



南瓜高效再生体系的建立

郭佳, 李衍素, 贺超兴, 闫妍, 于贤昌*

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

摘要 南瓜(*Cucurbita moschata*)再生率较低, 为建立高效的南瓜再生体系, 以南瓜子叶为外植体, 进行35组不同激素浓度的不定芽诱导研究。结果表明, 南瓜再生受培养基中激素浓度和配比的影响, 适宜浓度6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)能有效促进不定芽形成; 单独使用脱落酸(ABA)诱导使南瓜子叶发黄, 但与6-BA组合使用可显著提高外植体的再生能力, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA与 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA组合南瓜芽再生率高达90.26%。将不定芽置于MS培养基中进行生根培养, 再生苗移栽易成活。从子叶接种到苗再生约需70天。

关键词 子叶, 植物激素, 植株再生, 南瓜

郭佳, 李衍素, 贺超兴, 闫妍, 于贤昌 (2019). 南瓜高效再生体系的建立. 植物学报 54, 539–546.

南瓜(*Cucurbita moschata*)为南瓜属一年生蔓性草本植物, 是人类最早栽培的古老作物之一, 抗逆性强, 可作为砧木广泛应用于瓜类嫁接, 且早、中、晚熟品种俱全, 具有极高的营养与观赏价值(林德佩, 2000)。我国南瓜产量呈逐年增长趋势, 从1996–2016年间, 其总产量由 $2.97 \times 10^6 \text{ t}$ 增长到 $7.84 \times 10^6 \text{ t}$ (<http://www.fao.org/home/en/>)。但随着保护地南瓜种植面积的不断扩大, 连茬种植增多, 南瓜病害呈现逐年加重的趋势, 导致其产量和品质受到很大影响, 而培育出具有相应抗性性状的新品种是解决这一问题的有效途径(张亚锋等, 2007)。

尽管常规育种方法在南瓜属植物育种中所占的比重较大, 但杂交选择育种周期较长且遗传性状不稳定(林德佩, 2000)。近年来, 以植物组织培养和基因工程为基础的生物育种为南瓜的良种繁育提供了一种新的技术手段, 而高效的南瓜植株再生体系是其分子育种的基础(Zhang et al., 2008)。关于南瓜属植株再生此前已有报道。Lee等(2003)和Ananthakrishnan等(2003)以5个美洲南瓜(*C. pepo*)(即西葫芦)品种的子叶为外植体, 通过器官发生途径获得了西葫芦的完整再生植株; 张玉园等(2015)以印度南瓜(*C. maxima*)

北观的子叶节为外植体, 芽再生率最高可达64.5%, 平均再生不定芽数达3.06个; 张亚锋等(2007)以不同苗龄的中国南瓜(*C. moschata*)无蔓一号子叶节为外植体, 通过器官直接发生途径获得了再生芽, 但存在外植体再生率不稳定和不定芽诱导率较低的问题, 再生体系有待进一步优化。

在植物再生过程中, 不同类型的生长调节物质及其组合是诱导不定芽产生的必要条件(崔凯荣和戴若兰, 2000)。以往研究表明, 细胞分裂素(6-BA)可以有效促进外植体细胞分裂和不定芽发生(肖守华等, 2010; 孙守如等, 2013)。前人以黄瓜(*Cucumis sativus*)子叶为外植体、6-BA为培养基中的主诱导激素, 配合添加ABA, 建立了黄瓜子叶再生体系(陆玲和周燮, 1992; 梅茜和张兴国, 2002; 李冷等, 2007; Hu et al., 2017)。研究表明, 6-BA是不定芽形成的必要激素, 辅以ABA可显著提高甜瓜(*Cucumis melo*)再生能力(付秋实等, 2014, 2015)。综上, 南瓜属植物的再生, 均以子叶为外植体、6-BA为主要激素, 但未见辅以ABA的报道。

本研究以南瓜京欣砧5号的子叶为外植体, 设定不同6-BA/ABA浓度配比, 优化了南瓜再生体系, 为

收稿日期: 2018-07-18; 接受日期: 2018-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(No.31772363)、国家现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-23-B08)、中国农业科学院科技创新工程(No.CAAS-ASTIP-IVFCAAS)和农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室

* 通讯作者。E-mail: yuxianchang@caas.cn

南瓜生物技术育种和品质改良奠定基础。

1 植物材料

供试植物材料为南瓜(*Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poiret)京欣砧5号,由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供。

2 培养基成分与培养条件

2.1 种子萌发与培养

用50℃温水浸泡南瓜种子30分钟,去皮后对种子进行消毒:将种子置于75%乙醇中表面消毒45秒,无菌水冲洗3次;后用4% NaClO消毒15分钟,无菌水冲洗6次。将种子接种于MS培养基(4.43 g·L⁻¹ MS粉末、30 g·L⁻¹蔗糖及3 g·L⁻¹凝胶)中,27℃、黑暗环境下进行萌发培养。试验过程中使用的培养基经高压蒸汽灭菌(121℃,20分钟),pH5.6–5.8。供试药剂均购自北京华越洋生物科技有限公司。

2.2 外植体获得

种子萌发3天后,在超净工作台上小心移去南瓜幼苗下胚轴,用解剖刀横切子叶,将远下胚轴部分小心移除,取近下胚轴的1/2子叶,将其一分为二,作为南瓜再生过程中的外植体,并将其背面向下水平接种于不定芽诱导培养基中。

2.3 不定芽诱导及伸长培养

将外植体接种于添加不同浓度6-BA与ABA的MS培养基中,并置于白天(16小时) (28±1)℃、夜间(8小时) 25℃、光强50 μmol·m⁻²·s⁻¹ (光源为飞利浦LED灯)条件下培养。

为避免因处理时间及个体差异对结果造成误差,试验采用双因素无重复设计,其中,设置25组不同6-BA与ABA浓度配比处理(T1–T25)及10组单独添加6-BA或ABA的处理(M1–M10),每处理设置10个培养皿,每皿接种5–10个外植体。培养约45天后,统计外植体再生情况。

2.4 生根与移栽

待不定芽伸长至3–4 cm时,将其转入生根培养基(MS培养基)中,培养条件同2.3节所述。将长根的再生苗瓶盖打开,炼苗1周后,将长势健壮的再生苗移栽至育苗基质(草炭:蛭石=3:1, v/v)中,并置于白天(12小时) 25℃、夜间(12小时) 18℃的人工气候室中培养。

2.5 数据统计与分析

利用以下公式进行数据统计及处理,并应用SPSS 19.0软件中的Tukey法对数据进行双因素无重复方差分析。

再生率(%)=(诱导出不定芽外植体数/接种外植体总数)×100%;

平均再生芽数(个)=总再生不定芽数/分化不定芽外植体数。

3 结果与讨论

3.1 再生率和平均再生芽数的双因素无重复方差分析

由表1和表2可知,在α=0.05的显著水平下,不同浓度6-BA和ABA对南瓜再生率及平均再生芽数有显著影响(6-BA和ABA浓度的P值均小于0.05)。以此为

表1 南瓜再生率方差分析

Table 1 Variance analysis of regeneration rate of pumpkin

Source	Type III Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	1.194 ^a	10	0.119	19.893	0.000
Intercept	11.738	1	11.738	1955.511	0.000
6-BA concentration	0.932	5	0.186	31.040	0.000
ABA concentration	0.291	5	0.058	9.699	0.000
Error	0.144	24	0.006		
Total	13.664	35			
Corrected total	1.338	34			

^a: R²=0.892 (调整R²=0.847)。^a: R²=0.892 (Adjusted R²=0.847).

表2 南瓜平均再生芽数方差分析

Table 2 Variance analysis of average number of induced shoots of pumpkin

Source	Type III Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	20.734 ^a	10	2.073	6.731	0.000
Intercept	116.473	1	116.473	378.098	0.000
6-BA concentration	11.488	5	2.298	7.458	0.000
ABA concentration	10.032	5	2.006	6.513	0.001
Error	7.393	24	0.308		
Total	151.118	35			
Corrected total	28.127	34			

^a: $R^2=0.737$ (调整 $R^2=0.628$)。 ^a: $R^2=0.737$ (Adjusted $R^2=0.628$)。

表3 不同浓度6-BA对南瓜芽再生的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA on the bud induction of pumpkin

Treatments	6-BA (mg·L ⁻¹)	Number of explants	Number of explants with adventitious shoots	Number of shoots	Average number of induced shoots	Rate of plant regeneration (%)
M1	0.5	60	39.78	73.60	1.85	66.31
M2	1.0	60	41.51	72.22	1.74	69.18
M3	1.5	60	34.01	50.00	1.47	56.69
M4	2.0	60	29.88	33.46	1.12	49.79
M5	2.5	60	27.16	31.50	1.16	45.26

依据, 进行后续试验。

3.2 不同浓度6-BA对南瓜不定芽诱导的影响

以往对南瓜离体培养的研究表明, 6-BA是其再生的必要激素(赵建萍等, 2000; 邹建等, 2003; 刘栓桃等, 2004)。赵晓菲等(2014)在西葫芦的离体再生中也发现, 不添加激素的对照组外植体虽能产生不定芽, 但与添加激素的处理相比, 其再生能力最差。因此, 需将子叶外植体接种至含有6-BA的不定芽诱导培养基中。接种约4周可分化出芽原基, 7周时对不定芽进行统计, 发现6-BA浓度对外植体再生能力有显著影响(表1, 表3)。由表3可知, 当6-BA浓度为0.5–1.0 mg·L⁻¹时, 南瓜子叶的再生率及平均再生芽数均较高。当6-BA浓度在1.5–2.5 mg·L⁻¹范围时, 随着6-BA浓度的升高, 外植体产生不定芽的数量和质量明显下降, 且当6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹和2.5 mg·L⁻¹时, 外植体的平均再生芽数最低, 再生率也均低于50%。因此, 当6-BA浓度在0.5–1.5 mg·L⁻¹时, 有利于外植体产生不定芽, 南瓜子叶的再生率较高, 再生苗质量也较好。

3.3 不同浓度ABA对南瓜不定芽诱导的影响

将子叶外植体接种在含有ABA的培养基中, 接种约4

周可分化出芽原基, 7周时对不定芽进行统计, 发现外植体再生率均小于36%。由表4可知, 当培养基中ABA浓度为1.5 mg·L⁻¹时, 南瓜外植体再生不定芽的平均芽数及再生率均最高。当ABA浓度在0.5–2.5 mg·L⁻¹时, 随着ABA浓度的升高, 南瓜子叶的再生率和平均不定芽数均呈现先升高后下降的趋势, 且当ABA浓度为2.0 mg·L⁻¹时外植体的再生能力最差。以上结果表明, 在MS培养基中单独添加ABA时, 外植体较难通过器官发生途径获得再生苗。

3.4 6-BA与ABA组合对南瓜不定芽诱导的影响

在培养基中单独添加6-BA或ABA时, 均能诱导南瓜子叶外植体芽的再生, 但芽再生率及平均不定芽数均较低(表3, 表4)。为进一步优化诱导南瓜不定芽的产生, 在培养基中添加了不同浓度的6-BA和ABA(表5)。由表5可知, 在培养基中同时添加6-BA和ABA有利于进一步提高芽的再生率, 其中, 处理T6中外植体的再生率及平均再生芽数均最高, 即当在MS培养基中添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA与0.5 mg·L⁻¹ ABA时, 南瓜外植体的再生率可达90.26%, 平均再生芽数也达到最高(为4.21)。但高浓度激素不利于芽的诱导, 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA与2.5 mg·L⁻¹ ABA组合时, 外植体的再

生率最低(为23.81%), 平均再生芽数为1.05。

3.5 南瓜植株再生优化体系

以南瓜近下胚轴的1/2子叶为外植体, 将其接种至不

定芽诱导培养基(添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA与0.5 mg·L⁻¹ ABA的MS培养基)中(图1A, B)。外植体首先由黄转绿并伸展(图1B, C); 约20天, 靠近胚轴的切口处逐渐膨大形成愈伤组织(图1D); 培养4周, 愈伤组织逐渐

表4 不同浓度ABA对南瓜芽再生的影响

Table 4 Effects of different concentrations of ABA on the bud induction of pumpkin

Treatments	ABA (mg·L ⁻¹)	Number of explants	Number of explants with adventitious shoots	Number of shoots	Average number of induced shoots	Rate of plant regeneration (%)
M6	0.5	60	15.35	16.27	1.06	25.58
M7	1.0	60	18.63	20.31	1.09	31.05
M8	1.5	60	21.52	24.75	1.15	35.87
M9	2.0	60	13.12	13.26	1.01	21.87
M10	2.5	60	14.85	15.74	1.06	24.74

表5 不同浓度6-BA与ABA配比对南瓜芽再生的影响

Table 5 Effects of different concentrations of 6-BA and ABA on the bud induction of pumpkin

Treatments	6-BA (mg·L ⁻¹)	ABA (mg·L ⁻¹)	Number of explants	Number of explants with adventitious shoots	Number of shoots	Average number of induced shoots	Rate of plant regeneration (%)
T1	0.5	0.5	60	48.64	148.36	3.05	81.07
T2	0.5	1.0	60	44.53	95.74	2.15	74.22
T3	0.5	1.5	60	46.31	135.24	2.92	77.19
T4	0.5	2.0	60	36.35	68.70	1.89	60.58
T5	0.5	2.5	60	34.88	60.00	1.72	58.14
T6	1.0	0.5	60	53.87	228.00	4.21	90.26
T7	1.0	1.0	60	51.52	170.53	3.31	85.86
T8	1.0	1.5	60	52.39	193.33	3.69	87.32
T9	1.0	2.0	60	50.55	92.00	1.82	84.25
T10	1.0	2.5	60	37.36	54.17	1.45	62.26
T11	1.5	0.5	60	51.50	183.33	3.56	85.83
T12	1.5	1.0	60	52.80	192.20	3.64	88.01
T13	1.5	1.5	60	36.28	46.07	1.27	60.46
T14	1.5	2.0	60	41.36	64.53	1.56	68.94
T15	1.5	2.5	60	26.59	32.17	1.21	44.32
T16	2.0	0.5	60	43.36	114.47	2.64	72.27
T17	2.0	1.0	60	40.25	80.91	2.01	67.09
T18	2.0	1.5	60	35.53	57.21	1.61	59.22
T19	2.0	2.0	60	31.78	39.73	1.25	52.97
T20	2.0	2.5	60	14.29	15.00	1.05	23.81
T21	2.5	0.5	60	35.98	63.33	1.76	59.97
T22	2.5	1.0	60	34.11	50.82	1.49	56.85
T23	2.5	1.5	60	29.30	35.45	1.21	48.84
T24	2.5	2.0	60	30.97	38.40	1.24	51.61
T25	2.5	2.5	60	28.36	33.75	1.19	47.27

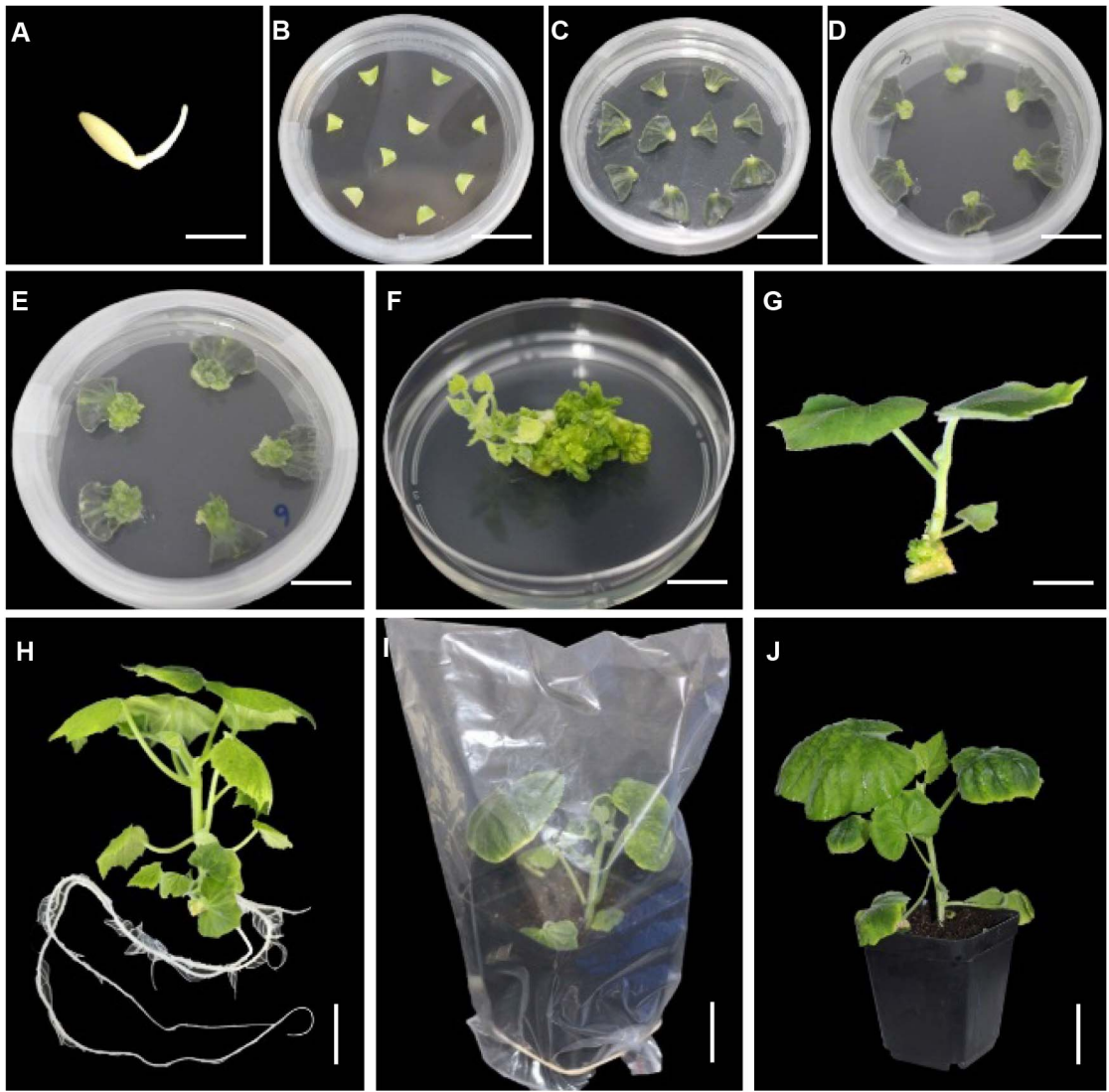


图1 南瓜子叶外植体的离体再生体系建立
(A) MS培养基中萌发3天的种子(Bar=1 cm); (B)–(E) 在不定芽诱导培养基(含激素的MS培养基)中分别培养3天、10天、20天和4周时的外植体, 其中, (D) 在切口处已见愈伤组织产生; (E) 已见芽原基((B)–(C) Bars=2 cm; (D) Bar=22.5 mm; (E) Bar=15 mm); (F) 外植体接种7周产生的不定丛生芽(Bar=15 mm); (G) 伸长芽(Bar=1 cm); (H) 再生植株(Bar=2 cm); (I), (J) 炼苗移栽((I) Bar=35 mm; (J) Bar=40 mm)。

Figure 1 Establishment of plant regeneration of cotyledons of pumpkin
(A) Cultivation for 3 days: seed germination in MS (Bar=1 cm); (B)–(E) Cultivation of explants in shoot regeneration medium (SRM, MS with hormone) for 3 days, 10 days, 20 days and 4 weeks, respectively, (D) Callus induction from explants; (E) Differentiation of bud primordium from callus (Bars=2 cm in (B) and (C), Bar=22.5 mm in (D), 15 mm in (E)); (F) Cultivation for 7 weeks: shoots induction in SRM (Bar=15 mm); (G) Elongating of shoots (Bar=1 cm); (H) Regenerated plant (Bar=2 cm); (I), (J) Exercising and transplanting((I) Bar=35 mm; (J) Bar=40 mm).

分化出芽原基(图1E); 7周丛生出不定芽(图1F)。约第8周, 自外植体膨大处切取南瓜不定芽(图1F), 并将其转入新的培养基中。待不定芽伸长至3–4 cm时(图

1G), 将其转入生根MS培养基中, 再生芽容易生根(图1H), 生根率为100%。约15天后, 对无菌苗进行炼苗和移栽(图1I, J)。结果表明南瓜离体再生苗移栽至

温室后易成活,成活率为95%,从子叶接种到苗再生约需70天。

3.6 讨论

南瓜可通过体细胞胚发生与器官发生2条途径实现植株再生(付洪冰等, 2010)。前人研究发现,与体细胞胚途径相比,通过器官直接发生途径获得完整再生植株的周期较短、再生率高、再生苗质量好(张若纬等, 2009)。且在器官发生途径中,外植体的选择是决定植株再生能力的关键性因素。以往研究表明,葫芦科植物可通过新鲜果皮壁(Schroeder, 1968)、茎尖(Paula, 1991)、下胚轴(Curuk et al., 2003)、胚珠(谢冰等, 2006)、未受粉子房(闵子扬等, 2016)、子叶(Gonsalves et al., 1995; 师桂英等, 2006; Ren et al., 2013; Košmrlj et al., 2015)、子叶节(张玉园等, 2015; 鲁晓晓等, 2017)及叶片(Kintzios et al., 2002; 冯凤娟等, 2008)等器官发生途径实现植株再生。也有研究表明,在以葫芦科甜瓜子叶为离体培养的外植体时,不定芽多产生于近下胚轴端的切口处,且与其它部位相比,子叶的不定芽诱导率较高、再生能力较强(师桂英等, 2006)。因此,本研究以南瓜京欣砧5号子叶为外植体,通过器官发生途径建立南瓜植株再生优化体系。

培养基中植物生长调节物质的种类和含量对植株再生率的影响显著,其对植物器官直接发生途径的影响首先表现在对不定芽的诱导上(崔凯荣和戴若兰, 2000; Ananthakrishnan et al., 2003; 耿新丽等, 2006)。前人在葫芦科植物再生的研究中发现,6-BA是外植体高效分化出不定芽的必要激素(张亚锋等, 2007; 张若纬等, 2009; 肖守华等, 2010; 付秋实等, 2015)。也有研究表明,6-BA与ABA配合使用可以显著提高不定芽的诱导率(Han et al., 2005)。从激素对植物体的影响效应来看,6-BA作为一种细胞分裂素对植物的生长分化有促进作用,而ABA是一种植物生长抑制剂,两者配合使用可能对于维持外植体的激素平衡发挥重要作用(张若纬等, 2009)。但以往在南瓜属植物再生的研究中,多采用单独使用细胞分裂素或将其与生长素结合使用的方法来诱导外植体产生不定芽(Lee et al., 2003; 褚剑峰等, 2004; 李贞霞等, 2005; Zhang et al., 2008; 赵晓菲等, 2014)。本研究采用双因素无重复试验,应用SPSS软件Tukey法分

析数据,结果表明6-BA和ABA浓度对于南瓜不定芽再生率及平均再生芽数有显著影响,且6-BA和ABA均有诱导京欣砧5号南瓜子叶产生芽的作用,二者配合使用可显著提高芽的再生率。在MS培养基中添加 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA与 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA时,芽再生率高达90.26%,远高于Zhang等(2008)单独添加6-BA时的63.7%及李贞霞等(2005)配合使用6-BA与萘乙酸(NAA)得到的86.7%芽再生率。

本研究还表明,单独添加ABA虽使南瓜子叶生长速度减缓,但有利于其生根,因此推测ABA在离体培养过程中还起到促进植物根系形成的作用;不定芽周围容易产生新的不定芽,未见生长点的叶片处难生不定芽,这可能与细胞的特异性有关,但其机理仍需进一步探究。

综上所述,在南瓜的再生过程中,以MS培养基为种子萌发培养基,采用近胚轴端的1/2子叶为外植体,并将其接种在含有 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA与 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA的MS培养基中,可高效诱导出南瓜不定芽。后经过生根培养即可获得完整再生植株,实现南瓜再生体系的优化。该再生优化过程所需时间为65–75天,再生率为90.26%。再生体系的建立为南瓜的生物技术育种、抗逆砧木选育及其分子调控机制研究提供了技术支持。

参考文献

- 褚剑峰, 郑琪, 黄伟忠 (2004). 日本迷你南瓜的组织培养及快速繁殖. 植物生理学通讯 40, 711.
- 崔凯荣, 戴若兰 (2000). 植物体细胞胚发生的分子生物学. 北京: 科学出版社. pp. 49–53.
- 冯凤娟, 梁东, 马锋旺, 张栋 (2008). 甜瓜叶片高效再生体系的建立. 西北农业学报 17(5), 321–324.
- 付洪冰, 崔崇士, 赵曦, 刘琦 (2010). 农杆菌介导南瓜遗传转化体系的建立. 植物学报 45, 472–478.
- 付秋实, 曹芸运, 谭明明, 王烨, 郭仰东, 王怀松 (2014). 薄皮甜瓜离体再生体系的优化. 中国瓜菜 27(2), 16–19.
- 付秋实, 谭明明, 王烨, 王怀松 (2015). 不同甜瓜品种再生体系的比较研究. 中国瓜菜 28(2), 5–8.
- 耿新丽, 赵一鹏, 秦勇 (2006). 金童观赏南瓜离体繁殖技术研究. 安徽农业科学 34, 1338–1339.
- 李冷, 潘俊松, 何欢乐, 吴爱忠, 蔡润 (2007). 黄瓜离体培养再生技术及农杆菌介导的ACS1转化. 上海交通大学学报

- (农业科学版) **25**, 17–23, 29.
- 李贞霞, 李新峥, 董卫华 (2005). 南瓜组织培养体系建立研究. 北方园艺 (3), 75–76.
- 林德佩 (2000). 南瓜植物的起源和分类. 中国西瓜甜瓜 (1), 36–38.
- 刘栓桃, 赵智中, 苗前 (2004). 黑籽南瓜的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯 **40**, 459.
- 陆玲, 周燮 (1992). ABA与GA₃对黄瓜离体子叶和石刁柏茎生根的影响. 植物生理学报 **18**, 173–178.
- 鲁晓晓, 郭威涛, 周俊国, 江毅, 姜立娜, 陈学进 (2017). 印度南瓜愈伤组织诱导及其离体再生培养. 北方园艺 (15), 42–47.
- 梅茜, 张兴国 (2002). 黄瓜组织培养研究. 西南农业大学学报 **24**, 266–267.
- 闵子扬, 李涵, 邹甜, 童龙, 成娟, 孙小武 (2016). 南瓜未授粉子房离体培养及植株再生. 植物学报 **51**, 74–80.
- 师桂英, 徐秉良, 薛应钰 (2006). 厚皮甜瓜黄河蜜植株再生研究. 兰州大学学报(自然科学版) **42**(5), 48–51.
- 孙守如, 章鹏, 胡建斌, 孙利萍, 张曼, 孙治强 (2013). 南瓜未受精胚珠的离体培养及植株再生. 植物学报 **48**, 79–86.
- 肖守华, 李国生, 焦自高, 王崇启, 董玉梅, 李圣辉 (2010). 西瓜高效再生体系的建立. 中国瓜菜 **23**(3), 11–14.
- 谢冰, 王秀峰, 樊治成 (2006). 西葫芦未受精胚珠离体培养条件的优化及胚囊植株的产生. 中国农业科学 **39**, 132–138.
- 张若伟, 顾兴芳, 王烨, 张圣平, 张宝玺 (2009). 基因型和6-BA对黄瓜子叶节再生频率的影响. 中国蔬菜 (22), 45–48.
- 张亚锋, 曹家树, 武涛 (2007). 南瓜属植物再生体系的建立及其应用. 植物生理学通讯 **43**, 599–604.
- 张玉园, 鲁晓晓, 周俊国, 李新峥, 朱自果 (2015). 南瓜子叶节离体再生体系构建. 江苏农业科学 **43**(12), 26–29.
- 赵建萍, 柏新付, 蒋小满, 毕可华 (2000). 培养因子对艾西丝南瓜芽增殖及不定根形成的影响. 植物学通报 **17**, 84–86.
- 赵晓菲, 程永安, 张恩慧, 唐桃霞 (2014). 西葫芦双单倍体自交一代离体再生研究. 西北农业学报 **23**(6), 134–140.
- 邹建, 宋明, 汤青林, 张钟灵, 刘红雨, 周虹 (2003). 观赏南瓜子叶离体培养的初步研究. 西南农业大学学报(自然科学版) **25**(4), 297–299.
- Ananthakrishnan G, Xia XD, Elman C, Singer S, Paris HS, Gal-On A, Gaba V (2003). Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. *Plant Cell Rep* **21**, 739–746.
- Curuk S, Ananthakrishnan G, Singer S, Xia XD, Elman C, Nestel D, Cetiner S, Gaba V (2003). Regeneration *in vitro* from the hypocotyl of *Cucumis* species produces almost exclusively diploid shoots, and does not require light. *HortScience* **38**, 105–109.
- Gonsalves C, Xue BD, Gonsalves D (1995). Somatic embryogenesis and regeneration from cotyledon explants of six squash cultivars. *HortScience* **30**, 1295–1297.
- Han JS, Kim CK, Park SH, Hirschi KD, Mok IG (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.). *Plant Cell Rep* **23**, 692–698.
- Hu BW, Li DW, Liu X, Qi JJ, Gao DL, Zhao SQ, Huang SW, Sun JJ, Yang L (2017). Engineering non-transgenic Gynoecious cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* **10**, 1575–1578.
- Kintzios S, Sereti E, Bluchos P, Drossopoulos J, Kitsaki C, Liopa-Tsakalidis A (2002). Growth regulator pre-treatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep* **21**, 1–8.
- Košmrlj K, Kladnik A, Bohanec B (2015). Adventitious regeneration in styrian oil pumpkin in relation to the endoreduplication pattern and induced tetraploidy on fusaric acid-supplemented media. *Plant Growth Regul* **75**, 587–594.
- Lee YK, Chung WI, Ezura H (2003). Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). *Plant Sci* **164**, 413–418.
- Paula PC (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L cv. YC 60. *Plant Cell Rep* **9**, 620–622.
- Ren Y, Bang H, Gould J, Rathore KS, Patil BS, Crosby KM (2013). Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **49**, 223–229.
- Schroeder CA (1968). Adventive embryogenesis in fruit pericarp tissue *in vitro*. *Bot Gaz* **129**, 374–376.
- Zhang YF, Zhou JH, Wu T, Cao JS (2008). Shoot regeneration and the relationship between organogenic capacity and endogenous hormonal contents in pumpkin. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **93**, 323–331.

Establishing a High-efficiency Regeneration System in Pumpkin (*Cucurbita moschata*)

Jia Guo, Yansu Li, Chaoxing He, Yan Yan, Xianchang Yu*

Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract To improve regeneration efficiency of pumpkin (*Cucurbita moschata*), a high-efficiency regeneration system of plantlets was established. Cotyledons were used as explants and cultured on MS supplemented with 35 concentrations of phytohormone to induce shoots. The frequency of regeneration plantlets was affected by the concentration and proportion of phytohormone in medium. Within a certain concentration, 6-BA appeared to promote the efficiency of shoot regeneration. The addition of ABA in MS caused chlorosis of cotyledons; however, 6-BA and ABA combined could effectively promote the regeneration frequency of explants. Explants cultured on MS containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA showed the highest frequency of shoot regeneration (90.26%). The elongated shoots were cultured on MS for rooting; plantlets appeared healthy after transplanting and nearly 70 days was required for explants to become a completely regenerated plant with the high-efficiency regeneration system for pumpkin.

Key words cotyledons, phytohormone, plant regeneration, pumpkin

Guo J, Li YS, He CX, Yan Y, Yu XC (2019). Establishing a high-efficiency regeneration system in pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Chin Bull Bot* **54**, 539–546.

* Author for correspondence. E-mail: yuxianchang@caas.cn

(责任编辑: 朱亚娜)

本刊加入 OSID 开放科学计划

为扩大论文的传播力和影响力, 本刊申请加入了 OSID (Open Science Identity) 开放科学计划。OSID 开放科学计划是原国家新闻出版广电总局出版融合发展(武汉)重点实验室首创的媒体融合新技术。通过扫 OSID 码作者可以上传发表文章的一些幕后故事和背景资料, 形式有语音、视频和文字等, 更加立体化地展示和传播科研成果, 弥补纸刊载体的局限性。OSID 开放科学计划为作者提供一个与同行学者交流研究成果的平台和窗口。从本期开始我们在每篇论文首页均放置了 OSID 码, 欢迎广大读者扫码加入读者圈。