

# 真空辅助农杆菌介导中华猕猴桃 高效遗传转化体系的建立

尚霄丽 冯建灿\* 朱道圩 邢东方 马春华

(河南农业大学园艺学院, 郑州 450002)

**摘要** 以中华猕猴桃伏牛 95-2 (*Actinidia chinensis* 'Funiu 95-2') 叶片为试验材料, 对不同侵染方式、预培养时间、菌液浓度、共培养时间等影响  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因( $\beta$ -glucuronidase, *GUS*)瞬时表达率的因素进行了研究。结果表明, 叶片预培养 3 天, 菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.3, 真空渗入方式侵染 10 min, 共培养 4 天条件下, *GUS* 基因瞬时表达率最高, 达到 92.2%。对转基因抗性植株进行 PCR 检测和 *GUS* 组织化学染色, 初步证明外源基因已整合到中华猕猴桃伏牛 95-2 的基因组中。

**关键词** 中华猕猴桃; 根癌农杆菌; 遗传转化; 真空渗入

猕猴桃属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属植物, 由于其维生素 C 含量高、风味独特、营养丰富而倍受关注。中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)是猕猴桃主要栽培种之一, '伏牛 95-2' 的果肉为红色, 是特异的中华猕猴桃种质资源, 但因果实小、外观差, 有待于对其进行改良, 提高其果实品质适应市场需要。利用常规育种手段进行猕猴桃的品种改良需要的周期长、工作量大且效率低, 难以满足生产发展的需要。基因工程技术为猕猴桃种质改良开辟了一条新途径。

根癌农杆菌介导的遗传转化已在美味猕猴桃 (*A. deliciosa* var. *deliciosa*)<sup>[1-6]</sup>和阔叶猕猴桃(*A. latifolia* Merr.)<sup>[7]</sup>中获得成功, 但有关中华猕猴桃遗传转化的报道较少。目前仅有黄萍等<sup>[8]</sup>报道中华猕猴桃叶柄—农杆菌转化体系, 但获得少量(7 个)抗性芽, 转化率较低。因此, 需要建立高效、稳定的中华猕猴桃的遗传转化体系, 为进行中华猕猴桃品种改良的研究打下基础。

真空渗入辅助的农杆菌介导遗传转化方法是一种在真空处理条件下所进行的农杆菌介导的遗传转化方法, 其转化效率明显高于普通侵染方式的农杆菌介导法。但目前为止, 有关该方法应用于猕猴桃遗传转化的研究未见报道。

本试验以中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片为转化受体, 对不同侵染方式、预培养时间、菌液浓度、共培养时间等影响 *GUS* 基因瞬时表达率的因素进行了研究, 以期建立高效的中华猕猴桃遗传转化体系, 为进一步进行目的基因的导入并进行中华猕猴桃品种的

改良打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

受体叶片取自中华猕猴桃伏牛 95-2 (*A. chinensis* 'Funiu 95-2') 苗龄 4 周的组培苗。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404, 它含有 pBI121 质粒, 该质粒含 CaMv35S 启动子调控的 *GUS* 报告基因和抗卡那霉素筛选的新霉素磷酸转移酶 *NPTII* 基因。

预培养培养基: MS+1.0 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA; 共培养培养基: MS+1.0 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA+200  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS); 筛选培养基: MS+1.0 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA+500 mg/L 头孢霉素(cefotaxime, Cef)+50 mg/L 卡那霉素(kanamycin, Kan)。

培养基均附加 30 g/L 蔗糖、6 g/L 琼脂, pH 5.8, 121  $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min。高压灭菌的培养基冷却至 60  $^{\circ}$ C 左右加入过滤灭菌的 AS、Cef 和 Kan, 混匀、分装备用。试验材料在(25 $\pm$ 2)  $^{\circ}$ C, 光周期 14 h/10 h 的条件下培养。

液体 YEB 培养基: 5 g/L 蛋白胨+1 g/L 酵母提取物+5 g/L 牛肉浸膏+0.493 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 调 pH 7.0; 固体 YEB 培养基附加 15 g/L 琼脂。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体准备 取组培苗幼嫩叶片, 去掉叶尖和叶缘, 垂直叶片中脉切成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 大小的叶

收稿日期: 2009-10-12 接受日期: 2010-01-11

\* 通讯作者。Tel: 0371-63579621, E-mail: jcfeng@henau.edu.cn

盘外植体。

**1.2.2 农杆菌培养和活化** 将冻存的包含质粒 pBI121 的农杆菌 LBA4404 菌株划线于添加 50 mg/L Kan 和 50 mg/L 利福平 (rifampicin, Rif) 的固体培养基上, 28 °C 倒置培养 1~2 天。挑取单菌落接种于添加 50 mg/L Kan 和 50 mg/L Rif 的 YEB 液体培养基中, 28 °C 恒温摇床上培养至对数生长期, 4 °C 下 3 500~4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 并用 MS 液体基本培养基重悬, 稀释至不同浓度进行侵染。

**1.2.3 影响农杆菌转化效果的因素** (1) 侵染方式

侵染时采用普通侵染和真空渗入侵染两种方法。普通侵染的侵染时间为 10 min (中间轻摇几次)。真空渗入侵染是将浸有叶盘的三角瓶置于真空干燥器内, 用 SHB-III 循环水多用真空泵形成 0.1 MPa 真空度, 处理时间为 10 min。(2) 预培养时间 将处理的外植体置于预培养基上分别预培养 0、1、2、3、4 天, 用菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.3 的农杆菌采用真空侵染的方式侵染 10 min, 暗处共培养 4 天后进行筛选培养。(3) 菌液浓度 采用不同菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 真空侵染外植体, 侵染时间 10 min, 暗处共培养 4 天后进行筛选培养。(4) 共培养时间 用菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.3 的农杆菌 LBA4404 将预培养 3 天的外植体真空侵染 10 min, 暗处分别共培养 2、3、4、5 天后进行筛选培养。上述试验因素均处理 30 个叶片, 每个处理均设 3 次重复。

**1.2.4 GUS 组织化学检测** 共培养结束后, 将叶片转入无菌水中, 除菌后用无菌滤纸吸干外植体, 并将其浸泡在染色液中。GUS 染色液具体成分如下: 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 中加入 0.5 g/L X-gluc、1% Triton-X100、1% DMSO、10 mmol/L EDTA。37 °C 恒温过夜, 然后转入 70% 乙醇浸泡脱去色素后观察。GUS 基因瞬间表达呈阳性者可肉眼观察到蓝色, 然后统计 GUS 基因瞬时表达率 (有蓝色反应的外植体数  $\times 100 /$  外植体总数)。

**1.2.5 PCR 检测** 共培养结束后, 将叶片转入无菌水中, 除菌后用无菌滤纸吸干叶片, 将叶片置于筛选培养基上进行筛选培养, 每 4 周继代一次。经 3 次筛选培养后, 获得形态良好的 Kan 抗性不定芽并再生出完整植株。运用本实验室的改良 CTAB 方法<sup>[9]</sup> 提取抗性不定芽叶片 DNA, 根据 *NPTII* 基因两端序列设计引物, 上游引物: 5'-GTTCTTTTGTCAAGACCG-ACC-3'; 下游引物: 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATC-ACG-3'。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 52 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35

次, 72 °C 延伸 10 min。

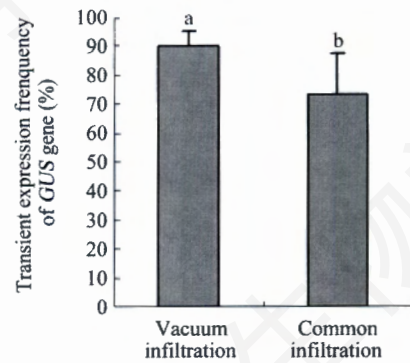
## 2 结果

### 2.1 不同侵染方式对 GUS 基因瞬时表达率的影响

不同侵染方式对 GUS 基因瞬时表达率的影响如图 1, 普通侵染方式 GUS 基因瞬时表达率为 73.3%, 0.1 MPa 真空渗入侵染表达率为 90%, 是普通侵染方式的 1.23 倍。因此, 真空渗入侵染方式有效提高了 GUS 基因瞬时表达率, 是一种有效的提高遗传转化效率的辅助手段。

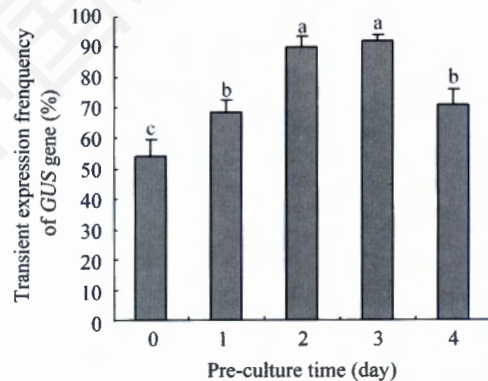
### 2.2 预培养时间对 GUS 基因瞬时表达率的影响

预培养时间对 GUS 基因瞬时表达率的影响如图 2。结果表明, 未经预培养的外植体, 外植体 GUS 基因瞬时表达率仅为 54.4%, 而且外植体在随后进行筛



**Fig.1 Effects of infection methods on transient expression frequency of GUS gene**

a, b: note significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.



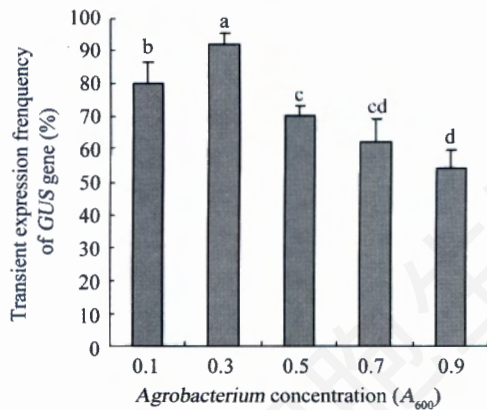
**Fig.2 Effects of pre-culture time on transient expression frequency of GUS gene**

a, b, c: note significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.

选培养时逐渐褐化、死亡; 预培养 1~3 天内, 随预培养时间的增加表达率逐渐升高, 3 天时表达率最高, 是未经预培养的外植体表达率的 1.69 倍, 预培养可明显提高外植体 *GUS* 基因瞬时表达率; 预培养至 4 天时, *GUS* 基因瞬时表达率下降为 71.1%, 而且叶片已经开始膨大加厚, 叶柄处有少量愈伤产生。预培养 2 天与预培养 3 天的 *GUS* 基因瞬时表达率差异不显著, 由此可见, 中华猕猴桃伏牛 95-2 遗传转化时适宜的预培养时间为 2~3 天。但本试验中预培养 3 天时瞬时表达率最高, 因此, 将叶片预培养 3 天, 进行菌液浓度、共培养时间的筛选试验。

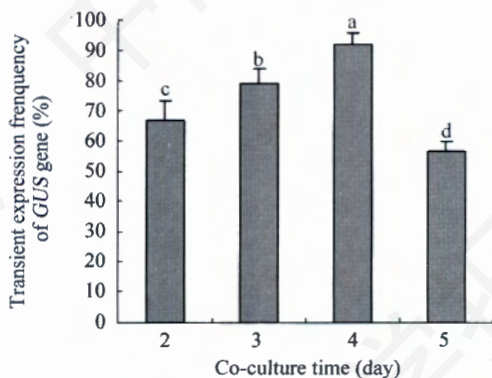
### 2.3 菌液浓度对 *GUS* 基因瞬时表达率的影响

农杆菌菌液浓度直接影响 *GUS* 基因瞬时表达率 (图 3)。农杆菌菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.3 时 *GUS* 基因瞬时表达率最高, 且与其它处理差异显著。当菌液浓



**Fig.3** Effects of *Agrobacterium* concentration on transient expression frequency of *GUS* gene

a, b, c, d: note significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.



**Fig.4** Effects of co-culture time on transient expression frequency of *GUS* gene

a, b, c, d: note significant difference at 5% level by Duncan's multiple range test.

度  $A_{600}$  值从 0.1 提高到 0.3 时, 表达率从 80% 上升至 92.2%; 当  $A_{600}$  值超过 0.3 时 *GUS* 基因瞬时表达率逐渐下降, 菌液浓度  $A_{600}$  值从 0.5 提高到 0.9 时, 表达率从 70% 降低至 54.4%。因此, 中华猕猴桃伏牛 95-2 遗传转化时  $A_{600}$  值为 0.3 为适宜的菌液浓度。

### 2.4 共培养时间对 *GUS* 基因瞬时表达率的影响

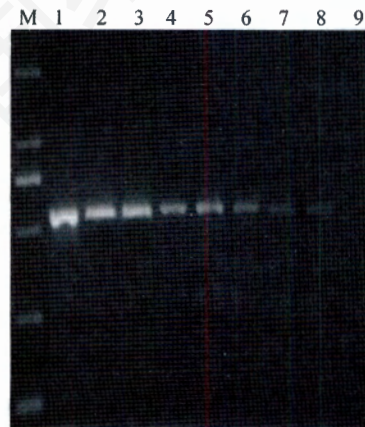
图 4 可见, 共培养时间不同, *GUS* 基因瞬时表达率差异显著。共培养 2~4 天内, 随共培养时间的延长, *GUS* 基因瞬时表达率呈递增趋势, 由 66.7% 提高至 92.2%; 但培养至 5 天时可以看出农杆菌斑迹, 部分外植体死亡, 从而导致表达率下降为 56.7%。由此可以看出, 4 天为中华猕猴桃伏牛 95-2 遗传转化适宜的共培养时间。

### 2.5 转化植株再生与分子检测

经农杆菌介导转化和 3 次筛选培养后, 获得了形



**Fig.5** The expression of *GUS* gene in the leaf of transformed plant



**Fig.6** PCR assay of *NPTII* gene in transformed plants  
M: DNA marker DL2000; 1: pBI121 (positive control); 2-8: transformed plants; 9: untransformed plants (negative control).

态良好的 Kan 抗性不定芽并再生出完整植株。对抗性芽的叶片进行 GUS 组织化学分析, 发现抗性芽叶片呈蓝色, 说明 GUS 基因已整合至中华猕猴桃伏牛 95-2 基因组中, 并得到稳定表达(图 5)。对 GUS 组织化学分析呈阳性的抗性芽进行 PCR 检测, 设计特异引物检测 NPTII 基因, 扩增出 500 bp 左右的预期目的片断, 初步证明 NPTII 基因已成功整合到猕猴桃基因组中(图 6)。

### 3 讨论

目前农杆菌介导猕猴桃遗传转化报道中转化率均较低, 抗性芽的获得效率一般为 4% 左右<sup>[5,8]</sup>。因此, 建立高效、稳定的中华猕猴桃的遗传转化体系, 是进行中华猕猴桃品种改良的基础。

#### 3.1 侵染方式

农杆菌真空渗透法进行瞬时表达具有简便高效性<sup>[10]</sup>, 植物细胞在负压条件下, 农杆菌的 T-DNA 易于转化进细胞可提高转化率<sup>[11]</sup>。Janssen 等<sup>[2]</sup>使用普通侵染方式的美味猕猴桃叶片 GUS 基因瞬时表达率仅为 60% 左右; 本试验首次将真空渗入侵染方式应用于中华猕猴桃的遗传转化中, GUS 基因瞬时表达率提高至 90%。真空侵染方式在苹果<sup>[12]</sup>、柑桔<sup>[13]</sup>、葡萄<sup>[14]</sup>等树种的遗传转化中也得到了应用。由此可以看出, 真空渗入侵染是提高农杆菌介导遗传转化效率的一种有效辅助手段。

#### 3.2 预培养时间

植物遗传转化过程中, 侵染前对外植体进行预培养可以提高转化效率<sup>[15,16]</sup>, Sriskandarajah 等<sup>[17]</sup>在研究苹果遗传转化过程中发现预培养可以促进细胞分裂, 更易整合外源 DNA, 从而提高瞬时表达率和转化率。本试验对中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片进行 2~3 天预培养明显提高了转化率, GUS 基因瞬时表达率是未预培养叶片的 1.69 倍。但 Janssen 等<sup>[2]</sup>以美味猕猴桃叶片为受体, 发现预培养降低了转化率, 这可能与种间的差异有关。

#### 3.3 菌液浓度

菌液浓度对遗传转化成败有很大影响。菌液浓度太低不利于农杆菌附着在外植体上, 大大降低转化效果; 菌液浓度过高, 不利于共培养后去除农杆菌, 且过高的菌液浓度对外植体也有一定的毒害作用<sup>[18]</sup>。一般认为农杆菌介导遗传转化中适宜菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.5 左右, 杨树<sup>[19]</sup>、草莓<sup>[20]</sup>和阔叶猕猴桃<sup>[7]</sup>使用菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.4、0.6、0.5 时获得的 GUS 基

因瞬时表达率较高分别为 62.08%、64.8%、88.4%。而本试验发现中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片的适宜菌液浓度较低, 菌液浓度  $A_{600}$  值为 0.3 时, GUS 基因瞬时表达率为 92.2%。这表明在对不同物种在进行遗传转化时, 菌液浓度也不相同。

#### 3.4 共培养时间

农杆菌和外植体共培养是转化过程中非常重要的环节。农杆菌附着后不能立即转化, 只有在创伤部位生存 16 h 后的菌株才能诱发肿瘤, 因此, 共培养时间必须长于 16 h, 但共培养时间过长, 由于农杆菌的过度生长, 植物细胞因受到毒害而死亡<sup>[18]</sup>。本试验发现中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片共培养 4 天时 GUS 基因瞬时表达率最高, 达到 92.2%; 而山定子<sup>[21]</sup>共培养 3 天抗性芽获得率最高, 达到 67.02%; 葡萄<sup>[22]</sup>共培养 2 天, GUS 基因瞬时表达率最高, 达到 30%。树种不同所需的共培养时间不同, 大多数树种以 2~4 天转化率较高。

### 参考文献(References)

- 1 Uematsu C, Murase M, Ichikawa H, Imamura J. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwi fruit. *Plant Cell Rep* 1991; 10(6-7): 286-90.
- 2 Janssen BJ, Gardner RC. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell Rep* 1993; 13(1): 28-31.
- 3 Fung RW, Janssen BJ, Morris BA. Inheritance and expression of transgenes in kiwifruit. *NZ J Crop Horticult Sci* 1998; 26(3): 169-79.
- 4 刘春林, 董延瑜. 美味猕猴桃遗传转化研究初报. *湖南农学院学报* 1994; 20(3): 214-21.
- 5 郭卫东, 沈向, 李嘉瑞, 郑学勤. 利用 LfycDNA 转化猕猴桃的研究. *园艺学报* 1999; 26(2): 116-7.
- 6 樊军锋, 李嘉瑞, 韩一凡, 李玲, 彭学贤. mtID/gutD 双价耐盐基因转化秦美猕猴桃的研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)* 2002; 30(3): 53-8.
- 7 高月, 毕静华, 刘永立. 阔叶猕猴桃遗传转化技术参数的优化. *果树学报* 2007; 24(4): 553-6.
- 8 黄萍, 沈孝善, 马朝宏. 农杆菌对中华猕猴桃叶柄的遗传转化初报. *西南农业学报* 2002; 15(4): 113-5.
- 9 李继东, 毕会涛, 李海涛, 李振山, 冯建灿, 陈红卿. 灰枣成熟叶片 DNA 提取及 ISSR 反应体系的构建. *果树学报* 2008; 25(6): 837-41.
- 10 李静, 陈敏, 刘现伟, 沈法富, 王鹏. 莴苣高效瞬时表达体系的建立. *园艺学报* 2006; 33(2): 405-7.
- 11 刘建利, 张占路, 吴燕民. 百脉根农杆菌快速高效遗传转化体系的建立. *草业学报* 2006; 15(3): 128-31.
- 12 程家胜, 田颖川, 孟秀美, 李文谷, 刘旭峰, 张景亭, 等. 苏云农杆菌  $\delta$ -内毒素基因(Bt)导入苹果. *西北农业学报* 1999; 8(1): 78-81.
- 13 Santos-Rosa M, Poutaraud A, Merdinoglu D, Mestre P. Development of a transient expression system in grapevine via

- agro-infiltration. *Plant Cell Rep* 2008; 27(6): 1053-63.
- 14 De Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep* 2009; 28(3): 387-95.
- 15 McHughen A, Jordan M, Feist G. A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. *J Plant Physiol* 1989; 135(2): 245-8.
- 16 Sangwan RS, Bourgeois Y, Sangwan-Norreel BS. Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. *Mol Gen Genet* 1991; 230(3): 475-85.
- 17 Sriskandarajah S, Goodwin P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1998; 53(1): 1-11.
- 18 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998, 223-5.
- 19 蔡 诚, 吴大强, 纵 方, 项 艳. 正交设计在杨树最佳遗传转化体系的建立. *核农学报* 2008; 22(2): 136-40.
- 20 朱海生, 潘东明, 林义章, 张志忠, 温庆放. 根癌农杆菌介导草莓遗传转化研究. *核农学报* 2008; 22(1): 36-40.
- 21 马志梅, 王 忆, 许雪峰, 孔 瑾, 韩振海. 根癌农杆菌介导的山定子遗传转化的研究. *核农学报* 2008; 22(2): 160-4.
- 22 李金凤, 杨丽娜, 周蓓蓓, 章 镇, 陶建敏. 葡萄砧木 5BB 农杆菌介导法的遗传转化体系. *江苏农业学报* 2009; 25(3): 715-7.

## Establishment of Efficient Genetic Transformation System of *Actinidia chinensis* by Vacuum Infiltration Assisted Method

Xiao-Li Shang, Jian-Can Feng\*, Dao-Yu Zhu, Dong-Fang Xing, Chun-Hua Ma

(College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract** Factors affecting transient expression frequency of *GUS* gene, including different infection methods, days of pre-culture, concentration of *Agrobacterium tumefaciens*, days of co-culture were studied in genetic transformation, using leaves of *Actinidia chinensis* 'Funiu 95-2' as explants. The results showed that the highest transient expression frequency (92.2%) was obtained when explants were firstly pre-cultured for 3 d, infected for 10 min with *Agrobacterium tumefaciens* ( $A_{600}=0.3$ ) by vacuum infiltration and finally co-cultured for 4 d. PCR detection and GUS histochemical staining proved initially that the foreign gene had been integrated into the *Actinidia chinensis* genomes.

**Key words** *Actinidia chinensis*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation; vacuum infiltration

Received: October 12, 2009 Accepted: January 11, 2010

\*Corresponding author. Tel: 86-371-63579621, E-mail: jcfeng@henau.edu.cn