

网络出版日期:2016-12-29
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20161229.1008.028.html>

黄瓜 *CsHIR1* 基因表达载体的构建及遗传转化

任丹莉,陈菲帆,王 晖,秦亚光,张 颜,李玉红

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 为了优化黄瓜遗传转化体系以及研究 *CsHIR1* 基因在黄瓜中的功能特性,本试验利用 In-fusion 技术构建植物表达载体 pCAMBIA35S-*CsHIR1*,经过限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切检测、质粒 PCR 检测和测序鉴定,结果表明,表达载体 pCAMBIA35S-*CsHIR1* 已构建成功并转入农杆菌 GV3101 中。以黄瓜抗病种质‘PI197088’和感病种质‘CCMC’的子叶节为外植体,通过优化的农杆菌介导法初步将 *CsHIR1* 基因转入黄瓜中,经 PCR 检测获得 25 株阳性植株,其中 8 株阳性植株自交得到种子 T1 代,T1 代 PCR 检测阳性率为 44.7%,实时荧光定量分析表明 *CsHIR1* 在 T1 代阳性株中的相对表达量稍高于对照植株,有 1 株与对照组的差异较显著,这为进一步研究 *CsHIR1* 在黄瓜中的功能奠定了基础。

关键词 黄瓜; *CsHIR1*; 表达载体; 遗传转化

中图分类号 S642.2;Q78

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2017)02-0255-07

霜霉病是黄瓜(*Cucumis sativus* L.)生产上最重要的卵菌病害之一,严重影响黄瓜的产量和品质^[1-4]。喷施杀菌剂是目前生产上最主要的防治方法,但会导致环境污染、农药残留及使病原菌产生抗药性等一系列问题^[1-3],而抗病品种的培育是防治黄瓜霜霉病最为经济有效的措施。挖掘新的抗性相关基因,解析其抗性机制,是培育黄瓜抗霜霉病新品种的基础和前提。由于黄瓜的遗传基础极为狭窄,而霜霉病的抗性又是由多基因控制的数量性状,因此,创制新的抗性种质资源,可以加速黄瓜抗性分子育种的速度。

遗传转化是验证克隆基因功能最为直接和重要的方法之一^[5],也是创建新种质改善植物性能最有效的方法之一。目前,已用于转基因研究的植物有 200 多种,而农杆菌介导法是最常用的转化方法^[6]。受基因型、外植体类型、激素、培养基等多种因素的影响,瓜类植物如西甜瓜、黄瓜、苦瓜等遗传转化都比较困难^[7]。黄瓜的遗传转化虽起步较早,但目前仍然没有建立起高效稳定的黄瓜遗传转化体系,因此,这已成为国内外学者亟需解决的问题。

过敏性诱导反应(Hypersensitive induced reaction,HR),是寄主抵抗活体寄生病原菌侵染的最有效防御机制之一,植物细胞 HR 可以有效防止病原菌向植株其他健康部位侵染和扩展^[8-11],与 HR 反应有关的过敏性诱导反应蛋白(Hypersensitive-induced response protein,HIRP),在植物对抗病原物的过程中起到重要作用^[12-15]。目前,已经在烟草^[7]、玉米^[16]、大麦^[17]、辣椒^[18]、水稻^[15]、小麦^[19]、花生^[20]等栽培作物上克隆到 *HIR* 基因,并证明 *HIR* 基因的表达涉及 HR 反应^[13-20]。但对 *HIR* 蛋白的功能研究较少,仅在辣椒、小麦和水稻上有所涉及^[21]。西北农林科技大学黄瓜课题组对黄瓜抗/感种质接种霜霉菌后的 *CsHIR1* 基因表达做了研究,发现在抗病种质‘PI197088’的 *CsHIR1* 表达量是感病种质‘CC-MC’的 3~7 倍。为探讨 *CsHIR1* 基因在黄瓜霜霉病抗性中的作用,本研究构建 *CsHIR1* 的植物表达载体 pCAMBIA35S-*CsHIR1*,并运用改进的农杆菌介导的遗传转化法对黄瓜进行遗传转化,为进一步研究 *CsHIR1* 基因在黄瓜霜霉病抗性中的作用以及创制抗霜霉病的新种质奠定基础。

收稿日期:2016-03-20 **修回日期:**2016-05-20

基金项目:国家自然科学基金(31171955,31471891);西北农林科技大学优秀人才招聘专项资金(YQ2013003)。

第一作者:任丹莉,女,在读硕士,研究方向为蔬菜育种与生物技术。E-mail:1617814061@qq.com

通信作者:张 颜,男,博士,讲师,主要从事果菜类种质资源与生物技术研究。E-mail:zhangyan2014@nwsuaf.edu.cn

李玉红,女,博士,教授,主要从事黄瓜种质资源与生物技术研究。E-mail:liyuhong73@126.com

1 材料与方法

1.1 植物材料

黄瓜高抗霜霉病种质‘PI97088’由美国威斯康星大学麦迪逊分校瓜类研究室提供,黄瓜易感病种质‘CCMC’购于黑龙江省鑫星农业发展有限公司。

1.2 菌种和质粒

载体 pCAMBIA35S(含卡那霉素和潮霉素 B 抗性)由陕西省油菜中心张彦峰先生赠与,大肠杆菌感受态受体菌株 Top10 以及根癌农杆菌感受态受体菌株 GV3101 均由西北农林科技大学园艺学院蔬菜生理生态与生物技术实验室保存。

1.3 主要试剂

荧光定量试剂盒购于 Takara,反转录试剂盒和 HiProof DNA 聚合酶均购自杨凌杰一生物技术有限公司,DNA 标准分子质量(2 kb)购自广州东盛生物科技有限公司,柱式植物 RNA 提取试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均购自北京天根公司,限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 购自 Fermentas 公司,一步克隆试剂盒 NovoRec 和 2×*Taq* mix 购自上海近岸科技有限公司。引物的合成和序列测定工作,均委托北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.4 试验方法

1.4.1 黄瓜叶片总 RNA 的提取及反转录 以黄瓜种质‘CCMC’和‘PI97088’的幼苗期新鲜叶片为材料,参照天根生化科技(北京)有限公司的植物 RNA 提取试剂盒说明书提取黄瓜叶片总 RNA,反转录用杨凌杰一生物技术有限公司的反转录试剂盒进行。用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测所提 RNA 的质量,并用美国 NanoDrop ND-2000C 紫外可见光分光光度计检测提取的黄瓜 RNA 和 cDNA 浓度。

1.4.2 植物表达载体的构建 基于 In-fusion 技术的 PCR 引物设计原则,运用 Primer Premier 5 软件设计引物, CsHIR1-P-L: 5'-CGGTAC-CCGG GGATCCATGGGTAATCTTTTTTGT-TGTGTGA-3',划线处为载体的同源序列,斜体部分为 *Bam*H I 的酶切位点, CsHIR1-P-R: 5'-TCACCATGGT GTCGACCTAGTGAGAAGT-A GCGGCACCCTGA-3',划线处为载体的同源序列,斜体部分为 *Sal* I 的酶切位点。利用此引物对黄瓜 cDNA 进行扩增得到 *CsHIR1* 基因。

CsHIR1 的 PCR 扩增体系和载体的连接参照陈菲帆等^[22]的方法,扩增程序为:94 ℃预变性 10 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 8 min。用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 对载体 pCAMBIA35S 进行双酶切,酶切体系:模板(100 ng/μL)3 μL, 10×tangobuffer 2 μL, *Sal* I (10 U/μL)0.5 μL, *Bam*H I (10 U/μL)0.5 μL,加水至 10 μL,37 ℃过夜。酶切产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳,按照胶回收试剂盒的步骤回收约 1 300 bp 的单一线性载体片段。将线性载体片段和扩增的 *CsHIR1* 利用 In-fusion 技术^[22]进行连接组成重组质粒 pCAMBIA35S-*CsHIR1*。

1.4.3 转化大肠杆菌 用冻融法将重组质粒 pCAMBIA35S-*CsHIR1* 转入感受态大肠杆菌 Top10,经卡那霉素(50 mg/L)平板筛选后,挑取单克隆,摇菌提质粒。对重组质粒用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam*H I 进行双酶切验证,并利用 *CsHIR1* -P 的扩增引物对重组质粒进行质粒 PCR 检测,将通过双酶切和质粒 PCR 检测证实连接正确的载体,送去测序进行进一步验证。

1.4.4 转化农杆菌 通过冻融法将测序正确的表达载体 pCAMBIA35S-*CsHIR1*,转入根癌农杆菌 GV3101,利福平(50 mg/L)和卡那霉素(50 mg/L)抗性筛选阳性单克隆后挑菌进行大量扩繁。提取农杆菌质粒进行质粒 PCR 验证,并于-80 ℃保存带有目的载体的根癌农杆菌 GV3101。

1.4.5 黄瓜 *CsHIR1* 遗传转化 将构建好的植物表达载体分别转入黄瓜感病种质‘CCMC’和抗病种质‘PI97088’的子叶节,黄瓜的再生体系参照钟辉丽等^[1]的方法,黄瓜的遗传转化体系参照李月等^[23]的方法,并做相应的改进。如为了提高再生芽的成活率,本试验并未对其进行抗生素(卡那霉素和潮霉素 B)筛选,而是待再生苗成活后统一用潮霉素 B 引物进行 PCR 检测。另外,为了提高转化效率,本试验的转化体系中没有预培养阶段,得到的外植体不经预培养直接进行农杆菌侵染。

1.4.6 转化植株的 PCR 鉴定 取移栽成活的再生苗叶片用 CTAB 法提取 DNA,以潮霉素 B 引物进行 PCR 检测来间接判断载体的转入情况。检测后的阳性植株移栽到温室里,开花后进行自交授粉,得到 T1 代后取部分种子继续用潮霉素 B

引物进行 PCR 检测。

1.4.7 转化植株的实时荧光定量分析 对 PCR 检测为阳性的 T1 代植株,采集叶片参照天根生化科技(北京)有限公司的植物 RNA 提取试剂盒说明书提取黄瓜叶片总 RNA,用反转录试剂盒进行反转录,得到 cDNA 置于-20 ℃备用。

用荧光定量试剂盒 SYBR Premix Ex *Taq*TM (Perfect Real Time, TaKaRa)对转基因 T1 代黄瓜的 *CsHIR1* 进行定量分析,所用仪器为 Cfx Connect 型定量 PCR 仪,内参基因用 *UBI*。反应体系为:SYBR Premix Ex *Taq*TM 10 μL,cDNA 1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,加 ddH₂O 至 20 μL,每个样品重复 3 次。反应条件为预变性 95 ℃ 30 s;30 个循环,95 ℃ 20 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s(参考 TaKaRa 操作手册)。

2 结果与分析

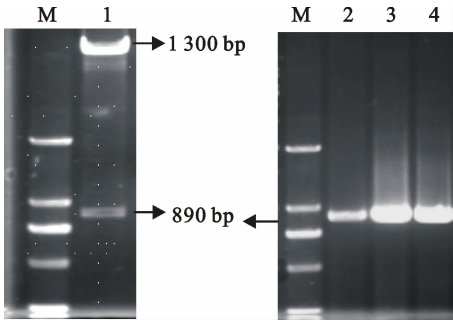
2.1 黄瓜 *CsHIR1* 表达载体的检测

对重组质粒 pCAMBIA35S-*CsHIR1* 用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Bam* H I 进行双酶切分别得到 890 bp 的 *CsHIR1* 和 1 300 bp 的载体片段,并以重组质粒 pCAMBIA35S-*CsHIR1* 为模板,以 *CsHIR1* -P 为引物,利用 HiProof 高保真酶扩增目的基因*CsHIR1*,进行质粒 PCR 检测。双酶切和质粒 PCR 的凝胶(10 g/L 琼脂糖)电泳检测结果显示,表达载体 pCAMBIA35S-*CsHIR1* 初步构建成功(图 1)。然后再将重组质粒 pCAM

BIA35S-*CsHIR1* 送北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行测序,测序比对结果显示载体 pCAM-BIA35S-*CsHIR1* 构建成功。

2.2 黄瓜的遗传转化

采用优化的农杆菌介导的遗传转化体系,具体的培养基配方和培养条件见表 1。在此遗传转化体系中,没有预培养阶段,切好的子叶节直接进行农杆菌侵染。侵染液中农杆菌的 OD₆₀₀ 为 0.2,即用侵染液将对数期的菌液稀释 3~4 倍再进行侵染,侵染液中农杆菌浓度过高易造成污染,过低则转化效率低。生根培养时,未对再生苗进行抗生素(卡那霉素和潮霉素 B)筛选,最后移栽成活的再生苗统一用潮霉素 B 引物进行 PCR 检测。



M. DL2000 DNA ladder; 1. 质粒双酶切 Double digested plasmid; 2~4. 质粒 PCR Plasmid PCR; 箭头表示基因 *CsHIR1* (890 bp) 和载体片段(1 300 bp) Arrows indicate the amplification of the *CsHIR1* (890 bp) and carrier segment(1 300 bp)

图 1 pCAMBIA35S-*CsHIR1* 重组质粒的检测
Fig. 1 The detection of recombinant plasmids
pCAMBIA35S-*CsHIR1*

表 1 黄瓜遗传转化体系

Table 1 The system of cucumber genetic transformation

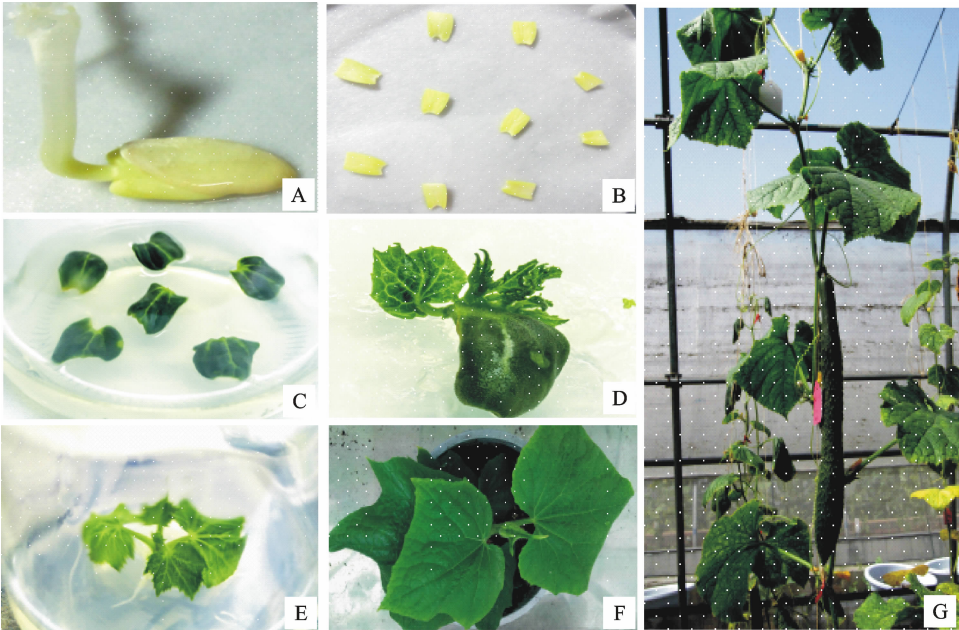
时期 Period	培养基配方/试剂 Culture media formula/Reagents	培养条件 Incubation time and conditions
种子消毒 Seed disinfection	75%酒精 alcohol	30 s
	2.7%~3% NaClO	15~20 min
	无菌水 Sterile water	3—5 times(3 min/time)
种子培养 Seed culture	1/2MS+30 g/L 蔗糖 sucrose+7 g/L 琼脂 agar(pH=5.8)	暗培养 Dark culture (3—5 d)
菌液制备 Preparation of bacteria	YEP+Rif 50 mg/L+Kan 50 mg/L	至对数生长期 Until logarithmic growth phase(OD ₆₀₀ =0.6—0.8)
侵染 Infection	1/2MS+10 g/L 蔗糖 sucrose+农杆菌 Agrobacterium (OD ₆₀₀ =0.2)	黑暗下摇晃 Shaking in dark conditions (15—18 min)
共培养 Co-culture	MS+30 g/L 蔗糖 sucrose+7 g/L 琼脂 Agar +6-BA 0.5 mg/L+ABA 1 mg/L	暗培养 Dark culture(3 d)
再生培养 Regeneration Culture	MS+30 g/L 蔗糖 Sucrose+7 g/L 琼脂 Agar+6-BA 0.5 mg/L+ABA 1 mg/L+150 mg/L 特美汀 Timentin	至芽长到 1.5~2.0 cm Until bud length 1.5—2.0 cm
生根培养 Rooting culture	1/2MS+7 g/L 琼脂 Agar+30 g/L 蔗糖 Sucrose+150 mg/L 特美汀 Timentin	至长出大量须根 Until it grow a large number of fibrous roots

经过种子培养,切取子叶节,制备农杆菌,农杆菌侵染和共培养,外植体再生培养,再生苗生根培养,再生苗的驯化,得到 T0 代转化植株,将其移栽到大田里进行自交授粉获得 T1 代(图 2)。

2.3 黄瓜 *CsHIR1* 转基因植株的检测

2.3.1 转基因植株的 PCR 检测 对 T0 代和 T1

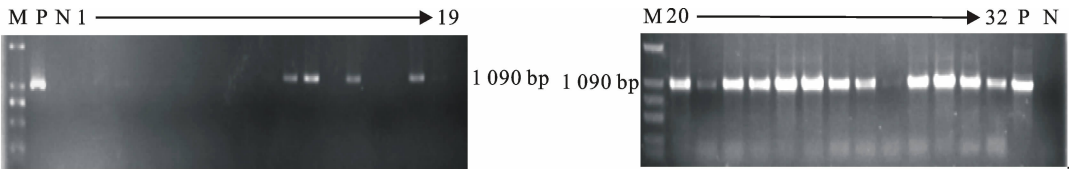
代的转化植株均用潮霉素 B 基因(1 090 bp)进行检测,琼脂糖凝胶电泳结果显示,T0 代获得 18 株‘CCMC’和 6 株‘PI197088’共 25 个阳性植株,T0 代阳性率最高可达 17.3%(图 3),其中 8 株(6 株‘CCMC’和 2 株‘PI197088’)阳性株得到自交种子 T1 代,T1 代阳性率为 44.7%(图 3)。



A. 半出壳的种子 Semi-hatched seeds; B. 共培养的外植体 Co-cultured explants; C. 再生培养的外植体 Explants in regeneration training period; D. 出芽的外植体 Budding explant; E. 再生苗 Regeneration plant; F. 转基因植株 Transgenic plant; G. 已结瓜的转基因植株 Transgenic plants with fruits

图 2 黄瓜的遗传转化过程

Fig. 2 The process of cucumber genetic transformation



M, DL2000 DNA ladder; P, 含目的基因的重组质粒 The plasmid carrying *CsHIR1* gene ; N, 未转化的植株 The normal plant; 1~19, 部分 T0 代转化株 Some transformants from T0 generation; 20~32, 部分 T1 代植株 Some transformants from T1 generation; 箭头表示扩增的潮霉素 B 基因 The arrow indicates the amplification of the Hyg gene

图 3 T0 和 T1 代转化株的 PCR 检测

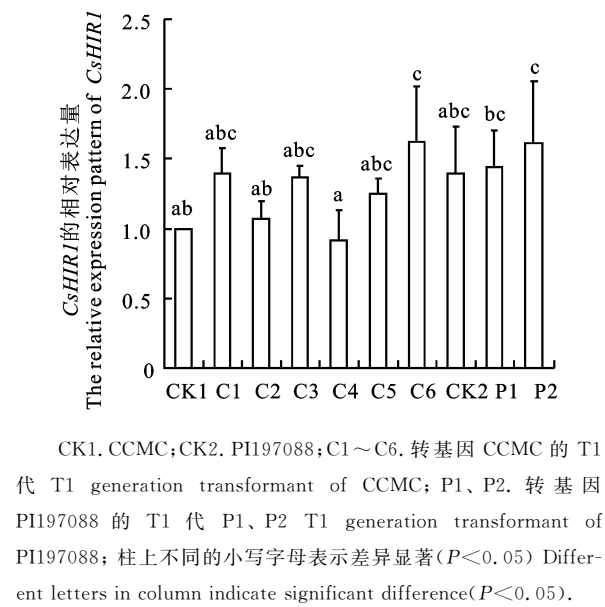
Fig. 3 The PCR detection of T0 and T1 generation transformant

2.3.2 转基因植株的实时荧光定量检测 对 PCR 检测为阳性的 T1 代,用实时荧光定量法分析基因 *CsHIR1* 的表达情况,结果表明各 T1 代之间的 *CsHIR1* 表达差异不是很明显(图 4),T1 代转基因植株 C1~C5 和 P1~P2 的 *CsHIR1* 表达量与各自的对照 CK1、CK2 无显著差异,只有转基因植株 C6 与其对照 CK1 有着显著性差异

($P<0.05$)。

3 讨论

本研究以 *CsHIR1* 基因为研究对象,成功构建植物表达载体 pCAMBIA35S*CsHIR1* ,并初步实现 *CsHIR1* 在黄瓜中的遗传转化,获得转基因 T0 代和 T1 代的阳性植株,经统计计算不同批次



CK1. CCMC; CK2. PI197088; C1~C6. 转基因 CCMC 的 T1 代 T1 generation transformant of CCMC; P1、P2. 转基因 PI197088 的 T1 代 P1、P2 T1 generation transformant of PI197088; 柱上不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different letters in column indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 4 *CsHIR1* 在不同转基因植株的 T1 代叶片中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression pattern of *CsHIR1* in the leaves of different T1 generation transformant

T0 代的转化率为 0~17.3%, 其中 6 株‘CCMC’和 2 株‘PI197088’的转化株得到了转基因 T1 代。

鉴于目前黄瓜的遗传转化效率较低, 国内外学者主要从外植体的基因型、外植体的种类、生长调节剂、农杆菌种类、侵染条件等方面做了研究^[24]。本试验选用 2 种基因型的外植体‘PI197088’和‘CCMC’, 结果表明, 这 2 种外植体的转化率基本相同。在种子培养时间上, 研究发现 4~5 d 苗龄的子叶节的再生率和转化效率较高, 这与刘培培等^[25]的研究结果相同; 在外植体培养条件上, 试验结果显示再生培养前(种子培养、外植体侵染农杆菌和共培养)使外植体一直保持在黑暗条件下, 可以提高黄瓜的转化效率, 这与王烨等^[26]认为一定时间的暗培养可以提高外植体的再生率这一结果相似, 有研究认为暗处理可以减少外植体溢出酚类物质, 从而有利于不定芽的形成进而提高再生率^[27]。在再生苗的检测上, 本实验室对是否加抗生素进行筛选做了比较, 发现抗生素筛选会降低黄瓜的转化效率和阻碍再生苗的生长, 抗生素筛选的植株生长势弱, 须根浮于培养基表面, 这与王学斌等^[28]报道的一定浓度的抗生素筛选可以提高转化效率不同, 造成这种不同的原因可能是不同基因型外植体对抗生素的耐受力不同; 在预培养时间上, 切好的子叶节不经预培养直接侵染农杆菌转化效率与经过 1~2 d 预

培养后侵染农杆菌的转化效率相近, 这与王艳蓉等^[29]报道的预培养可以提高抗性芽率不同, 可能是由于本试验所用转化条件以及外植体基因型与前人有所不同, 其中 1 株‘CCMC’的转基因 T1 代与对照组有显著性差异, 证明目标基因已经转化并实现了转录水平的表达^[30]。

本研究通过优化部分条件建立适合外植体‘PI197088’和‘CCMC’的遗传转化体系, 并且得到转基因 T1 代, 初步证明目的基因转入黄瓜中。后续工作本课题组将会围绕 *CsHIR1* 的转化植株进行进一步的检测和功能验证, 以期获得抗霜霉病的黄瓜新种质。

参考文献 Reference:

[1] 钟辉丽, 李玉红, 陈雪琳, 等. 黄瓜离体器官再生体系的优化[J]. 中国农学通报, 2015, 31(10): 80-86.
ZHONG H L, LI Y H, CHEN X L, et al. Optimization of regeneration system in *Cucumis sativus* L [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(10): 80-86 (in Chinese with English abstract).

[2] SAVORY E A, GRANKE L L, QUESSADA-OCAMPO L M, et al. The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(3): 217-226.

[3] ALES LEBEDA, YIGAL COHEN. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) — biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 129(2): 157-192.

[4] ADHIKARI B N, SAVORY E A, VAILLANCOURT B, et al. Expression profiling of *Cucumis sativus* in response to infection by *Pseudoperonospora cubensis* [J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34954.

[5] 田花丽, 刘 缙, 张彦锋, 等. 黄瓜高效遗传转化体系的建立及银杏抗菌肽转化[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 134-139.
TIAN H L, LIU J, ZHANG Y F, et al. Establishment of an efficient genetic transformation system of cucumber and transformation of ginkgo anti-fungal peptide gene [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2011, 20(2): 134-139 (in Chinese with English abstract).

[6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 585-586.
WANG G L, FANG H J. Plant Genetic Engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998: 585-586 (in Chinese).

[7] 白 婧, 屈淑平, 崔崇士. 瓜类蔬菜组织培养与遗传转化研究进展[J]. 中国瓜菜, 2008, 21(4): 33-37.
BAI J, QU SH P, CUI CH SH. Advances in tissue culture and genetic transformation of cucurbit vegetables [J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2008, 21(4): 33-37 (in Chinese with English abstract).

[8] DANGL J L, DIETRICH R A, RICHBERG M H. Death don't have mo mercy; cell death programs in plant-microbe interactions [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(10): 1793-1807.

[9] LAM E, KATO N, LAWTON M. Programmed cell

- death, mitochondria and the plant hypersensitive response. [J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 848-853.
- [10] HEATH M C. Hypersensitive response-related death. [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44(3): 321-334.
- [11] 张 岗, 孙燕飞, 李依民, 等. 小麦过敏性诱导反应基因 TaHIR4 的克隆及序列分析[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2010, 38(8): 111-118.
- ZHANG G, SUN Y F, LI Y M, *et al.* Cloning and sequence analyses of a hypersensitive induced reaction gene TaHIR4 in wheat [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2010, 38(8): 111-118 (in Chinese with English abstract).
- [12] YUX M, ZHAOW Q, YANG W X, *et al.* Characterization of a Hypersensitive response-induced gene TaHIR3 from wheat leaves infected with leaf rust[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 31(2): 314-322.
- [13] KARRER E E, BEACHY R N, HOLT C A. Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36(5): 681-690.
- [14] JUNG H W, LIM C W, LEE S C, *et al.* Distinct roles of the pepper hypersensitive induced reaction protein gene CaHIR1 in disease and osmotic stress, as determined by comparative transcriptome and proteome analyses [J]. *Planta*, 2008, 227(2): 409-425.
- [15] LIANG Z, CHEUNG M Y, LI M W, *et al.* Rice hypersensitive induced reaction protein 1(OsHIR1) associates with plasma membrane and triggers hypersensitive cell death [J]. *Bmc Plant Biology*, 2010, 10(6): 290.
- [16] NADIMPALLI R, YALPANI N, JOHAL G S, *et al.* Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(38): 29579-29586.
- [17] ROSTOKS N, SCHMIERER D, KUDMA D, *et al.* Barley putative hypersensitive induced reaction genes: genetic mapping, sequence analyses and differential expression in disease lesion mimic mutants[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(6): 1094-1101.
- [18] HO WON J, BYUNG KOOK H. The leucine-rich repeat (LRR) protein, CaLRR1, interacts with the hypersensitive induced reaction (HIR) protein, CaHIR1, and suppresses cell death induced by the CaHIR1 protein[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(4): 503-514.
- [19] DUAN Y, GUO J, SHI X, *et al.* Wheat hypersensitive-induced reaction genes TaHIR1 and TaHIR3 are involved in response to stripe rust fungus infection and abiotic stresses [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(2): 273-283.
- [20] 刘 羽, 赵传志, 李长生, 等. 花生 HIR 基因的克隆表达与进化分析[J]. 山东农业科学, 2014 (5): 1-6.
- LIU Y, ZHAO CH ZH, LI CH SH, *et al.* Cloning, expression and evolution analysis of peanut HIR gene[J]. *Shandong Agricultura Sciences*, 2014 (5): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [21] 毛双双, 李玉红, 周 旋, 等. 黄瓜过敏性诱导反应蛋白基因(CsHIR1)原核表达及其多克隆抗体制备[J]. 西北植物学报, 2014, 34(5): 884-889.
- MAO SH SH, LI Y H, ZHOU X, *et al.* Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cucumber CsHIR1 gene[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2014, 34 (5): 884-889 (in Chinese with English abstract).
- [22] 陈菲帆, 王琪琦, 钟辉丽, 等. 基于 In-fusion 技术的 ERECTA 基因植物表达载体的构建[J]. 北方园艺, 2015(18): 110-115.
- CHEN F F, WANG Q Q, ZHONG H L, *et al.* Construction of ERECTA gene plant expression vector that based on in-fusion technology[J]. *Northern Horticulture*, 2015 (18): 110-115 (in Chinese with English abstract).
- [23] 李 月, 赵俊龙, 杨绪勤, 等. 黄瓜遗传转化体系优化及表皮毛基因 Gl 的转化[J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2014, 32(6): 7-13.
- LI Y, ZHAO J L, YANG X Q, *et al.* Optimization of genetic transformation system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and transformation of cucumber trichome gene Gl[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science Edition)*, 2014, 32(6): 7-13 (in Chinese with English abstract).
- [24] WANG S L, KU S S, XING GUO Y E, *et al.* Current status of genetic transformation technology developed in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14(3): 469-482.
- [25] 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[J]. 园艺学报, 2012, 39(5): 869-878.
- LIU P P, JIANG ZH SH, WANG M L, *et al.* Expression vector construction of rubisco activase gene csrca and genetic transformation to cucumber[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(5): 869-878 (in Chinese with English abstract).
- [26] 王 烨, 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[J]. 西北植物学报, 2011, 31(9): 1793-1798.
- WANG Y, GU X F, ZHANG SH P. Effect of dark culture on enzyme and soluble protein variance during cucumber cotyledon node regeneration[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2011, 31(9): 1793-1798 (in Chinese with English abstract).
- [27] 周鹤莹, 张 玮, 张 卿, 等. 森林草莓 'Hawaii4' 高效遗传转化系统的建立[J]. 北京农学院学报, 2015, 30(1): 10-14.
- ZHOU H Y, ZHANG W, ZHANG Q, *et al.* Establishment of high-efficiency transformation of the woodland strawberry (*Fragaria vesca*, Hawaii 4) [J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2015, 30(1): 10-14 (in Chinese with English abstract).
- [28] 王学斌, 司龙亨, 孟 茜, 等. 潮霉素 B 浓度和农杆菌浸泡时间对黄瓜外植体再生的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 2013, 44(2): 143-147.
- WANG X B, SI L T, MENG Q, *et al.* Effect of hygromycin concentration and agrobacterium immersing time on cucumber (*Cucumis sativus* L.) explant regeneration [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2013, 44(2): 143-147 (in Chinese with English abstract).
- [29] 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[J]. 上海交通大学学报 (农业科学版),

2006,24(2):152-156.

WANG Y R,CHEN L M,PAN J S,*et al.* Establishment of high effective regeneration system in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agriculture Science Edition)*, 2006, 24(2): 152-156 (in Chinese with English abstract).

[30] 宫雪超,于丽杰,高金秋. 转基因植物的检测与鉴定[J]. 牡丹江师范学院学报(自然科学版),2007(1):15-17.

GONG X CH,YU L J,GAO J Q. Detection and identification of transgenic plants[J]. *Journal of Mudanjiang Teachers' College (Natural Sciences Edition)*, 2007(1): 15-17 (in Chinese).

Construction of Expression Vector of Defense Genes *CsHIR1* from
Cucumber and Its Genetic Transformation Research

REN Danli, CHEN Feifan, WANG Hui,
QIN Yaguang, ZHANG Yan and LI Yuhong

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract In order to study the genetic *CsHIR1* features and optimize the cucumber genetic transformation system, *CsHIR1* was studied to transform into cucumber plants. The plant expression vector pCAMBIA35S-*CsHIR1* was constructed by In-fusion technology. After double enzymes *Sal* I and *Bam*H I digestion detection, plasmid PCR detection and sequence identification, the results showed that expression vector pCAMBIA35S-*CsHIR1* has been successfully built and transferred into agrobacterium GV3101. Using the cotyledon node of cucumber germplasm ‘CCMC’ of susceptible to downy mildew and high-resistant germplasm ‘PI197088’ as explant, *CsHIR1* gene has been initially proved to transfer into cucumber through the optimization of agrobacterium-mediated genetic transformation system. The 25 positive plants have been obtained by PCR detection, and 8 of which got T1 seeds. The PCR detection positive rate from the T1 generation was 44. 7%. We examined the expression of *CsHIR1* by real time quantitative PCR in seedlings of T1 generation, one of the six lines was higher than CK indicating the *CsHIR1* has been transformed into cucumber.

Key words Cucumber; *CsHIR1* gene; Expression vector; Genetic transformation

Received 2016-03-20 **Returned** 2016-05-20

Foundation item National Natural Science Foundation of China (No. 31171955, No. 31471891); Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology Research and Special Talents Funded Projects(No. YQ2013003).

First author REN Danli, female, master student. Research area:vegetable breeding and biotechnology. E-mail:1617814061@qq.com

Corresponding author ZHANG Yan, male, Ph. D, lecturer. Research area:germplasm resources and biotechnology in fruit vegetable. E-mail:zhangyan2014@nwsuaf. edu. cn

LI Yuhong, female, Ph. D, professor. Research area:germplasm resources and biotechnology in cucumber. E-mail: liyuhong73@126.com

(责任编辑:潘学燕 **Responsible editor: PAN Xueyan**)