

甜瓜高效不定芽再生体系的建立

贺玉花^{1,2}, 徐龙兰¹, 唐伶俐^{1,2}, 徐永阳^{1,2}, 田小琴¹,
张健^{1,2}, 孔维虎^{1,2}, 李文东³, 赵光伟^{1,2}

(1. 中国农业科学院郑州果树研究所 郑州 450009; 2. 三亚中国农业科学院国家南繁研究院 海南三亚 572000;
3. 潍坊创科种苗有限公司 山东昌乐 262400)

摘要: 对 8 个基因型甜瓜再生能力进行研究, 筛选出再生能力较强的基因型, 并以其为材料对外植体类型, 不定芽诱导、伸长和不定根诱导 3 个阶段植物生长调节剂的类型与质量浓度进行优化筛选, 旨在建立甜瓜高效的不定芽再生体系。结果表明, 不同基因型间再生能力存在差异, 2 个厚皮甜瓜基因型 B8、P110 和 1 个薄皮甜瓜基因型 IVF05 再生能力较强, 其中 B8 再生效果最好; 以 B8 材料为基础建立再生体系, 发现不定芽诱导能力最高的外植体为子叶近胚轴端, 不定芽诱导阶段最适的培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ ABA, 不定芽诱导率 96.7%; 不定芽伸长和不定根诱导最适的培养基分别为 MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA 和 1/2 MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA, 获得的再生苗生根率达 93.3%。

关键词: 甜瓜; 再生体系; 基因型; 外植体; 植物生长调节剂

中图分类号: S652 文献标识码: A 文章编号: 1673-2871(2023)11-010-06

Establishment of an efficient regeneration and genetic transformation system in melon

HE Yuhua^{1,2}, XU Longlan¹, TANG Lingli^{1,2}, XU Yongyang^{1,2}, TIAN Xiaoqin¹, ZHANG Jian^{1,2}, KONG Weihu^{1,2}, LI Wendong³, ZHAO Guangwei^{1,2}

(1. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; 2. National Nanfan Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572000, Hainan, China; 3. Weifang Chuangke Seeds Co., Ltd., Changle 262400, Shandong, China)

Abstract: Gene functional verification was limited because of lacking of the efficient genetic transformation in melon (*Cucumis melo* L.). Improving the regeneration rate to build an efficient adventitious bud regeneration system, which is the base to realize the genetic transformation of melon. Therefore, we studied the adventitious bud induction ability of eight melon genotypes, screened out the optimum melon genotypes for regeneration. And then the optimal research on the types of explants, types and concentrations of plant growth regulators during adventitious bud induction and elongation, and adventitious root induction was conducted. The results showed that there was a difference in regeneration ability among eight diverse genotypes. The two accessions B8, P110 from *Cucumis melo* L. ssp. *melo* and one accession IVF05 from *Cucumis melo* L. ssp. *agrestis* possess stronger regeneration ability, especially the B8 accession. Based on the B8 accession, we studied the primary elements influenced the regeneration system. The results showed that the type of explants with the highest ability to induce adventitious buds was the cotyledons near hypocotyl; the most suitable medium composition for the induction stage of adventitious buds is MS medium with 6-Benzylaminopurine (1.0 mg·L⁻¹) and abscisic acid (1.0 mg·L⁻¹); the most suitable medium composition for adventitious bud elongation and adventitious root induction were MS medium with 6-BA (0.1 mg·L⁻¹) and 1/2 MS medium with 3-Indole-3-butyric acid (0.5 mg·L⁻¹) respectively. Finally, we screened out a genotype (B8) with stronger regeneration ability, and successfully established an efficient adventitious bud regeneration system based on the genotype, the rooting rates of adventitious roots is 93.3%.

Key words: Melon; Regeneration system; Genotype; Explant; Plant growth regulator

收稿日期: 2023-08-03; 修回日期: 2023-09-13

基金项目: 河南省重大科技专项(221100110400); 河南省科技攻关计划项目(222102110056); 国家现代农业产业技术体系(CARS-25); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2022-ZFRI); 海南省重点研发计划(ZDYF2021XDNY164)

作者简介: 贺玉花, 女, 助理研究员, 主要从事甜瓜遗传育种相关研究。E-mail: heyuhua@caas.cn

通信作者: 赵光伟, 男, 研究员, 主要从事甜瓜遗传育种研究。E-mail: zhaoguangwei@caas.cn

甜瓜(*Cucumis melo* L.)属于葫芦科甜瓜属,是世界上重要的园艺经济作物之一。我国是世界甜瓜生产和消费第一大国,据联合国粮食与农业组织(FAO)统计数据,2021年我国甜瓜种植面积为38.66万 hm^2 ,产量达1400万t,占世界总产量的49%。当前甜瓜育种多依赖杂交、回交等传统育种手段,存在育种周期长、盲目性大、改良数量性状效果较差等缺点^[1-2]。与传统育种相比,分子育种更精准高效,是当前和未来甜瓜育种中的重要策略。解析基因功能是开展分子育种的前提,遗传转化是进行基因功能验证、明确基因功能最直接的手段,而构建甜瓜高效不定芽再生体系是实现遗传转化的基础。

甜瓜不定芽再生体系受基因型、外植体类型、植物生长调节剂的种类与浓度等因素的影响。不同基因型甜瓜的内源激素水平存在差异,因而其再生能力也有所不同^[3-4]。研究表明,不同基因型甜瓜间再生率差异显著,且薄皮甜瓜再生率要高于厚皮甜瓜^[5-10]。选择不定芽诱导能力较高的外植体类型,是建立再生体系的关键。而不同类型的外植体,其细胞结构和种类存在一定差异,未分化的分生组织及分化程度较低的薄壁组织细胞更适于诱导再生^[11-12]。前人研究发现,甜瓜的各个部位均可用于组织再生获得完整植株,其中子叶、下胚轴使用较多^[5,13-17]。另外,植物生长调节剂的种类和浓度是影响外植体分化的重要因素,常用于甜瓜再生的植物生长调节剂有6-苄基腺嘌呤(6-BA)、吲哚-3-乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)等。在不定芽诱导阶段,一般均需添加6-BA,添加质量浓度一般在0.5~2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,添加少量的IAA或ABA能够更好地平衡内源激素水平,提高不定芽再生率^[17-20]。不添加植物生长调节剂也可以实现不定芽的伸长和生根,再生率约为70%^[21-22],而添加少量的植物生长调节剂能够促进不定芽伸长和生根,并且缩短再生时间。添加低质量浓度的6-BA(0.05~0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)能够促进不定芽伸长且降低玻璃化程度,再生苗状态较好,再生率为80%左右^[3,18-19,23-24]。以1/2 MS培养基为基础,添加少量IAA或IBA(0.2~0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 最佳),能够促进不定芽生根^[16-20,25-26]。

尽管甜瓜再生体系构建已有不少报道,但在甜瓜离体再生过程中仍存在愈伤组织分化出芽困难、不定芽诱导率低和再生体系重复性差等问题。笔者以8个甜瓜基因型为试验材料,通过对甜瓜基因型,外植体类型,不定芽诱导、伸长及不定根诱导过程中植物生长调节剂种类和质量浓度等关键影响因素进行探究,以期筛选出再生能力强、不定芽再

生率高的甜瓜基因型并建立重复性高的甜瓜不定芽再生体系,为甜瓜遗传转化体系的建立提供一定科学依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料及地点

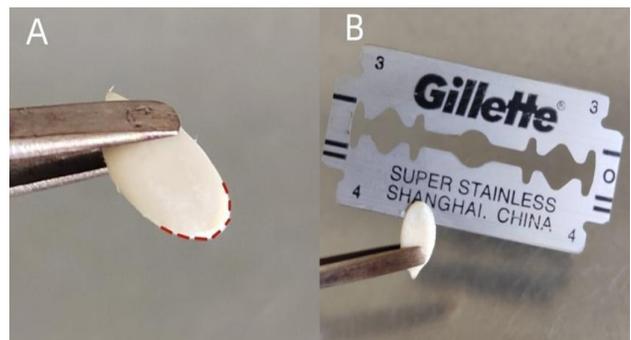
试验材料共8份不同的甜瓜种质,包括3个厚皮甜瓜材料:B8(红心脆,原新疆地方品种)、P110(Vedrantais,原法国材料)、905(引自西甜瓜中期库,原美国品种PMR45);5个薄皮甜瓜材料:IVF05(引自中国农业科学院蔬菜花卉研究所)、E5(甜宝,原日本材料)、E55(牛角蜜,原地方品种)、E79(白沙蜜,原地方品种)、974(黄皮梨瓜,原地方品种)。材料均经中国农业科学院郑州果树研究所甜瓜遗传育种课题组连续多代自交纯化。

试验于2021年9月至2022年3月在中国农业科学院郑州果树研究所遗传转化实验室进行。

1.2 方法

1.2.1 种子处理 挑选状态健康的甜瓜种子,加适量常温无菌水浸泡30 min后剥去外种皮,移至超净工作台后,先用75%乙醇浸泡30 s,然后用2%的次氯酸钠浸泡15 min(其间不断摇晃),无菌水冲洗4~5次,播种于1/2 MS培养基上,在正常光周期条件(25 $^{\circ}\text{C}$,光照16 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,黑暗8 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$,光照度3000 lx)下培养3 d,至子叶由黄转绿时获得无菌苗。

1.2.2 不定芽的诱导培养 选择上述8个基因型的甜瓜材料分别获取无菌苗,将无菌苗子叶沿腹缝线远胚轴端划开(图1),开口深度为0.5 cm左右,接种于添加不同质量浓度的6-BA和ABA(设置10个组合,具体处理见表1)的MS培养基上,在正常光周期条件下培养,进行不定芽诱导,观察不定芽诱导情况。每个处理3个培养皿,每个培养皿接种10个外植体,14 d继代1次,28 d后统计出芽情况,计算



注:A.虚线表示腹缝线远胚轴端位置;B.切割示意图。

图1 外植体处理示意图

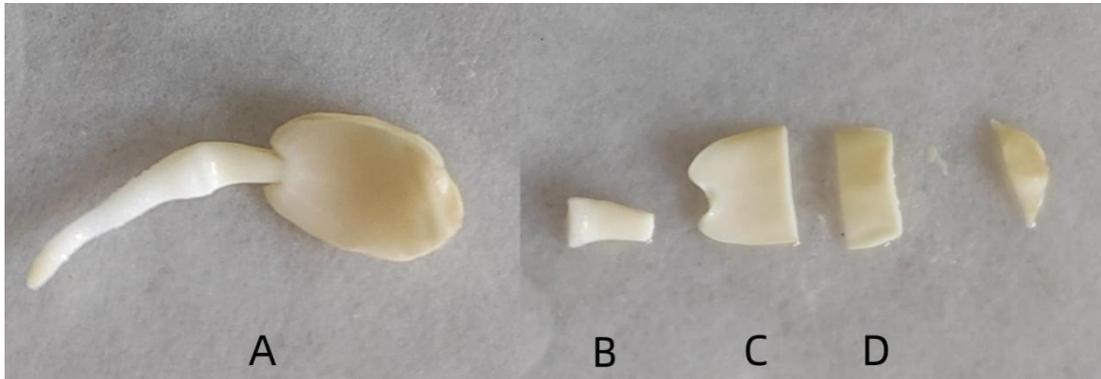
Fig. 1 Diagram map of cotyledon treatment

不定芽出芽率。根据不定芽出芽率,筛选再生能力最佳的基因型及不定芽诱导阶段最适培养基。

不定芽出芽率/%=出芽外植体个数/接种外植体个数×100。

1.2.3 外植体类型的筛选 选择再生能力最佳基因型材料和最适培养基,设置子叶近胚轴端、子叶

远胚轴端和胚轴 3 种外植体(图 2),对其不定芽诱导能力进行探究。在无菌环境下去除无菌苗生长点、根系及大部分胚轴,保留子叶和 2 cm 左右胚轴,同时将子叶垂直叶脉切割,分成近胚轴端和远胚轴端两部分。将不同类型的外植体接种于最适不定芽诱导培养基上进行不定芽诱导。每个外植体



注:A.子叶外植体未被切割前;B.胚轴;C.子叶近胚轴端;D.子叶远胚轴端。

图 2 外植体类型示意图

Fig. 2 Diagram map of cotyledon types

类型 3 个培养皿,每个培养皿接种 10 个外植体,14 d 继代 1 次,28 d 后观察不定芽诱导情况,计算不定芽诱导率,筛选最佳外植体类型。

1.2.4 不定芽伸长 不定芽诱导 28 d 后,将生长状态较好的不定芽从切下,转移至 MS 伸长培养基上,在正常光周期条件下培养,设置添加 6-BA 质量浓度梯度 0.1(处理 A)、0.2(处理 B)、0.5(处理 C)、1.0 mg·L⁻¹(处理 D)4 个处理,每个处理设置 3 个培养皿,每个培养皿接种 10 个不定芽。21 d 后观察不定芽从伸长情况,确定不定芽伸长最适培养基。

1.2.5 不定根诱导 不定芽伸长至 2~3 cm、具有 3~4 片真叶时,将其转移至 1/2 MS 生根培养基上进行不定根诱导。设添加 IBA 质量浓度梯度 0.0、0.1、0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹ 等 5 个处理(A~E),每个处理 3 次重复,每个重复 10 个不定芽。培养 14 d 后观察生根情况。

1.3 统计与分析

利用 Excel 2016 和 SPSS Statistics 26 进行试验数据统计及差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同基因型及植物生长调节剂质量浓度配比对甜瓜不定芽诱导的影响

基因型和植物生长调节剂直接影响不定芽诱导率,试验以 8 个基因型甜瓜为研究对象,对 10 个

不同组合的培养基进行不定芽诱导,28 d 后统计出芽率(表 1)。结果表明,4 个薄皮基因型甜瓜(E5、E55、E79、974)的平均出芽率分别为 23.3%、20.7%、31.0%、35.3%,显著低于厚皮基因型甜瓜 B8、P110 和薄皮基因型甜瓜 IVF05,其中除 E79 在处理 5 的出芽率为 80.0%、974 在处理 3 的出芽率为 83.3% 外,4 个薄皮基因型甜瓜(E5、E55、E79、974)在其他处理条件下的出芽率均低于 60.0%,表明 4 个薄皮基因型甜瓜(E5、E55、E79、974)的再生能力较弱。905 只有在处理 6、7 和处理 10 条件下出芽率高于 60.0%,且其平均出芽率低于 50.0%,表明 905 的再生能力也较弱。而 B8、P110 和 IVF05 的平均出芽率均在 55.0% 以上,再生能力较强,其中 B8 诱导再生获得的不定芽从长势好,单芽多,再生苗状态较好,是更合适的再生材料。

处理 1 和处理 2 只添加了 6-BA,其平均出芽率显著低于其他另外添加了 ABA 的处理,表明添加一定量的 ABA 能促进甜瓜不定芽诱导。处理 3 和处理 9 的平均出芽率均为 53.8%,高于其他处理,且 B8、P110 和 IVF05 均可在处理 9 下获得最高出芽率,分别为 96.7%、86.7% 和 93.3%,因此选择处理 9 培养基(MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ ABA)为不定芽诱导的最适培养基。

2.2 不同外植体类型对甜瓜不定芽再生的影响

与先诱导愈伤组织再诱导不定芽的间接再生

表1 不同基因型在不同植物生长调节剂处理下的不定芽出芽情况

Table 1 Adventitious bud emergence of different genotypes under different treatment

处理 编号	$\rho(6\text{-BA})/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{ABA})/$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	不同基因型甜瓜材料								平均出芽 率/%
			B8	P110	905	IVF05	E5	E55	E79	974	
1	1.0	0.0	30.0	76.7	11.1	36.7	23.3	0.0	16.7	6.7	25.2±8.0 c
2	2.0	0.0	13.3	50.0	20.0	36.7	13.3	3.3	26.7	10.0	21.7±5.1 c
3	0.5	0.2	76.7	50.0	23.3	90.0	36.7	26.7	43.3	83.3	53.8±8.6 a
4	1.0	0.2	70.0	60.0	40.0	43.3	33.3	16.7	43.3	40.0	43.3±5.3 ab
5	2.0	0.2	16.7	66.7	53.3	40.0	23.3	30.0	80.0	26.7	42.1±7.5 b
6	0.5	0.5	80.0	73.3	66.7	93.3	33.3	3.3	16.7	40.0	50.8±10.7 ab
7	1.0	0.5	63.3	43.3	74.2	90.0	23.3	56.7	20.0	50.0	52.6±7.9 ab
8	2.0	0.5	71.8	73.3	56.7	43.3	23.3	13.3	36.7	30.0	43.6±7.3 ab
9	1.0	1.0	96.7	86.7	50.0	93.3	20.0	36.7	10.0	36.7	53.8±11.3 a
10	2.0	1.0	53.3	60.0	80.0	73.3	3.3	20.0	16.7	30.0	42.1±9.4 b
平均出芽 率/%			57.2±8.5 a	64.0±4.1 a	47.5±7.1 ab	64.0±7.8 a	23.3±3.0 c	20.7±5.3 c	31.0±6.3 bc	35.3±6.4 bc	

注:按处理和基因型分别对平均出芽率进行差异显著性分析。不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

相比,直接诱导产生不定芽的直接再生方式可以缩短转化进程,因此,外植体应选择产生不定芽数量多的类型。以 B8 为研究对象,MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ ABA 为不定芽诱导培养基,观察 3 种外植体的再生能力,28 d 后统计不定芽出芽率。结果如表 2 所示,胚轴做外植体诱导产生大量愈伤组织,诱导出芽率极低,是不适合的外植体类型。以子叶近胚轴端做外植体,出芽率为 93.3%,显著高于其他 2 种外植体,且产生愈伤组织较少,因此,子叶近胚轴端是最适合用于不定芽再生的外植体类型。

表2 不同外植体类型对 B8 不定芽再生的影响

Table 2 Effect of different explant types on adventitious bud regeneration in B8

外植体类型	出芽率/%	不定芽诱导情况
子叶近胚轴端	93.3±0.0 a	愈伤组织少,不定芽数量多
子叶远胚轴端	56.7±0.1 b	愈伤组织少,不定芽数量中
胚轴	10.0±0.1 c	愈伤组织多,不定芽数量少

2.3 植物生长调节剂对不定芽伸长的影响

以 B8 为研究对象,设置 4 个不同质量浓度 6-BA 处理(A~D),在不定芽诱导 21 d 后观察不定

芽伸长情况(图 3),并统计单芽数量(表 3)。结果表明,添加不同质量浓度的 6-BA,丛生芽均可得到伸长,各处理间不定芽伸长量没有明显差异,但随着 6-BA 质量浓度逐渐升高,发现获得的单芽数量逐渐减少,当 6-BA 添加质量浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 时,获得的伸长单芽数为 16.3,显著高于其他处理。在不定芽伸长量正常的基础上,单芽数量越多,越有利于切割出更多的无菌苗用于后期生根。因此,B8 材料不定芽伸长阶段最适培养基配比为 MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA。

2.4 植物生长调节剂对不定根诱导的影响

以 B8 为研究对象,设置 5 个不同质量浓度 IBA 处理(A~E),在不定根诱导 14 d 后观察不定根诱导情况(图 4),并统计生根率和平均主根数(表 4)。结果表明,不同的处理条件下再生苗生根率均较高(均在 85.0%以上),但诱导产生的根系形态及数量有明显差异。处理 A 产生根系数量不稳定,大多数根系仅含有一条主根,侧根较多。处理 B 和处理 C 的主根数量有一定的增加,但发育较好、侧根



图3 不同浓度 6-BA 对 B8 不定芽伸长的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of 6-BA on the extension of adventitious buds in B8

发达的主根数量相对较少。处理 D 平均主根数量为 3.1, 显著高于其他处理, 且根系发育好、侧根发达, 是最佳的生根处理。处理 E 不定根生长受到抑制, 平均主根数仅为 0.9。综上, IBA 的适量添加可以促进不定根的产生, 但质量浓度过高 ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 会抑制生根, 当添加质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 促进生

根效果最好, $1/2 \text{ MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}$ 是较合适的不定根诱导培养基。

3 讨论与结论

稳定且高效的再生体系是遗传转化成功实现的前提。植物再生分为通过诱导愈伤组织的间接再生和通过诱导不定芽的直接再生, 甜瓜中主要采用直接诱导再生的方式。甜瓜不定芽再生体系受基因型、外植体类型、植物生长调节剂的种类与浓度等因素的影响。笔者研究发现, 2 个厚皮甜瓜材料 (B8、P110) 和 1 个薄皮甜瓜材料 (IVF05) 不定芽诱导能力均较强, 平均出芽率显著高于其他 4 个薄皮甜瓜基因型材料 (E5、E55、E79、974), 这与前人得出的薄皮甜瓜再生率高于厚皮甜瓜的结论不同^[7-10, 12]。笔者认为, 这与试验中所选材料不同有关, 对于甜瓜厚皮材料与薄皮材料的再生能力的强弱并没有定论。

表 3 不同质量浓度 6-BA 处理对 B8 不定芽伸长的影响
Table 3 Effect of different concentrations on adventitious bud extensions in B8

处理编号	$\rho(6\text{-BA})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	伸长单芽数量	不定芽伸长情况
A	0.1	16.3±0.7 a	不定芽伸长量正常, 单芽数量多, 丛芽数量少
B	0.2	8.3±0.7 b	不定芽伸长量正常, 单芽数量少, 丛芽数量多
C	0.5	7.7±0.7 b	不定芽伸长量正常, 单芽数量少, 丛芽数量多
D	1.0	7.3±1.2 b	不定芽伸长量正常, 单芽数量少, 丛芽数量多

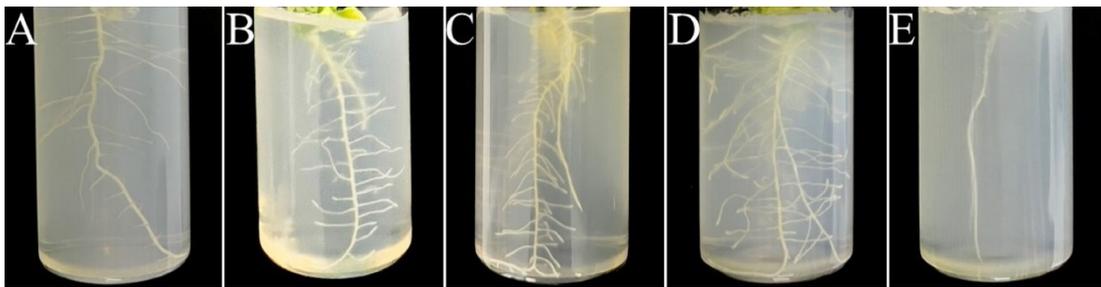


图 4 不同质量浓度 IBA 对 B8 不定根诱导的影响

Fig 4 Effect of different concentrations of IBA on the rooting of adventitious buds in B8

表 4 不同质量浓度 IBA 处理对 B8 不定根诱导的影响
Table 4 Effect of different concentrations in the rooting of adventitious buds in B8

处理编号	$\rho(\text{IBA})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	生根率/%	平均主根数
A	0.0	86.7±0.5 b	0.9±0.0 c
B	0.1	90.0±0.5 ab	1.5±0.1 bc
C	0.2	90.0±0.5 ab	1.7±0.1 b
D	0.5	93.3±0.3 a	3.1±0.2 a
E	1.0	86.7±0.3 b	0.9±0.0 c

在诱导外植体直接再生的过程中添加适量的植物生长调节剂可以提高外植体出芽率, 同时提高不定芽的伸长速度和新生苗生根率, 从而缩短再生周期。不定芽诱导阶段一般会添加 6-BA, 同时添加少量的 IAA、ABA 能获得更好的效果, 不定芽诱导率在 70%~90%^[3, 18, 24, 27-28]。笔者在本研究发现, 对于 8 个不同基因型材料, 出芽率最高的培养基均添加了少量的 ABA, 表明在不定芽诱导过程中, 添加适量的 ABA 能够促进不定芽诱导, 这与前人研究

结果一致^[18, 29], 但是对于不同基因型材料, 出芽率最高的培养基添加 ABA 的质量浓度不同, 表明在进行甜瓜再生时, 针对不同基因型, 应进行预试验, 筛选最适合的植物生长调节剂种类与质量浓度。B8 材料在 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ABA}$ 培养基上进行不定芽诱导, 其诱导率高达 96.7%, 高于前人研究中其他基因型材料的不定芽诱导率。添加少量的植物生长调节剂可以有效促进再生芽的伸长, 而笔者研究发现不同质量浓度 6-BA 处理不定芽伸长量并没有明显差异, 这与 Zhang 等^[30]的研究结论一致, 但 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ 处理产生的单芽数量显著高于其他 3 个处理。

甜瓜的子叶、下胚轴均能进行脱分化, 再生获得完整植株。在含有 STM 基因(茎尖分生组织)的干细胞中, 分生组织的诱导率更高, 生长更快, 而子叶中 STM 基因主要分布在子叶近胚轴端 U 型切口的深层细胞中, 因此更适于用作再生。笔者在对 B8 材料

外植体类型的研究中发现,胚轴不定芽诱导率极低,产生大量愈伤组织,而靠近胚轴端的子叶却有着极高的不定芽诱导率,这与前人研究结果一致^[28,31]。

综上所述,笔者通过对甜瓜再生过程中基因型、外植体类型、植物生长调节剂种类和浓度等关键影响因素进行研究,筛选出再生能力较强的厚皮甜瓜材料 B8,并以其为基础建立了一个稳定高效的甜瓜再生体系,其中再生过程中最佳外植体类型为子叶近胚轴端,不定芽诱导最佳培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ ABA,不定芽伸长最佳培养基为 MS+0.1 mg·L⁻¹ 6-BA,不定根诱导最佳培养基为 1/2 MS+ 0.5 mg·L⁻¹ IBA。

参考文献

- [1] HOOGHVORST I, TORRICO O, HOOGHVORST S, et al. *In situ* parthenogenetic doubled haploid production in melon "Piel de Sapo" for breeding purposes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 378.
- [2] KESH H, KAUSHIK P. Advances in melon (*Cucumis melo* L.) breeding: An update[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 282: 110045.
- [3] GALPERIN M, PATLIS L, OVADIA A, et al. A melon genotype with superior competence for regeneration and transformation[J]. *Plant Breeding*, 2003, 122(1): 66-69.
- [4] ZHANG H J, GAO P, WANG X Z, et al. An efficient regeneration protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2014, 13(1): 54-63.
- [5] DONG J Z, YANG M Z, JIA S R, et al. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants[J]. *Biotechnology*, 1991, 9(9): 858-863.
- [6] VALLES M P, LASA J M. *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro) [J]. *Plant Cell Reports*, 1994, 13(3/4): 145-148.
- [7] 陶兴林. 甜瓜高效再生体系、转化体系的建立与优化[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [8] 付秋实, 谭明明, 王焯, 等. 不同甜瓜品种再生体系的比较研究[J]. *中国瓜菜*, 2015, 28(2): 5-8.
- [9] 祁宏英, 徐洪国, 王秀文, 等. 甜瓜再生体系的建立[J]. *中国瓜菜*, 2021, 34(5): 105-108.
- [10] 张春秋, 李斯贝, 胡紫玉, 等. 不同类型甜瓜高效再生体系的建立[J]. *中国瓜菜*, 2022, 35(1): 32-36.
- [11] MOLINA R V, NUEZ F. Correlated response of *in-vitro* regeneration capacity from different source of explants in *Cucumis melo* [J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 15(1/2): 129-132.
- [12] 王秋蓉, 李柱刚, 王珣, 等. 葫芦科植物再生体系影响因素研究进展[J]. *北方园艺*, 2022(23): 126-133.
- [13] MORENO V, GARCIA S M, GRANELL I, et al. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L., cv. 'Amarillo Oro') [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1985, 5(2): 139-146.
- [14] HOMMA Y, SUGIYAMA K, OOSAWA K. Improvement in production and regeneration of somatic embryos from mature seed of melon (*Cucumis melo* L.) on solid media[J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1991, 41(4): 543-551.
- [15] CURUK S, ELMAN C, SCHLARMAN E, et al. A novel pathway for rapid shoot regeneration from the proximal zone of the hypocotyl of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2002, 38: 260-267.
- [16] 肖守华, 赵善仓, 王崇启, 等. 厚皮甜瓜高效再生体系的建立[J]. *山东农业科学*, 2007(4): 35-39.
- [17] 王爱玲, 张敏, 郑贺云, 等. 甜瓜红心脆和早皇后再生体系的建立[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(11): 82-84.
- [18] 付秋实, 曹芸运, 谭明明, 等. 薄皮甜瓜离体再生体系的优化[J]. *中国瓜菜*, 2014, 27(2): 16-19.
- [19] 张竞秋, 郝金凤, 方天祺, 等. 河套蜜瓜组织培养和再生植株比较研究[J]. *北方园艺*, 2003(1): 52-53.
- [20] 田芳, 姚兆群, 陈美秀, 等. 甜瓜“黄旦子”再生体系的建立[J]. *北方园艺*, 2017(9): 85-88.
- [21] PARVIN S, KAUSAR M, HAQUE M, et al. *In vitro* propagation of muskmelon (*Cucumis melo* L.) from nodal segments, shoot tips and cotyledonary nodes[J]. *Rajshahi University Journal of Life & Earth and Agricultural Sciences*, 2013, 41: 71-77.
- [22] KARTHIK S, PAVAN G, PRASANTH A, et al. Improved in planta genetic transformation efficiency in bitter melon (*Momordica charantia* L.) [J]. *In vitro cellular & developmental biology-Plant*, 2021, 57(2): 190-201.
- [23] AKASAKA K Y, TOMITA K O, EZURA H. Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. *Plant Science*, 2004, 166(3): 763-769.
- [24] NADERI D, ASKARI K O, MAHMOUDI E. Cefotaxime and benzyladenine improve melon regeneration[J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2016, 14(1): 56-60.
- [25] HAO J F, NIU Y D, YANG B J, et al. Transformation of a marker-free and vector-free antisense ACC oxidase gene cassette into melon via the pollen-tube pathway[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(1): 55-61.
- [26] 栾非时, 白晶, 朱子成, 等. 农杆菌介导薄皮甜瓜遗传转化体系建立[J]. *东北农业大学学报*, 2019, 50(1): 11-18.
- [27] 裴海荣, 李伟, 张蕾, 等. 植物生长调节剂的研究与应用[J]. *山东农业科学*, 2015, 47(7): 142-146.
- [28] SU Y H, ZHOU C, LI Y J, et al. Integration of pluripotency pathways regulates stem cell maintenance in the *Arabidopsis* shoot meristem[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(36): 22561-22571.
- [29] DU X F, PENG Q W, YAO C P, et al. Plant regeneration from cotyledon nodes of Chieh-qua (*Benincasa hispida* Cogn. var. Chieh-qua How) *in vitro* [J]. *Indian Horticulture Journal*, 2018, 8(1): 12-19.
- [30] ZHANG Y F, ZHOU J H, WU T, et al. Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2008, 93: 323-331.
- [31] 李晓慧, 赵卫星, 尚霄丽, 等. 众云-18 网纹甜瓜离体再生体系的建立[J]. *农业科技通讯*, 2017(6): 155-157.