

文章编号: 1000-8551(2021) 07-1540-08

# 利用 *GFP* 基因的黄瓜 T-DNA 插入突变体构建与快速鉴定

冯路路<sup>1,2</sup> 王雪艳<sup>1</sup> 夏磊<sup>1</sup> 王团团<sup>1</sup> 李季<sup>1,\*</sup> 陈劲枫<sup>1</sup>( <sup>1</sup> 南京农业大学园艺学院,作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏 南京 210095;<sup>2</sup> 江苏沿江地区农业科学研究所,江苏 南通 226541)

**摘要:**为促进黄瓜功能基因组学研究,本研究开展了黄瓜 T-DNA 插入突变体快速构建与鉴定方法的研究。基于对黄瓜遗传转化体系农杆菌侵染活力和共培养条件的优化,本研究以绿色荧光蛋白 *GFP* 基因为插入片段,进行黄瓜 T-DNA 插入突变体的创制,并利用荧光显微镜进行快速鉴定,最后采用 TAIL-PCR 技术对突变体进行分子鉴定,确定突变位点。结果表明,选取农杆菌侵染液在活化至 12~18 h 时具有最佳的活力和浓度,而最佳共培养温度为 23℃。采用体式荧光显微镜快速鉴定,从 2 978 个转化外植体中鉴定得到 3 株表达 GFP 再生苗,转化率为 1.00‰。TAIL-PCR 成功鉴定了一个突变体,其插入位点位于 CsaV3\_1G032940 基因的第 10 个外显子中,该基因在拟南芥中的同源基因为 AT4G18950 (blue light-dependent H<sup>+</sup>-ATPase phosphorylation 1, BHP1),参与蓝光介导的气孔开放过程,但在正常栽培环境中该突变体的 T0 植株与野生型无差异。本研究结果对黄瓜功能基因组学研究具有重要意义。

**关键词:** 黄瓜; T-DNA 插入; GFP; TAIL-PCR

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2021.07.1540

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是一种重要的蔬菜作物,其栽培历史悠久<sup>[1]</sup>。近年来,随着黄瓜基因组测序的完成及基因工程技术的不断发展,越来越多的重要功能基因被定位并克隆出来,发现新基因和发掘基因功能已经成为黄瓜功能基因组学研究的重要任务<sup>[2]</sup>。突变体是研究基因功能最直接、最有效的试验材料之一,相较于野生型植株,突变体往往仅在某一个基因位点发生变化,避免了其他位点的干扰<sup>[3]</sup>,对基因功能研究具有重要价值。由于黄瓜的遗传基础较为狭窄<sup>[4]</sup>,自然变异的频率很低,因此,人为创制突变体进行基因功能研究已成为必然。

突变体的创制途径主要包括物理诱变、化学诱变及插入突变等,近年来的基因编辑技术作为一种定向创制突变体的方法已广泛应用于番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.)<sup>[5]</sup>、水稻(*Oryza sativa* L.)<sup>[6]</sup>及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[7]</sup>中,黄瓜中也有相应报道。其中,插入突变具有研究无表型基因、易获得突变位

点、易于进行反向遗传学研究等诸多优点<sup>[8]</sup>,是一种较为适合创制植物突变体的方法。随着农杆菌介导的转基因技术不断发展,T-DNA 插入破坏基因广泛应用于功能基因组学研究<sup>[9]</sup>。目前,利用 T-DNA 插入创制突变体的方法已经成功应用于构建拟南芥<sup>[10]</sup>和水稻<sup>[11]</sup>突变体库,并对相关突变体的突变基因功能进行了分析,明确了花青素<sup>[12]</sup>、穗形态<sup>[13]</sup>以及叶片夹角<sup>[14]</sup>等农艺性状相关的重要基因。前人多是利用甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulphonat, EMS)来创制黄瓜突变体,如王晶等<sup>[15]</sup>利用 EMS 诱变获得了有关株型、叶片、花器官以及果实性状的黄瓜突变体;薛红霞等<sup>[16]</sup>利用 EMS 诱变得到了叶型、叶色、果实长度、株型等多个类型的黄瓜突变体。在葫芦科插入突变体创制方面,任海英等<sup>[17]</sup>利用 T-DNA 插入突变得到一个蔓枯病抗性明显增强的甜瓜突变体 *edr2*。李蕾等<sup>[18]</sup>将 T-DNA 插入应用于黄瓜突变体构建中,并利用 PCR 和斑点杂交技术对 T-DNA 插入突变体进行了验证。Hu

收稿日期: 2020-03-25 接受日期: 2020-06-11

基金项目: 江苏省重大新品种创新项目(PZCZ201719)

作者简介: 冯路路,男,主要从事葫芦科作物遗传育种与种质创新。E-mail: 756877819@qq.com

\* 通讯作者: 李季,男,副教授,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。E-mail: lij1981@njau.edu.cn

等<sup>[19]</sup>通过基因编辑技术敲除了黄瓜中的 *CsWIP1* 基因,该基因的突变使黄瓜植株由雌雄同株转变为全雌株,并在转基因后代中筛选得到非转基因的纯合突变体 *Cswip1*。

利用 T-DNA 插入的方法创制突变体往往需要高效的遗传转化体系。Trulson 等<sup>[20]</sup>早在 1986 年就首次成功获得黄瓜转基因材料,在过去三十多年中,研究者对黄瓜的遗传转化方案进行了基因型<sup>[21]</sup>、外植体<sup>[22]</sup>、选择标记<sup>[23]</sup>等多方面的优化,但目前的黄瓜遗传转化体系依旧存在着转化效率低、转基因遗传稳定性差等问题。本研究在南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室已经建立的农杆菌介导的黄瓜子叶节遗传转化体系的基础上,从农杆菌活力、共培养温度等方面进行进一步优化,以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报告基因为插入基因,利用 TAIL-PCR 进行 T-DNA 插入突变体的 T-DNA 侧翼序列进行扩增,确定 T-DNA 的插入位点,对插入基因的功能进行初步解析,以期得到更高效的遗传转化体系,为黄瓜功能基因组学研究提供一定的技术和材料基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

用于遗传转化的黄瓜材料为南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室保存的长春密刺高代自交系 CCMC。农杆菌菌株 C58、表达载体 pGreen0029 均由南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室提供。DNA 提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek\_安诺伦(北京)生物科技有限公司,Genome Walking Kit 试剂盒购自宝日医生物技术(北京)有限公司。植物组培材料在南京农业大学葫芦科作物遗传与种质创新实验室组织培养室中培养,培养条件为温度 25℃,光周期 16 h/8 h(昼/夜)。再生植株在人工气候箱中培养,培养条件为温度 28℃/25℃(昼/夜),光周期 18 h/6 h(昼/夜),相对湿度 70%~75%。

### 1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌介导的黄瓜子叶节法转化方法 以 CCMC 为受体材料,选取饱满的种子进行消毒,接种到无菌培养基上。待种子生长至下胚轴直立子叶未张开的状态,将植株生长点剔除后,保留 1/3 子叶和 2 mm 下胚轴的子叶节作为转化外植体接种于预培养基[MS + 6-苄基腺嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA) 1.5 mg·L<sup>-1</sup> + 脱落酸(abscisic acid, ABA) 0.2 mg·L<sup>-1</sup>]上,黑暗条件下培养 1 d。

挑取携带植物表达载体 pGreen0029 的农杆菌单菌落进行活化培养,之后将其制备成 OD<sub>600</sub> 为 0.5 的侵染液。将经预培养的外植体置于农杆菌重悬液中侵染 20 min,然后将侵染完成的外植体置于共培养基[MS + 6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup> + ABA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> + 乙酰丁香酮(acetosyringone, AS) 100 μmol·L<sup>-1</sup>]上黑暗培养 3 d 后转到选择培养基[MS + 6-BA 1.5 mg·L<sup>-1</sup> + ABA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> + Kan(卡那霉素) 100 mg·L<sup>-1</sup> + 特美汀(timentin, TM) 200 mg·L<sup>-1</sup>]上继续培养。

1.2.2 农杆菌生长曲线的测定 取刚活化好的菌液 400 μL 加入 50 mL 配置好的液体 YEB 培养基中,在 28℃ 重新摇菌,在 24 h 内每隔 2 h 吸取 10 μL 不同稀释程度的菌液接种于配置好的 YEB 固体培养基中,28℃ 倒置避光培养 30 h,然后对培养基上长出的农杆菌单菌落进行计数,根据稀释倍数得到各个时间段单位菌液中的活细菌数量并测定其 OD<sub>600</sub> 值,并制作农杆菌的生长曲线。

1.2.3 共培养温度处理对转化效率的影响 农杆菌侵染操作方法同 1.2.1,将侵染完成的外植体接种于共培养基上分别在 18、23、28、33℃ 条件下黑暗培养 3 d,然后转接至选择培养基上培养 15 d 后对外植体进行荧光观察,统计不同温度条件下的外植体的再生率以及转化率,重复 3 次。

1.2.4 利用 *GFP* 报告基因筛选转化外植体 以 pGreen0029 载体为转化载体,该载体的 T-DNA 插入序列为绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的表达单元,因此当 T-DNA 成功插入到植物宿主细胞中时, *GFP* 可以作为报告基因,在外植体分化培养 15 d 左右进行荧光观察,将外植体置于 MVX10 宏观变倍体式荧光显微镜下(日本 Olympus 公司),在 GFP 通道(460~550 nm)下对外植体进行荧光观察。未转化的外植体由于叶绿体自发荧光而显现为红色,被转化的外植体由于会表达 *GFP* 则显现为绿色。为了准确评估转化事件,将整体表达 GFP 信号的愈伤组织或再生芽认定为阳性愈伤或阳性芽,愈伤组织或再生芽上仅分散有 GFP 表达细胞的不能认定为阳性愈伤或阳性芽。

1.2.5 利用 *GFP* 报告基因鉴定转化植株 将筛选得到的外植体经过分化、伸长、生根后进行驯化,待植株生长健壮后取转化植株的叶片、卷须、花芽以及根系等部位置于 MVX10 宏观变倍体式荧光显微镜下,在 GFP 通道(460~550 nm)下进行 GFP 信号的表达观察。并将转化植株置于植物活体成像系统中,对转化植株整体的 GFP 荧光表达情况进行观察鉴定。

1.2.6 TAIL-PCR 克隆 T-DNA 侧翼序列 DNA 试剂

盒[安诺伦(北京)生物科技有限公司]提取已经驯化的一株 T-DNA 插入黄瓜突变体和野生型黄瓜幼嫩叶片的总 DNA ,具体步骤参考产品说明书。利用 Premier 5.0 软件在 T-DNA 右边界设计 3 个巢式引物 SP1、SP2 和 SP3(表 1) ,引物 AP1、AP2 是由 Genome Walking Kit 试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司]提供的经过特别设计的退火温度较低的兼并引物。按照试剂盒说明对黄瓜 T-DNA 插入突变体的 T-DNA 侧翼序列进行扩增 ,将第三轮 PCR 产物经凝胶电泳鉴定后送往南京擎科生物科技有限公司进行测序 ,测序结果在葫芦科作物基因组数据库 (<http://cucurbitgenomics.org/>) 网站进行序列比对分析。根据得到的插入位点 ,在 T-DNA 载体序列中设计特异性引物 M-F ,在插入位点旁临的基因组序列中设计特异性引物 M-R ,利用这对特异性引物对突变体进行鉴定。

表 1 试验所用引物序列  
Table 1 The primers used in this experiment

引物名称 Primer name	核苷酸序列(5'-3') Nucleotide sequence(5'-3')	用途 Use
SP1	ATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGA	TAIL-PCR
SP2	TCGGTACGCTGAAATCACCAGTCTCT	
SP3	GGGTCTTTATAGGGTTTCGCCTCATGT	
M-F	CGGAGAGGTACGTATTTTAC	插入位点鉴定
M-R	CTGATGCCAAGATAAGAAGAG	

2 结果与分析

2.1 黄瓜遗传转化体系优化

在农杆菌介导的黄瓜遗传转化的体系中 ,农杆菌自身活力是影响侵染成功率的关键因素。细菌培养增殖有四个时期:迟缓期、对数期、稳定期和衰亡期 ,处于对数期的细菌具有更好的活力<sup>[24]</sup>。农杆菌活力鉴定

通常采用 OD 值法 ,但该方法测定的菌液浓度同时包含了活菌和死亡菌 ,不能准确地反映农杆菌的真实活力 ,本研究通过测定农杆菌活化培养过程中不同时间点单位菌液中的活菌数目( CFU·mL<sup>-1</sup>) ,制作农杆菌生长曲线。由图 1 可知 ,农杆菌活化 8~20 h ,菌群处于对数生长期;20 h 之后 ,虽然 OD 值仍在上升 ,但活菌统计显示菌群已进入衰亡期。综合菌群活力和菌体数量 ,本研究认为农杆菌活化培养 12~18 h 时 ,菌液具有最佳的活力。

共培养阶段是农杆菌完成对植物细胞侵染的时期 ,共培养阶段的温度、时间、培养基成分以及 pH 值都是影响转化效率的关键因素<sup>[25]</sup>。本研究对不同共培养温度处理转化外植体 2 周后统计其再生率和阳性诱导率 ,由表 2 可知 ,只有共培养温度为 33℃ 时外植体再生率最低 ,仅为 21.29% ,显著低于其他温度条件下培养的外植体 ,说明共培养阶段高温会抑制外植体的分化。28℃ 是最适宜农杆菌生长的温度 ,但阳性诱导率的统计结果显示 ,当共培养温度为 23℃ 时阳性诱导率最高为 2.26% ,显著高于 28℃ 下的转化率。综合外植体的再生率和阳性诱导率 ,本研究认为 23℃ 是最适的共培养温度。

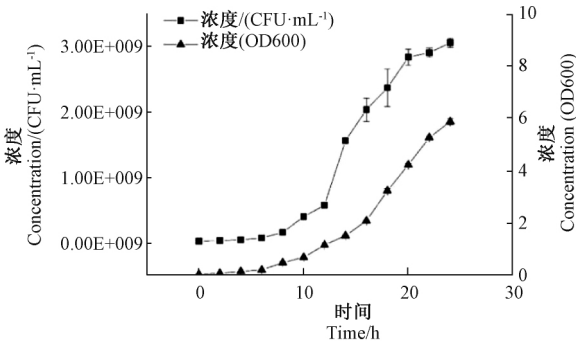


图 1 农杆菌生长曲线图  
Fig.1 Agrobacterium growth curve

表 2 共培养温度对黄瓜子叶节转化的影响

Table 2 Effects of co-cultivation temperature on transformation of cucumber cotyledon nodes

共培养温度 Co-culture temperature/℃	外植体总数 Total number of explants	再生外植体数 Number of regeneration explants	再生率 Regeneration rate/%	具有阳性愈伤的外植体数 Number of explants with positive callus	阳性诱导率 Positive induction rate/%
18	266	77	28.95aA	0	0bB
23	265	84	31.70aA	6	2.26aA
28	285	85	29.82aA	2	0.70bAB
33	249	58	21.29bA	0	0bB

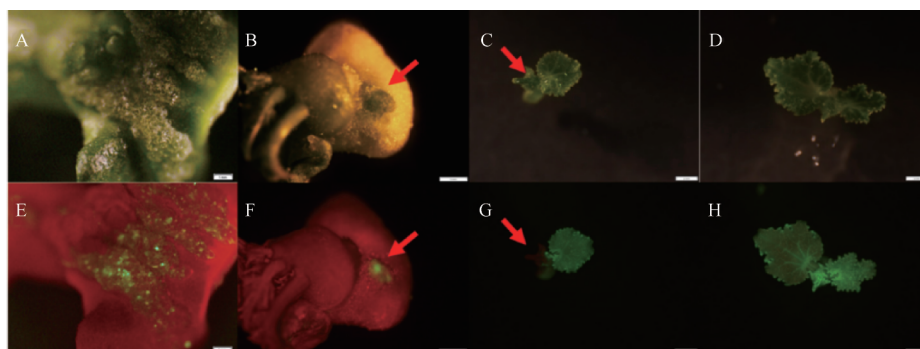
注: 不同大写字母表示不同处理间差异极显著(  $P<0.01$  ); 不同小写字母表示不同处理间差异显著(  $P<0.05$  )。  
Note: Different capital letters indicate extremely significant difference at 0.01 level. Defferent lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

## 2.2 利用绿色荧光蛋白 GFP 的突变体快速鉴定

在外植体侵染完成后分化培养 2 周,统计外植体的分化率并进行 GFP 荧光观察。观察结果显示,绿色荧光在不同类型的组织中均有表达。白色且质地松散的非胚性愈伤组织中,GFP 信号较弱,仅在愈伤表面呈松散分布(图 2-A、E);在绿色的质地较为致密的愈伤组织中,GFP 信号较为集中地分布在愈伤突起部位(图 2-B、F),这类愈伤再生率较高;在再生芽中,荧光信号分布也有不同表现,例如在嵌合体的再生芽中,成功转化的组织部位可以清晰检测到荧光信号,而未转化部位无荧光信号(图 2-C、G)。相比之下,由转化细胞发育而来的阳性再生芽,其各个组织部位均能检测到较强的荧光信号(图 2-D、H)。在通过体式荧光显微镜的快速鉴定后,将具有较强荧光信号的胚性愈伤组织或再生芽的外植体继续继代培养,同时切去各荧

光组织部位周围的无荧光再生芽。

利用优化后的遗传转化体系创制 T-DNA 插入突变体,通过 GFP 荧光表达的筛选,最终从 2 978 个黄瓜转化子叶节外植体中得到 3 株 GFP 阳性植株,遗传转化率为 1.00‰。将筛选得到的阳性外植体进行驯化,待植株生长健壮后对植株的叶片、花芽、卷须以及根系等部位进行 GFP 信号表达观察,发现这些组织部位均有 GFP 信号的表达(图 3)。利用活体成像系统对整个植株进行 GFP 荧光表达观察,发现转化植株整体均有不同程度的 GFP 荧光信号,其中,转化植株的叶脉和生长点等组织部位荧光信号最强,为 700 cps(counts per second);嫩叶和卷须等组织部位荧光信号强度次之,为 400 cps;衰老叶片和叶片边缘等组织部位荧光信号强度最弱,为 50 cps(图 4)。



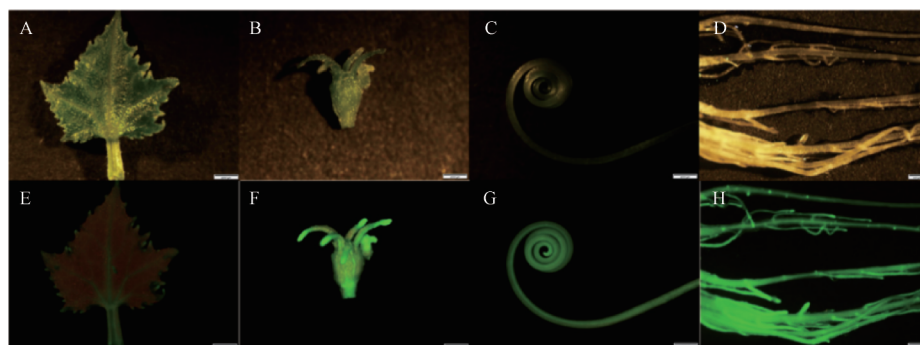
注: A、B、C 和 D 分别是明场下的具有非胚性愈伤的外植体,具有胚性愈伤的外植体,转基因嵌合体,具有阳性芽的外植体;

E、F、G 和 H 分别是具有非胚性愈伤的外植体,具有胚性愈伤的外植体,转基因嵌合体,具有阳性芽的外植体。

Note: A, B, C and D: Explants with non-embryogenic callus, explants with embryogenic callus, transgenic chimeras, explants with positive buds in bright field. E, F, G and H: Explants with non-embryogenic callus, explants with embryogenic callus, transgenic chimeras, explants with positive buds.

图 2 外植体的 GFP 表达分析

Fig.2 Analysis of GFP expression in explants

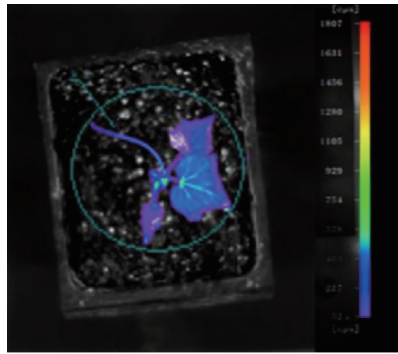


注: A、B、C 和 D 分别是明场下转基因植株的叶片、花芽、卷须和根系; E、F、G 和 H 分别是转基因植株的叶片、花芽、卷须和根系。

Note: A, B, C and D: Leaves, flower buds, tendrils, roots of transgenic plants in the field. E, F, G and H: Leaves, flower buds, tendrils, roots of transgenic plants.

图 3 转基因植株的荧光观察

Fig.3 Fluorescence observation of transgenic plants



注: 右侧光标显示生物发光强度值范围为  
(紫色端) 50~1 800 cps (红色端)。

Note: The cursor on the right shows that the range of  
bioluminescence intensity is (purple end) 50~1 800 cps (red end).

图 4 转基因植株的活体成像观察

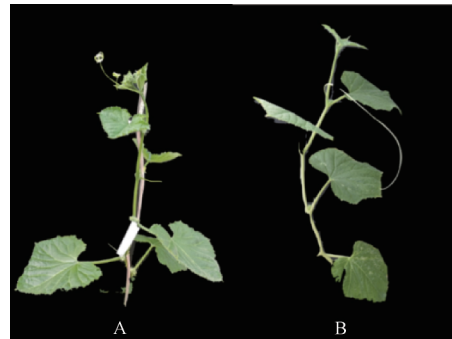
Fig.4 *In vivo* imaging observation of transgenic plants

### 2.3 突变体插入位点的分子鉴定

以未转化长春密刺植株(图 5-A)为对照,对 T0 突变体 T-DNA-PG-1(图 5-B)的株型、雄花、雌花以及叶片形态等性状进行比较观察,结果显示, T0 植株与野生型植株相比无明显差异。为检测 T-DNA 插入突变体中 T-DNA 的插入位置,本研究采用 TAIL-PCR 对 T-DNA 插入突变体进行 T-DNA 的侧翼序列扩增,分别利用 Genome Walking Kit 试剂盒中的简并引物 AP1、AP2 和自行设计的序列特异性引物 SP1、SP2、SP3 对已经驯化的 1 株 T-DNA 插入突变体的基因组 DNA 进行 3 轮 PCR 扩增,在使用简并引物 AP1 的第三轮 PCR 扩增结果中得到了一段大于 2 000 bp 的 DNA 片段(图 6-B)。然后将该第三轮 PCR 产物测序,得到 736 bp 的准确 DNA 序列。利用 DNAMAN 软件将测序结果与载体序列进行比对,发现测序结果前 160 bp 的 DNA 序列中有 112 bp 的 DNA 序列与载体序列一致,然后将测序结果在葫芦科作物基因组数据库(<http://cucurbitgenomics.org/>)网站进行序列比对,测序结果中位于 193~704 之间共 512 bp 的 DNA 片段与黄瓜基因组第一条染色体的 20 011 698~20 011 187 的 DNA 片段 100% 匹配,因此,初步将 T-DNA 插入突变体的 T-DNA 插入位置定位于第 1 条染色体上 CsaV3\_1G032940 基因的第 10 个外显子中,推测该基因是一类蛋白激酶。

为了进一步验证 TAIL-PCR 的鉴定结果,在 T-DNA 载体上设计特异性引物 M-F,距离 T-DNA 右边界 1 149 bp。然后在基因组中设计特异性引物 M-R,距离 T-DNA 右边界插入位点 401 bp(图 6-A)。利用设计的这一对引物对黄瓜野生型植株和 T-DNA 插入突

变体植株的 DNA 进行扩增。在黄瓜 T-DNA 插入突变体植株的 DNA 中,由于有 T-DNA 载体插入,可以扩增出预期约 1 550 bp 的片段;而在野生型植株的 DNA 中,由于未插入 T-DNA 载体,不能扩增出预期大小的 DNA 片段(图 6-C)。将得到的 PCR 产物进行测序,测序结果显示 PCR 扩增序列和预期的序列结果基本一致,进一步确定了 T-DNA 插入突变体的 T-DNA 插入位置。



注: A: 野生型植株; B: 突变体 T-DNA-PG-1。

Note: A: Wild type plant. B: Mutant plant T-DNA-PG-1.

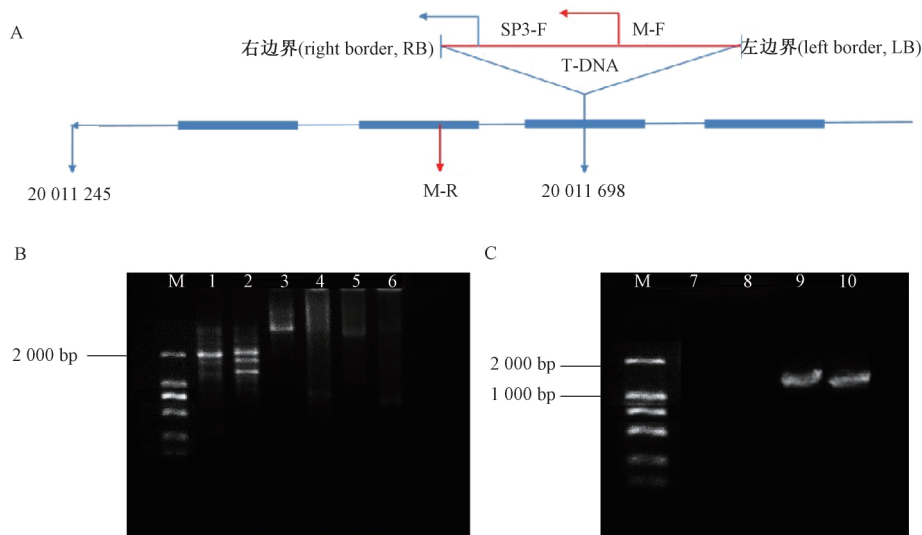
图 5 野生型和突变体植株性状对比

Fig.5 Wild type and mutant plants trait comparison

## 3 讨论

报告基因具有可靠、便捷和灵敏度高等优点,是一种较为适合鉴定转基因植株的方法,目前  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶基因( $\beta$ -glucuronidase, GUS)和 GFP 是黄瓜遗传转化体系中应用最为普遍的报告基因。GUS 是一种广泛应用于转基因快速检测的报告基因<sup>[26]</sup>,但 GUS 无法进行活体检测,在外植体再生阶段时只能对再生芽进行破坏性的检测。相比之下,利用 GFP 荧光观察可以活体鉴定转基因材料,且操作简单观测结果准确,能有效减少假阳性的问题。Priyadarshani 等<sup>[27]</sup>利用 GFP 报告基因对菠萝进行遗传转化使转基因菠萝的筛选变得简单、无损;Jung 等<sup>[28]</sup>利用 GFP 监测技术检测辣椒早期发育阶段的转基因,提高辣椒遗传转化效率;Hu 等<sup>[19]</sup>利用 GFP 报告基因在外植体发育早期对黄瓜转基因植株进行鉴定,在共培养 3 d 之后就能检测到微弱的荧光信号。因此,利用 GFP 作为报告基因在外植体发育早期就可以进行筛选鉴定,更为简便快捷。本研究以 GFP 作为报告基因,在转化外植体分化 2 周后进行荧光观察鉴定阳性转化事件,避免了大量再生芽的驯化、DNA 提取及 PCR 检测等工作,并利用 GFP 报告基因对成熟的阳性植株各组织部位进行观





注: A: T-DNA 在第一条染色体的插入位点; B: TAIL-PCR 扩增转基因植株的侧翼序列; C: T-DNA 插入位点的验证。M: DNA maker; 1~3: 兼并引物 AP1 的第 1、2、3 轮 TAIL-PCR 扩增; 4~6: 兼并引物 AP2 的第 1、2、3 轮 TAIL-PCR 扩增; 7: 水; 8: 野生型植株; 9、10: 转基因植株。

Note: A: T-DNA insertion site on the first chromosome. B: TAIL-PCR amplifies flanking sequences of transgenic plants.

C: Verification of T-DNA insertion sites. M: DNA marker. 1 to 3: Round 1, 2, 3, TAIL-PCR amplification of degenerate primer AP1. 4 to 6: Round 1, 2, 3, TAIL-PCR amplification of degenerate primer AP2.

7: Water. 8: Wild type plant. 9 and 10: Transgenic plants.

图 6 转基因植株 T-DNA 侧翼序列的扩增以及插入位点的验证

Fig.6 Amplification of T-DNA flanking sequences of transgenic plants and verification of insertion sites

察鉴定,极大提高了转基因植株的筛选效率。

共培养阶段是农杆菌对植物细胞完成侵染的关键时期,共培养温度对 T-DNA 的转移有着明显影响。农杆菌的最适生长温度为 28℃,但农杆菌的最适生长温度不一定是农杆菌具备最强侵染效力的温度。Fullner 等<sup>[29]</sup>研究认为,T-DNA 转移的最适温度为 19℃,最利于 T-DNA 复合物的组装和转移。此外,*vir* 基因的诱导和外源 DNA 片段的整合及稳定表达应在 25℃,温度高于 32℃就有可能影响其活性<sup>[30]</sup>。本研究通过设置不同的共培养温度进行黄瓜的遗传转化,发现当共培养温度处于 23℃时,外植体的分化率和阳性诱导率都优于其他组。

利用 T-DNA 插入创制突变体的一个显著优点就是能够快速得到插入位点的 T-DNA 侧翼序列<sup>[31]</sup>,为突变基因的定位节省了大量时间。侧翼序列的扩增包括 TAIL-PCR、质粒拯救、PCR 步移以及反向 PCR 等多种方法,其中 TAIL-PCR 操作简便、特异性高、灵敏度高,PCR 产物可以直接用于测序,被广泛应用于各类插入突变体库侧翼序列的分离<sup>[32]</sup>。本研究利用 TAIL-PCR 成功分离得到黄瓜 T-DNA 插入突变体的 T-DNA 侧翼序列,通过对黄瓜基因组进行序列比对,确定 T-DNA 片段插入到 CsaV3\_1G032940 基因(BHP)的外显子中,该基因在拟南芥中的同源基因为 AT4G18950,

与植物介导蓝光依赖性气孔开放有关<sup>[33]</sup>,但目前在正常栽培条件下,该基因的 T-DNA 插入突变体与野生型表型无明显差异,在今后的研究中会对该基因在突变体中的表达以及该突变体在蓝光条件处理下的表型鉴定进行深入研究。

## 4 结论

本研究确定了农杆菌 C58 的菌液最佳取样时期为摇菌后 12~18 h,农杆菌侵染的最佳共培养温度为 23℃,并利用 GFP 报告基因显著提升了转化植株的筛选效率,同时通过 TAIL-PCR 成功克隆得到突变体的 T-DNA 侧翼序列,进一步确定了突变体的插入位点,此方法能有效应用于黄瓜的遗传转化中,并为黄瓜及葫芦科其他作物的相关研究提供了参考。但侵染效率过低仍是限制转化效率的最主要原因,后续研究将进一步从黄瓜基因型筛选、转化载体的选择、共培养处理方式等方面开展转化体系优化,同时开展黄瓜花粉管通道法、花粉磁转染等转化技术的探索。

## 参考文献:

- [1] Wang S L, Seong S K, Ye X G, He C F, Suk Y K, Pil S C. Current status of genetic transformation technology developed in

- cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14 (3): 469-482
- [2] Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, Li L, Gu X F, Fan W. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Nature Genetics, 2009, 41(12): 1275-1281
- [3] Chung D H, Potter S C, Tanomrat A C, Ravikumar K M, Toney M D. Site-directed mutant libraries for isolating minimal mutations yielding functional changes [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2017, 30(5): 347-357
- [4] 翁益群. 美国农业部黄瓜分子育种研究简介 [J]. 天津农业科学, 2019, 25(6): 6-18
- [5] Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/crispr-associated9 system [J]. Plant Physiology, 2016, 166(3): 1292-1297
- [6] Shan Q W, Wang Y P, Li J, Gao C X. Genome editing in rice and wheat using the crispr/cas system [J]. Nature Protocols, 2014, 9(10): 2395
- [7] Decaestecker W, Buono R A, Pfeiffer M L, Vangheluwe N, Jacobs T B. Crispr-tsco: A technique for efficient mutagenesis in specific cell types, tissues, or organs in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2019, 31(12): 2868-2887
- [8] 陈志辉. 水稻 T-DNA 插入突变体库构建与利用及 miRNA 基因功能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015
- [9] 李彦龙. 棉花 T-DNA 插入突变体侧翼序列分析与双 T-DNA 载体系统构建 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016
- [10] Frank U, Kublik S, Mayer D, Engle M, Schlöter M, Durner J, Gaupels F. A T-DNA mutant screen that combines high-throughput phenotyping with the efficient identification of mutated genes by targeted genome sequencing [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 539
- [11] Meng X B, Yu H, Zhang Y, Zhuang F F, Song X G, Gao S S, Gao C X, Li J Y. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9 [J]. Molecular Plant, 2017, 10(9): 1238-1241
- [12] Mabuchi A, Soga K, Wakabayashi K, Hoson T. Phenotypic screening of Arabidopsis T-DNA insertion lines for cell wall mechanical properties revealed ANTHOCYANINLESS2, a cell wall-related gene [J]. Journal of Plant Physiology, 2016, 191: 29-35
- [13] Li Y, Li X M, Fu D B, Wu C Y. Panicle Morphology Mutant 1 (PMM1) determines the inflorescence architecture of rice by controlling brassinosteroid biosynthesis [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 34
- [14] Zhao S Q, Xiang J J, Xue H W. Studies on the rice LEAF INCLINATION1 (LC1), an IAA-amido synthetase, reveal the effects of auxin in leaf inclination control [J]. Molecular Plant, 2012, 6(1): 174-187
- [15] 王晶, 姜群峰, 魏庆镇, 李子昂, 付文苑, 陈劲枫. 长春密刺黄瓜突变体库的构建和部分性状分析 [J]. 核农学报, 2015, 29(8): 1479-1486
- [16] 薛红霞, 蒋卫举, 李晓丽, 宋晓飞, 郑金双, 闫立英, 孙承振. 黄瓜突变体库的构建及表型变异的初步研究 [J]. 核农学报, 2019, 33(3): 432-439
- [17] 任海英, 方丽, 茹水江, 王汉荣. 抗蔓枯病黄瓜突变体 *edr2* 抗病现象的初步研究 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3131-3138
- [18] 李蕾, 孟永娇, 张璐, 姜群峰, 李季, 钱春桃, 陈劲枫. 黄瓜遗传转化优化的研究 [J]. 华北农学报, 2015, 30(5): 115-121
- [19] Hu B W, Li D W, Liu X, Qi J J, Gao D L, Zhao S Q, Huang S W, Sun J J, Yang L. Engineering non-transgenic gynocious cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system [J]. Molecular Plant, 2017, 10(12): 1575-1578
- [20] Trulson A J, Simpson R B, Shahin E A. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with a grobacterium rhizogenes [J]. Tag Theoretical and Applied Genetics, 1986, 73(1): 11-15
- [21] 张若伟, 顾兴芳, 王烨, 张圣平, 张宝玺. 基因型和 6-BA 对黄瓜子叶节再生频率的影响 [J]. 中国蔬菜, 2009(22): 45-48
- [22] Nanasato Y, Konagaya K, Okuzaki A, Tsuda M, Tabei Y. Improvement of Agrobacterium-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks [J]. Plant Biotechnology Reports, 2013, 7: 267-276
- [23] 杨丽. 建立黄瓜遗传转化和基因编辑技术体系以创制全雌系种质材料 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018
- [24] Li S X, Cong Y H, Liu Y P, Wang T T, Shuai Q, Chen N N, Gai J Y, Li Y. Optimization of agrobacterium-mediated transformation in soybean [J]. Frontiers of Plant Science, 2017, 8: 246
- [25] 李桂兰, 刘晨光, 乔潇, 杨晓倩, 王迪, 乔亚科. 共培养条件对农杆菌转化大豆子叶节的影响 [J]. 核农学报, 2014, 28(9): 1567-1575
- [26] Ye S W, Cai C Y, Ren H B, Wang W B, Xiang M Q, Tang X S, Zhu C P, Yin T F, Zhang L, Zhu Q. An efficient plant regeneration and transformation system of Ma Bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) started from Young Shoot as explant [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1298
- [27] Priyadarshani S, Cai H Y, Zhou Q, Liu Y H, Cheng Y, Xiong J J, Patson D L, Cao S J, Zhao H M, Qin Y. An efficient agrobacterium mediated transformation of pineapple with GFP-Tagged protein allows easy, non-destructive screening of transgenic pineapple plants [J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 617
- [28] Jung M, Shin S H, Park J M, Lee S N, Lee M Y, Ryu K H, Paek K Y, Harn C H. Detection of transgene in early developmental stage by GFP monitoring enhances the efficiency of genetic transformation of pepper [J]. Plant Biotechnology Reports, 2011, 5(2): 157-167
- [29] Fullner K J, Nester E W. Temperature affects the T-DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(6): 1498-1504
- [30] Salas M G, Park S H, Srivatanakul M, Smith R H. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells [J]. Plant Cell Reports, 2001, 20(8): 701-705
- [31] Liao C C, Chen L J, Lo S F, Chen C W, Chu Y W. EAT-Rice: A predictive model for flanking gene expression of T-DNA insertion activation-tagged rice mutants by machine learning approaches [J]. PLoS Computational Biology, 2019, 15(5): e1006942

- [32] Wu L, Di D W, Zhang D, Song B, Luo P, Guo G Q. Frequent problems and their resolutions by using thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) to clone genes in *Arabidopsis* T-DNA tagged mutants [J]. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2015, 29(2): 260–267
- [33] Hayashi M, Inoue S, Ueno Y, Kinoshita T. A Raf-like protein kinase BHP mediates blue light-dependent stomatal opening [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45586

## Construction and Rapid Identification of Cucumber T-DNA Insertion Mutants Using GFP Gene

FENG Lulu<sup>1,2</sup> WANG Xueyan<sup>1</sup> XIA Lei<sup>1</sup> WANG Tuantuan<sup>1</sup> LI Ji<sup>1,\*</sup> CHEN Jinfeng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing, Jiangsu 210095; <sup>2</sup>Jiangsu Yanjiang Institute of Agricultural Science, Nantong, Jiangsu 226541)

**Abstract:** In order to promote the functional genomics of cucumber, a study on the rapid construction and identification of cucumber T-DNA insertion mutants was carried out. Based on the optimization of the cucumber genetic transformation system in terms of *Agrobacterium* infection activity and co-culture conditions, the cucumber T-DNA insertion mutants were created by using green fluorescent protein *GFP* gene as an insert DNA segment and quickly screened by using a fluorescence microscope. TAIL-PCR technology was employed to identify the mutation sites of the positive transformants. The results showed that the *Agrobacterium* infection solution had the best vigor and concentration after cultivation to 12–18 h, and the optimal co-culture temperature was 23°C. Three regenerated seedlings expressing GFP were identified from 2 978 transformed explants by using stereo fluorescence microscopy. The transformation efficiency was 1.00%. A T-DNA mutant was identified successfully by TAIL-PCR, the insertion site was located in the tenth exon of the CsaV3\_1G032940 gene. The homologous gene of this gene in *Arabidopsis* is AT4G18950 (BHP1, Blue light-dependent H<sup>+</sup>-ATPase Phosphorylation 1), involved in the process of stomatal opening mediated by blue light. However, under the normal growth condition, the T0 plant of this mutant had no difference in phenotype from wild type cucumber. The results of this study are of great significance for the functional genomics research of cucumber.

**Keywords:** cucumber, T-DNA insertion, GFP, TAIL-PCR