

doi:10.11937/bfyy.20173043

# 农杆菌介导的黄瓜遗传转化的影响因素

常怀成, 倪 蕾, 孙涌栋, 罗未蓉

(河南科技学院 园艺园林学院, 河南 新乡 453003)

**摘 要:**以“津优1号”黄瓜子叶节为外植体试材,研究了外植体苗态、乙酰丁香酮(AS)浓度、脱菌次数、头孢霉素(Cef)浓度及生根培养基等因素对遗传转化的影响,以期为开展黄瓜的遗传转化研究提供参考依据。结果表明:使用子叶抱合类外植体诱导分化效果最好;在预培养基和共培养基中添加  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  AS有利于外植体分化;用无菌水冲洗3次可有效控制农杆菌污染;选择培养基中添加  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef,生根培养基中添加  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef在抑制农杆菌的同时可有效促进根系生长。

**关键词:**黄瓜;遗传转化;根癌农杆菌;CsEXP10

**中图分类号:**S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)02-0009-06

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是一种重要的蔬菜作物,在世界各地普遍栽培。黄瓜遗传基础狭窄,遗传变异率低<sup>[1]</sup>,使用常规育种方法效率低下。因此,基因工程技术就成为黄瓜育种的重要手段。遗传转化是基因工程的核心内容,目前已在拟南芥<sup>[2-4]</sup>、番茄<sup>[5-7]</sup>等植物中建立了较为成熟的转化体系。虽然已通过遗传转化技术在黄瓜中开展了耐除草剂<sup>[8]</sup>、抗菌<sup>[9]</sup>、耐寒<sup>[10-11]</sup>、耐虫害<sup>[12]</sup>、抗病毒<sup>[13]</sup>、单性结实<sup>[14]</sup>等研究,并取得了一定的进展。但建立的黄瓜遗传转化体系依然受外植体类型、培养基中激素组合、抗生素等因素的影响,转化效率低下、试验重复性差。因此,建立稳定、高效的遗传转化体系极为重要<sup>[15-16]</sup>。该研究以黄瓜子叶节为外植体,采用农杆菌介导法将黄瓜 CsEXP10 基因 RNAi 干扰载体导入黄瓜,研究了不同外植体苗态、不同 AS 浓度、脱菌次

数、不同抑菌剂 Cef 浓度及不同生根培养基等对黄瓜遗传转化的影响,以期为开展黄瓜的遗传转化研究及培育优良新品种提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄瓜种子为“津优1号”,购自天津科润黄瓜研究所。

供试根癌农杆菌菌株 GV3101 和 CsEXP10 基因 RNAi 干扰载体 pCAMBIA1301-CsEXP10 均为河南科技学院蔬菜学科研究室保存。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 外植体的获取

选饱满、无病、无损伤的黄瓜种子温汤浸种,并在超净工作台中对种子进行消毒处理后在 MS 培养基(MS 粉  $4.43 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂  $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,蔗糖  $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 5.8)上进行接种。切取不同苗态类型的无菌苗子叶节做外植体。

#### 1.2.2 影响因素的研究

接种到添加不同浓度 AS(0、50、100、150、 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的预培养基(MS+ $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  AgNO<sub>3</sub>+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA)中进行培养;农杆菌侵染后将外植体接种到添加不同浓度 AS(0、

**第一作者简介:**常怀成(1996-),男,硕士研究生,研究方向为蔬菜生理生态。E-mail:15617199956@163.com.

**责任作者:**罗未蓉(1981-),女,硕士,讲师,现主要从事园艺学教学与科研工作。E-mail:wrluo2008@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31401860, U1204322);河南省高校科技创新人才计划资助项目(17HASTIT040)。

**收稿日期:**2017-09-26

50、100、150、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的共培养基(MS+2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$ +2.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA)中培养;共培养后用无菌水冲洗外植体进行脱菌处理,后转接到添加不同浓度 Cef(0、200、300、400、500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的选择培养基(MS+2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$ +2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA+100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Kan)中培养。切取在选择培养基中诱导分化的不定芽转接到不同的生根培养基中进行生根培养,每个阶段分别观察和统计外植体状态。

### 1.2.3 转基因植株的鉴定

当植株生长到一定的大小时进行驯化移栽。获得黄瓜抗性植株后,取幼嫩叶片 10~100 mg,使用植物 DNA 提取试剂盒(生兴,南京)提取 DNA,以 5'-TGGAGAAGGTGCTTATGGAATG-3'和 5'-CATAATTCAGGCGCTCGATAC-3'为引物对进行 PCR 扩增确定转基因植株。

### 1.3 数据分析

采用 Microsoft Excel 2003 软件进行数据处理,采用 DPS 统计软件进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体不同苗态对黄瓜遗传转化的影响

在切取外植体时,不同苗龄阶段的无菌苗其子叶展开情况不同(图 1)。不同发育阶段的黄瓜外植体,其所具有的细胞分化程度不同,后期的愈



注:A.子叶抱合;B.子叶微展,开角度呈 30°左右;C.子叶展开角度呈 60°左右;D.子叶平展。

Note: A. Closed cotyledon; B. Opening angle of cotyledon about 30°; C. Opening angle of cotyledon about 60°; D. Flat-tened cotyledon.

图 1 苗态类型

Fig. 1 Seedling type

伤诱导率也不同。从表 1 可以看出,苗态 A、B 和 C 与 D 相比,差异显著。其中,苗态 A 的愈伤诱导率最高,抗性芽数最多,即诱导分化效果最好。因此,选择苗态 A 作为子叶节外植体类型进行遗传转化。

表 1 不同外植体苗态对遗传转化的影响

Table 1 Effects of seedling type on genetic transformation

苗态类型 Seedling type	外植体总数 Number of explants/个	愈伤诱导率 Callus induction rate/%	抗性芽数 Number of resistant shoots/个
A	24	67.60a	16.22a
B	24	62.50a	15.00a
C	24	54.17a	13.00a
D	24	37.50b	9.00b

注:小写字母表示各处理间的差异显著性( $P<0.05$ )。下同。

Note: Difference lowercase letters in the same column show statistical significance( $P<0.05$ ). The same below.

### 2.2 预培养基中添加 AS 对黄瓜遗传转化的影响

外植体通过预培养能够提高在外界环境条件下的适应性,AS 可以诱发农杆菌介导的有效基因的激活和高效表达,提高植物的遗传转化率。从表 2 可知,在预培养基中添加不同浓度的 AS 对黄瓜外植体的抗性芽数和愈伤诱导率影响显著。当 AS 浓度为 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤诱导率和外植体抗性芽数最高,分别为 86.10% 和 20.66;当 AS 浓度为 0、150、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,与 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  相比差异显著,但彼此之间差异不显著;当 AS 浓度为 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,外植体愈伤诱导率和抗性芽数最低,分别为 51.87% 和 12.45。

表 2 预培养基中加入 AS 对遗传转化的影响

Table 2 Effects of pre-culture medium with AS on genetic transformation

AS 浓度 Concentration of AS/( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	外植体总数 Number of explants/个	愈伤诱导率 Callus induction rate/%	抗性芽数 Number of resistant shoots/个
0	24	58.33b	14.00b
50	24	71.30ab	17.11ab
100	24	86.10a	20.66a
150	24	58.33b	14.00b
200	24	51.87b	12.45b

2.3 共培养基中加入 AS 对黄瓜遗传转化的影响

在共培养基中添加不同浓度的 AS 可以提高外植体诱导分化率。由表 3 可以看出,在共培养基中添加 AS 的外植体愈伤诱导率和抗性芽数显著高于对照。其中,在 AS 浓度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,其愈伤诱导率和抗性芽数最高,分别为 62.50%和 15.00。因此,在共培养基中添加浓度为 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AS 可以显著提高愈伤诱导率和增加抗性芽数。

表 3 共培养基中加入 AS 对遗传转化的影响

Table 3 Effects of co-culture medium with AS on genetic transformation

AS 浓度 Concentration of AS/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	外植体总数 Number of explants/个	愈伤诱导率 Callus induction rate/%	抗性芽数 Number of resistant shoots/个
0	24	37.50a	9.00a
50	24	54.17a	13.00a
100	24	62.50a	15.00a
150	24	45.83a	11.00a
200	24	50.00a	12.00a

2.4 无菌水冲洗次数对黄瓜遗传转化的影响

为了减少侵染过程中农杆菌菌液污染,利用无菌水对外植体进行冲洗脱菌。由表 4 可知,无菌水不同冲洗次数对外植体染菌率和其生长情况有显著影响。与对照相比,无菌水冲洗 1 次和 2 次虽然有明显差异,但外植体表面仍有农杆菌污染,且对外植体生长有不良影响。无菌水冲洗 3 次时脱菌效果最好,染菌率最低,外植体生长状况良好。因此,选择无菌水冲洗 3 次进行脱菌处理。

表 4 无菌水冲洗次数对遗传转化的影响

Table 4 Effects of washing times on genetic transformation

冲洗次数 Washing times/次	外植体总数 Number of explants/个	外植体染菌率 Infection rate of explants/%	外植体生长情况 Growth status of explants
0	24	28.61a	外植体被农杆菌侵染,逐渐黄化死亡
1	24	12.57b	外植体上残留大量农杆菌,植株生长后期污染
2	24	11.25b	部分农杆菌生长,外植体长势较好
3	24	1.75c	脱菌彻底,无污染,外植体长势良好

2.5 选择培养基中加入 Cef 对黄瓜遗传转化的影响

Cef 是一种抑菌抗生素,可以有效抑制选择培养阶段的农杆菌污染。由表 5 可知,在选择培养基中添加不同浓度的 Cef 对愈伤诱导率和抗性芽数有显著影响。与对照相比,在选择培养基中添加 Cef 可以有效促进外植体的诱导分化,且添加 300、400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时愈伤诱导率和抗性芽数最大,均为 67.60%和 16.22。因此,在同样的效果下选择较低的浓度即  $300\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 5 选择培养基加入 Cef 对遗传转化的影响

Table 5 Effects of select-culture medium with Cef on genetic transformation

Cef 浓度 Concentration of Cef/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	外植体总数 Number of explants/个	愈伤诱导率 Callus induction rate/%	抗性芽数 Number of resistant shoots/个
0	24	0.00b	0.00b
200	24	66.67a	16.00a
300	24	67.60a	16.22a
400	24	67.60a	16.22a
500	24	58.33a	14.00a

2.6 不同生根培养基对黄瓜遗传转化的影响

当在选择培养基中分化的不定芽长至 2~3 cm 时,转接到不同的生根培养基(表 6)中进行生根培养。在生根培养最初的 4 d,在培养基 3 中生根率达到了 100.00%,并且植株生长良好,发育迅速,外植体变高变大,叶色深绿(图 2 C)。至第 4 天时,不定芽下端切口与培养基接触处出现微小的白色愈伤(图 2 B),与其它培养基差异显著。培养基 1 和 2 无法生根;培养基 4 可以生根,但愈伤过多且呈团状,产生的根系短小,不利于根系进一步分化(图 2 A)。

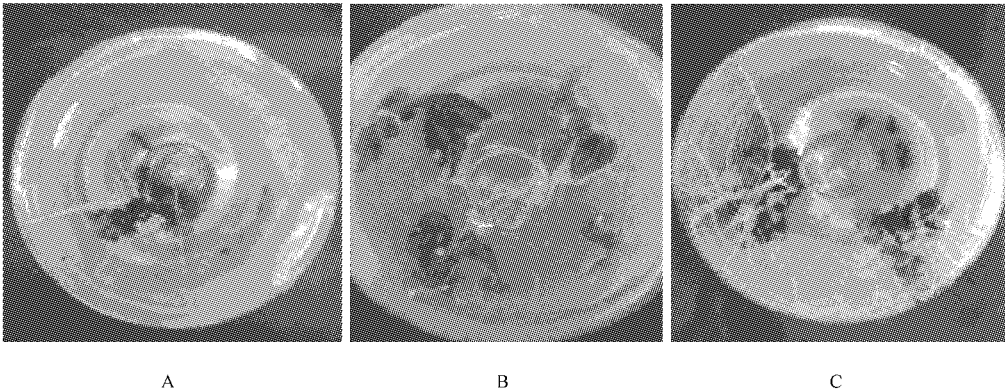
2.7 黄瓜子叶节遗传转化体系的建立

在对影响黄瓜遗传转化因素进行比较分析的基础上,建立了一套最佳组合方案,即在无菌苗子叶抱合时切取外植体,置于预培养基上  $\text{MS}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AgNO}_3+100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AS}$  中预培养 2 d,接着在共培养基  $\text{MS}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AgNO}_3+100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AS}$  中共培养 2 d,用无菌水冲洗 3 次,然后置于选择培养基  $\text{MS}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

6-BA+2.0 mg · L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> + 300 mg · L<sup>-1</sup> Cef+100 mg · L<sup>-1</sup> Kan 上进行选择培养,不定芽长至 2~3 cm 时,切取不定芽放于生根培养基 MS+0.2 mg · L<sup>-1</sup> IAA+400 mg · L<sup>-1</sup> Cef 上生根培养,植株长至一定大小,进行驯化移栽(图 3)。

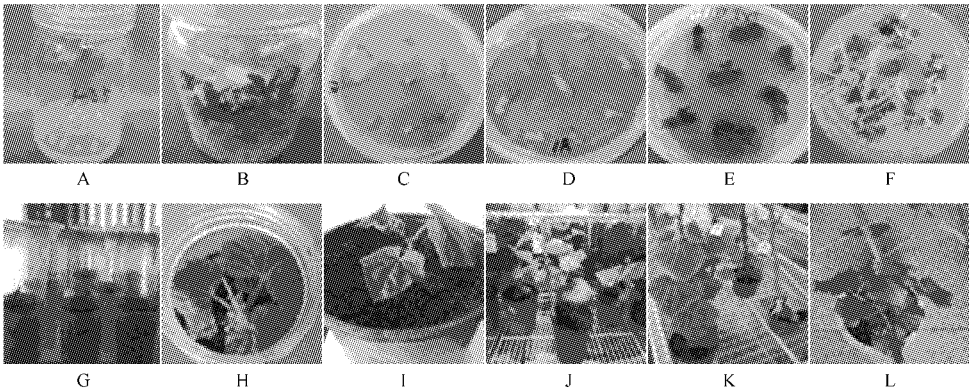
表 6 生根培养基对黄瓜遗传转化的影响  
Table 6 Effects of rooting medium on genetic transformation

编号 Number	培养基 Medium	生根率 Rooting rate/%	生长状况 Growth status
1	MS	0.0c	污染现象严重,无法生根
2	MS+400 mg · L <sup>-1</sup> Cef	0.0c	无法生根
3	MS+0.2 mg · L <sup>-1</sup> IAA+400 mg · L <sup>-1</sup> Cef	100.0a	生长良好,发育迅速,叶色深绿
4	MS+0.2 mg · L <sup>-1</sup> NAA+400 mg · L <sup>-1</sup> Cef	89.5b	可以生根,愈伤多且呈团状,根系短小



注:A. 不良根系;B. 生根前的白色愈伤;C. 良好根系。  
Note: A. Bad roots; B. Callus; C. Good roots.

图 2 不同培养基对生根的影响  
Fig. 2 Effects of different culture medium on rooting



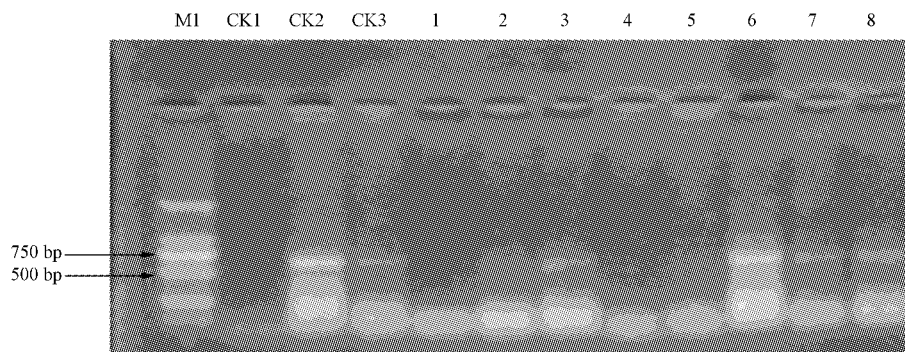
注:A. 无菌苗种子;B. 无菌苗;C. 预培养;D. 共培养;E. 选择培养;F. 生根培养;G~L. 驯化及移栽。  
Note: A. Steriled seeds; B. Steriled seedling; C. Pre-cultivation; D. Co-cultivation; E. Select-cultivation; F. Rooting cultivation; G-L. Domestication and transplanting.

图 3 黄瓜子叶节遗传转化体系  
Fig. 3 Genetic transformation system of cotyledon node of cucumber

## 2.8 抗性植株的获得

在前期优化和建立黄瓜遗传转化体系的基础上,获得了119株抗性植株。采用植物DNA提取试剂盒提取抗性植株DNA,以相应质粒DNA为阳性对照,进行PCR扩增。反应条件为:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,54℃退火30 s,

72℃延伸1 min,30个循环;72℃继续延伸10 min。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。结果发现,34株抗性植株能扩增出和质粒DNA大小一致的条带,而阴性对照和非转基因植株均未扩增出任何条带(图4)。



注:MI, Marker;CK1, 阴性对照;CK2~CK3, 阳性对照;1~2,4~5, 非转基因植株;3,6~8, 转基因植株。

Note:MI, Marker;CK1, Negative control;CK2-CK3, Positive control;1-2,4-5, Non-transgenic plants;3,6-8, Transgenic plants.

图4 部分黄瓜抗性植株的PCR分析

Fig. 4 PCR analysis of cucumber resistant plants

## 3 结论与讨论

不同发育阶段的黄瓜外植体苗态所具有的细胞分化程度不同,最终导致黄瓜子叶节的愈伤诱导率不同。白婧<sup>[17]</sup>以子叶作为外植体,转化南瓜时发现,颜色鲜绿且成直立状的外植体苗态类型再生效果较好。肖守华<sup>[18]</sup>以西瓜、甜瓜子叶节为外植体,研究了不同苗态对不定芽诱导率的影响,结果表明,当子叶颜色由黄色转浅绿色时效果最佳。该研究结果表明,A类(子叶抱合)苗态愈伤诱导率最高,抗性芽数最多,诱导分化效果最佳。

植物遗传转化中通常采用AS来提高转化效率。梁慧敏等<sup>[19]</sup>认为,加入10 mg·L<sup>-1</sup> AS可以显著提高苜蓿的愈伤诱导率及抗性芽率。齐飞<sup>[20]</sup>以子叶节为外植体,建立了黄瓜谷胱甘肽转氨酶CsGRX1基因转化体系,发现共培养基中加入100 μmol·L<sup>-1</sup> AS转化效果较好。该试验在预培养基和共培养基中分别添加不同浓度的AS,均显著提高了愈伤诱导率和抗性芽数,且AS最佳浓度均为100 μmol·L<sup>-1</sup>。

遗传转化中Cef可作为抑菌剂来抑制农杆菌

污染。不同作物和生态环境需要的Cef浓度不同。该研究发现,在选择培养基中添加300 mg·L<sup>-1</sup>和400 mg·L<sup>-1</sup>的Cef,愈伤诱导率和抗性芽数最大。该研究结果与张若纬<sup>[15]</sup>的一致。

农杆菌污染现象是农杆菌介导的遗传转化过程中常见的问题,在共培养阶段即可发生。张玉园<sup>[21]</sup>在耐盐StNHX1基因转化印度南瓜的研究中发现,对农杆菌侵染的外植体进行脱菌处理3次即可。该研究在选择培养初期采用无菌水冲洗3次即可有效控制农杆菌污染。

生根培养阶段需要添加一定浓度的IAA和NAA来促进外植体根部的分化。该试验结果表明,在生根培养最初的4 d,在培养基(MS+0.2 mg·L<sup>-1</sup> IAA+400 mg·L<sup>-1</sup> Cef)上生根率达到了100.0%,并且植株生长良好,根系发达,须根较多。

该研究以黄瓜子叶节为外植体,对外植体苗态、AS浓度、脱菌处理、Cef浓度及生根培养基进行了筛选优化,建立了黄瓜子叶节遗传转化体系,为深入开展黄瓜遗传转化研究提供参考依据。

## 参考文献

- [1] HUANG S, LI R, ZHANG Z, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Nature Genetics, 2009, 41(12): 1275-1281.
- [2] 张萍, 王斐, 孙辉, 等. 棉花 *GhACO1* 基因植物表达载体构建及拟南芥遗传转化[J]. 生物学杂志, 2011, 28(6): 19-22.
- [3] ALAN M L, ARLENE R B, STEPHEN G R, et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Science, 1986, 234: 464-466.
- [4] KENICHI T, QI Y P, LE V N, et al. An efficient *Agrobacterium* mediated transient transformation of *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2013, 69: 713-719.
- [5] XU P, STEPHANIE J R, MARILYN J R. Expression of antiapoptotic genes *bcl-xL*, and *ced-9* in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(44): 15805-15810.
- [6] YANG C X, LI H X, ZHANG J H, et al. A regulatory gene induces trichome formation and embryo lethality in tomato [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(29): 11836-11841.
- [7] 崔梦祥, 李鹏丽, 刘仲齐, 等. *LeCOPILIKE* 基因的克隆、反义构建及微型番茄的转化[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(5): 329-338.
- [8] 金红, 杜胜利, 陈峥, 等. 抗除草剂转基因黄瓜的获得及 T1 植株抗性鉴定[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 44-46.
- [9] 东丽, 李杰, 朱延明. 抗真菌、抗渗透胁迫基因多价植物表达载体构建及对黄瓜遗传转化的研究[J]. 农业科技通讯, 2008(3): 37-41.
- [10] 邓小燕, 张兴国, 井鑫, 等. 冷诱导转录因子基因 *CBF3* 转化黄瓜的研究[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2004, 26(5): 603-605.
- [11] 刘文萍, 卢淑雯, 刘建新, 等. 农杆菌介导的 *BnCS* 基因对黄瓜遗传转化研究[J]. 北方园艺, 2009(1): 20-22.
- [12] 魏爱民, 张文珠, 杜胜利, 等. 影响农杆菌介导的黄瓜抗虫基因遗传转化体系的因素研究[J]. 天津农业科学, 2006, 12(3): 1-3.
- [13] 王慧中, 赵培洁, 周晓云. 转 *WMV-2CP* 基因黄瓜植株的再生[J]. 植物生理学报, 2000, 26(3): 267-272.
- [14] 苏绍坤, 刘宏宇, 秦智伟. 农杆菌介导 *iaaM* 基因黄瓜遗传转化体系的建立[J]. 东北农业大学学报, 2006, 37(3): 289-293.
- [15] 张若纬. 黄瓜离体再生和遗传转化体系的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [16] 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.
- [17] 白婧. 农杆菌介导  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶(BG2)基因转化南瓜的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.
- [18] 肖守华. 西瓜、甜瓜遗传转化体系的建立及转基因植株的抗病性分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.
- [19] 梁慧敏, 夏阳, 孙仲序, 等. 根癌农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 152-156.
- [20] 齐飞. 黄瓜谷氧还蛋白 *CsGRX1* 基因对黄瓜遗传转化体系的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [21] 张玉园. 南瓜子叶节离体再生体系的构建与耐盐 *StNHX1* 基因的转化[D]. 新乡: 河南科技学院, 2015.

## Factors Influencing *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation of Cucumber

CHANG Huaicheng, NI Lei, SUN Yongdong, LUO Weirong

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003)

**Abstract:** ‘Jinyou No. 1’ cucumber cotyledonary node explants was used as experimental material, the effects of seedling type, acetosyringone concentration (AS) in pre-culture medium and co-culture medium, washing times with sterile water, cephalosporin (Cef) concentration in select-culture medium and rooting medium on genetic transformation system were researched in order to supply reference for genetic transformation of cucumber. The results showed that various optimum parameters such as seedling type A (closed cotyledon), with  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of AS, washed three times with sterile water, select-culture medium with  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef, and rooting medium with  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Cef were obtained with cotyledonary node explants.

**Keywords:** cucumber; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; *CsEXP10*