

# 黄瓜遗传转化研究进展

孙兰英

(黑龙江省农业科学院浆果研究所, 绥化 152204)

中图分类号: S642.2; S603.2 文献标识码: A

文章编号: 1001-0009(2004)03-0010-01

黄瓜是人们喜食的蔬菜作物之一, 在我国蔬菜周年供应中占有重要地位, 但易受多种真菌病害的危害而使产量降低, 品质下降, 传统的育种方法周期长、耗资大、效率低、受抗性基因资源匮乏的限制, 还易出现抗性退化的现象, 用现有品种资源进行有性杂交育种很难尽快得到具有抗性的优良品种。近年来, 由于分子生物学和植物基因工程技术的迅速发展, 利用 DNA 重组技术可使性状在种间转移, 且受体本身主要性状不被改变, 突破了远缘杂交不亲和障碍, 开辟了植物育种的新途径。

黄瓜的遗传转化始于 1986 年, 用含双元载体的发根农杆菌(含 Nos<sup>-</sup> npt II)感染下胚轴, 形成发根后再诱导植株再生。但由发根再生的频率太低, 只得到几株转基因植株。随后, McInnes 等、施和平等用发根农杆菌对诱导黄瓜子叶生根的情况进行了研究。除此之外, 未见更多的使用发根农杆菌对黄瓜进行遗传转化的报道。相比之下, 是用根癌农杆菌对黄瓜进行遗传转化的报道相对多一些。Chee 以 3 d~5 d(天)苗龄的子叶外植体, 用含双载体的根癌农杆菌感染, 经卡那霉素(Kan)100 mg/L(毫克/升)筛选, 共获得 100 多株转基因植株, R<sub>0</sub> 及 R<sub>1</sub> 代植株表现正常。Sarmiento 等用两个腌制黄瓜品种的 18 d~21 d(天)苗龄顶部的 1~3 片真叶或叶柄作材料, 用根癌农杆菌 LBA4404 转化。以叶柄作外植体时, 通过诱导 Kan 抗性愈伤组织再生植株, 获得 2 株达到开花成熟的转基因植株; 以真叶为外植体时, 愈伤组织上先形成根, 然后由 Kan 抗性根再诱导叶原基或体细胞胚, 进而再生成植株, 共获得 21 株成熟的转基因植株。转化频率约为 2%~6%。在以前的报道中, 只使用 npt II 基因作为选择标记基因, 因此只能通过选择 Kan 抗性的细胞进行植株再生。Soryu Nishibayashi 等, 以黄瓜下胚轴作外植体, 建立了含双元载体(带有 Nos<sup>-</sup> npt II, CaMV 35S-1-gus 及 CaMV 35S-hph 基因)根癌农杆菌介导的遗传转化系统。研究发现, 共培养(5 天)时加入 AS, 能大大提高下胚轴切口表面细胞的转化效率。使用 20 mg/L~30 mg/L(毫克/升)的潮霉素 B 比使用 50 mg/L~100 mg/L(毫克/升)的卡那霉素的选择效率更好。在 R<sub>0</sub> 及 R<sub>1</sub> 代转基因植株的不同组织及器官中有 CaMV 35S-1-gus 基因表达。

上述转化系统其受体水平均需经过严格的培养与再生过程才能获得转基因植株, 且培养的结果常常不尽人意。因此, 探讨避开组织培养的有效转化途径在这方面就显得更具有实际意义。许耀等以黄瓜的萌动种胚作为 TiT-DNA 转化受体, 短期内获得了转基因植株, 并从生理生化和分子水平上

证实了外源基因的转移、整合与表达, 但转化频率只有  $7.7 \times 10^{-4}$ , 且转化种胚苗中存在遗传上的嵌合性。

随着黄瓜组织培养技术的日趋成熟及黄瓜遗传转化体系的完善, 人们根据生产的实际需要, 已经开始有目的地将有用的外源基因导入黄瓜。Chee PP 等用 5 d(天)龄无菌苗的子叶作为外植体, 导入黄瓜花叶病毒 C 株系(CMV-C)的外壳蛋白基因(cp), 通过胚状体发生途径, 在 8 次转化试验中共获得了 100 多株转基因植株, 经检测证明 NPT-II、gus 及 CMV-cp 基因已整合进黄瓜基因组并在后代中表达。Gonsalves 等于 1989 年~1991 年连续 3 年对这些转基因植株进行田间试验, 证明对 CMV 有明显的抗病作用。Nishibayashi S 等对转 CMV-D cp 基因的转基因植株进行田间试验, 也观察到对 CMV 的抗性, 鉴于我国现有的多数黄瓜栽培品种均抗 CMV, 因此转移 CMV-cp 在黄瓜生产上并非必需。王慧中等以黄瓜无菌苗子叶切段为外植体, 通过叶盘法与根癌农杆菌进行共培养, 将 NPT-II 基因及 WMV-2cp 基因导入黄瓜, 经检测, 证明外源的 WMV-2cp 基因已导入黄瓜细胞且能稳定地遗传到子代。获得的转基因子一代植株对 WMV-2 表现出较强的抗性。

黄瓜受真菌病害危害严重, 但将抗真菌的目的基因导入黄瓜的研究报道较少, Raharjo 等用腌制黄瓜品种的 10 d~21 d(天)苗龄顶部第 1 及第 2 片真叶的叶柄(4 mm~5 mm(毫米))作外植体, 用含有不同双元载体的根癌农杆菌菌株将几丁质酶编码的基因导入黄瓜, 研究表明悬浮培养可大大提高转化频率。经检测, 外源基因整合到植物基因组中并得到表达。Tahei Y 等将水稻几丁质酶基因导入黄瓜, 获得抗灰霉病的转基因植株。在国内, 到目前为止, 还未见到这方面的研究报道。

从遗传转化方法方面来讲, 黄瓜的遗传转化主要采用农杆菌介导法, 但也有少数使用其它方法的。J. Schulze 等将 NPT-II 及 uid A 基因用基因枪法轰击黄瓜胚性悬浮培养细胞。获得了报告基因稳定表达的转基因植株。汤辉仙等以黄瓜原生质体作受体, 进行 DNA 直接转移, 以小分子的荧光黄染料作为荧光标记, 将其包裹在脂质体内, 用聚乙二醇(PEG)诱导融合或保温共培养法。将脂质体导入黄瓜悬浮细胞原生质体内, 原生质体经持续分裂形成愈伤和胚状体, 进而分化出芽和根。在此基础上, 进一步用脂质体包裹质粒 DNA pU-CI2-CAT, 脂质体与黄瓜悬浮细胞原生质体经 PEG 诱导融合, 培养 3 d 和 6 d(天)后均得到较强的 CAT(氯霉素乙酰转移酶)活性, 说明脂质体介导的外源基因已在黄瓜细胞中表达。陈峥等探讨了乙酰丁香酮对愈伤组织诱导率的影响, 结果表明接触乙酰丁香酮的外植体 13 d~14 d(天)后产生的愈伤组织, 明显多于没有接触乙酰丁香酮的外植体。

王慧中等研究了抗病性及病毒浓度, 试验结果表明, 转基因黄瓜植株不能做到对病毒完全免疫, 但可以有效地推迟发病时间, 减轻发病程度, 具有较强的应用价值。

黄瓜的遗传转化虽然取得一些进展, 并逐渐向实用性方向发展, 但就抗真菌病基因转移来说, 均为单基因导入, 且仅报道过几丁质酶基因导入黄瓜, 其它抗真菌基因的导入还未见报道, 因此还需进行深入研究。

收稿日期: 2004-02-12