

尚霄丽,李 涵,张建鹏,等. 中华猕猴桃遗传转化受体系统的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):46-48.

# 中华猕猴桃遗传转化受体系统的建立

尚霄丽<sup>1,2</sup>, 李 涵<sup>2</sup>, 张建鹏<sup>2</sup>, 吴春昊<sup>2</sup>

(1. 河南农业大学, 河南郑州 450002; 2. 濮阳职业技术学院, 河南濮阳 457000)

**摘要:**以中华猕猴桃伏牛 95-2 的组培苗叶片为外植体,研究不同浓度生长调节剂对其愈伤组织、不定芽诱导和生根的影响及其对卡那霉素的敏感性,从而建立高效稳定的中华猕猴桃伏牛 95-2 的受体系统。结果表明,中华猕猴桃伏牛 95-2 的最佳愈伤组织及不定芽诱导培养基为 MS+1.0 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA,在此培养基条件下,其不定芽分化率、每个叶盘不定芽的分化数均较高,分别为 87.50%、4.2 个;最佳生根培养基为 1/2MS+2.0 mg/L NAA,生根率达 100.00%。当卡那霉素浓度大于 10 mg/L 时,能够明显抑制愈伤组织的生长,且随着浓度的增加,愈伤组织死亡率逐渐增大;当卡那霉素浓度为 20 mg/L 时,愈伤组织及不定芽的分化率均为 0,因此 20 mg/L 卡那霉素浓度为中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片遗传转化的最佳筛选浓度。

**关键词:**中华猕猴桃;受体系统;卡那霉素

**中图分类号:** S663.403 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0046-03

猕猴桃属猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属植物,由于它们具有维生素 C 含量高、风味独特、营养丰富等优点而备受关注。中华猕猴桃(*Actinidia chinensis*)是猕猴桃的主要栽培种之一,其中伏牛 95-2 品系的果肉为红色,是特异的中华猕猴桃种质资源,但因其具有果实小、外观差等不足,因此有待于改良并提高其果实品质以适应市场需求。利用常规育种手段进行猕猴桃的品种改良所需的周期长、工作量大且效率低,难以满足生产发展的需要,而基因工程技术则为猕猴桃的种质改良开辟了一条新途径。

自 1985 年 Horsch 等发明叶盘法<sup>[1]</sup>以来,基因工程的转

化工作相对简化。成功的基因转化系统首先依赖良好的植物受体系统的建立,即要求用于转化的外植体能够高效、稳定地再生无性系,并能接受外源 DNA 的整合,同时用于筛选的转化细胞或植株应该对抗生素具有一定的敏感性。目前有关中华猕猴桃的组织培养已有相关报道<sup>[2-9]</sup>,但由于其再生受基因型的限制,因此其再生体系没有普遍性,而且不同品种间的再生效率也有很明显差异。本试验以中华猕猴桃伏牛 95-2 品系的组培苗叶片为试验材料,建立了中华猕猴桃伏牛 95-2 的叶片基因转化的受体系统,为进行农杆菌介导的中华猕猴桃的遗传转化奠定了基础。

收稿日期:2012-12-05

作者简介:尚霄丽(1982—),女,河南清丰人,博士研究生,讲师,从事园艺植物遗传育种教学和研究工作。E-mail: xiaoli820218@163.com。

定提取质膜微囊的封闭性和方向性。质膜微囊封闭性的计算方法为:加入去垢剂测得的  $H^+$ -ATPase 酶活减去未加去垢剂时的酶活,再除以加入去垢剂测得的  $H^+$ -ATPase 酶活,该比值越大,表明膜微囊封闭性越高,正向型质膜微囊所占比例越高。本研究中使用 Triton X-100 处理质膜,结果发现该比值高达 84.37%,表明通过两相法提取的水稻叶片细胞质膜微囊封闭性好,主要为正向型原位质膜微囊。

## 参考文献:

- [1] Albertsson P A, Andersson B, Larsson C, et al. Phase partition a method for purification and analysis of cell organelles and membrane vesicles[J]. *Methods of Biochemical Analysis*, 1982, 28: 115-150.
- [2] Palmgren M G, Askerlund P, Fredrikson K, et al. Sealed inside-out and right-side-out plasma membrane vesicles: Optimal conditions for formation and separation[J]. *Plant Physiology*, 1990, 92(4): 871-880.
- [3] Sandelius A S, Morre D J, Moller I M, et al. The plant plasma membrane [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1990: 44-67.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料中华猕猴桃伏牛 95-2(*A. chinensis* Funiu 95-

- [4] Gallagher S R, Leonard R T. Effect of vanadate, molybdate and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots[J]. *Plant Physiology*, 1982, 70(5): 1335-1340.
- [5] Briskin D P, Leonard R T, Hodges T K. Isolation of the plasma membrane: membrane markers and general principles[J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148: 542-558.
- [6] Sandstrom R P, Deboer A H, Lomax T L, et al. Latency of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in vesicles isolated by aqueous phase partitioning[J]. *Plant Physiol*, 1987, 85(3): 693-698.
- [7] 王建华, 陈 珈, 吴显荣. 玉米细胞两种质膜囊泡的制备和鉴别[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(5): 443-445.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [9] 王细娥, 张丽军, 谢锦云, 等. 蛋白质组研究中细胞质膜的纯化和纯度鉴定研究进展[J]. *生命科学研究*, 2006, 10(增刊): 15-20.
- [10] Hodges T K, Mills D. Isolation of plasma membrane[J]. *Methods in Enzymology*, 1986, 118: 41-54.

2)来源于本实验室建立并保存的无菌伏牛 95-2 试管苗。叶片取自叶龄 30 d 左右的组培苗,选择肥厚、颜色深绿、叶脉明显、发育良好的叶片。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织及不定芽的诱导 去掉叶片的叶尖和叶缘,垂直沿叶片中脉切成 0.5 cm×0.5 cm 的叶盘作为试验用外植体。将叶片正面向上接种于以 MS 为基本培养基、附加不同浓度 ZT 和 NAA 组合的培养基中(具体配方见表 1),探讨不同植物生长调节剂浓度对叶片再生的影响。每个处理组合设 40 个外植体,3 次重复。培养条件:温度(25±2)℃,光照时间 14 h/d。培养 30 d 后调查愈伤组织形成率,培养 40 d 后调查愈伤组织不定芽分化率,以及每个叶盘分化的不定芽数。相关计算公式为:

出愈率=诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数×100%;

不定芽分化率=诱导出芽的外植体数/愈伤组织数×100%。

1.2.2 不定芽的生根培养 将长 2~3 cm 的健壮不定芽接种于附加不同浓度 NAA 和 IAA 的 1/2MS 基本培养基上(具体配方见表 2),从而筛选出适宜中华猕猴桃伏牛 95-2 不定芽生根的生长素及其浓度。生根试验为单因素试验,共 8 个处理,每个处理设 30 个不定芽,3 次重复。培养 30、40 d 后调查每个处理的生根率及生根情况。生根率的计算公式为:

生根率=生根数/接种的不定芽数×100%。

1.2.3 卡那霉素敏感性测定 以筛选出的愈伤组织的不定芽诱导培养基或生根培养基为基本培养基,添加不同质量浓度(0.5、10、15、20、30、40、50 mg/L)的卡那霉素进行敏感性试验。将叶片或不定芽置于含有不同浓度卡那霉素的培养基中,每种卡那霉素浓设 30 个外植体,3 次重复,40 d 后调查外植体的再生及褐化情况。卡那霉素在培养基高压灭菌后冷却至 50℃左右时加入,是在超净工作台上通过过滤灭菌的。

1.2.4 数据统计分析 使用 Excel 和 DPS 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导与再生

由表 1 可以看出:不同处理组合对中华猕猴桃伏牛 95-2 叶盘愈伤组织的诱导率均为 100%;但不同处理组合对伏牛 95-2 的不定芽分化率、每个叶盘形成的不定芽数的影响较明显,其中处理组合 4 的不定芽分化率、每个叶盘的不定芽分化数均较高,分别为 87.5%、4.2 个,且与其他处理组间差异显著( $P<0.05$ );不同浓度 ZT 对愈伤组织不定芽的分化影响较明显,当 NAA 浓度为 0.3 mg/L、ZT 浓度 1.0 mg/L 时,不定芽分化率最高,而当 NAA 浓度保持不变,ZT 浓度增加至 1.5、2.0 mg/L 时,再生芽的玻璃化现象严重,使得再生出的有效芽减少,不定芽的分化率分别降低为 75.00%、73.30%;不同 ZT 浓度(0.5~2.0 mg/L)条件下,均为 0.3 mg/L NAA 的愈伤组织分化率较高。由以上分析可以看出,处理组合 4 为中华猕猴桃伏牛 95-2 适宜的叶片不定芽分化培养基配方。

2.2 不定芽的生根培养

由表 2 可以看出,中华猕猴桃伏牛 95-2 生根缓慢;当生

表 1 不同植物生长调节剂组合对中华猕猴桃叶片愈伤组织及不定芽形成的影响

处理组合	植物生长调节剂		每处理叶片数(个)	出愈率(%)	愈伤组织不定芽分化率(%)	每个叶盘形成的不定芽数(个)
	ZT(mg/L)	NAA(mg/L)				
1	0.5	0.1	40	100	45.80d	1.3
2	0.5	0.3	40	100	62.50c	2.4
3	1.0	0.1	40	100	55.00cd	1.9
4	1.0	0.3	40	100	87.50a	4.2
5	1.5	0.1	40	100	56.67c	2.2
6	1.5	0.3	40	100	75.00b	3.0
7	2.0	0.1	40	100	55.00cd	1.9
8	2.0	0.3	40	100	73.30b	3.2

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。表 2、表 3 同。

根培养 30 d 时,生根率均较低,而附加 2.0 mg/L NAA 培养基的生根率最高,为 86.67%;当培养 40 d 时,该培养基生根率为 100%。

由表 2 还可以看出,不同生长素对不定芽生根率的影响较明显,培养 40 d 时,分别附加 2.0 mg/L NAA、1.0 mg/L IAA 培养基的生根率分别为 100%、74.44%,且两者间差异显著( $P<0.05$ )。同时通过观察发现,附加 NAA 的培养基中不定芽生根数较多且根较长,茎部甚至都有根形成;附加 IAA 的培养基生根数较少且根较短。因此生长素 NAA 较 IAA 更能促进中华猕猴桃伏牛 95-2 的不定芽形成不定根。

此外还可从表 2 看出,不同生长素浓度对中华猕猴桃伏牛 95-2 不定根形成的影响也较明显。培养 40 d 时,随 NAA 浓度的增加,伏牛 95-2 不定芽生根率逐渐增加;当 NAA 浓度从 0.5 mg/L 增加至 2.0 mg/L 时,不定芽生根率从 43.33%升高至 100%。由此可见,2.0 mg/L NAA 为适宜中华猕猴桃伏牛 95-2 的生根培养激素配方。

表 2 不同生长调节剂及浓度对中华猕猴桃伏牛 95-2 生根的影响

处理组合	植物生长调节剂		不定芽生根率(%)		生根状况
	NAA(mg/L)	IAA(mg/L)	30 d	40 d	
9	0.5		13.33e	43.33e	茎中、基部有根的形成
10	1.0		25.55d	61.11d	茎中、基部有根的形成
11	1.5		56.67b	91.11b	茎中、基部有根的形成
12	2.0		86.67a	100.00a	茎中、基部有根的形成
13		0.5	13.33e	54.44d	茎基部有根的形成
14		1.0	20.00de	74.44c	茎基部有根的形成
15		1.5	38.89c	73.33c	茎基部有根的形成
16		2.0	56.67b	58.89d	茎基部有根的形成

2.3 中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片对卡那霉素的敏感性试验

由表 3 可以看出,培养 40 d 时,卡那霉素明显抑制中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片愈伤组织形成率及不定芽的再生率。当卡那霉素浓度为 5 mg/L 时,猕猴桃叶片愈伤组织形成率、不定芽再生率分别由对照的 100%、87.5%下降至 94.4%、54.4%;当卡那霉素浓度增加至 10 mg/L 时,愈伤组织形成率、不定芽再生率分别下降至 41.10%、17.78%;当卡那霉素浓度为 15 mg/L 时,虽然能够产生少量的愈伤组织

(8.89%),但没有不定芽的分化,且叶片逐渐变黄;当卡那霉素浓度达到 20 mg/L 时,愈伤组织和不定芽的形成完全被抑制,叶片停止生长并开始白化而死亡;随着卡那霉素浓度的进一步增大,叶片白化死亡率增加;当卡那霉素浓度增加到 40 mg/L 时,猕猴桃叶片已全部死亡。

表 3 卡那霉素对中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片外植体愈伤组织和不定芽诱导的影响

卡那霉素浓度 (mg/L)	外植体数	出愈率 (%)	不定芽再生率 (%)	死亡率 (%)
0	30	100.00a	87.50a	0f
5	30	94.40b	54.40b	4.40e
10	30	41.10c	17.78c	58.89d
15	30	8.89d	0d	87.78c
20	30	0e	0d	92.20b
30	30	0e	0d	95.50b
40	30	0e	0d	100.00a
50	30	0e	0d	100.00a

3 小结与讨论

本试验建立了红果肉中华猕猴桃伏牛 95-2 的叶片受体系统,得出最佳不定芽诱导培养基、最佳生根培养基配方分别为 MS+1.0 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA、1/2MS+2.0 mg/L NAA;筛选出卡那霉素的临界浓度为 20 mg/L。本研究为进一步进行中华猕猴桃伏牛 95-2 的遗传转化研究奠定了基础。

细胞分裂素对不定芽的再生起着关键作用,不同基因型猕猴桃再生中适宜的细胞分裂素一般为 ZT<sup>[6-7]</sup>、CPPU<sup>[5]</sup>、6-BA<sup>[3]</sup>。本试验使用细胞分裂素 ZT 对中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片进行不定芽诱导,不定芽分化率最高可达 87.50%,表明 1.0 mg/L 为 ZT 的适宜浓度,这与田宏现等以美味猕猴桃茎段为外植体、使用 1.0 mg/L ZT 得到较高再生率的研究结果<sup>[8]</sup>一致;但张远记等以软枣猕猴桃叶片为外植体进行研究发现,2.0 mg/L ZT 的诱导率最好<sup>[4]</sup>;这可能与不同基因型适宜的细胞分裂素浓度不同有关。生长素对于外植体的分化起辅助作用,一般使用的生长素为 NAA 和 IBA,毕静华等对阔叶猕猴桃的研究发现,使用 5 μmol/L ZT 和 0.1 μmol/L NAA 培养基的再生率较高<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,适宜中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片不定芽再生的植物生长调节剂组合为 1.0 mg/L ZT 和 0.3 mg/L NAA。

本试验分别选取了不同浓度的 NAA 和 IAA 进行生根试验,结果表明,适当浓度的 NAA 较 IAA 对中华猕猴桃伏牛 95-2 不定芽的生根促进作用明显。当 NAA 浓度由 0.5 mg/L 增加至 2.0 mg/L 时,生根率从 43.33% 上升至 100.00%,表明生根率随 NAA 使用浓度的增大而呈上升趋势。由此可见,中华猕猴桃伏牛 95-2 最佳生根培养基为 1/2MS+2.0 mg/L NAA。

卡那霉素是一种能抑制细胞中核糖体蛋白质合成的内酰胺类抗生素,当卡那霉素达到一定浓度时能够抑制细胞生长。若选择的抗生素浓度太低,会产生假阳性抗性芽和大量嵌合体;若浓度过高,会延缓抗性愈伤组织的生长,造成褐化而得不到正常的转化体,甚至使大量外植体在选择中死亡;当选择的抗生素浓度适宜时,非转基因的外植体不会形成愈伤组织,叶片黄化并逐渐死亡,而发生转化的细胞能形成愈伤组织并产生抗性芽。因此为了获得最佳的筛选效果,确定选择性抗生素的最佳浓度是必要的。本试验研究表明,浓度为 20 mg/L 的卡那霉素为中华猕猴桃伏牛 95-2 叶片遗传转化的最佳筛选浓度,这与毕静华等以阔叶猕猴桃叶片为外植体得出的 20 mg/L 卡那霉素筛选临界浓度的研究结果<sup>[10]</sup>相一致;而黄萍等通过研究抗生素对中华猕猴桃叶柄愈伤组织诱导及花芽分化的影响,发现当卡那霉素浓度大于 25 mg/L 时,无不定芽发生<sup>[11]</sup>;樊军锋等以秦美猕猴桃叶片为材料,发现不定芽对卡那霉素的临界浓度为 50 mg/L<sup>[12]</sup>;这些结果主要是由于不同的基因型对卡那霉素的敏感性不同。因此对不同基因型应确定适宜的遗传转化的筛选浓度,为进一步提高转化率提供理论依据。

参考文献:

[1]Horsch R B,Fry J E,Hoffmann N L,et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science,1985,227(4691):1229-1231.

[2]洪树荣. 猕猴桃离体茎段和叶愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 湖北农业科学,1981(9):28-30.

[3]樊军锋,李 玲,韩一凡,等. 秦美猕猴桃叶片再生最佳系统的建立[J]. 西北植物学报,2002,22(4):907-912.

[4]张远记,钱迎情. 软枣猕猴桃试管苗叶片和茎段的愈伤组织诱导及植株再生[J]. 西北植物学报,1996,16(2):137-141.

[5]刘永立,兰大伟,毕静华,等. 葛枣猕猴桃组织培养中的器官形成与植株再生[J]. 果树学报,2005,22(3):220-223.

[6]兰大伟,刘永立,原田隆. 狗枣猕猴桃叶片离体培养的器官、体细胞胚形成与植株再生[J]. 果树学报,2007,24(2):218-222.

[7]毕静华,刘永立,Asghar S. 阔叶猕猴桃叶片离体器官发生和植株再生[J]. 果树学报,2005,22(4):405-408.

[8]田宏现,曾艳玲,谭晓风,等. 米良一号猕猴桃的组织培养研究[J]. 经济林研究,2005,23(1):7-9.

[9]田 娜,徐子勤,何近刚. 猕猴桃高频直接再生体系的建立[J]. 武汉植物学研究,2007,25(1):79-83.

[10]毕静华,高 月,刘永立,等. 阔叶猕猴桃抗生素敏感性及其遗传转化的研究[J]. 核农学报,2006,20(4):287-291.

[11]黄 萍,沈孝善,马朝宏. 抗生素对猕猴桃叶柄愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 贵州农业科学,2002,30(6):6-7.

[12]樊军锋,李嘉瑞,韩一凡,等. *mtlD/gutD* 双价耐盐基因转化秦美猕猴桃的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2002,30(3):53-58.