



夏磊,王团团,段莉莉,等. 黄瓜亚硝酸还原酶基因(*CsNiR*)的克隆及对外植体分化的影响[J]. 南京农业大学学报 2020 43(2): 231-237.

XIA Lei, WANG Tuantuan, DUAN Lili, et al. Cloning of nitrite reductase gene(*CsNiR*) in cucumber and its effect on explant differentiation[J]. Journal of Nanjing Agricultural University 2020 43(2): 231-237.

黄瓜亚硝酸还原酶基因(*CsNiR*)的克隆及对外植体分化的影响

夏磊,王团团,段莉莉,李季*,陈劲枫

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院,江苏南京 210095)

摘要: [目的]本文旨在揭示黄瓜亚硝酸还原酶基因(*CsNiR*)的表达特征及其在黄瓜再生体系中的功能。[方法]以黄瓜自交系 CCMC 为试验材料,克隆 *CsNiR* 的编码区序列全长,对其进行生物信息学分析;利用本氏烟草表皮细胞瞬时表达系统对 *CsNiR* 蛋白进行亚细胞定位,并采用 RT-qPCR 技术分析 *CsNiR* 基因在不同组织中的表达量。对不同基因型黄瓜子叶节外植体的 NiR 活性与外植体分化率进行相关性分析,测定在不同培养条件下不同基因型黄瓜子叶节外植体 *CsNiR* 基因表达量,并统计在不同 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例(1:5、1:2、1:1、2:1)培养条件下外植体分化率情况。[结果]*CsNiR* 基因 ORF 全长为 1 752 bp,编码 583 个氨基酸,具有含血红素蛋白 β -化合物区域和 4Fe-4S 区域的完整 NiR 蛋白结构。系统进化树分析发现植物中 *CsNiR* 高度保守,黄瓜与甜瓜氨基酸序列相似性高达 96%。RT-qPCR 结果表明,*CsNiR* 基因在黄瓜成熟叶表达量最高,雄花中次之,在茎尖和侧芽等分化组织中表达量最低,具有组织特异性。亚细胞定位结果表明 *CsNiR* 主要在细胞膜和叶绿体中表达。对不同基因型黄瓜子叶节的 NiR 活性与再生率的测定发现, NiR 活性与黄瓜外植体分化率显著负相关。在不同基因型黄瓜外植体诱导分化过程中,*CsNiR* 基因的表达在含有诱导激素培养基上的表达量显著低于无诱导激素的培养基,当 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1:5 时,黄瓜子叶节外植体分化率最高。[结论]植物中 NiR 高度保守,*CsNiR* 基因的表达具有特异性,在茎尖等分生组织表达含量最低, NiR 活性与外植体分化率呈负相关关系,降低 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例有助于提高黄瓜外植体分化率。

关键词: 黄瓜; *CsNiR* 基因; 子叶节; 外植体; 分化率

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2020)02-0231-07

Cloning of nitrite reductase gene(*CsNiR*) in cucumber and its effect on explant differentiation

XIA Lei, WANG Tuantuan, DUAN Lili, LI Ji*, CHEN Jinfeng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objectives] This paper aimed to reveal the expression characteristics of nitrite reductase gene(*CsNiR*) and its function in cucumber regeneration system. [Methods] The coding region sequence full-length of *CsNiR* was cloned from cucumber inbred line CCMC of which the bioinformatics analysis was carried out. The subcellular localization of *CsNiR* protein was identified by the transient expression system of *Nicotiana benthamiana* epidermal cells. The expression pattern of *CsNiR* in different tissues of CCMC was detected by RT-qPCR. Correlation between NiR activity and explant differentiation rate in different genotypes cucumber cotyledonary-nodes were analyzed. Transcriptional changes of *CsNiR* in different genotypes of cucumber cotyledonary-nodes under different culture conditions were also analyzed by RT-qPCR, and the differentiation rates of explants under different $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratios(1:5, 1:2, 1:1, 2:1) were also counted. [Results] The ORF of *CsNiR* gene was 1 752 bp in length and encoded 583 amino acids. It had a complete NiR protein structure containing the heme protein β -compound region and the 4Fe-4S region. Phylogenetic tree analysis showed that *CsNiR* was highly conserved in plants, and the amino acid sequence similarity between cucumber and melon reached to 96%. RT-qPCR suggested that *CsNiR* had tissue-specific expression characteristics where showed the highest expression in mature leaves of cucumber followed by male flowers, but the lowest expression in the meristem containing organs such as shoot tips and lateral buds. Subcellular localization results indicated that *CsNiR* was mainly expressed in cell membrane and chloroplast. The endogenous NiR activity and regeneration rate of cotyledonary-nodes from different cucumber genotypes showed significant negative correlation. The expression of *CsNiR* in cotyledonary-nodes under induce-medium was significantly lower than that in the inducer-free medium. When $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio was 1:5, the explant differentiation rate of cucumber cotyledonary-nodes was highest. [Conclusions] NiR homologs were highly conserved in plant. The cucumber *CsNiR* gene showed tissue specific expression and the lowest in the shoot meristem. The NiR activity was negatively correlated with the explant differentiation. Decreasing the $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio would help to increase

收稿日期: 2019-06-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD1000800)

作者简介: 夏磊,硕士研究生,*通信作者: 李季,副教授,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究. E-mail: Liji1981@njau.edu.cn.

differentiation rate of cucumber explants.

Keywords: cucumber; *CsNiR* gene; cotyledonary-node; explant; differentiation rate

随着黄瓜基因组测序的完成与植物基因工程的快速发展,转基因技术成为黄瓜品种改良的重要方法之一^[1-2]。高效的离体再生体系能够显著提高黄瓜遗传转化效率^[3-5]。目前,黄瓜离体再生培养研究主要集中在基因型、苗龄、外植体、激素等方面,关于其分子机制鲜有研究^[6-8]。Wang等^[9]通过QTL定位与GWAS关联分析,预测了1个与黄瓜离体再生相关的基因*Csa1G642540*,且过表达该基因能显著提高外植体分化率。

氮是植物生长发育必需的营养元素,植物吸收的主要氮源为硝态氮和铵态氮,不同植物对不同氮源的吸收具有偏好性^[10]。不同氮源对植物营养元素的吸收、根系发育、光合生理、内源激素的调节等植物生长发育过程具有重要影响^[11]。植物体内氮的同化主要受到硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(NiR)的调控,NR降解 NO_3^- 为 NO_2^- ,NiR催化 NO_2^- 还原为 NH_4^+ ^[12]。研究发现,NiR基因与植物再生过程密切相关。Nishimura等^[13-14]发现控制水稻再生主效基因为亚硝酸还原酶编码基因(*OsNiR*),人工过量表达*OsNiR*可以显著提高水稻再生能力,并建立了一个高效的水稻遗传转化体系。研究发现,小麦*TaNiR*通过促进其愈伤组织的光合代谢,从而提高其再生效率^[15]。杜光玲等^[16]对玉米不同类型愈伤组织分化中硝态氮代谢的差异进行分析,发现高活性的NiR可以诱导产生优良愈伤组织,从而提高植株再生效率。在香蕉中,也发现*NiR*基因可能是影响外植体再生的正调控因子^[17]。虽然*NiR*基因对植物外植体分化过程具有重要影响,但目前在黄瓜中尚未见报道。

本试验克隆了黄瓜亚硝酸还原酶基因(*CsNiR*),研究其在黄瓜各个组织器官和亚细胞层面的表达特征,并探讨*CsNiR*对黄瓜外植体分化的影响,旨在为进一步优化黄瓜遗传转化再生体系提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取6个不同基因型黄瓜自交系作为试验材料:CCMC(华北型)、XTMC(华北型)、Amir(欧洲温室型)、“二早子”(华南型)、NJMC(美国生态型)、7011A(加工型),由南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新重点实验室创制和保存,在南京农业大学白马基地温室和本实验室的组织培养室进行种植培养。

外植体培养:将黄瓜种子在温水中浸泡2~3 h,然后将种子用无水乙醇表面灭菌1 min,并将2%次氯酸钠表面灭菌15~20 min,然后用无菌水冲洗3遍。将消毒好的种子种在MS培养基中[4.43 g·L⁻¹ MS粉+30 g·L⁻¹蔗糖+2.8 g·L⁻¹结冷胶,pH(5.8±0.03)] 28℃黑暗条件下萌发3~6 d。待子叶直立刚刚展开,却未完全展开时,纵向切割每个子叶,剔除生长点,获得2个外植体。将来自不同基因型的外植体平铺在MS培养基、MS⁺培养基(MS培养基+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA)及不同氮素比例培养基,并转移至26℃的正常培养条件,16 h光照/8 h黑暗,光照度为2 000 lx。4个不同氮素比例的培养基基本成分包括NH₄Cl、KNO₃、铁盐等营养成分。其中,铵盐浓度分别为10、20、30、40 mmol·L⁻¹,硝酸盐浓度分别为50、40、30、20 mmol·L⁻¹,即NH₄⁺/NO₃⁻比例分别为1:5、1:2、1:1、2:1,pH值平均为5.8±0.03。

1.2 *CsNiR* 基因的克隆

利用RNA simple total RNA Kit(北京 Tiangen 公司)提取CCMC叶片总RNA,利用Prime Script RT Reagent Kit(大连 TaKaRa 公司)将RNA反转录成cDNA。通过黄瓜全基因组数据库(<http://cucurbit-genomics.org>)检索*NiR*基因序列,获得黄瓜*CsNiR*基因全长序列。利用Primer Premier 5.0软件获得*CsNiR*基因正、反向引物(表1)。利用Prime STAR[®] GXL DNA Polymerase(大连 TaKaRa 公司)扩增目标基因片段,对PCR产物进行切胶回收,连接T载体,委托南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.3 *CsNiR* 的序列分析

利用DNAMAN 6.0软件获得*CsNiR*基因编码的氨基酸序列;通过InterProScan sequence search(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>)进行结构域预测;利用Prosites软件(<http://prosite.expasy.org/>)找到酶活位点;利用NCBI数据库BLAST工具,获得不同物种*CsNiR*基因及氨基酸序列;利用MEGA 7.0软件构建系统进化树;利用SignalP 4.1软件进行信号肽分析预测;利用ProtComp v. 9.0、PSORT和TargetP1.1软件对*CsNiR*蛋白亚细胞定位在线预测。

表 1 本研究所用引物
Table 1 The primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	用途 Usage
<i>CsNiR</i> -PCR-F/R	TTTCTACATCCAAGCACACTAGCTATC/ TTTGCCCTTTTCTCTACTAATCAG	<i>CsNiR</i> 基因克隆 Cloning of <i>CsNiR</i> gene
<i>Csa2M301530.1</i> -qPCR-F/R	ATTGTTCTCAGTGGTGTTCTAC/ CCTTTGAGATCCACATCTGCT	RT-qPCR 中内参基因引物 Primer of reference gene for RT-qPCR
<i>CsNiR</i> -qPCR-F/R	GAGGACATCGTCCCTCTCTG/ AAATCCTCCGACGATGCTCT	RT-qPCR 中 <i>CsNiR</i> 特异性引物 Special primer of <i>CsNiR</i> for RT-qPCR
<i>CsNiR</i> -C-F/R	ATCCCCATGTCCTCCTCTT/ CCCATCCTCTCTTCTCTCT	亚细胞定位 Subcellular localization

1.4 *CsNiR* 的亚细胞定位

将回收的目的片段与经 *Sma* I 酶切后的载体 pGreen0029 进行 T₄ 连接,构建融合表达载体 pGreen0029-*CsNiR*::GFP。表达载体和空载体通过注射法转化本氏烟草表皮细胞,遮光培养 72 h 后,用激光共聚焦显微镜观察细胞内 GFP 激发的绿色荧光信号和叶绿体激发的红色荧光信号。

1.5 *CsNiR* 的荧光定量 PCR

分别取黄瓜 CCMC 的根、茎、成熟叶、幼叶、雄花、雌花、果实、茎尖、侧芽作为样品。其中,当植株长至 18~20 节位时,取成熟叶(中部第 5、6 片叶)、幼叶(顶部第 2、3 片叶)、果实(雌花开后 3~4 d);外植体取子叶节再生区域,即 MS 和 MS⁺培养基中培养 0、7、14 d 时不同基因型黄瓜子叶节外植体,每个样品 3 个重复。以上述样品的 cDNA 为模板,使用 Real-Time PCR 检测系统(Bio-rad ,CFX96 ,USA) 进行实时定量 PCR 反应。选用黄瓜看家基因 *Csa2M301530.1* 作为内参基因^[18]。根据扩增的 *CsNiR* 序列设计定量 PCR 引物,见表 1。实时定量 PCR 按照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(大连 TaKaRa 公司) 说明书进行。20 μL 反应体系: cDNA 1.0 μL ,正、反向荧光定量引物各 0.5 μL ,SYBR Green I mix 10 μL 和 ddH₂O 8 μL。重复 3 次。使用 Excel 2007 软件分析不同组织中基因表达水平,通过公式 2^{-ΔΔC_T} 计算基因相对表达量^[19]。

1.6 黄瓜亚硝酸还原酶活性及子叶节再生能力的测定

根据 Nishimura 等^[13] 提供的方法,测定黄瓜子叶节再生区域内 NiR 的活性。将不同基因型黄瓜的子叶节外植体平铺在不同培养基中,培养 14 d 左右。对分化出丛芽的外植体进行统计,每次统计 50 个外植体,3 次重复。分化率=分化芽的外植体数/外植体总数×100%。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *CsNiR* 基因的克隆及序列分析

以黄瓜 CCMC 叶片 cDNA 为模板,用引物 *CsNiR*-PCR-F/R 进行 PCR 扩增,获得 1 752 bp 扩增片段(图 1),测序结果与黄瓜基因组数据中 *NiR* 基因(*CsaV3_3G018610*) 序列一致。*CsNiR* 基因的结构如图 2 所示,具有 4 个外显子和 3 个内含子,编码 583 个氨基酸。通过 InterProScan sequence search 进行结构域预测,发现 *CsNiR* 具有完整的 NiR 蛋白结构,含血红素蛋白 β-化合物区域(G3DSA)、4Fe-4S 区域(PF0177),属于 NiR 超级家族(图 2)。利用 Prosite 软件对黄瓜亚硝酸还原酶活性位点进行分析,黄瓜 NiR 序列区域的 499~515 的 TGCPTCGQVQVADIGF 为 *CsNiR* 蛋白的主要活性位点(PS00365)。

2.2 黄瓜 *CsNiR* 蛋白氨基酸序列的比对及进化关系

将 DNAMAN 6.0 软件翻译获得的 *CsNiR* 编码的氨基酸序列在 NCBI 蛋白数据库中比对,发现该蛋白与甜瓜、印度南瓜、西瓜等 18 个物种 NiR 蛋白有 76%~96% 的相似性,其中与甜瓜的蛋白相似性最高为 96%。系统进化树分析结果(图 3) 显示,这些蛋白序列聚为 2 类,一类为黄瓜、烟草和拟南芥等双子叶植物,一类为水稻、小麦等单子叶植物,且葫芦科作物中 NiR 高度保守。

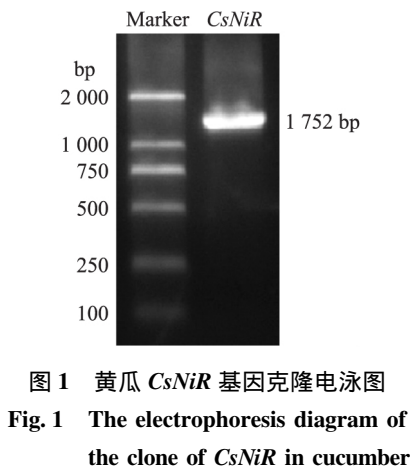


图 1 黄瓜 *CsNiR* 基因克隆电泳图

Fig. 1 The electrophoresis diagram of the clone of *CsNiR* in cucumber

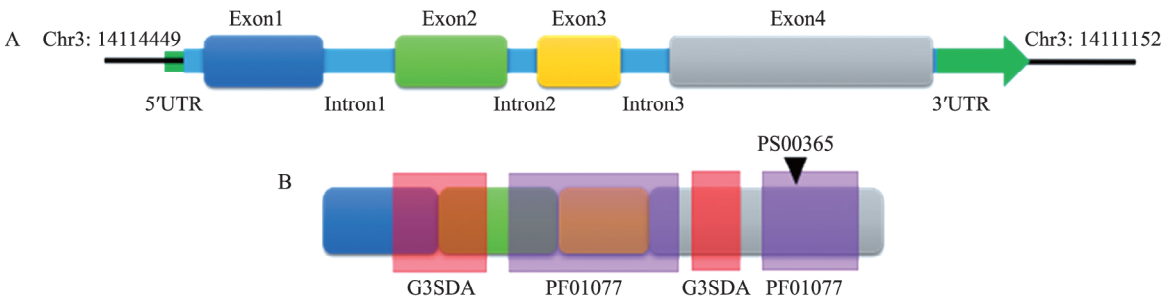


图 2 黄瓜 CsNiR 的基因(A) 和蛋白结构(B)

Fig. 2 Genomic(A) and protein structure(B) of CsNiR in cucumber

Exon: 外显子; Intron: 内含子; G3SDA: 血红素蛋白 β -化合物 Heme protein β -compound; PF01077: 4Fe-4S.

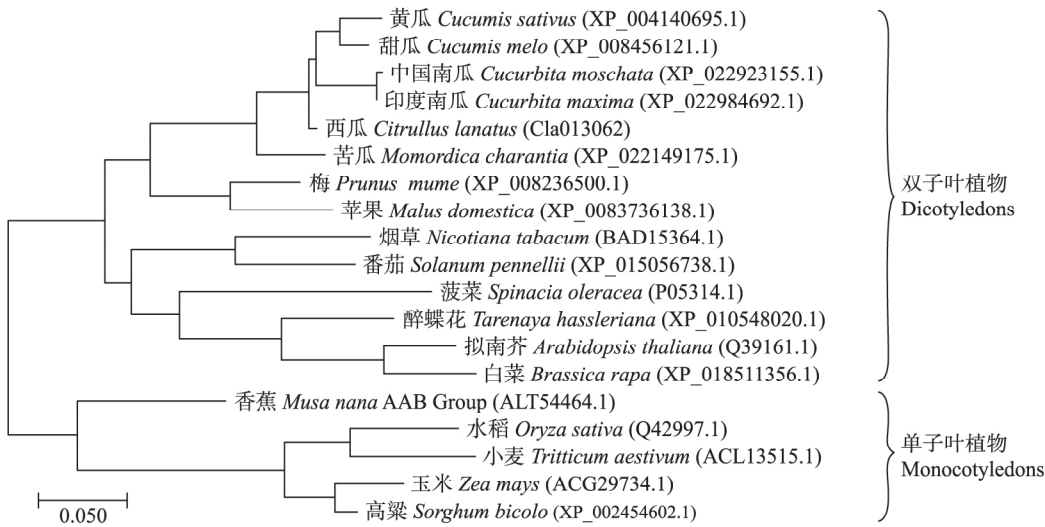


图 3 黄瓜与其他植物 CsNiR 蛋白系统进化树分析

Fig. 3 The phylogenetic tree analysis of CsNiR in cucumber and other plants

2.3 CsNiR 蛋白亚细胞定位

利用 SignalP 4.1 软件进行信号肽预测,结果显示 CsNiR 没有明显的信号肽序列。利用 ProtComp v.9.0、PSORT 和 TargetP1.1 软件对 CsNiR 蛋白进行亚细胞定位预测,结果发现其定位于叶绿体的得分最高,分别为 9.28、0.762、0.863。共聚焦显微镜观察结果(图 4)显示,融合载体 pGreen0029-CsNiR::GFP 在细胞膜中表达,在细胞质中沿膜成点状分布,与叶绿体荧光完全重叠,表明 CsNiR 蛋白定位于细胞膜和叶绿体上。

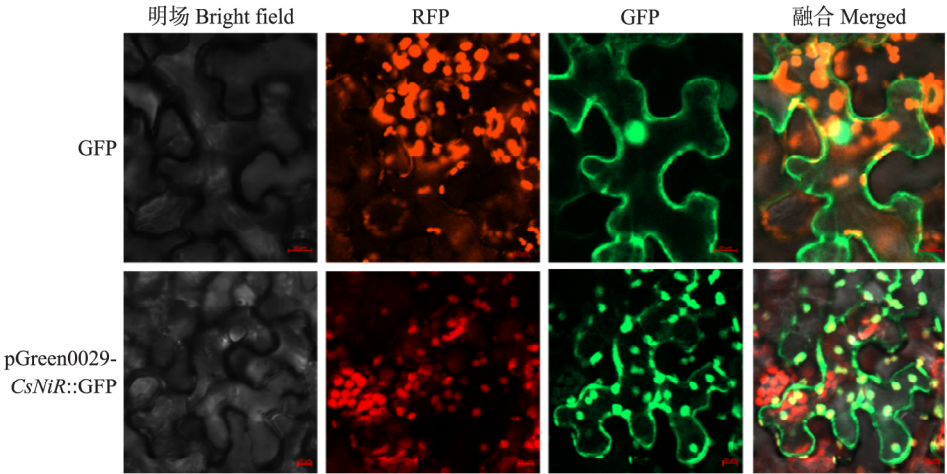


图 4 CsNiR 蛋白的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization analysis of CsNiR protein

2.4 *CsNiR* 在黄瓜不同组织的表达分析

如图5所示: *CsNiR* 在成熟叶中的表达量最高, 雄花中次之, 而在茎尖和侧芽的表达量最低, 说明叶片是 *CsNiR* 参与 NO_2^- 催化反应的主要场所。

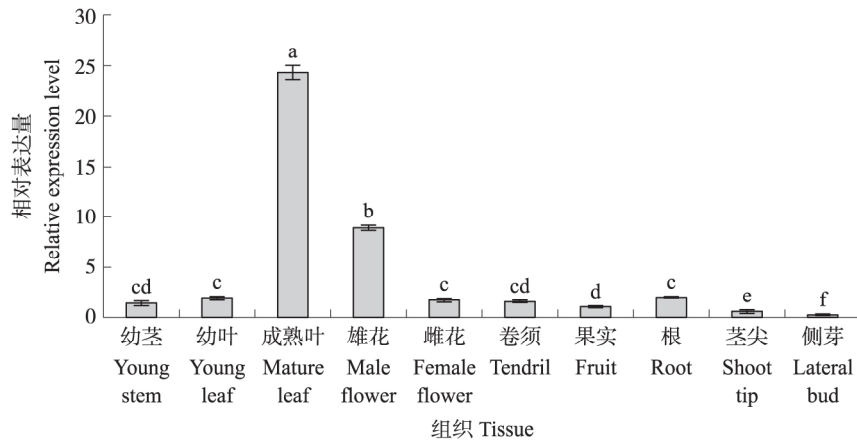


图5 黄瓜 *CsNiR* 基因在不同组织中的表达量

Fig. 5 The expression levels of *CsNiR* gene in different tissues of cucumber

不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different small letters indicate significant difference at 0.05 level. The same as follows.

2.5 不同基因型黄瓜的 NiR 活性与再生能力的相关性分析

由图6可见: 在 Amir 中 NiR 活性最低, 分化率最高, 而‘二早子’中 NiR 活性最高, 分化率最低。进一步对 NiR 活性和外植体分化率进行相关性分析表明, 两者呈显著负相关, 相关系数为-0.876。

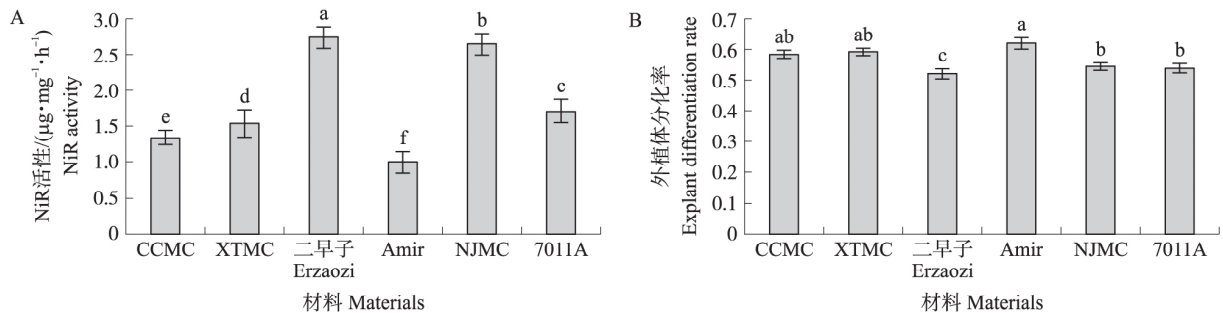


图6 不同基因型黄瓜子叶节的 NiR 活性和外植体分化率

Fig. 6 NiR activity and explant differentiation rate of cotyledon nodes in different genotypes cucumber

由图7可见: 不同基因型黄瓜外植体分化过程中, 在含有外源激素的 MS^+ 培养基上外植体分化能力显著提高。在 MS^+ 培养基上外植体再生区域内 *CsNiR* 基因表达量显著低于 MS 培养基, 表明外源激素的添加可以提高外植体分化率, 同时降低 *CsNiR* 基因的表达量。

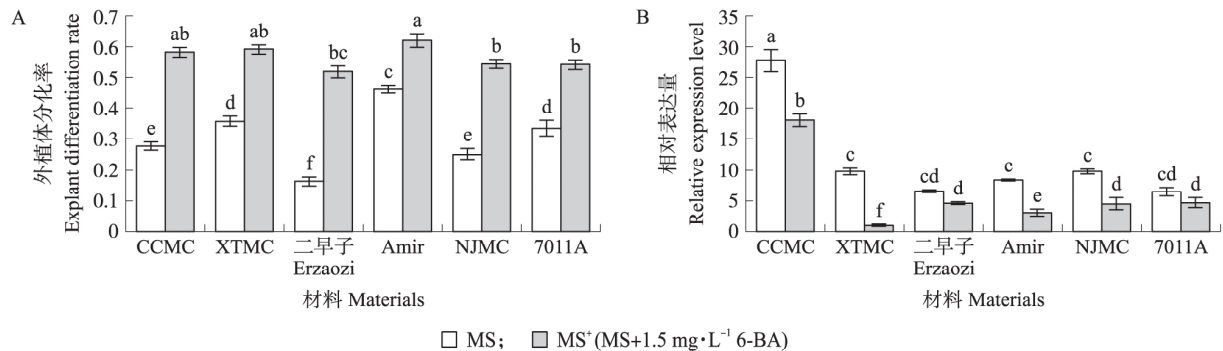


图7 不同处理条件下黄瓜外植体分化率及 *CsNiR* 基因的相对表达量

Fig. 7 Differentiation rate of explants and relative expression level of *CsNiR* gene in cucumber under different treatment conditions

2.6 不同氮素比例对黄瓜外植体分化的影响

在不同氮素比例的分化培养基上,外植体分化率随 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的增加而下降。即当 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 分别为 1:5、1:2、1:1、2:1 时,外植体平均分化率分别为 0.355 2、0.337 0、0.255 5 和 0.132 5。差异显著性比较结果显示 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1:5 时外植体分化率极显著高于 2:1 ($P<0.01$)。因此,降低 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例有助于外植体分化。

3 讨论

本试验以黄瓜 CCMC 为材料,克隆得到了亚硝酸还原酶基因 *CsNiR*,其具有完整的血红素蛋白 β -化合区域、4Fe-4S 区域结构^[20]。系统进化树分析发现植物 NiR 高度保守,黄瓜与甜瓜氨基酸序列相似性高达 96%,与水稻、烟草等物种的 NiR 蛋白相似性均大于 78%。但同时发现 NiR 蛋白在进化过程中分化为单子叶和双子叶两个方向的分支,这有可能是单子叶植物和双子叶植物对不同氮源偏好性差异的原因之一^[10]。植物亚硝酸还原酶的主要催化反应场所在叶绿体中。本研究亚细胞定位结果显示黄瓜 NiR 蛋白存在于细胞膜和叶绿体中,这与 Mitra 等^[21]研究发现 NiR 蛋白定位在叶片的叶绿体、非绿色组织的质体及细胞膜中的结果相符合。荧光定量 PCR 结果显示在成熟叶片中 *CsNiR* 的表达量最高,这间接说明黄瓜亚硝酸盐代谢的场所主要分布于叶片中。

研究发现 *NiR* 与植物组培再生活力密切相关,在水稻和小麦中,提高 *NiR* 转录水平显著提高了其外植体分化效率^[13-15]。但本研究却发现在茎尖、侧芽等细胞增殖分化旺盛的组织中 *CsNiR* 基因表达量最低,不同基因型黄瓜 NiR 活性与外植体再生率呈显著负相关,这与在水稻中的研究结果恰好相反^[13]。硝态氮有利于器官的分化,而铵态氮有利于细胞的生长^[22],合适的 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比例有助于植物外植体再生。本研究却发现外植体分化率随 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的增加而下降,这与在小麦^[23]、草莓^[24]上的研究结果一致。植物激素参与植物体内氮循环调控,如细胞分裂素诱导小麦中硝酸还原酶的形成^[25];桑树谷氨酸脱氢酶基因的表达受到细胞分裂素的调控^[26];水杨酸通过促进细胞分裂素的形成,提高水稻幼苗硝酸还原酶活性^[27]。我们研究发现,在黄瓜中添加外源细胞分裂素对外植体分化具有促进作用,但也显著抑制了 *CsNiR* 的表达。因此,我们推测 *NiR* 与细胞分裂素可能存在拮抗作用。黄瓜 *CsNiR* 基因如何调控外植体分化活力,是否通过参与黄瓜内源细胞分裂素的合成,或者与其他植物激素相关基因存在互作,仍需进一步研究。

参考文献 References:

- [1] Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, et al. The genome of the cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Nature Genetics* 2009, 41: 1275–1281.
- [2] Qi J J, Liu X, Shen D, et al. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity [J]. *Nature Genetics* 2013, 45(12): 1510–1515.
- [3] Kose E, Koç N K. *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) and plant regeneration [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2003, 17(2): 56–62.
- [4] 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, 164.
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 Jiao Tong University (Agricultural Science)* 2006, 24(2): 152–156, 164 (in Chinese with English abstract).
- [5] Zhang Z X, Li X, Ma S, et al. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) from cotyledon explants [J/OL]. *Protocol Exchange* 2017. DOI: 10.1038/protex.2017.107.
- [6] 侯爱菊, 朱延明, 杨爱霞, 等. 诱导黄瓜直接器官发生主要影响因素的研究 [J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 101–103.
Hou A J, Zhu Y M, Yang A F, et al. Main factors influencing the frequency of direct organogenesis of cucumber *in vitro* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* 2003, 30(1): 101–103 (in Chinese with English abstract).
- [7] Shukla P S, Das A K, Jha B, et al. High-frequency *in vitro* shoot regeneration in *Cucumis sativus* by inhibition of endogenous auxin [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 2014, 50(6): 729–737.
- [8] 唐莉, 周晏起, 王毅, 等. 黄瓜离体再生影响因素研究进展 [J]. 农业科技通讯, 2017(7): 232–236.
Tang L, Zhou Y Q, Wang Y, et al. Research progress on influencing factors of cucumber *in vitro* regeneration [J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology* 2017(7): 232–236 (in Chinese with English abstract).
- [9] Wang Y, Zhou Q, Zhu G T, et al. Genetic analysis and identification of a candidate gene associated with *in vitro* regeneration ability of cucumber [J]. *Theoretical and Applied Genetics* 2018, 131(12): 2663–2675.

- [10] Patterson K ,Cakmak T ,Cooper A ,et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants[J]. *Plant Cell & Environment* 2010 ,33(9) : 1486–1501.
- [11] 邢瑶 ,马兴华. 氮素形态对植物生长影响的研究进展[J]. *中国农业科技导报* 2015 ,17(2) : 109–117.
Xing Y ,Ma X H. Research progress on effect of nitrogen form on plant growth[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2015 ,17(2) : 109–117(in Chinese with English abstract) .
- [12] Miflin B J ,Lea P J. The pathway of nitrogen assimilation in plants[J]. *Phytochemistry* ,1976 ,15(6) : 873–885.
- [13] Nishimura A ,Ashikari M ,Lin S ,et al. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ,102(33) : 11940–11944.
- [14] Nishimura A ,Aichi I ,Matsuoka M. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice[J]. *Nature Protocols* 2006 ,1(6) : 2796–2802.
- [15] 余茂云 ,陈朵朵 ,冯晨,等. 小麦亚硝酸还原酶基因及调控序列克隆、定位和表达分析[J]. *作物学报* 2011 ,37(1) : 28–39.
She M Y ,Chen D D ,Feng C ,et al. Isolation ,chromosome assignment and expression assay of nitrite reductase gene and regulatory sequence in wheat[J]. *Acta Agronomica Sinica* 2011 ,37(1) : 28–39(in Chinese with English abstract) .
- [16] 杜光玲 ,秦文娟 ,邓士政,等. 玉米不同类型愈伤组织分化中硝态氮代谢的差异分析[J]. *河南农业科学* 2010 ,39(6) : 18–21.
Du G L ,Qin W J ,Deng S Z ,et al. The variation analysis of nitrate-nitrogen metabolism of different types of maize callus in the process of callus differentiation[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences* 2010 ,39(6) : 18–21(in Chinese with English abstract) .
- [17] 毛宇源. 福建香蕉离体培养条件的优化及其再生能力研究[D]. 福州: 福建农林大学 2016.
Mao Y Y. Study on the optimization of the *in vitro* culture conditions and the regeneration capacity of some Fujian banana germplasm resources in Fujian[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University 2016(in Chinese with English abstract) .
- [18] Wan H J ,Zhao Z G ,Qian C T ,et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber[J]. *Analytical Biochemistry* 2010 ,399(2) : 257–261.
- [19] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research* 2001 ,29(9) : e45.
- [20] Swamy U ,Wang M T ,Tripathy J N ,et al. Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-*Electron* reactions by the iron-sulfur: siroheme cofactor[J]. *Biochemistry* 2005 ,44(49) : 16054–16063.
- [21] Mitra S K ,Gantt J A ,Ruby J F ,et al. Membrane proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* using alternative solubilization techniques[J]. *Journal of Proteome Research* 2007 ,6(5) : 1933–1950.
- [22] Hinnen M G J ,Pierik R L M ,Bronsema F B F. The influence of macronutrients and some other factors on growth of *Phalaenopsis* hybrid seedlings *in vitro* [J]. *Scientia Horticulturae* ,1989 ,41(1/2) : 105–116.
- [23] 王海波 ,魏景芳 ,葛亚新,等. 小麦愈伤组织状态调控与原生质体培养[J]. *中国农业科学* ,1996 ,29(6) : 8–14.
Wang H B ,Wei J F ,Ge Y X ,et al. Regulation of callus status and culture of protoplast in wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica* ,1996 ,29(6) : 8–14(in Chinese with English abstract) .
- [24] 张洁. 草莓(*Fragaria ananassa* Duch.) 悬浮细胞培养与植株再生的研究[D]. 保定: 河北农业大学 2002.
Zhang J. The studies on suspension cell culture and plant regeneration in strawberry[D]. Baoding: Hebei Agricultural University 2002(in Chinese with English abstract) .
- [25] 陆嘉陵 ,简志英 ,汤玉玮. 细胞分裂素促进小麦硝酸还原酶的诱导[J]. *植物学报(英文版)* ,1989 ,31(2) : 123–127.
Lu J L ,Jian Z Y ,Tang Y W. The accelerative effects of cytokinin on nitrate reductase induction[J]. *Journal of Integrative Plant Biology* ,1989 ,31(2) : 123–127(in Chinese with English abstract) .
- [26] 植爽 ,任艳红 ,唐星,等. 桑树谷氨酸脱氢酶基因 *MaGDHs* 的克隆及表达分析[J]. *中国农业科学* 2018 ,51(4) : 758–769.
Zhi S ,Ren Y H ,Tang X ,et al. Molecular cloning and expression analysis of genes *MaGDHs* encoding glutamate dehydrogenase in mulberry[J]. *Scientia Agricultura Sinica* 2018 ,51(4) : 758–769(in Chinese with English abstract) .
- [27] 高夕全 ,刘爱荣 ,叶梅荣,等. 水杨酸对水稻幼苗硝酸还原酶活性和根系生长的影响[J]. *安徽农业技术师范学院学报* 2000 ,14(1) : 13–15.
Gao X Q ,Liu A R ,Ye M R ,et al. Effects of salicylic acid on roots growth and NRA in rice[J]. *Journal of Anhui Agrotechnical Teachers College* , 2000 ,14(1) : 13–15(in Chinese with English abstract) .

责任编辑: 范雪梅