



专题综述

瓜类蔬菜组织培养与遗传转化研究进展

白婧, 屈淑平, 崔崇士

(东北农业大学园艺学院 哈尔滨 150030)

摘要: 概述了瓜类蔬菜组织培养过程中的主要影响因素—基因型、外植体类型、部位与生理状态、培养基、生长调节物质、碳源及其他添加物质对植株再生的影响, 以及根癌农杆菌介导的瓜类蔬菜遗传转化的影响因素与研究进展。

关键词: 瓜类蔬菜; 组织培养; 农杆菌介导; 遗传转化

Advances in tissue culture and genetic transformation of cucurbit vegetables

BAI Jing, QU Shu-ping, CUI Chong-shi

(College of Horticulture Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang, 150030, China)

Abstract: This article reviews recent progress in tissue culture and genetic transformation of cucurbit crops. The main factors during tissue culture regeneration are reviewed. These main factors include genotype; type, location and physiological state of explant; culture medium; growth regulators; carbon resource and other added substances. The influencing factors and advances of the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cucurbit crops are also discussed.

Key words: Cucurbit crops; Tissue culture; *Agrobacterium* mediated transformation; Genetic transformation

瓜类蔬菜是葫芦科(Cucurbitaceae)中以果实供食用的栽培蔬菜总称, 为一年生或多年生攀缘性草本植物。包括9个属15个种及2个变种, 其中黄瓜、西瓜、甜瓜和西葫芦在世界范围内分布广泛, 种类繁多, 栽培面积大, 经济价值高, 在人类的日常饮食生活中起到了十分重要的作用。但病虫害、逆境等因素对瓜类蔬菜的产量及品质影响很大。近年来, 基因工程技术育种越来越多地应用于瓜类蔬菜, 在瓜类蔬菜抗性育种中发挥了越来越重要的作用。利用组织培养获得再生体系, 为开展瓜类蔬菜转基因研究、创造新的种质资源特别是抗性种质资源, 提高瓜类蔬菜育种水平奠定了良好基础。目前, 瓜类蔬菜已能够通过器官发生途径获得再生植株, 有的还建立了比较高频的再生体系。而且已有多种瓜类蔬菜获得了转基因植株, 如黄瓜、甜瓜、西瓜等^[1-9]。本文就瓜类蔬菜器官途径再生体系建立与农杆菌介导遗传转化的研究进展做一综述。

1 组织培养影响因素

1.1 基因型

植物组织培养成功与否在很大程度上受基因型的影响。不同基因型植物的离体培养条件不同, 外植体对培养的反应如不定芽发生时间、途径以及发生率差异也很大。赵秀娟等^[10]用10种黄瓜材料为研究对象, 发现基因型间的再生能力差别较大, 不定芽再生率低的只有10%的, 高的可以达到80%。杜胜利等^[11]用12个不同基因型黄瓜品种进行试验, 不定芽再生

率最高可达73%, 最低只有25%。Abrie等^[12]利用西葫芦和笋瓜获得了高效再生植株, 但有3个品种在任何培养基上均未形成再生器官, 而笋瓜品种Chicago Warded却发生了胚胎途径的再生, Hales Best 36品种在所有的含有细胞分裂素的培养基上都能形成芽, 表现了较强的基因型差异。Todd等^[13]测试了85个基因型的黄瓜子叶外植体在MS+1 mg/L BA+1 mg/L NAA培养基上不定芽的发生情况, 只有4个基因型的子叶外植体有不定芽发生。

1.2 外植体类型与部位

瓜类蔬菜器官组织培养研究中外植体的种类很多, 如子叶、子叶节、茎尖、下胚轴、真叶等等。但不同的外植体或相同外植体不同发育阶段的不定芽诱导率差异明显。李贞霞等^[14]用相同培养基对黄狼南瓜胚根、胚轴和子叶分别进行愈伤组织的诱导, 结果认为子叶是南瓜诱导愈伤组织的最适外植体, 胚根次之, 胚轴的诱导效果最差。何晓明等^[15]对津绿4号黄瓜的子叶和下胚轴作为外植体诱导再生植株的研究表明, 下胚轴诱导的愈伤组织不能分化出芽, 部分产生白色不定根, 而子叶出芽率为30%。甜瓜组织培养研究中, 不同基因型品种的幼嫩子叶都可得到较高频率的再生不定芽^[12-14], 而真叶、下胚轴、茎尖等部位再生频率很低, 甚至不能再生。由于农杆菌介导的转化方法对植物再生频率要求较高, 所以, 在瓜类蔬菜遗传转化的研究中, 多采用再生频率较高的子叶、子叶节或者子叶柄作为外植体。

同一外植体不同部位不定芽诱导率与诱导方式也有差

收稿日期: 2008-03-19; 修回日期: 2008-05-26。

作者简介: 白婧, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为蔬菜育种。电话: 0451-55190343; 电子信箱: baijing810820@126.com。

通讯作者: 崔崇士, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种和生物技术研究。电子信箱: shwkj@mail.neau.edu.cn。

异。赵建萍^[15]对艾西丝南瓜的再生研究表明,子叶不同部位的切块虽均能高频率地诱导出愈伤组织,且诱导率达53.3%~100%,但唯有子叶基部临近下胚轴一端切口边缘有不定芽的分化,这与王春霞等^[16]对京欣1号西瓜子叶进行芽分化试验的结果一致,表明子叶的不同部位再分化能力并不相同。余义和等^[17]认为,以子叶作为外植体可以通过愈伤组织途径之后形成再生植株,而以子叶节作为外植体可以直接诱导不定芽形成再生植株。马国斌等^[18]的研究表明,西瓜和甜瓜组织培养中,子叶和真叶外植体切块形态学下端部位总是首先大量发生愈伤组织或分化出器官,而切块形态学上端部很少或几乎不发生愈伤组织或器官。可见,多数研究均表明,子叶的形态学下端与子叶节在离体培养中更容易诱导出芽且诱导率较高。

1.3 外植体生理状态

不同生理状态的外植体分化率差别很大。多数研究中以无菌苗生长天数作为外植体生理状态的衡量依据;Dong^[19]和Compton等^[20]的研究认为,5d苗龄幼苗子叶的不定芽发生频率最高;赵建萍等^[15]在研究艾西丝南瓜子叶离体培养时发现,4~5d苗龄子叶不定芽诱导率最高,随苗龄的增加或减少芽的分化率均迅速降低。宋道军等^[21]研究认为苗龄3d左右的西瓜基端子叶最易于再生。而黄学森、王果萍等^[22-23]的研究表明,当西瓜子叶刚刚由黄变绿大概5d苗龄时不定芽发生率最高。但从众多研究结果可以看出,相同种类瓜类蔬菜适宜分化的苗龄并不一致。这可能是由于培养条件和基因型等差异导致不同品种的种子发育快慢不同。所以,以子叶颜色判断外植体生理状态可能更为有效。张志忠等^[24]对西瓜高频再生体系的研究中认为无菌苗子叶呈淡绿色时不定芽诱导率最高,颜色发黄或已变为深绿色的子叶分化效果较差,这与Dong^[19]、黄学森^[22]、任春梅^[25]及王果萍等^[23]的报道均是一致的。

1.4 基本培养基

同种植物、相同外植体选用不同的基本培养基,不定芽诱导率不同。瓜类蔬菜器官途径组织培养大多选择MS培养基为基本培养基,少数应用改良型MS培养基或其他培养基,如Miller、B5、LS等。于喜艳等^[26]在研究甜瓜子叶离体培养时选用改良的Miller培养基获得了较高的不定芽诱导率。王春霞等^[16]以子叶为外植体选用MSA培养基也得到了较高的不定芽诱导率。邓向东等^[27]发现LS培养基对哈密瓜的不定芽诱导效果较好。

1.5 生长调节剂的种类及配比

采用瓜类蔬菜器官组织培养诱导不定芽常用的细胞分裂素是BA,生长素中常用的是IAA、NAA和IBA,也有部分研究应用ZT、KT、2,4-D等激素。生长调节剂种类及其配比是影响植物细胞脱分化和再分化的关键因素之一,特别是细胞分裂素与生长素的比例搭配,直接影响细胞分化方向及研究成败。由于离体培养中基因型及外植体的依赖性,以致不同品种、不同类型、同一品种不同部位,甚至不同研究者所获得的适宜培养基也不尽相同。李贞霞等^[28]以黄狼南瓜为试材进行芽诱导试验的结果表明,MS+1.0 mg/L BA+0.05 mg/L NAA为最适培养基;余义和等^[17]使用相同试验材料研究则认

为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA为最适芽诱导培养基。赵建萍^[15]以IAA 0.4 mg/L分别与BA 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mg/L进行配比,对艾西丝南瓜进行芽诱导,结果表明,BA在2.0~8.0 mg/L均可诱导不定芽,以4.0 mg/L效果最佳,低于1.0 mg/L时不能诱导出芽,而由切口处分化出少量新叶,难以发育成正常植株。梅茜等^[29]对津研4号黄瓜芽诱导研究结果显示,BA质量浓度低于0.5 mg/L时,完全不能诱导不定芽的形成;BA为1.0 mg/L时,最适合芽再生;高于此质量浓度,不定芽再生率反而下降。刘春香等^[30]以黄瓜品种LS-21为试材所进行的研究表明,6-BA (1.2~1.6)mg/L+IAA 0.2 mg/L,芽分化频率均较高。另外,不同激素诱导效果也有很大差异,邓向东等^[27]对网纹香和S-242个甜瓜品种应用了6-BA、ZT、KT、2ip、2,4-D 5种激素进行诱导,其中6-BA诱导效果最好。

多数研究认为,当不定芽伸长至2~3 cm时即进行生根培养。NAA、KT、IAA和IBA都能明显促进再生植株生根。蔡润等^[30]将古拉巴等8个甜瓜品种再生芽在1/2 MS+IAA 0.02 mg/L培养基中生根,生根率可达91%,驯化成活率在90%以上。苏永全等^[31]以甜瓜品种黄河蜜3号为材料,认为在1/2 MS+IAA 0.20 mg/L的培养基上生根效果最好,生根率达100%。褚剑峰等^[32]用高质量浓度的生长素液浸泡西瓜和甜瓜再生芽后,在1/2 MS+IBA 0.8 mg/L的生根培养基上生根率较高,且用质量浓度60 mg/L NAA液浸泡处理生根率最高。南瓜和黄瓜诱导生根时大多数采用1/2 MS培养基,也有附加不同激素的培养基。余义和等^[17]研究认为,诱导黄狼1号南瓜不定根的最佳培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA。

综合不同学者的研究发现,生长调节物质的种类与浓度使用范围较广。不同瓜类与品种所选择的激素种类与浓度差异很大。所以,不同基因型作物进行离体培养时,均应设置不同激素种类浓度梯度进行试验摸索,以选择最佳诱导激素与浓度配比。

1.6 碳源与其他添加物

瓜类蔬菜离体培养研究,培养基中基本采用蔗糖作为碳源,对不同碳源的比较试验尚未见报道。蔗糖添加量多为0.3%。也有不同报道;余义和等^[17]在南瓜离体培养中利用的蔗糖浓度为0.2%,但结果差异不显著。邓向东等^[27]试验发现,提高培养基中的蔗糖浓度对提高哈密瓜不定芽诱导率有促进作用,但其效果因哈密瓜品种不同而差异显著。陈学军等^[33]认为,含较低浓度蔗糖的分化培养基对西葫芦胚珠再生芽的诱导效果优于较高浓度的。另外,有很多报道培养基中适当添加AgNO₃可促进不定芽再生。梅茜等^[29]研究表明,添加2.0 mg/L的AgNO₃时,黄瓜芽诱导率比对照高出1倍。也有不同报道;赵军良等^[34]在黄瓜子叶离体培养研究的培养基中加入1~4 mg/L的AgNO₃或0.1~0.3 mg/L的GA₃,结果发现,所有的外植体只大量长根,无芽分化,而且随着培养时间的延长,外植体逐渐变黄死去。田长恩等^[35]研究发现,培养基中附加BR会抑制甜瓜子叶离体培养中不定根和不定芽的诱导再生,但对不定根的抑制作用不同于不定芽。

总之,瓜类蔬菜离体培养过程影响因素很多,培养条件如温度、光照,培养过程中的光、暗处理,外植体大小、切割方

式、放置方向,继代时间间隔等均可影响到诱导分化率。但目前有关这方面的研究报道较少,其影响的程度和机理还有待于继续研究探讨。

2 农杆菌介导的遗传转化研究进展

2.1 农杆菌介导法的影响因素

2.1.1 菌株的影响 根据农杆菌 Ti 质粒诱导的植物冠瘿瘤中所合成的冠瘿碱不同,将农杆菌分为 4 类:胭脂型(nopaline)、章鱼碱型(octopine)、农杆菌型(agropine)和农杆菌素碱型(agrocinopine)。在遗传转化中常用的有章鱼碱型、胭脂碱型和农杆菌型。由于农杆菌菌株的侵染能力在应用于不同类型植株时存在很大差异,同一植物不同菌株的敏感性也不同,因而不同的作物种类在实际操作过程中其实存在着最合适或最为敏感的农杆菌菌株。张志忠等^[24]分别用农杆菌菌株 LBA4404、AGL-1 和 EHA105 侵染同一西瓜品种,结果表明 EHA105 的侵染能力明显优于 LBA4404 和 AGL-1。在植物遗传转化试验中,选择两者的合适搭配是很重要的,这种高效侵染的配合将直接影响最终转化率的高低。目前,瓜类蔬菜遗传转化中常用的菌株为章鱼碱型的 LBA4404 与农杆菌型的 EHA105。

2.1.2 酚类化合物的影响 酚类化合物如乙酰丁香酮(AS)等对农杆菌转化能力有明显影响。Stachel 等^[25]于 1985 年首次从烟草叶片的伤口渗出液中分离出乙酰丁香酮(AS)和羟基乙酰丁香酮(HO-AS),并证明这些酚类物质能激活 Ti 质粒上 Vir 区基因的表达。乙酰丁香酮(AS)是双子叶植物细胞壁合成的前体,通常单子叶植物在转化过程中不产生乙酰丁香酮,所以多数研究认为添加 AS 可以促进根癌农杆菌感染单子叶植物,而双子叶植物转化则不需加乙酰丁香酮。但目前许多瓜类蔬菜遗传转化研究认为,添加一定浓度的 AS 可以提高转化效率。陈峥等^[27]的研究表明,细胞渗出液中含有 0.5~1.0 mg/L 的 AS 即可诱导农杆菌 Vir 区基因的活化,接触 AS 的外植体一段时间后产生的愈伤组织明显多于没有接触的;李建勇^[28]等进行西瓜遗传转化研究时,在共培养培养基中加入 20 mg/L 的 AS 能够显著提高西瓜子叶外植体的转化效率,转化率高达 70%,远远高于没有加 AS 对照的转化率(20%);张志忠等^[24]的研究表明,共培养培养基中添加乙酰丁香酮可明显提高转化频率,最高达 74.8%,而在其他条件类似情况下不经此处理的转化率仅为 46.6%。由此可见,多数研究认为转化过程中使用乙酰丁香酮对提高转化率是有益的。

2.1.3 AgNO₃ 的影响 研究表明,转化过程中培养基加入 AgNO₃ 可以明显提高转化效率。范爱丽^[29]进行黄瓜遗传转化研究时,在培养基中添加 2~4 mg/L AgNO₃,对黄瓜遗传转化有一定的促进作用,并获得了较多的再生芽和健壮的抗性芽。梅茜等^[29]的研究表明,在培养基中适当添加 AgNO₃,可以促进不定芽再生,且以 2.0 mg/L 最适,比对照的芽诱导率高出 1 倍,但高于此质量浓度,芽再生率反而下降。对于产生这种效果的原因,一些研究认为,AgNO₃ 是乙烯作用的抑制剂,它可以通过促进多胺的合成提高体细胞胚胎和芽发生的频率^[40-41]。Chi 等^[40]认为 AgNO₃ 并不是抑制乙烯的合成,而是促进 ACC 合成

酶活力和 ACC 的积累。也有研究认为,Ag⁺ 在促进植株再生上与多胺代谢无关,Ag⁺ 抑制乙烯活性可能是通过竞争性结合细胞上的乙烯受体蛋白,起到阻止或降低乙烯的作用。因而关于 AgNO₃ 的作用机理还有待进一步的研究。

2.2 目的基因研究进展

植物基因工程所转移的目标基因及所控制的性状正在不断扩大和日益深化,随着瓜类蔬菜离体培养技术的日趋成熟,许多学者对瓜类蔬菜的遗传转化进行了深入研究。迄今为止,利用转基因技术已经培育出抗病、抗逆、延迟成熟和高品质的瓜类蔬菜品种。病毒病是瓜类蔬菜最重要的且较难防治的病害之一,因此,应用基因工程创造抗病毒病新种质方面的研究成为瓜类蔬菜品种改良的前沿领域。Yoshioka 等^[42]首次报道了用根癌农杆菌介导将黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因成功导入甜瓜。何铁海等^[43]将江浙地区来源的 CMV-CP 基因经农杆菌介导转化黄瓜,抗性接种试验结果表明,部分转基因植株对 CMV 具有较高抗性。王慧中等^[44]在将 WMV-1 CP 基因导入西瓜后,又将 WMV-2 CP 基因导入浙蜜 2 号西瓜,经 southern 验证获得 3 个转化株,进一步研究表明 CP 基因符合 1 对基因遗传,并培育成高抗 WMV-2 的转基因后代纯合株系。王慧中等^[45]还通过农杆菌介导法将 WMV-2 CP 基因导入甜瓜品种华南 108,获得转基因抗性植株。目前,已转入甜瓜的病毒外壳蛋白基因有黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因(CMV-CP)、西瓜花叶病毒外壳蛋白基因(WMV-CP)、西葫芦花叶病毒外壳蛋白基因(ZYMV-CP)等。黄学森等^[46]将西瓜花叶病毒 2 号(WMV-2)外壳蛋白(CP)基因、小西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)复制酶(Nib)基因和黄瓜花叶病毒(CMV)复制酶基因构建三价基因的植物表达载体,通过农杆菌介导转化四倍体西瓜植株,获得转基因植株,并在后代中稳定遗传。经温室及大田接种鉴定,T3 代转基因西瓜抗病毒性达中抗水平。

关于瓜类蔬菜真菌性病害转基因研究也有报道。东丽^[47]将 chitinase、rip 2 种抗真菌病的基因、及胁迫信号传导过程中的关键基因 DREB1A 基因构建在 1 个植物表达载体上,采用农杆菌介导法将此植物表达载体导入黄瓜长春密刺与津研 4 号,获得了转基因抗性植株。葛屹松^[48]用根癌农杆菌介导法将几丁质酶基因和 β-1,3 葡聚糖酶基因导入新疆甜瓜中,经卡那霉素的抗性筛选,获得转化再生植株。张明方等^[49]采用根癌农杆菌介导法将含有葡聚糖酶基因和几丁质酶双基因的表达载体遗传转化西瓜,经 PCR 检测,基因已导入西瓜植株。黄瓜转水稻几丁质酶基因植株提高了对黄瓜灰霉病抗性也已见报道^[50]。

另外,对控制瓜类蔬菜(西瓜、甜瓜、黄瓜和苦瓜等)果实成熟、耐贮性的 ACC 合成酶反义基因和 ACC 解氨酶基因等的研究也越来越多。王春霞等^[51]通过根癌农杆菌将番茄的 ACC 合成酶反义基因导入到西瓜中,获得的转基因植株乙烯释放量明显受到抑制。陆潞、黄永红等^[52-53]成功克隆了哈密瓜 ACC 氧化酶基因,并将其反义基因通过农杆菌导入哈密瓜中,经 PCR 检测表明,获得转基因植株。

干旱、盐渍、低温等逆境胁迫对瓜类蔬菜的生长和发育影响也很大,常常造成作物严重减产。但研究表明,单独导入

某个功能基因难以获得理想的抗逆性效果。所以,近几年,在植物抗逆性的转基因研究方面对转录因子研究较多。转录因子是能够与真核基因启动子区域中顺式作用元件发生特异性相互作用的 DNA 结合蛋白,通过它们之间以及与其他相关蛋白之间的相互作用,激活或抑制转录。1 个转录因子可以调控多个与同类性状有关基因的表达,从而使植株性状获得综合改良的效果。邓小燕等^[54]将从拟南芥 Columbia 生态型基因组 DNA 中扩增并克隆的冷诱导转录因子 CBF3 基因与 CaMV 35 S 启动子和 Nos 终止子融合后构建成植物表达载体并通过农杆菌介导法转化黄瓜子叶,获得转基因植株。东丽等^[57]采用农杆菌介导法将与 2 种抗真菌病基因构建于同一植物表达载体上的胁迫信号传导过程中的关键基因 DREB1A 转录因子基因转入黄瓜,对转基因植株 T1 代 PCR 阳性植株抗逆性实验证明,DREB1A 基因能够有效提高转基因黄瓜的抗旱性,同时,转基因植株 T0 代种子甘露醇筛选试验也表明种子抗旱性提高。

3 存在问题与展望

3.1 转化应用范围较窄,离体再生成苗率低

目前,瓜类蔬菜遗传转化研究主要集中在黄瓜、西瓜和甜瓜 3 个种类上,而对其他物种如南瓜、苦瓜等研究则较少。瓜类蔬菜离体再生过程中,由于受到各种内、外部因素的影响,由愈伤组织分化出芽十分困难,直接分化不定芽分化率较低,且再生体系重复性差。虽然目前关于瓜类蔬菜组织培养研究较多,但多集中在外植体选择、芽诱导等前期工作,关于组织培养的后继工作,如生根移栽、再生植株生长状况等研究较少,以致虽然芽分化率较高,但成苗率低。因此,作为农杆菌介导的遗传转化的基础,关于再生体系方面的研究还需进一步深入。

3.2 遗传转化效率低,重复性差,后续研究较少

农杆菌介导的遗传转化是农杆菌、受体植物与外界环境条件共同作用的过程,外植体基因型与生理状态、菌种、培养条件等许多内外因素对遗传转化效率的影响都很大,常常造成不同植物甚至同一植物的转化效率存在很大差异而使转化重复性差。所以,建立高效、重复性好的转化系统仍是研究的重点。目前,关于这方面的研究主要集中在对农杆菌的改造和培养条件的优化方面,而这些研究并没有从本质上解决不同植物的转化效率差异问题^[55],而且越来越多的研究表明,在决定转化效率的因素中,植物的基因型差异比菌种大,并且这些差异基本上是可遗传的,只是在不同植物中的遗传方式不同^[56]。因此,在今后的研究中,对植物因子深入研究将有助于更深入的了解转化的分子机理、扩大农杆菌的宿主范围和提高转化效率^[57]。另外,目前虽然对于遗传转化成功获得转基因植株的报道很多,但对于转化后代的遗传规律的研究报道却较少。所以,在建立高效、重复性好的转化系统的基础上,应加大对转化后代遗传规律的研究。

3.3 基因沉默与转化植株的性状变异

基因沉默与外源基因在受体植物中甲基化状况、转基因的拷贝数、插入位点等因素有关。有效防止外源基因的沉默,

提高转化率,也是建立和完善转化体系的一个重要研究内容。遗传转化植株性状变化除可能由无性变异引起外,还可能因为外源基因的导入破坏了受体基因的活性,影响到受体植株正常的代谢或表型发生改变。所以应根据育种目标积极辅以杂交、回交、组培等育种手段创造优良性状,真正达到遗传转化的目标。

3.4 转基因植物的安全性

由于标记基因的使用,使得转基因植物的安全性成为人们关注的热点,也是限制转基因植物向商品化、实用化方向发展的一个重要因素。而标记基因的消除可以减少人们对标记基因安全性的忧虑,并有助于多个转基因整合到植物中。今后的研究也应着重考虑更优的、用于转基因植株筛选的策略。就目前情况看,选用无争议的生物安全性标记基因或培育无选择标记的转基因植株是确保转基因技术安全发展的有效办法之一。

瓜类蔬菜遗传转化虽取得了一定进展,但存在的问题还很多。在今后的研究中,高频再生体系与遗传转化体系仍是我们研究的重点。同时,更应不断将更多性状优良的外源基因导入瓜类蔬菜中,以达到品种改良的目的。

参考文献

- [1] Lee YK, Chung WI, Ezura H. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.) [J]. *Plant Science*, 2003, 164(3): 413-418.
- [2] Soniya EV, Das MR. In vitro organogenesis and genetic transformation in popular *cucumis sativus* L. through agrobacterium tumefaciens [J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2002, 40(3): 329-333.
- [3] Yoshioka K, Hanada K, Nakazaki Y. Successful transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. [J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1992, 42(2): 277-285.
- [4] Galperin M, Patlis L, Ovadi A, et al. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2003, 122(1): 66-69.
- [5] Dong JC, Yang MZ, Jia SR, et al. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants [J]. *Bio/Technology*, 1991(9): 858-862.
- [6] 赵秀娟, 吴定华. 黄瓜的组织培养 [J]. *华南农业大学学报*, 1998, 19(4): 125-126.
- [7] 杜胜利, 魏惠军. 苗龄、基因型和外植体类型对黄瓜离体器官发生的影响 [J]. *天津农业科学*, 2000, 6(4): 1-5.
- [8] Abrie AL, Van SJ. Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars [J]. *Plant Growth Regul*, 2001, 35(3): 263-267.
- [9] Todd CW, Robert DL. In vitro adventitious and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus* L. [J]. *Hortscience*, 1981, 16(6): 759-760.
- [10] 李贞霞, 李新峥, 董卫华. 南瓜组织培养体系建立研究 [J]. *北方园艺*, 2005(3): 75-76.
- [11] 何晓明, 林毓娥. 黄瓜子叶和下胚轴的离体培养 [J]. *植物生理学通讯*, 2001(5): 423-424.

- [12] Homma Y, Sugiyama K, Oosawa K. Improvement in production and regeneration of somatic embryos from mature seed of melon (*Cucumis melo* L.) on solid medium[J]. Japanese Journal of Breeding, 1991, 41: 543-551.
- [13] Card Gonsalves, Xue Baodi. Transformation cucumber mosaic virus white leaf strain protein gene into *Cucumis melo* L. and evaluation transgenic plants for protection against infection[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119(2): 345-355.
- [14] Dirks R, Van BN. In vitro plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. [J]. Plant Cell Rep, 1989, 7: 626-627.
- [15] 赵建萍. 艾西西南瓜子叶的离体培养[J]. 园艺学报, 1999, 26(3): 196-197.
- [16] 王春霞, 简志英, 刘愚, 等. 京欣 1 号西瓜子叶组织培养的研究[J]. 园艺学报, 1996, 23(4): 401-403.
- [17] 余义和, 李桂荣, 王新娟, 等. 南瓜离体培养及植株再生的研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(20): 5180-5181.
- [18] 马国斌, 王鸣, 郑学勤. 西瓜和甜瓜组织培养中外植体的极性现象和敏感部位[J]. 果树科学, 1999, 16(3): 232-234.
- [19] Dong JZ, Jia Shiring. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon[J]. Plant Cell Reports, 1991(9): 559-562.
- [20] Compton ME, Gray DJ. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1993, 118(1): 151-157.
- [21] 宋道军, 陈若雷, 尹若春, 等. 西瓜高效组织培养再生体系的初步研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2000(4): 8-11.
- [22] 黄学森, 焦定量, 那丽. 西瓜子叶离体培养获得再生植株[J]. 中国西瓜甜瓜, 1994(3): 15-16.
- [23] 王果萍. 西瓜高效组织培养技术体系研究[J]. 中国西瓜甜瓜, 2002(2): 1-3.
- [24] 张志忠, 吴菁华, 吕柳新. 西瓜高频再生系统研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(2): 151-153.
- [25] 任春梅, 董廷瑜, 洪亚辉, 等. 西瓜组织培养研究[J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(1): 50-53.
- [26] 于喜艳, 何启伟, 孔庆国. 甜瓜子叶组织培养的研究[J]. 山东农业科学, 2002(2): 22-23.
- [27] 邓向东, 耿玉轩, 路子显, 等. 外植体和培养因子对哈密瓜不定芽诱导的影响[J]. 园艺学报, 1996, 23(1): 57-61.
- [28] 梅茜, 张兴国. 黄瓜组织培养研究[J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(3): 266-267.
- [29] 刘春香, 赵俊利, 王海霞, 等. 黄瓜再生体系的建立[J]. 潍坊学院学报, 2006(7): 82-84.
- [30] 蔡润, 俞虹. 甜瓜种苗克隆[J]. 上海交通大学学报, 2000, 34(11): 1586-1590.
- [31] 苏永全, 张玉鑫. 黄河蜜瓜子叶组培技术研究[J]. 甘肃农业科技, 2007(6): 18-19.
- [32] 褚剑峰, 郑琪, 林国美. 西瓜和甜瓜的组织培养技术研究[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(6): 1169-1170.
- [33] 陈学军, 邢国明, 陈竹君. 西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3): 165-167.
- [34] 赵军良, 马蓉丽, 李昌华. 黄瓜子叶组织培养再生植株[J]. 山东农业科学, 2002(2): 22-23.
- [35] 田长恩, 叶蕙, 李人圭, 等. 多胺、可溶性蛋白含量及过氧化物酶与甜瓜子叶不定芽发生的关系[J]. 园艺学报, 1997, 24(2): 199-200.
- [36] Stachel SE, Messens E, Montagu M, et al. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cell that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature, 1985, 318: 624-629.
- [37] 陈峥, 金红. 提高黄瓜农杆菌遗传转化体系再生频率的研究[J]. 天津农业科学, 2001, 7(4): 47-49.
- [38] 李建勇, 丁淑丽, 孙利祥, 等. 影响西瓜农杆菌介导的高效遗传转化效率的主要因子[J]. 浙江农业学报, 2007, 19(3): 197-201.
- [39] 范爱丽. 根农杆菌介导黄瓜遗传转化体系的研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2006.
- [40] Chi GL, Pua EC. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* 'ssp. Chinensis (Chinese cabbage) in vitro[J]. Plant Science, 1989, 64: 243-250.
- [41] 张鹏, 傅爱根, 王爱国. AgNO₃ 在植物离体培养中的作用及可能的机制[J]. 植物生理通讯, 1997, 33(5): 376-379.
- [42] Yoshioka K, Hanada K, Nakazaki Y. Successful transfer of the cucumber mosaic virus coat protein gene to *Cucumis melo* L. [J]. Japanese Journal of Breeding, 1992, 42: 277-285.
- [43] 何铁海, 应成波, 钱剑锐, 等. 抗 CMV 病毒外壳蛋白 CP 基因导入黄瓜的研究[J]. 河南职业技术学院学报, 2001, 29(3): 27-28.
- [44] 王慧中, 赵培洁, 徐吉臣, 等. 转 WMV-2 外壳蛋白基因西瓜植株的病毒抗性[J]. 遗传学报, 2003, 30(1): 70-75.
- [45] 王慧中, 李亚南, 赵培洁. 根癌农杆菌介导的甜瓜基因转化及其转基因植株的再生[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(3): 287-290.
- [46] 黄学森, 牛胜鸟, 王锡民, 等. 转基因抗病毒病四倍体西瓜的培育[J]. 中国瓜菜, 2007(6): 1-4.
- [47] 东丽. Chi_rip, DREB1A 基因多价植物表达载体构建及对黄瓜遗传转化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005.
- [48] 葛屹松. 新疆甜瓜组培体系的优化及抗病转基因研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2002.
- [49] 张明方, 于天祥, 杨景华, 等. 农杆菌介导西瓜转葡聚糖酶及几丁质酶双基因[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 475-478.
- [50] Tabei Y, Kitade S, Nishizawa Y, et al. Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*) [J]. Plant Cell Reports, 1997, 17(3): 159-164.
- [51] 王春霞, 简志英, 刘愚, 等. ACC 合成酶及其反义基因对西瓜的遗传转化[J]. 植物学报, 1997, 39(5): 445-450.
- [52] 陆璐, 王鸣, 郑学勤, 等. 哈密瓜 ACC 氧化酶_cDNA 克隆及其序列分析[J]. 园艺学报, 2000, 27(1): 32-36.
- [53] 黄永红. 甜瓜 ACC 氧化酶反义基因植物表达载体的构建及其转化甜瓜品种 'CT-1' 的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [54] 邓小燕. 抗寒基因表达载体构建及遗传转化研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003.
- [55] Opabode JT. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency[J]. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 2006, 1(1): 12-20.
- [56] 邹智, 卢长明. 影响农杆菌介导遗传转化的植物因子研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(1): 1-9.
- [57] Gelvin SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the 'gene-jockeying' tool[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(1): 16-37.