

# 西瓜组织培养及遗传转化的研究进展

陈 磊, 庞晓虹, 刘宏宇

(东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 从基因型、苗龄、外植体、激素及其他添加物、温度、光照等方面综述了西瓜的再生、遗传转化体系的建立, 及应用于西瓜的转基因方法, 探讨了当前西瓜组织培养再生体系建立存在的问题, 并展望了西瓜遗传转化的前景。

**关键词:** 西瓜; 再生体系; 遗传转化

中图分类号: S 651.03.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)02-0136-05

近年来, 人们利用植物遗传转化的方法将多种目的基因导入植物已获得成功, 其中许多有价值的转基因植物已经或者即将应用于生产。西瓜 (*Citrullus lanatus*) 是一种重要的经济作物, 其果实汁多味甜, 营养丰富, 是盛夏季节消暑、解渴的佳品。据联合国粮农组织 (FAO) 2002 年统计, 西瓜在世界 10 大果品中居第 5 位。由于西瓜的常规遗传育种方法育种周期长、难度大和遗传性状不稳定, 因此采用基因工程技术手段进行种质创新, 培育优质、高产的抗病新品种已成为西瓜遗传育种研究的热点。植物离体高效组培再生体系的建立是转基因成功的关键。西瓜组织培养的研究始于 20 世纪 70 年代初, Andrus 等<sup>[1]</sup> 于 1971 首次对无籽西瓜下胚轴进行培养, 诱导形成芽丛, 成功地建立了无籽西瓜的无性繁殖体系。在我国, 许智宏等<sup>[2]</sup> 以西瓜顶芽为外植体诱导丛生芽, 并成功地获得了试管苗。随后, 许多学者相继做了大量的研究, 并取得了相应进展<sup>[3-6]</sup>, 为西瓜遗传转化奠定了基础。自 1983 年第 1 例转基因植物获得成功后, 植物基因工程在多种植物上得到广泛应用并取得成功。直至 20 世纪 90 年代初, 随着基因工程技术的逐渐完善, 人们才开始采用基因工程技术培育西瓜新品种。1994 年韩国学者 Choi 等<sup>[7]</sup> 首次报道将含有卡那霉素抗性筛选基因 (*NPTII*) 和标记基因 (*GUS*) 利用农杆菌 LBA4404 有效地转入了 2 个不同的西瓜品种。随后, 许多研究者对西瓜遗传转化进行了深入研究, 将外源基因或 DNA 导入西瓜, 并获得转基因植株。现对国内外西瓜再生体系和遗传转化体系的研究进行综述, 为通过基

因工程技术培育西瓜新品种提供参考。

## 1 西瓜再生体系的建立

植物离体高效组培再生体系的建立是转基因成功的关键。与大多数植物相比, 西瓜的再生能力较弱, 不容易通过愈伤组织途径形成再生植株, 且易出现玻璃化苗, 移栽不易成活, 这一情况严重的制约了基因工程在西瓜上的应用。因此, 加强西瓜高效组织培养再生体系的建立研究是西瓜转基因成功的重要环节。西瓜不容易通过愈伤组织途径再生植株, 且周期较长, 不利于转基因研究。在西瓜的组织培养中, 通常是将外植体直接诱导产生不定芽, 再分化成完整植株。下面从 5 个方面对影响西瓜再生的因素进行分析。

### 1.1 基因型和苗龄的影响

基因型是影响植物再生的内因, Compton 等<sup>[8]</sup> 以不同品种子叶外植体为材料进行研究, 发现其再生率不同, 其他学者也有类似的结论<sup>[9-10]</sup>。苗龄不同决定着外植体的生理状态不同, 这是影响植株再生的又一个重要因素。Compton 等<sup>[11]</sup> 研究表明 5 d 苗龄的外植体诱导率最高, 但不同品种间差异较大, 苗龄超过 10 d 的子叶几乎不能诱导不定芽分化, Rakhi 等<sup>[12]</sup> 则认为 7 d 苗龄的子叶诱导率最高。任春梅等<sup>[13]</sup> 的研究认为苗龄日 8~9 d 的顶芽诱导产生的不定芽最多, 刚刚由黄色转为浅绿色时苗龄 (4~5 d) 的子叶诱导不定芽的诱导率最高。张志忠等<sup>[9]</sup> 研究也发现苗龄对于分化影响较大, 但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, 故不宜以具体天数来确定苗龄, 而以子叶颜色来判断可能更为有效。无菌苗子叶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, 其他学者也有类似的报导<sup>[13-16]</sup>。

### 1.2 外植体类型的影响

西瓜可以从茎尖、体胚、不成熟幼胚的子叶、子叶块等多种类型的外植体获得再生, 但不同类型外植体的诱导率不同<sup>[17]</sup>。Islam 等<sup>[18]</sup> 认为胚轴较子叶更为有效

第一作者简介: 陈磊 (1981-), 女, 在读硕士, 研究方向为蔬菜分子育种。

通讯作者: 刘宏宇。E-mail: hylu@neau.edu.cn

基金项目: 黑龙江省青年基金资助项目 (QC05C57); 东北农业大学创新团队资助项目 (CXT002-4 D)。

收稿日期: 2008-08-23

Nandariyah 等<sup>[19]</sup>则认为子叶更容易诱导。而 Zamora 等<sup>[20]</sup>认为较上述各种材料而言厚度为 3~5 mm 的果实切片是最适合于诱导的外植体。任春梅等<sup>[13]</sup>的研究认为顶芽诱导不定芽的诱导率高于子叶。万勇、张铮等<sup>[9]</sup>的试验研究认为带完整子叶的顶芽诱导不定芽的效果最好,与任春梅等的报导基本一致。另外,万勇、张铮等<sup>[9]</sup>试验还发现无子叶顶芽产生的不定芽生长弱,易玻璃化,而带完整子叶的顶芽诱导效果最好。外植体的大小可能也是一个影响因素<sup>[21]</sup>。目前大多数研究人员在组织培养或是遗传转化过程中主要采用子叶或顶芽作为外植体。原生质体培养和体胚的诱导也有报道<sup>[11,22]</sup>,尽管这方面的研究较少,但这将增加西瓜再生及遗传转化中可以利用的外植体类型。

### 1.3 激素种类和浓度的影响

1.3.1 激素对不定芽诱导的影响 Helmle 等<sup>[21]</sup>发现在不提供任何激素的 1/2MS 培养基上茎尖外植体可以获得再生, Szalai<sup>[10]</sup>的试验也证实这种情况,他指出再生能力决定于基因型而非激素含量。但这种分化所需时间相对较长。Compton 和 Gray<sup>[11]</sup>认为:BA 是西瓜子叶再分化所必需的物质,但其浓度并非关键因素。Compton M B 等<sup>[23]</sup>研究也表明,对于不定芽的诱导而言,BA 浓度的影响不是很大,且附加 IAA 会导致愈伤组织的过度生长从而抑制不定芽的分化。郝立新和王怀名<sup>[24]</sup>报道,将西瓜子叶接种到 MS+5.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA 培养基上,诱导不定芽的频率最高。Choi<sup>[7]</sup>等将西瓜子叶在仅附加 1.0 mg/L BA 的 MS 培养基上诱导不定芽。王春霞等<sup>[4]</sup>将西瓜子叶接种到 MS 盐类+维生素 B5+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IAA 培养基上,子叶的出芽率最高。总之,由西瓜子叶诱导不定芽,BA 是至关重要的,其浓度一般为 1.0~5.0 mg/L。近年来,大多数学者认为,一定浓度的 BA 是诱导西瓜外植体分化的关键,附加低浓度的生长素则有利于这种分化的发生<sup>[13,25]</sup>,玉米素也有类似的效果<sup>[17]</sup>。BA 浓度过高会加剧试管苗的玻璃化,Vedat 等<sup>[17]</sup>研究表明超过 4 mg/L BA 或者 KT 会引起不定芽的畸形和严重玻璃化。张志忠等<sup>[6]</sup>研究认为低浓度的 BA 与 IBA 组合诱导不定芽效果较好。

1.3.2 激素对不定芽伸长的影响 西瓜子叶诱导不定芽常常形成密集的芽丛,芽伸长后才能分化成植株。赤霉素 GA<sub>3</sub>能促进细胞伸长,从而使植株茎秆增长。汤绍虎等<sup>[26]</sup>将从顶芽诱导的丛生芽转入 MS+2.0 mg/L BA+1.0 mg/L IAA+2.0 mg/L GA<sub>3</sub>培养基上,半个月芽大部分伸长 20~30 mm,而且生长健壮。但是,在西瓜子叶的离体培养中,一般是将诱导的芽丛转入附加 0.2 mg/L KT 的 MS 培养基上使芽伸长<sup>[13,14]</sup>。万勇等<sup>[9]</sup>认为 MS 附加 0.5 mg/L BA、1.0 mg/L IAA 为最佳继代增殖培养基。而张志忠等<sup>[6]</sup>将丛生芽分株移入

MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L IBA 的培养基上获得很好的伸长效果。

1.3.3 激素对生根的影响 许智宏和卫志明<sup>[3]</sup>比较了不同生长素(IAA、NAA、IBA)以及不同的无机盐浓度对西瓜带芽切块生根的影响,结果表明:附加 0.2 mg/L IAA,MS 无机盐减半,而铁盐保持不变时,生根效果最佳。Compton 和 Gray<sup>[18]</sup>,马国斌等<sup>[27]</sup>将伸长的芽转入附加 0.5 mg/L IAA 的 MS 培养基中生根,效果最好。邵宏波和初立业<sup>[28]</sup>将伸长的芽转入附加 0.5 mg/L NAA 的改良 MS 培养基中,生根率达 94%以上。另外,王春霞等<sup>[4]</sup>则将伸长的芽转入 1/2MS+0.1 mg/L NAA 培养基上生根。因此,附加低浓度的生长素(IAA 或 NAA),降低 MS 无机盐浓度,可以促进根的分化,有利于伸长芽生根。

### 1.4 其他添加物

研究表明附加 AgNO<sub>3</sub>可抑制植物细胞培养过程中乙烯的形成,防止褐化,从而提高其分化率<sup>[29]</sup>。宋道军等<sup>[30]</sup>试验发现,不论是通过愈伤组织诱导芽的分化,还是通过外植体直接诱导不定芽,加入适量的 AgNO<sub>3</sub>都能不同程度地提高其不定芽的分化能力,西瓜外植体直接诱导不定芽以 5 mg/L 的浓度最为适宜,其对不定芽分化的诱导率最大可以提高 10%。

### 1.5 温度和光照

一般情况下,温度和光照条件对外植体出芽的影响较小,通常的培养温度在 23~28℃范围内,光照条件为 1 000~3 000 lx, 12~16 h/d。然而,王春霞等<sup>[4]</sup>在西瓜组织培养研究中发现,对外植体进行暗培养处理是获得高频再生的关键,未经暗处理外植体的出芽率(19%)显著低于经过 6 d 暗期处理外植体的出芽率(86%)。Compton<sup>[31]</sup>对西瓜栽培种不定芽分化的光照条件进行了研究,发现经过 16 h/d 光照培养 6 周后产生的愈伤组织,暗处理会促进其不定芽的器官发生。

## 2 西瓜的遗传转化方法

植物遗传转化方法很多,如采用农杆菌质粒、病毒、脂质体等作为载体的载体法,还有包括电击法、基因枪法、激光束法、显微注射法、花粉管通道法、子房注射法、浸胚法等直接导入法。但目前应用于西瓜遗传转化的研究主要是农杆菌介导法,除此之外,也有采用花粉管通道法、基因枪法、DNA 浸胚法、子房注射法、离子束介导法等直接外源总体 DNA 导入西瓜的报导。下面主要介绍一下目前应用较多的转化方法及获得的成果。

### 2.1 农杆菌介导法

自从 Declene 和 Beley(1976)证明西瓜对根癌农杆菌敏感之后,陆续有一些利用基因工程创造西瓜新种质的报道。农杆菌介导法被认为是西瓜遗传转化的最佳方法之一,对其基本方法步骤(包括外植体材料、接种、

共培养、再生、转化体筛选与转基因株鉴定等)已有介绍<sup>[32]</sup>。农杆菌介导法的转化受体一般为原生质体、叶盘、茎段等。西瓜的原生质体、叶盘、茎段虽然可以产生愈伤组织,但难以形成再生植株,而用西瓜子叶可以直接诱导不定芽,形成再生植株。由于子叶诱导的不定芽只能从子叶基部的伤口处产生,损伤产生的信号有利于农杆菌 Ti 质粒 Vir 区基因的表达以及 T-DNA 的转移等。子叶基部损伤处的细胞一旦转化,就有可能诱导出转化的不定芽,进而形成转基因植株。转化受体一般通过诱导愈伤组织产生不定芽,进而再生获得转基因植株。

2.2 DNA 直接导入法

外源 DNA 直接导入技术是以整体植物的细胞为受体,将带有目的性状的供体总 DNA 导入植物,筛选获得带有目的性状的后代。直接导入法是不依赖组织培养的直接转化技术,可以有效地克服西瓜植株再生困难的问题,且西瓜花器较大、便于操作。

2.2.1 花粉管通道法 花粉管通道法可以用于基因表达载体和总 DNA 等多种形态的遗传物质的转化,这种遗传转化方法是 20 世纪 70 年代周光宇(1988)创建的,其原理是花粉落在雌花的柱头,萌发后,形成天然的通向子房的通道,将外源 DNA 涂于授粉的柱头,或将柱头剪去一部分,直接滴于伤口处,然后外源 DNA 沿花粉管通道通过珠心进入胚囊,在合子早期阶段尚不具各细胞壁的胚胎细胞,具有吸收外源 DNA 片段的能力,它是以自然活体胚细胞为受体进行外源 DNA 转化。

2.2.2 基因枪法 基因枪法又称微弹轰击法,该技术是 1987 年由美国 Cornell 大学 San Ford 等人最先提出的遗

传转化技术。该技术的提出给单子叶植物,尤其是对农杆菌不敏感的植物提供了一种有效的转化途径。基因枪法转化法具有周期短、不受外植体限制等优点。幼胚、成熟胚、分生组织及胚性愈伤组织等多种外植体适用于基因枪法转化。

2.2.3 DNA 浸胚法 将干种子放于 DNA 溶液中直接吸收的方法。近年来,运用 DNA 浸胚法获得了大量水稻、玉米、棉花的变异材料和品系,说明了外源 DNA 浸泡种胚等可获得变异的后代。

2.2.4 子房注射法 外源 DNA 与花粉直接混合,然后对柱头进行授粉的方法。

2.2.5 离子束介导 离子束介导的外源基因组 DNA 导入西瓜,可以筛选到带有目的性状的转化后代,为远缘和超远缘物种间遗传物质交流提供了一种新的有效途径,且可以实现多基因的转移和表达,显示出在农作物育种上的美好应用前景。

3 西瓜遗传转化的研究进展

随着遗传转化技术的日趋成熟,许多学者将抗病、抗逆、耐贮藏等外源基因导入西瓜,并取得了相应进展(见表 1)。

3.1 标记基因的转入

Choi 等<sup>[7]</sup>报道应用农杆菌介导法,转化西瓜子叶获得了 *GUS* 报告基因表达的阳性植株。随后,许多学者将 *GUS* 报告基因、*NPT II* 选择标记基因与和启动子、目的基因重组在同一个载体上,共转化受体细胞,以便筛选转化的细胞。

表 1 西瓜遗传转化研究的主要进展

转化方法	转化材料	外源基因	转化结果	参考文献
农杆菌介导法	子叶	<i>GUS</i>	获得表达植株	Choi 等 <sup>[7]</sup>
		ACC 合成酶基因及其反义基因	获得转化植株,得到不同程度的表达	王春霞等 <sup>[46]</sup>
		<i>WMV-1 cp</i>	获得转化植株	王慧中等 <sup>[33]</sup>
		<i>NPT II</i> , <i>WMV-2 cp</i>	获得转化植株	王慧中等 <sup>[34]</sup>
		<i>HAL1</i> 基因	获得转化植株,抗盐性增强	Ellis 等 <sup>[47]</sup>
		<i>WMV-2 cp</i> , <i>ZYMV</i> 复制酶基因, <i>CMV</i> 复制酶基因	获得转化植株	牛胜鸟等 <sup>[35]</sup>
		<i>Chi3</i> 和 <i>Glute Ac</i>	46 株抗性再生植株	张志忠等 <sup>[36]</sup>
		葡聚糖酶基因和几丁质酶基因	获得转化植株	张明方等 <sup>[38]</sup>
		<i>bamase</i>	获得 8 株抗性植株	陈银华 <sup>[37]</sup>
		<i>NPR1</i>	获得 20 株西瓜转化苗 5 株呈阳性	秦新民等 <sup>[38]</sup>
		<i>ZYMV cp</i>	获得转化植株	刘丽锋等 <sup>[6]</sup>
				李涛等 <sup>[39]</sup>
				王果萍等 <sup>[42]</sup>
花粉管通道法	授粉后的柱头	黑籽南瓜 DNA	整合	
		几丁质酶基因	获得转化植株	王果萍等 <sup>[42]</sup>
基因枪法	带一半子叶的顶芽	<i>pBI121</i> DNA	<i>GUS</i> 染色阳性的抗性苗	任春梅等 <sup>[41]</sup>
DNA 浸胚法	种胚细胞	抗枯萎病瓢瓜总 DNA	引起了性状变异	肖光辉等 <sup>[40]</sup>
子房注射法	授粉后的柱头	抗枯萎病南瓜总 DNA	整合,获得转化植株	肖光辉 <sup>[44]</sup>
		抗枯萎病南瓜总 DNA	获得 2 份新类型材料	王浩波等 <sup>[43]</sup>
离子束介导	子叶	银杏 DNA	供体植物多基因在受体中的表达	Udupa 等 <sup>[45]</sup>

3.2 抗病基因的转入

王慧中等<sup>[33-34]</sup>在将 *WMV-1-cp* 基因导入西瓜后,又将 *CMV-2cp* 基因导入浙蜜 2 号西瓜,并培育成高抗

*WMV-2* 的转基因高代纯合株系。牛胜鸟等<sup>[35]</sup>利用西瓜花叶病毒(*WMV*)外壳蛋(*CP*)基因、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

酶基因构建三价植物表达载体,根癌农杆菌介导法转化西瓜子叶外植体获得再生植株。张志忠等<sup>[36]</sup>构建了同时含有番茄几丁质酶基因(*Chi3*)和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因(*GlucAc*)的双价抗真菌基因植物表达载体,采用根癌农杆菌介导法,将*Chi3*和*GlucAc*同时导入西瓜栽培种“中育一号”。陈银华<sup>[37]</sup>将带有雄性不育基因、除草剂基因及卡那霉素抗性基因的质粒 pBI-TBS bar,采用农杆菌介导法转化西瓜品种获得具有卡那霉素抗性植株。秦新民等<sup>[38]</sup>用农杆菌介导法转入将 NPR1 抗病基因导入西瓜。

3.3 总 DNA 的转入

1996 年,李涛等<sup>[39]</sup>采用花粉管通道法将黑籽南瓜 DNA 导入西瓜,经 2 次传代后,得到有变异性状的子代。肖光辉等<sup>[40]</sup>报道,采用 DNA 浸胚法将供体瓠瓜的总 DNA 导入西瓜,得到了性状变异的株系在病圃中经自交纯化和抗性筛选,在 D<sub>3</sub> 代获得 2 份高抗、2 份中抗西瓜枯萎病材料。任春梅等<sup>[41]</sup>以西瓜顶芽为受体,采用基因枪法将 *pBII21* DNA 导入西瓜,建立了基因枪介导的西瓜遗传转化系统。王果萍等<sup>[42]</sup>利用花粉管通道技术将外源几丁质酶基因的质粒 DNA 导入到西瓜,进而获得抗枯萎病的株系。王浩波等<sup>[43]</sup>采用子房注射法将南瓜的总 DNA 导入西瓜。另外,肖光辉等<sup>[44]</sup>同样采用子房注射法将瓠瓜总 DNA 导入西瓜,后代也出现了变异株。Udupa 等人<sup>[45]</sup>采用粒子束介导法将银杏 DNA 导入 3-16 和 SR2-14-2 两个西瓜品种中,获得了供体植物多基因在受体中的表达。

3.4 耐贮藏基因的转入

王春霞等<sup>[46]</sup>以 2 d 龄西瓜无菌苗子叶为外植体,通过与根癌农杆菌共培,将携带嵌合 *NP TII* 基因和番茄的 ACC 合成酶及其反义基因的质粒导入西瓜,获得转基因植株。

3.5 抗逆性基因的转入

Elul 等<sup>[47]</sup>优化了转化体系,转化率达 2.0% ~ 5.3%,将酵母耐盐基因 *HAL1* 转入西瓜,成功获得呈孟德尔遗传、高耐盐的转基因西瓜植株。

4 展望

植物分子遗传育种已成为当今农业育种的重要手段,对西瓜遗传转化的研究虽然起步较晚,进展较慢,但随着分子生物学基础研究的进展和基因转化技术及西瓜再生方法的不断更新、改进和完善,西瓜遗传转化的研究与应用必定会得到快速的发展。

4.1 西瓜再生体系的完善

西瓜的组织培养,国内外虽然有一些成功的报道,但几乎都缺乏可重复性,有些能重复出来的结果也远不如文献报道的好。

西瓜组织培养过程中玻璃化现象极为严重, Thom-

as P 等<sup>[48]</sup>认为再生过程中玻璃化现象是不可避免的,基本培养基类型、琼脂浓度、渗透调节物质、通气情况等均于此有关。甚至可以导致整个工作的失败。高浓度的 BA 会加剧试管苗的玻璃化, Vedat 等<sup>[17]</sup>也有类似结论,超过 4 mg/L BA 或者 KT 会引起严重的玻璃化。

西瓜伸长芽虽然能生根,形成完整的试管苗,但根系不发达,移栽难以成活。许多研究表明,将西瓜试管苗(或无根试管苗)嫁接到瓠瓜砧木上可以解决西瓜试管苗移栽难以成活问题,同时能增加西瓜的抗病能力<sup>[26 49]</sup>。

西瓜高效再生体系的建立研究是西瓜转基因成功的重要环节。目前,西瓜的再生过程中,还有一些问题没有解决,因此,要加强其基础理论研究,对培养机理进行深入探讨与总结。

4.2 转基因对西瓜的遗传改良

到目前为止,已用于西瓜遗传转化的常用的外源基因,主要有以下 3 类:第一类是标记基因,如 *GUS*、*NPT II*;第二类是抗病基因,包括 *WMV-1*、*WMV-2*、*ZYMV*、*CMV*;第三类是总 DNA (南瓜总 DNA、瓠瓜总 DNA、银杏总 DNA 和 *pBII21* DNA)。此外,还有与延长果实贮藏时间相关的基因 ACC 合成酶及其反义基因和抗逆性相关基因。这些基因在西瓜上的利用大多是为了建立有效的遗传转化体系。随着西瓜遗传转化体系的建立和完善,旨在改良西瓜性状的真正外源基因的利用不断增多,将一些有益的农艺性状基因及抗病、抗虫导入西瓜,对西瓜的遗传改良将起到更大的作用。在进一步完善西瓜抗病品种培育的同时,其它抗逆、品质改良、控制生长发育等基因工程有待大大加强。总之,随着转基因技术的不断完善和外源基因的不断挖掘,必将在西瓜性状改良和新品种培育上发挥越来越重要的作用。

参考文献

[1] Andrus Production of seedless watermelon [J]. U. S. A. Tech Bul 1971, 27(3): 293-301.  
[2] 许智宏, 卫志明, 刘桂云. 用离体培养无性繁殖三倍体无籽西瓜[J]. 植物生理学报, 1979, 5(3): 245-251.  
[3] 高新一, 林翔鹰, 杨春燕, 等. 无籽西瓜无性系繁殖的研究[J]. 中国农业科学, 1983(2): 58-63.  
[4] 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.  
[5] 万勇, 张铮. 西瓜组织培养快速繁殖的初步研究[J]. 江西农业学报, 2002, 14(4): 47-50.  
[6] 张志忠. 几丁质酶基因和几丁质酶-葡聚糖酶双价基因导入西瓜的研究[D]. 福建农林大学博士学位论文, 2004.  
[7] Choi P S, Soh W Y, Kim Y S. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using agrobacterium tumefaciens[J]. Plant Cell Reports 1994 13: 344-348.  
[8] Compton M E, Gray D J. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon[J]. HortScience, 1994, 117(3): 211-213.

- [9] Lee H K, Seo Y K, Rhee W Y, et al. Genotypic effect of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) on organogenesis from shoot tip culture of seedlings[J]. *Plant Tissue Culture*, 1994, 21(4): 239-246.
- [10] Szalai J. The micropropagation of watermelon[J]. *Kerteszeti Tudomány*, 1995, 27(4): 111-113.
- [11] Compton M E, Gray D J, Elmstrom G W. A simple protocol for micropropagating diploid and tetraploid watermelon using shoot-tip explants[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1993, 33(2): 211-217.
- [12] Rakhi C, Bhatnagar S P, Chaturvedi R. High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. Sugar Baby[J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2001, 37(2): 255-258.
- [13] 任春梅,董延瑜,洪亚辉等.西瓜组织培养的研究[J].*湖南农业大学学报*, 2000, 26(1): 50-53.
- [14] 黄学森,牛胜鸟,王锡民等.转基因抗病病毒四倍体西瓜的培育[J].*中国瓜菜*, 2007(6): 1-4.
- [15] 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.
- [16] 刘丽锋,古勤生,胡京昂,等.小西葫芦黄花叶病毒外壳蛋白基因导入西瓜的遗传转化[J].*果树学报*, 2007, 24(4): 496-501.
- [17] Hakan V. Adventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Cotyledons of Diploid Diyarbakır Watermelon (*Citrullus lanatus* cv. OS. rmeO)[J]. *Biol*, 2003(27): 101-105.
- [18] Islam R, Abad A, Reza M A, et al. In vitro plant regeneration from zygotic embryos of *Citrullus lanatus* Thunb[J]. *Scientific and Industrial Research*, 1997, 38(11): 445-447.
- [19] Nandariyah Gunarto, Waluyo D D, et al. In vitro effect of auxin and cytokinin type on the growth and ploidy level of watermelon[J]. *Breeding to increase competitiveness of Indonesian agriculture commodities*, 1997: 498-503.
- [20] Zamora C V. Tissue culture of *Citrullus lanatus* (Thunb.)[J]. The application of tissue culture techniques in economically important tropical trees, 1988: 187-195.
- [21] Helmle J M, Mathe A, Mozsar K, et al. Contribution to the micropropagation of triploid watermelon[J]. *Acta Horticulturae*, 1992, 30: 163-168.
- [22] Ma C P, Zhang X P, Rhodes B B, et al. Protoplast isolation and culture of watermelon cotyledon[J]. *Report Cucurbit Genetics Cooperative*, 1993, 16: 81-83.
- [23] Compton M E, Gray D J, Elmstrom G W. Regeneration of tetraploid plants from cotyledons of diploid watermelon[J]. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 1995, 107(19): 107-109.
- [24] 郝立新,王怀名.西瓜再生体系的建立[J].*华北农学报*, 1998, 13(3): 112-115.
- [25] Zarka V, Velich I, Bisztray G. In vitro regeneration from cotyledons of watermelon[J]. *Horticultural Science*, 2000, 6(4): 96-98.
- [26] 汤绍虎,廖映盼,徐荣灿.无籽西瓜培养基的选择及培养研究[J].*西南农业大学学报*, 1994, 16(6): 540-542.
- [27] 马国斌.西瓜组织培养再生体系的比较研究[J].*中国西瓜甜瓜*, 1998(3): 9-11.
- [28] 邵宏波,初立业.特大“新红宝”西瓜的快速繁殖研究[J].*生物技术*, 1994, 5(4): 31-33.
- [29] 王凌健,倪迪安,王光远等.青菜组培和转化系统的初步建立[J].*实验生物学报*, 1999, 32(1): 93-95.
- [30] 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.
- [31] Compton M E. Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1999, 39(3): 185-188.
- [32] 张兴平.生物技术在西瓜甜瓜遗传改良中的应用[C]//园艺学年评(2).北京:科学出版社, 1996: 107-129.
- [33] 王慧中,周晓云,张西宁.西瓜基因转化及其转基因植株再生的研究[J].*实验生物学报*, 1997, 30(4): 453-459.
- [34] 王慧中,赵培洁,周晓云,等.农杆菌法转化获得转基因西瓜植株[J].*浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2000, 26(1): 111-113.
- [35] 牛胜鸟,黄学森,王锡民.三价转基因抗病病毒西瓜的培育[J].*农业生物技术学报*, 2005, 13(7): 10-15.
- [36] 张志忠,吴蓄华,吕柳新.双价抗真菌基因表达载体的构建及转基因西瓜的研究[J].*热带亚热带植物学报*, 2005, 13(5): 369-374.
- [37] 陈银华,张广平.雄性不育基因 barnase 对西瓜的遗传转化[J].*湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2006(4): 128-130.
- [38] 秦新民,张丽珍.西瓜 NPR1 抗病基因的遗传转化[J].*广西师范大学学报*, 2006, 24(6): 81-85.
- [39] 李涛,谢伟军,杨晚霞.黑籽南瓜 DNA 导入西瓜后代 RAPD 标记的变化[J].*果树科学*, 1996, 13(3): 175-177.
- [40] 肖光辉,吴德喜,肖兰异,等.外源瓠瓜 DNA 导入西瓜引起后代性状变异[J].*园艺学报*, 1997, 24(3): 295-297.
- [41] 任春梅,董延瑜.基因枪介导西瓜遗传转化研究[J].*湖南农业大学学报*, 2000, 26(7): 432-435.
- [42] 王果萍,王景需,孙毅.几丁质酶基因导入西瓜植株及其抗病性鉴定研究[J].*植物遗传资源学报*, 2003, 4(2): 104-109.
- [43] 王浩波,林茂,杨坤,等.导入南瓜 DNA 选育抗枯萎病西瓜新种质的研究[J].*西北农业学报*, 2002, 11(1): 24-27.
- [44] 肖光辉.西瓜分子育种与瓠瓜枯萎病抗性在西瓜抗病育种中的应用[J].*湖南农业科学*, 2002(3): 11-13.
- [45] Udupa K S, O'cain P A, Mattimore V, Battista J R. Novel ionizing radiation-sensitive mutants of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Bacteriol.*, 1994, 176(24): 7439-7446.
- [46] 王春霞,简志英,刘愚等.ACC合成酶基因及其对西瓜的遗传转化[J].*植物学报*, 1997, 39(5): 445-450.
- [47] Ellul P, Rios G, Atares A, et al. The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) matsum. & Nakai][J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 462-469.
- [48] Thomas P, Mythili J B, Shivashankara K S. Explant medium and vessel aeration affect the incidence of hyperhydricity and recovery of normal plantlets in triploid watermelon[J]. *Horticultural Science and Biotechnology*, 2000, 75(1): 19-25.
- [49] Tabei Y, Yamanaka H, Kanno T. Adventitious shoot induction and plant regeneration from cotyledons of mature seed in watermelon (*Citrullus lanatus* S. Y)[J]. *Plant Tissue Culture Letters*, 1993, 10(3): 235-241.
- [50] 张明方,于天祥.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.