗性植株抗盐性测定结果

Table 4 The result of salt-resistant test for PCR positive rooted shoots of kiwifruit

NaCl 质量浓度/ (g·L ⁻¹) NaCl concentration	存活率/% Survival rate						对照 Control
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
0	80	80	70	60	70	80	80
1	80	70	80	70	80	70	80
2	70	60	70	0	0	70	0
3	70	60	70	0	0	60	0
4	0	0	60	0	0	50	0
5	0	0	0	0	0	0	0

注: 表中数据为 2 个月时统计结果。

Note: The data in the table are obtained after 2 months experiment

从表 4 可知, 对照猕猴桃抗 NaCl 的最高质量浓度为 1 g/L。在 1 g/L NaCl 下, 2 个月时存活率为 80%, NaCl 质量浓度高于 1 g/L, 存活率为 0。6 株 PCR 阳性植株中 R3, R6 抗 NaCl 能力最强, 在 4 g/L NaCl 下, 2 个月时存活率分别为 60% 和 50%, 高于 4 g/L, 存活率为 0。R1, R2 抗 NaCl 能力中等, 在 3 g/L NaCl 下, 2 个月时存活率分别为 70% 和 60%, 高于 3 g/L, 存活率为 0。R4, R5 抗 NaCl 能力最差, 与对照猕猴桃抗 NaCl 能力相当。在 1 g/L NaCl 下, 2 个月时存活率分别为 70% 和 80%, 高于 1 g/L, 存活率为 0。R1, R2, R3 和 R6 PCR 阳性植株抗 NaCl 能力高于对照的事实初步说明, 这 4 株猕猴桃耐盐基因转化获得成功, 其抗 NaCl 能力的差别可能是由于 mtD, guD 基因插入猕猴桃染色体位点不同及插入拷贝数多少不一造成的。R4, R5 抗 NaCl 能力与对照一致初步说明 R4, R5 PCR 阳性为假阳性。

3 结论与讨论

在已建立的秦美猕猴桃叶片外植体再生系统的基础上^[8], 确定了秦美猕猴桃叶片外植体不定芽诱导卡那霉素耐受质量浓度为 50 mg/L, 不定芽生根诱导卡那霉素耐受质量浓度为 40 mg/L, 完善了秦美猕猴桃遗传转化受体系统的建立。

通过叶盘法和基因枪相结合的办法, 开展了秦

美猕猴桃双价耐盐基因 mtD/guD 的转化研究, 获得卡那霉素生根抗性植株 20 株, 其中 6 株经 PCR 检测呈阳性。耐盐试验证明, 4 株阳性植株抗 NaCl 能力高于对照。经过 PCR 检测和耐 NaCl 试验测定初步证明双价耐盐基因转化获得成功。

盐生植物之所以能在一定盐分浓度下存活, 是因为体内存在多种耐盐机制, 其中渗透调节是植物体内普遍存在的一种耐盐机制。渗透调节指植物在高盐环境中受到盐胁迫时, 会通过代谢调节, 在细胞内积累一定量的小分子溶质。这些相容性溶质的产生可降低细胞渗透性, 保持细胞内外渗透势平衡, 阻止水分外渗, 避免产生盐害。糖醇是一种多元醇, 含多个羟基, 亲水能力强, 能有效维持细胞内水活度, 是一种较为重要的渗透调节物质。许多植物在渗透胁迫下, 能合成并积累超出常量的糖醇。醇类脱氢酶可促进细胞中糖类物质向糖醇方向转化, 有利于糖醇积累。Tarczynski 等^[3]将来源于大肠杆菌的 mtD 基因转入烟草, 引起了转基因植株中甘露醇含量的产生及对 14.5 mg/L 盐的抗性。刘俊君等^[5-7]将 mtD 基因及 guD 基因转入烟草, 得到了类似的试验结果, 并通过转化 mtD/guD 双价基因使转基因烟草抗盐性提高到了 20 mg/L。中国农业大学刘岩^[15]、西北农林科技大学王晓峰^[16]分别将 mtD/guD 双价基因转入玉米及甘蓝中, 其转基因植株抗盐性也有不同程度提高。本试验将 mtD/guD 双价

基因转入猕猴桃, 阳性植株耐盐性比对照有一定程度提高, 但提高幅度不大。这说明植物耐盐机理很复杂, 控制耐盐性状的基因及因素很多, 并非一个外来耐盐基因的导入就可大大提高其耐盐性, 今后应在继续开展基因转化的同时, 加强植物耐盐机理研究。另一方面也说明该双价基因植物表达载体构建不甚

理想, 表达量有限。今后应加强对该双价耐盐基因植物高效表达载体构建研究及遗传效应研究。

经过 PCR 检测及实际抗盐性测定已初步证明耐盐基因转化成功, 但并非完全确证。要完全确证转化成功, 需进一步做 Southern 杂交或 Western 杂交检测。

致谢: 本试验在中国林科院林业研究所分子遗传室完成, 国家林业局黄土高原林木培育实验室提供了部分资助, 在次表示衷心感谢。

[参考文献]

- [1] 黄宏文, 王圣梅, 龚俊杰, 等. 猕猴桃研究进展[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 179- 181.
- [2] 荆家海, 高俊凤, 王姝清, 等. 植物生理学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1994: 317- 318.
- [3] Tarczynski M, Jensen R G, Bohnert H J. Expression of a bacterial *mtD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 2600- 2604.
- [4] Michell C T. Stress protection in transgenic tobacco producing a putative osmoprotectant mannitol[J]. *Science*, 1993, 259(22): 508- 510.
- [5] 刘俊君, 彭学贤, 王海云, 等. 转基因烟草的甘露醇合成和耐盐性[J]. *生物工程学报*, 1996, 12(2): 206- 210.
- [6] Liu J J, Huang S X, Peng X X, et al Abstracts 4th International Congress of Plant Molecular Biology[Z]. Amsterdam, 1994.
- [7] 刘俊君, 黄绍兴, 彭学贤, 等. 高度耐盐双价转基因烟草的研究[J]. *生物工程学报*, 1995, 11(4): 381- 384.
- [8] 樊军锋, 李玲, 韩一凡, 等. 秦美猕猴桃叶片最佳再生系统的建立[J]. *西北植物学报*, 2002, 22(4): 823- 826.
- [9] Atkinson R G, Candy C J, Gardner R C. New Zealand[J]. *Crop Hort Sci*, 1990, 18: 153- 156.
- [10] Bart-Jan J, Richard C G. The use of transient *Gus* expression to develop an agrobacterium-mediated gene transfer system for kiwifruit[J]. *Plant Cell Reports*, 1993, 13: 28- 31.
- [11] Horsch R B, Fry T E, Hoffmann N L, et al A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 1985, 227: 1227- 1231.
- [12] 曹攸义, 刘国民, 王蒂, 等. 实用植物组织培养技术教程(修订本)[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1999: 111- 114.
- [13] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(6): 1349.
- [14] 刘俊君, 彭学贤, 王海云, 等. 大肠杆菌 *mtD* 基因和 *gutD* 基因的克隆、全系列测定和高效表达[J]. *生物工程学报*, 1995, 11(2): 157- 161.
- [15] 刘岩. 玉米耐盐性基因工程研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1997.
- [16] 王晓峰. 甘蓝和油菜耐盐基因工程研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 1999.

Studies on transformation of *mtD*/*gutD* salt-resistant gene to *Kiwifruit* (*Qinmei*)

FAN Jun-feng¹, LI Jia-ru², HAN Yi-fan³, LI Ling³, PENG Xue-xian⁴

(1 College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Forestry Research Institute, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100096, China;

4 Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080, China)

Abstract On the basis of the established Leaf-explant regeneration system of kiwifruit (*Qinmei*), transformation of *mtD*/*gutD* gene to kiwifruit (*Qinmei*) by means of leaf disc and microprojectile bombardment was undertaken for the first time. Through successive selection in the period of shoot and root induction under high level kanamycin pressure, 20 kanamycin-resistant rooted plants were obtained, out of which, 6 were positive through PCR analysis. The salt resistant test of these 6 positive plants showed that 4 of them were enhanced in salt tolerance ability to some extent. PCR analysis and salt resistance test preliminarily indicated that the successful transformation has been made.

Key words: *Kiwifruit* (*Qinmei*); *mtD*/*gutD* gene; transformation; salt resistant test