

## 根癌农杆菌介导的黄瓜转基因研究进展

柴里昂, 樊怀福, 刘晨, 杜长霞

浙江农林大学 农业与食品科学学院 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300

柴里昂, 樊怀福, 刘晨, 等. 根癌农杆菌介导的黄瓜转基因研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(4): 643–651.

Chai LA, Fan HF, Liu C, et al. Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic cucumber. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 643–651.

**摘 要:** 黄瓜 *Cucumis sativus* 是世界性的重要蔬菜作物。农杆菌介导的转基因技术是研究植物基因功能及品种改良的重要手段。为进一步加快黄瓜的转基因研究和育种进程, 文中针对农杆菌介导的黄瓜遗传转化方法, 从黄瓜再生能力的影响因素、遗传转化条件和过程中各类添加物质等方面, 阐述了根癌农杆菌介导的黄瓜转基因研究进展及存在的问题, 并对提高黄瓜遗传转化效率和安全筛选标记的应用等前景进行了展望, 以期为黄瓜抗逆育种和果实品质改良等研究提供参考。

**关键词:** 黄瓜, 转基因, 再生能力, 遗传转化效率

## Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic cucumber

Li'ang Chai, Huaifu Fan, Chen Liu, and Changxia Du

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Agricultural Product Quality Improvement Technology, College of Agriculture and Food Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China

**Abstract:** Cucumber (*Cucumis sativus*) is an important vegetable crop in the world. *Agrobacterium*-mediated transgenic technology is an important way to study plant gene functions and improve varieties. In order to further accelerate the transgenic research and breeding process of cucumber, we described the progress and problems of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic cucumber, from the influencing factors of cucumber regeneration ability, genetic transformation conditions and various additives in the process. We prospected for improving the genetic transformation efficiency and safety selection markers of cucumber, and hoped to provide reference for the research of cucumber resistance breeding and quality improvement.

**Keywords:** cucumber, transgenic, regenerative capacity, genetic transformation efficiency

**Received:** June 20, 2019; **Accepted:** September 2, 2019

**Supported by:** Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (Nos. LY18C150004, LY18C150003, LY15C150006).

**Corresponding authors:** Changxia Du. Tel: +86-571-63741277; E-mail: changxiadu@zafu.edu.cn

浙江省自然科学基金 (Nos. LY18C150004, LY18C150003, LY15C150006) 资助。

网络出版时间: 2019-10-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191010.0927.001.html>

黄瓜 *Cucumis sativus* 作为世界上重要的蔬菜作物之一, 其基因功能研究和遗传育种工作受到了广泛关注。农杆菌介导遗传转化技术是一种天然的植物转基因体系, 借助农杆菌侵染受伤植物体, 将经过改造的 T-DNA 区插入到植物的基因组, 再通过组织培养技术获得转基因植株, 具有稳定性好、成本低、技术简单、设备要求不高等优点, 逐渐成为黄瓜基因研究与品种改良的重要手段<sup>[1]</sup>。

根癌农杆菌介导的黄瓜转基因技术是目前应用最成熟、最广泛的遗传转化方法。依靠黄瓜的离体再生体系, 辅以适当的添加物质, 创建适宜黄瓜的遗传转化条件是此项技术的关键, 一般包括无菌外植体的获取、预培养、农杆菌侵染转化、农杆菌与外植体共培养、抗性芽诱导筛选、抗性芽伸长及生根、炼苗移栽等阶段。黄瓜的组织培养和遗传转化技术自问世以来<sup>[2-3]</sup>, 通过后续研究者们不断改良优化, 在抗生物胁迫<sup>[4-5]</sup>、抗非生物胁迫<sup>[6-7]</sup>、果实品质改良<sup>[8-9]</sup>、生长发育<sup>[10-11]</sup>等基因的遗传转化工作中取得了丰硕的成果。但是, 黄瓜因基因型、外植体类型等因素不同, 导致再生能力差异仍较大, 关于遗传转化的条件研究仍不够全面, 在黄瓜遗传转化过程中各种添加物质的原理及作用研究仍不够彻底, 以至褐化、污染、玻璃苗、老小苗、遗传转化效率低、基因表达和遗传不稳定等问题目前仍困扰着研究者们。文中从黄瓜离体再生的能力、遗传转化条件及过程中的各类添加物质出发, 分析和总结当前已有的进展与成果, 为根癌农杆菌介导黄瓜转基因技术的深入研究及未来发展提供参考。

## 1 影响黄瓜再生能力的因素

高再生能力是成功遗传转化的基础, 黄瓜的离体再生主要有直接通过培养外植体获得不定芽和通过先诱导愈伤组织再诱导出不定芽两种方式。两种方式在培养步骤上基本相同, 差别在于

直接诱导不定芽的方式具有再生周期短、再生率高等特点, 而通过诱导愈伤组织再诱导不定芽的方式更利于后续遗传转化的阳性筛选<sup>[4]</sup>。影响黄瓜再生能力的主要因素有以下几方面。

### 1.1 品种基因型

不同品种的黄瓜再生能力差异较大。Todd 等<sup>[3]</sup>对 85 个黄瓜品种进行了离体再生实验, 但仅有 28 个品种可以从子叶再生成芽, 证明了不同黄瓜基因型再生能力差异较大。不仅如此, 即使是容易再生的不同基因型黄瓜品种, 其再生能力也存在显著差异<sup>[12]</sup>, 如有研究发现, 黄瓜品种‘吉林早瓜’再生频率可达 97%, 而黄瓜品种‘9910 Gt’仅有 67%<sup>[13]</sup>, 同时指出无论是外植体平均再生芽数, 还是出苗和生长分化速度, 在相同的培养条件下, ‘吉林早瓜’都明显快于其他 5 个品种, 目前许多研究都得出了类似规律<sup>[14-16]</sup>。Wang 等<sup>[17]</sup>通过 QTL 定位和 SNP 分子标记技术, 发现基因 *Csa1G642540 (DnaJ)*, 参与响应脱落酸调节、分生组织再生和质膜  $H^+$ -ATP 酶活性调节等) 在黄瓜离体再生过程中发挥着重要作用, 首次在遗传机制中证实了不同品种黄瓜再生能力的差异性。合适的基因型再生能力强, 生长分化迅速、一致, 对逆境的适应性强, 可有效减少再生植株在组培微环境中的污染影响和有害物质的积累。

### 1.2 外植体选择

黄瓜再生芽需通过切取的外植体分化而来, 研究中主要针对苗龄、苗态和选择不同的外植体类型来优化黄瓜离体再生体系。

研究中多以 1-4 d 为黄瓜最佳苗龄<sup>[18-20]</sup>, 也有选择 5-7 d 作为最佳苗龄<sup>[21]</sup>, 在苗态上多选择子叶抱合未完全展开<sup>[6,22]</sup>、子叶直立完全展开<sup>[21]</sup>和未经过光照培养的短苗龄子叶<sup>[10,18]</sup>。苗龄既是影响原生质体的产量、活力、分裂率、植物体激素水平、营养物质含量等的主要因素, 又决定着黄瓜组培苗的苗态, 研究中可能因种子活力或浸种方式的差异, 导致黄瓜种子萌发速率不同, 进

而影响黄瓜组培苗达到最佳再生状态的苗龄不同<sup>[23]</sup>，因此，以苗态作为最佳再生效率的主要参考因素更为合理。

外植体类型主要有子叶、子叶节、下胚轴、上胚轴等，其中使用最多的为子叶<sup>[6,24]</sup>和子叶节<sup>[25-27]</sup>，再生频率分别能达到 96.7%<sup>[9]</sup>和 100%<sup>[28]</sup>，而胚轴再生频率仅有 21%<sup>[26]</sup>，明显低于子叶及子叶节，造成这种差异的原因可能主要受基因型影响，另外外植体的处理方法、培养环境等其他因素也对不同外植体的再生能力有一定影响。以子叶、子叶节和胚轴为外植体，均有成功获得转基因植株的报道，但有研究证实，子叶和子叶节的转基因效率高于胚轴<sup>[29]</sup>。综合来看，最适宜黄瓜离体再生的外植体类型为子叶节或子叶<sup>[30-31]</sup>。

## 2 农杆菌介导黄瓜转基因的转化条件

### 2.1 预培养条件

普遍认为，通过预培养可以调整外植体内源激素水平、植物体细胞生理状态，减轻逆境对幼嫩外植体的胁迫，促进细胞分裂和外源基因的整合<sup>[32]</sup>，且预培养一般以暗培养的方式进行，对于调节过氧化物酶活性增速等有显著影响<sup>[33]</sup>。根据不同预培养天数后的抗性芽出芽率<sup>[21]</sup>和 GUS 瞬时性表达率<sup>[34]</sup>发现，不同的预培养时间对遗传转化效率影响显著<sup>[32]</sup>，1-2 d 是多数研究中选用的预培养天数<sup>[10,35]</sup>，分析指出，外植体在过短的预培养时间内无法达到最佳的生理状态，过长的预培养时间会使外植体伤口愈合，农杆菌侵染的效果会大大降低，进而影响遗传转化效率。

### 2.2 侵染条件

利用预制的侵染液侵染受伤的外植体是黄瓜遗传转化过程中的重要步骤<sup>[36]</sup>。农杆菌 GV3101<sup>[8]</sup>、LBA4404<sup>[37]</sup>、EHA105<sup>[38]</sup>等菌株在黄瓜遗传转化的研究中都有报道使用，且都成功获得转基因植株，将含有目标质粒的农杆菌培养至菌液  $OD_{600}$  值为 0.6-0.8 后，再将其重悬稀释至

$OD_{600}$  值为 0.2-0.3，研究认为，培养液  $OD_{600}$  值在 0.6 至 0.8 间，农杆菌处于对数生长期，此时农杆菌活力最高，稀释后  $OD_{600}$  值在 0.2 至 0.3 间，可避免过高浓度的农杆菌使外植体腐化死亡<sup>[6-8]</sup>。外植体的侵染方式主要为浸泡侵染<sup>[4,10]</sup>，也有利用真空负压等其他设备提高侵染深度的方法被报道<sup>[39-40]</sup>，杨丽<sup>[39]</sup>在研究中使用绿色荧光蛋白监测了不同侵染条件下的遗传转化过程，发现再生位点与侵染位点并不一致，侵染比率只有 30%，在改为真空负压侵染后，侵染比率提高到了 90%。侵染时间虽受限于侵染方式，但大多介于 10-30 min<sup>[14,41]</sup>之间，侵染时间低于 10 min<sup>[32]</sup>或超过 30 min<sup>[42]</sup>的报道并不多见。

### 2.3 共培养条件

共培养阶段设置在外植体被侵染之后，是目标基因整合进入植物染色体的重要阶段，共培养时间的长短需根据外植体耐受力、侵染液浓度和共培养操作方式的差异进行选优，许多研究以抗性芽出愈率或 GUS 阳性表达量，选择最佳共培养时间在 2-4 d 内<sup>[34,39]</sup>。针对共培养温度的研究发现，不能仅考虑黄瓜外植体分化、农杆菌生长或是 T-DNA 转移的最佳温度，还需考虑共培养温度与共培养时间之间的互作关系，在共培养 2 d 时，26 °C 更利于遗传转化<sup>[42]</sup>。关于共培养基 pH 对遗传转化效率的影响研究发现，共培养基 pH 在 5.0-5.2 间更有利于抗性芽率的提高<sup>[38]</sup>，有认为是因为添加剂乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS) 在偏酸性环境下作用效果更好，也有认为较低的 pH 利于农杆菌 Vir 基因的活化、转移和表达。随着共培养时间、温度、培养基 pH 等条件的研究日趋完善，对于提高根癌农杆菌介导黄瓜遗传转化效率具有重要意义。

本课题组在研究中首先使用 1/2MS 液体培养基洗脱共培养结束的外植体 3 次，再将外植体吹干转至筛选培养基，发现可大大减少筛选培养阶段农杆菌的生长量和抑菌抗生素的使用量，与未

处理组相比,抗性芽率提高至 67%,这种洗脱农杆菌的方法对外植体正常生长有明显促进作用,下一步将对洗脱时间、抗生素添加量及对遗传转化效率的影响等因素作进一步研究。

### 3 添加剂在黄瓜转基因中的应用

#### 3.1 植物激素

研究发现,被切下的外植体的内源激素含量在不同再生时期剧烈变化,且在愈伤诱导阶段脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 的含量显著增加,ABA/吲哚-3-乙酸 (Indole-3-acetic acid, IAA) 和 ABA/赤霉素 (Gibberellin, GA) 含量也与愈伤诱导时期存在关联<sup>[43]</sup>,说明外植体在离体再生的各个过程中,各种植物激素的含量发挥着重要的调控作用,因此研究者们采用在黄瓜离体再生的不同阶段添加不同浓度不同植物激素组合的方式来筛选最适激素组合<sup>[40]</sup>,其中被广泛应用的两种植物激素是 6-苄氨基腺嘌呤 (6-Benzylaminopurine, 6-BA) 和 ABA (表 1),也有使用 GA、IAA、吲哚丁酸、萘乙酸等的报道。6-BA 的浓度范围多在 0.5–2.0 mg/L, ABA 的浓度范围在 0–2.0 mg/L。根据黄瓜基因型、外植体类型和离体再生阶段的不同,已有研究完善了津优系列<sup>[11,18]</sup>、津研系列<sup>[7,24]</sup>、‘新泰密刺’<sup>[4,37]</sup>、‘9930’<sup>[17,19]</sup>等黄瓜品系

的离体再生最佳激素组合,并获得了最高 100% 的再生频率 (表 1)<sup>[19]</sup>。本课题组在诱导‘新泰密刺’外植体直接分化出芽的过程中,发现 0.5 mg/L 6-BA 与 1.0 mg/L ABA 搭配使用效果最佳。

不定芽诱导完成后,外植体内源激素逐渐趋于稳定,研究中多采用下调所添加的植物激素浓度、改变或减少所使用激素的种类,以促进再生芽的伸长<sup>[20,22]</sup>,此步骤周期在 7–15 d 左右。当再生苗伸长至 2 cm 左右时即可开始诱导生根,有研究中添加少量的植物激素促进再生芽生根<sup>[10,15]</sup>,但一般认为不需要添加植物激素即可诱导生根<sup>[16,18]</sup>,这可能与黄瓜再生芽比较容易诱导生根有关<sup>[4]</sup>。

#### 3.2 AgNO<sub>3</sub>

在黄瓜离体再生过程中 AgNO<sub>3</sub> 被广泛用作添加剂,研究认为 Ag<sup>+</sup>在促进外植体分化、生长和防止褐化等方面有显著作用,这与 Ag<sup>+</sup>抑制乙烯合成量呈正相关,而乙烯合成抑制外植体再生有关<sup>[44]</sup>,一般认为添加 0.5–2.0 mg/L AgNO<sub>3</sub> 即可达到最佳效果,过高的使用量反而会起到反作用<sup>[13,31]</sup>,但也有研究中不使用 AgNO<sub>3</sub> 仍可获得较高的再生频率 (表 1),并保持再生芽良好的生长状态<sup>[5]</sup>,这可能是因为基因型、外植体有所差异,导致外植体抗逆性不同。在研究中,AgNO<sub>3</sub> 的最佳添加浓度还需要进一步筛选。

表 1 植物激素及 AgNO<sub>3</sub> 在不同黄瓜品种外植体芽诱导阶段的应用

Table 1 Application of plant hormone and AgNO<sub>3</sub> in the explant bud induction stage of different varieties of cucumber

Variety	Explant type	Medium formula	Regeneration frequency (%)
<i>Xintai mici</i> <sup>[4]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ABA	82.7
<i>Jinyan No. 4</i> <sup>[7]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+3.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L ABA+1.5 mg/L AgNO <sub>3</sub>	90.0
<i>9930</i> <sup>[9]</sup>	Cotyledon	MS+1.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ABA	96.7
<i>Jinyou No. 1</i> <sup>[11]</sup>	Cotyledon	MS+2.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	86.1
<i>Jinyou No. 1</i> <sup>[18]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+2.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	90.7
<i>9930</i> <sup>[19]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ABA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	90.2
<i>S06</i> <sup>[20]</sup>	Cotyledon	MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ABA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	91.2
<i>Changchun mici</i> <sup>[22]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ABA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	90.0
<i>S52</i> <sup>[23]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L ABA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	100.0
<i>G1</i> <sup>[34]</sup>	Cotyledonary nodes	MS+1.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L ABA+2.0 mg/L AgNO <sub>3</sub>	100.0

### 3.3 AS 及抗氧化剂

许多研究在遗传转化的预培养<sup>[23]</sup>、侵染、共培养阶段中添加一定浓度的 AS<sup>[18-19]</sup>,发现 AS 对提高抗性芽分化率有显著效果,这是因为 AS 等酚类物质具有活化农杆菌 Vir 区、促进外源基因导入植物基因组、进而提高遗传转化效率的作用<sup>[4,35]</sup>。共培养基中 AS 浓度最低为 20  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[19]</sup>,最高为 150  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[32]</sup>,侵染液中 AS 浓度多使用 100  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[18,42]</sup>,尽管在添加阶段和使用浓度上存在差异,但都表明酚类物质对黄瓜遗传转化具有促进作用。也有研究通过抑制酚类物质的氧化即添加抗氧化剂的方法来提高遗传转化效率,如  $\alpha$ -辛硫酸<sup>[16]</sup>、L-Cystine、二硫苏糖醇、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ <sup>[35]</sup>等,抗氧化剂在其他植物组织培养中的应用较为多见且效果良好<sup>[16]</sup>,但在黄瓜的遗传转化中应用并不广泛。无论是直接添加 AS,还是添加抗氧化剂,都是以提高酚类物质含量来提高遗传转化效率,但该类物质常以有毒有机溶剂溶解,或本身在高浓度下会有一定的毒害作用,并与侵染液种类<sup>[41]</sup>、共培养基 pH<sup>[38]</sup>、共培养温度<sup>[42]</sup>等因素易形成交互作用,具体的添加阶段和添加浓度还需要进一步探讨。

### 3.4 抗生素

在黄瓜遗传转化体系的筛选培养阶段,常以筛选抗生素和抑菌抗生素配合使用。卡那霉素 (Kanamycin, Kan)<sup>[16,40]</sup>、潮霉素<sup>[10,32]</sup>、草甘膦<sup>[25]</sup>等是使用最多的筛选标记,普遍认为,黄瓜外植体的筛选抗生素耐受压力与基因型<sup>[19,28]</sup>和培养阶段<sup>[20,26]</sup>关系密切,如黄瓜‘川绿 2 号’在 140 mg/L 的 Kan 浓度下仍不能完全抑制出芽,而‘白丝条’和‘二早子’在 40 mg/L 和 60 mg/L 的浓度下便能完全抑制出芽<sup>[42]</sup>,黄瓜‘S06’在芽诱导阶段临界 Kan 浓度为 140 mg/L,而在生根阶段 100 mg/L 的 Kan 即可完全抑制生根<sup>[20]</sup>。筛选抗生素浓度既不能太高,又不能太低,过高的浓度易使幼嫩

的植物体或未转化的细胞死亡,过低的浓度会导致假阳性率过高,大大增加后期阳性鉴定的工作量。近些年研究者们偏向设定梯度浓度来进行阳性筛选<sup>[26]</sup>,即在诱导出芽时使用低浓度的筛选抗生素,在壮芽及生根阶段使用较高的筛选浓度,这种根据基因型和培养阶段的改变而进行的动态筛选能有效解决过低或过高的筛选浓度引起的问题。

不同于筛选抗生素对于外植体分化抑制效果明显,抑菌抗生素常选用对植物体伤害较小而具有一定抑制农杆菌作用的抗生素,常用的抑菌抗生素有羧苄青霉素 (Carbenicillin, Carb)、头孢噻肟钠 (Cefotaxime sodium, Cef)、特美汀 (Timentin, TM)、氨苄西林等<sup>[32,36]</sup>,虽然这些抗生素都可以有效抑制农杆菌的生长,但往往使用的浓度较高,通常在 300–500 mg/L,对于外植体的分化、生长也有一定的影响。在一些报道中发现 Cef 相较于 Carb 更利于愈伤诱导和出芽<sup>[26,32]</sup>,TM 是一种新型抑制农杆菌的抗生素,最大的特点是抑菌持续性强,在 70 d 内都可有效抑菌<sup>[45]</sup>,但使用成本要比 Cef 等高出许多。因此在黄瓜遗传转化过程中可根据不同培养阶段和周期,选择最适宜的抑菌抗生素,如在分化诱导阶段选择对外植体和愈伤诱导影响较小的种类,在壮芽或生根等生长周期较长的阶段选择抑菌效果显著且持久的种类,并且在使用浓度上,可根据污染情况适当调高或降低,使遗传转化过程中外植体受到农杆菌和抗生素的影响降到最低。

基于前人的研究成果<sup>[46]</sup>,本课题组在试验中将活性炭作为外源添加物质应用在黄瓜遗传转化过程中,发现添加活性炭的培养基可保持较长时间无色透明状,而未添加活性炭的培养基在一周左右会逐渐变黄,并且发现活性炭在 0.5% 的质量浓度作用下,对抑制褐化和促进生根方面作用显著,但具体的添加阶段和对培养基原有物质的吸附作用还有待进一步研究。

## 4 讨论及展望

黄瓜是目前公认较难进行转基因的物种,已有报道中经 PCR、Southern blotting、qPCR 等方法检测后,遗传转化效率最高可达 29%<sup>[47]</sup>,而最低仅有 0.1%<sup>[48]</sup>,大多在 1%–10%之间,并且无法稳定遗传给下一代,常出现基因丢失或沉默现象<sup>[5]</sup>。农杆菌侵染位点与外植体再生位点不一致是造成黄瓜遗传转化效率低的重要原因<sup>[48]</sup>,各阶段培养时间、温度、培养基 pH 值、侵染方式、菌株及载体类别等是影响侵染位点深度的主要因素,但在已有研究中这些参数都有所差异,且缺乏足够的细节,在基础培养基、固化剂<sup>[16]</sup>、组织培养光环境和气体环境、再生植株驯化等方面的研究较少,农杆菌污染严重和转基因植株在驯化阶段死亡也是导致黄瓜遗传转化效率低的另一重要原因。目前各类抗生素仍是黄瓜转基因体系中的主要筛选标记,虽有如甘露糖<sup>[49]</sup>等的安全筛选标记被报道用于黄瓜转基因过程中,但发展较为缓慢<sup>[50]</sup>,与传统的抗生素筛选标记相比仍有很大的研究空间。

随着分子生物技术的不断发展,黄瓜转基因技术的不断优化,研究者们对根癌农杆菌介导的黄瓜转基因技术进行了积极的探索。超声波、真空泵等工具的应用越来越广泛<sup>[41]</sup>,活体转染<sup>[50]</sup>、新型纳米颗粒介导<sup>[51]</sup>等方法也逐渐进入研究者的视线,可以预见,黄瓜的离体再生和遗传转化体系会越来越完善,CRISPR/Cas9 技术<sup>[48]</sup>及安全筛选标记会越来越多地应用于无抗生素的黄瓜遗传转化研究上,一些目前难以突破的问题会随着研究的深入得以解决。

## REFERENCES

- [1] Zhang ZX, Li X, Ma S, et al. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon explants. *Plant Biotechnol Rep*, 2017, 9(6): 405–416.
- [2] Sato M, Imanishi S, Hiura I. *In vitro* plantlet formation from hypocotyl and hypocotyl callus of *Cucumis sativus* L. *Jpn J Breed*, 1979, 29(1): 33–38.
- [3] Wehner TC, Locy R. *In vitro* adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. *Hort Sci*, 1981, 16(6): 759–760.
- [4] Wang Y, Gu XF, Zhang SP, et al. Transformation of RNAi vector in cucumber (*Cucumis sativus*) *in vitro* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection. *Bull Bot*, 2014, 49(2): 183–189 (in Chinese).  
王烨, 顾兴芳, 张圣平, 等. RNAi 载体导入黄瓜的遗传转化体系. *植物学报*, 2014, 49(2): 183–189.
- [5] Ren DL, Chen FF, Wang H, et al. Construction of expression vector of defense genes *CsHIR1* from cucumber and its genetic transformation research. *Acta Agric Bor-Occid Sin*, 2017, 26(2): 255–261 (in Chinese).  
任丹莉, 陈菲帆, 王晖, 等. 黄瓜 *CsHIR1* 基因表达载体的构建及遗传转化. *西北农业学报*, 2017, 26(2): 255–261.
- [6] Pan LL. Cloning, transformation and functional analysis under NO<sub>3</sub><sup>-</sup> stress of *CsNR* gene in cucumber[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2017 (in Chinese).  
潘玲玲. 黄瓜 *CsNR* 基因的克隆、遗传转化及在硝酸盐胁迫下的功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [7] Liu Y. Study on transfer of *CsGRX4* gene by grobacterium mediation into cucumber[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016 (in Chinese).  
刘艳. 农杆菌介导的谷氧还蛋白基因 *CsGRX4* 对黄瓜遗传转化体系的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [8] Tang HY. Genetic transformation and functional analysis of the gene controlling white immature fruit skin color in cucumber[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).  
唐红钰. 黄瓜白果皮颜色基因遗传转化与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [9] Liu HQ. A modified protocol of *Agrobacterium*-mediated transformation and Map-based cloning and functional analysis of *w* gene controlling white immature fruit color in cucumber[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).  
刘汉强. 黄瓜高效遗传转化体系的建立和嫩果白

- 皮基因 *w* 的图位克隆与功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [10] Liu PP, Jiang ZS, Wang ML, et al. Expression vector construction of Rubisco activase gene *CsRCA* and genetic transformation to cucumber. *Acta Horti Sin*, 2012, 39(5): 869–878 (in Chinese).  
刘培培, 姜振升, 王美玲, 等. 黄瓜 Rubisco 活化酶基因 *CsRCA* 表达载体构建与遗传转化. *园艺学报*, 2012, 39(5): 869–878.
- [11] Ni L. Genetic transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using RNAi vector with *CsEXP10* gene[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2017 (in Chinese).  
倪蕾. *CsEXP10* 基因 RNAi 干扰载体导入黄瓜的研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2017.
- [12] Du SL, Wei HJ, Wei AM, et al. Effects of seedling stage, genotype and explant type on *in vitro* somatic organogenesis of cucumber. *Tianjin Agric Sci*, 2000, 6(4): 1–5 (in Chinese).  
杜胜利, 魏惠军, 魏爱民, 等. 苗龄、基因型和外植体类型对黄瓜离体器官发生的影响. *天津农业科学*, 2000, 6(4): 1–5.
- [13] Zhang RW, Gu XF, Wang Y, et al. Regeneration system establishment from cotyledons in different cucumber (*Cucumis sativus* L.) genotypes. *Acta Agric Bor-Sin*, 2010, 25(S1): 50–54 (in Chinese).  
张若纬, 顾兴芳, 王烨, 等. 不同黄瓜基因型子叶再生体系的建立. *华北农学报*, 2010, 25(S1): 50–54.
- [14] An YW. Study on regeneration and genetic transformation in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013 (in Chinese).  
安亚伟. 黄瓜离体再生与遗传转化体系的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- [15] Ding F. Research on influence factors of *in vitro* regeneration of cucumber[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2014 (in Chinese).  
丁飞. 黄瓜离体再生的影响因素研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- [16] Li L, Meng YJ, Zhang L, et al. Study on optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation system of cucumber. *Acta Agric Bor-Sin*, 2015, 30(5): 115–121 (in Chinese).  
李蕾, 孟永娇, 张璐, 等. 黄瓜遗传转化体系优化的研究. *华北农学报*, 2015, 30(5): 115–121.
- [17] Wang Y, Zhou GT, Zhu SH, et al. Genetic analysis and identification of a candidate gene associated with *in vitro* regeneration ability of cucumber. *Theoret Appl Genet*, 2018, 131(12): 2663–2675.
- [18] Li YH. Establishment of regeneration system and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation protocol in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2016 (in Chinese).  
李艳华. 黄瓜离体再生和农杆菌介导的遗传转化体系的建立与优化[D]. 新乡: 河南科技学院, 2016.
- [19] Wu Z. Establishment of regeneration *in vitro* and genetic transformation system in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese).  
吴振. 黄瓜离体再生和遗传转化体系的建立[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [20] Wang YR, Chen LM, Pan JS, et al. Establishment of high effective regeneration system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation. *J Shanghai Jiaotong Univ: Agric Sci*, 2006, 24(2): 152–156, 164 (in Chinese).  
王艳蓉, 陈丽梅, 潘俊松, 等. 黄瓜子叶高效再生体系的建立与遗传转化. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2006, 24(2): 152–156, 164.
- [21] Jia JS, Si LT, Han GC, et al. Regeneration *in vitro* and its influential factors of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Henan Agric Sci*, 2008, 31(6): 99–102 (in Chinese).  
贾金生, 司龙亭, 韩贵超, 等. 不同基因型黄瓜离体再生及其影响因素的研究. *河南农业科学*, 2008, 31(6): 99–102.
- [22] Zhong HL, Li YH, Chen XL, et al. Optimization of regeneration system in *Cucumis sativus* L. *Chin Agric Sci Bull*, 2015, 31(10): 80–86 (in Chinese).  
钟辉丽, 李玉红, 陈雪琳, 等. 黄瓜离体器官再生体系的优化. *中国农学通报*, 2015, 31(10): 80–86.
- [23] Bie BB, Huang DM, Pan JS, et al. Effects of seedling stages on regeneration from cotyledonary node of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and genetic transformation efficiency. *J Shanghai Jiaotong Univ: Agric Sci*, 2013, 31(6): 55–60 (in Chinese).  
别蓓蓓, 黄东梅, 潘俊松, 等. 不同苗态对黄瓜子

- 叶节离体再生及遗传转化效率的影响. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2013, 31(6): 55–60.
- [24] Huang YL, Yin KD, Yue CJ. Optimum combination of hormone concentration during callus subculture of cucumber. *Acta Laser Biol Sin*, 2014, 23(1): 83–89 (in Chinese).  
黄玉兰, 殷奎德, 岳才军. 黄瓜愈伤组织继代培养中激素浓度组合的优化. 激光生物学报, 2014, 23(1): 83–89.
- [25] Liu CH. Identification and functional analysis of the Propamcarb-related gene *CsDIR16* in cucumber[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese).  
刘春红. 黄瓜低霜霉威残留性相关基因 *CsDIR16* 的鉴定及功能分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [26] Zhang SJ. Studies on regeneration and *Agrobacterium-mediated* genetic transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.)[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese).  
张守杰. 黄瓜再生体系的建立及农杆菌介导的遗传转化[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [27] Yang LM, Liu HQ, Zhao JY, et al. *Littleleaf* (*LL*) encodes a WD40 repeat domain-containing protein associated with organ size variation in cucumber. *Plant J*, 2018, 95(5): 834–847.
- [28] Du YL, Zhao XT, Su F. Induction of two genotypes cucumber callus. *Northern Hortic*, 2016, (11): 96–99 (in Chinese).  
都彦伶, 赵新涛, 宿烽. 两种基因型黄瓜愈伤组织的诱导. 北方园艺, 2016, (11): 96–99.
- [29] Kose E, Koç NK. *Agrobacterium-mediated* transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and plant regeneration. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 2014, 17(2): 56–62.
- [30] Hou AJ, Zhu YM, Yang AF, et al. Main factors influencing the frequency of direct organogenesis of cucumber *in vitro*. *Acta Horti Sin*, 2003, 30(1): 101–103 (in Chinese).  
侯爱菊, 朱延明, 杨爱馥, 等. 诱导黄瓜直接器官发生主要影响因素的研究. 园艺学报, 2003, 30(1): 101–103.
- [31] Chang HC, Ni L, Sun YD, et al. Factors influencing *Agrobacterium-mediated* genetic transformation of cucumber. *Northern Hortic*, 2018, (2): 9–14 (in Chinese).  
常怀成, 倪蕾, 孙涌栋, 等. 农杆菌介导的黄瓜遗传转化的影响因素. 北方园艺, 2018, (2): 9–14.
- [32] Xu N, Chu J, Xia HW, et al. Establishment of genetic transformation system of cucumber ‘*New Jinchun 4*’. *J Trop Subtrop Botany*, 2010, 18(6): 679–684 (in Chinese).  
许娜, 储俊, 夏海武, 等. 黄瓜‘新津春四号’遗传转化体系的建立. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(6): 679–684.
- [33] Wang Y, Gu XF, Zhang SP. Effect of dark culture on enzyme and soluble protein variance during cucumber cotyledon node regeneration. *Acta Botan Bor-Occid Sin*, 2011, 31(9): 1793–1798 (in Chinese).  
王焯, 顾兴芳, 张圣平. 暗培养对黄瓜子叶节再生频率及其相关酶活性和可溶性蛋白含量的影响. 西北植物学报, 2011, 31(9): 1793–1798.
- [34] Huang DM, Bie BB, Pan JS, et al. Optimum for regeneration and transformation system in *Cucumis sativus* L. *J Shanghai Jiaotong Univ: Agric Sci*, 2012, 30(2): 42–47 (in Chinese).  
黄东梅, 别蓓蓓, 潘俊松, 等. 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 离体再生和转化体系的优化. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(2): 42–47.
- [35] Wang Y, Gu XF, Zhang SP, et al. Influence of Lipic acid on transformation of cucumber cotyledon *in vitro* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Agric Bor-Sin*, 2012, 27(S1): 51–56 (in Chinese).  
王焯, 顾兴芳, 张圣平, 等. 硫辛酸对农杆菌介导的黄瓜子叶节遗传转化的影响. 华北农学报, 2012, 27(S1): 51–56.
- [36] Nanasato Y, Konagaya KI, Okuzaki A, et al. Improvement of *Agrobacterium-mediated* transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. *Plant Biotechnol Rep*, 2013, 7(3): 267–276.
- [37] Lü JG. Suppression of cucumber stachyose synthase gene (*CsSTS*) inhibits phloem loading and reduces low temperature stress tolerance[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017 (in Chinese).  
吕建国. 抑制黄瓜水苏糖合成酶基因 *CsSTS* 降低韧皮部装载和低温胁迫耐受性[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [38] Ning Y, Li L, Miao YM, et al. Influence of



- Acetosyringone concentration and pH of co-culture medium on efficiency of cucumber genetic transformation. *China Cucurbits Vegetables*, 2013, 26(5): 6–9 (in Chinese).
- 宁宇, 李蕾, 苗永美, 等. 乙酰丁香酮及共培养 pH 对黄瓜遗传转化效率的影响. *中国瓜菜*, 2013, 26(5): 6–9.
- [39] Yang L. Engineering Non-transgenic gynoecious cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018 (in Chinese).
- 杨丽. 建立黄瓜遗传转化和基因编辑技术体系以创制黄瓜全雌系种质材料[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [40] Wang SL, Ku SS, Ye XG, et al. Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Integr Agric*, 2015, 14(3): 469–482.
- [41] Wu JY, Liu JG, Ma XR, et al. Obtain the transgenic cucumber of the fusion gene of region A of *P<sub>Ac</sub>* gene of streptococcus mutans and B subunit of Cholera toxin. *J Oral Sci Res*, 2016, 32(9): 902–906 (in Chinese).
- 吴家媛, 刘建国, 马欣荣, 等. 变异链球菌表面蛋白 A 区与霍乱毒素 B 亚单位嵌合基因转基因黄瓜植株的获得及鉴定. *口腔医学研究*, 2016, 32(9): 902–906.
- [42] Yang H, Liu XJ, Liang GY, et al. Establishment of genetic transformation system by *Agrobacterium tumefaciens* of cucumber. *Southwest China J Agric Sci*, 2014, 27(4): 1656–1660 (in Chinese).
- 杨宏, 刘小俊, 梁根云, 等. 农杆菌介导的华南型黄瓜遗传转化体系的初步研究. *西南农业学报*, 2014, 27(4): 1656–1660.
- [43] Zhang SJ, Wang XF, Yang XH, et al. Variation of endogenous phytohormone concentration in cotyledonary node calli during cucumber regeneration. *Acta Agric Bor-Occid Sin*, 2011, 20(5): 153–157 (in Chinese).
- 张守杰, 王秀峰, 杨小华, 等. 黄瓜子叶节离体再生过程中内源激素变化. *西北农业学报*, 2011, 20(5): 153–157.
- [44] Cao LX, Zhao L, Tang YL, et al. Stimulation effect of silver nitrate on shoot regeneration in cotyledon tissue culture of cucumber. *J Gansu Agric Univ*, 2001, 36(2): 168–171 (in Chinese).
- 曹利仙, 赵鹏, 唐宇力, 等. 硝酸银对黄瓜离体子叶培养芽再生的促进效应. *甘肃农业大学学报*, 2001, 36(2): 168–171.
- [45] Cheng ZM, Schnurr JA, Kapaun JA. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Rep*, 1998, 17(8): 646–649.
- [46] Zhao FQ, Yin X, Hong WJ, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Rhododendron moulmainense*. *Plant Physiol J*, 2017, 53(9): 1666–1672 (in Chinese).
- 赵富群, 尹茜, 洪文君, 等. 毛棉杜鹃的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 2017, 53(9): 1666–1672.
- [47] He ZQ, Duan ZZ, Liang W, et al. Mannose selection system used for cucumber transformation. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(9): 953–958.
- [48] Hu BW, Li DW, Liu X, et al. Engineering non-transgenic gynoecious cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10(12): 1575–1578.
- [49] Wang G, Zhang X, Wang P, et al. The induction and tolerance to mannose of adventitious bud derived from cotyledonary nodes in cucumber. *Crops*, 2014, (6): 32–35 (in Chinese).
- 王罡, 张栩, 王萍, 等. 黄瓜子叶节不定芽的诱导及对甘露糖耐性的研究. *作物杂志*, 2014, (6): 32–35.
- [50] Wei AM, Du SL, Han YK, et al. Study on transformation technology through *Agrobacterium tumefaciens* mediation in living cucumber plants. *Mol Plant Breed*, 2014, 12(4): 796–801 (in Chinese).
- 魏爱民, 杜胜利, 韩毅科, 等. 农杆菌介导的黄瓜活体植株转基因方法研究. *分子植物育种*, 2014, 12(4): 796–801.
- [51] Anjum NA, Rodrigo MAM, Moulick A, et al. Transport phenomena of nanoparticles in plants and animals/humans. *Environ Res*, 2016, 151: 233–243.

(本文责编 陈宏宇)