

· 技术方法 ·

南瓜未授粉子房离体培养及植株再生

闵子扬^{1,3}, 李涵¹, 邹甜¹, 童龙¹, 成娟¹, 孙小武^{1,2*}

¹湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; ²湖南省瓜类研究所, 邵阳 422001; ³湖南省西瓜甜瓜研究所, 长沙 410125

摘要 以南瓜(*Cucurbita moschata*)未授粉子房为外植体, 在离体条件下研究了激素种类、基因型、胚囊发育时期、消毒方式和热激处理时间对胚状体诱导效果的影响, 旨在建立完善的南瓜未授粉子房离体诱导再生体系。结果表明, MS+4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA和MS+0.04 mg·L⁻¹ TDZ两种培养基胚状体的诱导率都较高, 分别为19.8%和20.1%, 二者相比, 使用TDZ诱导更加简单; 在6个南瓜品种中, 2个生长势较强的品种(雪峰蜜本和鱧鱼南瓜)胚状体诱导率较高, 适合作为离体雌核诱导的实验材料; 开花当天的子房先切片后消毒可以有效降低愈伤组织的形成, 提高胚状体的诱导率; 在黑暗且35°C条件下热激5天有利于子房的转绿和出胚。将子叶胚转移至无激素的MS培养基上得到再生植株并移栽成活。经鉴定有7个再生植株的染色体数目n=x=22, 气孔保卫细胞叶绿体数的平均值为4.28个, 是单倍体植株。

关键词 胚状体, 南瓜, 再生植株, 未授粉子房

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.

南瓜(*Cucurbita moschata*)是葫芦科重要的蔬菜作物之一, 具有丰富的营养和保健功能(Adams et al., 2014)。获得纯系(或自交系)对于加速南瓜育种进程具有重要意义(曾爱松等, 2014), 离体雌核培养获得单倍体, 进而得到双单倍体是获得纯系的一条重要途径(李竞雄和宋同明, 1993; 杨江义和李旭锋, 2002)。国内外有关葫芦科植物离体雌核培养的研究已有报道(Lotfi et al., 2003; 谢冰等, 2006; 王璐等, 2008)。孙守如等(2013)利用南瓜的未受精胚珠离体诱导获得了单倍体植株。然而, 南瓜的胚珠很小, 剥离比较困难, 子房操作则相对简单, 可是目前有关南瓜未授粉子房的培养还未见报道。因此, 本研究以6个南瓜品种的未授粉子房为外植体, 对影响南瓜未授粉子房离体诱导胚状体的主要因素进行了比较研究, 并获得了单倍体再生植株, 为建立完善的南瓜未授粉子房离体培养再生体系及在实际育种中应用提供了技术支持。

1 材料

以湖南雪峰种业提供的中国南瓜(*Cucurbita moschata* D.)杂种一代雪峰蜜本、极早熟蜜本、中杂1号

和鱧鱼南瓜; 及印度南瓜杂种一代红栗2号和黄金2号6个品种为实验材料, 比较不同基因型对胚状体诱导效果的影响。以雪峰蜜本为试材, 比较不同激素、不同胚囊发育时期、不同消毒方式和热激处理时间等对胚状体诱导的影响。不同胚囊发育时期对胚状体诱导的影响以开花前24、12和0小时的子房为供体材料, 其它影响因素的比较均以开花当天的子房为试材。上述6个品种均种植于湖南农业大学教学实验基地, 待第2雌花开放后开始取样接种。

2 培养基成分与培养条件

2.1 外植体的获取与消毒

选取生长健壮且无病虫害植株上的未授粉子房为外植体, 在开花前24、12和0小时(当日)分别取样。其中, 当日的子房需在前一天套袋以确保未授粉。子房在流水下冲洗30分钟, 转入超净工作台用75%的乙醇浸泡30秒, 无菌水冲洗1次, 然后分别进行如下两种操作: (1) 先消毒后切片。将子房在3%的次氯酸钠溶液中消毒15分钟, 无菌水冲洗6次, 然后切除外表皮, 再切成1 mm左右的薄片接种在培养基上; (2) 先切片后消毒。将子房切成1 mm左右的薄片, 再用3%的次

收稿日期: 2015-01-04; 接受日期: 2015-04-19

基金项目: 南瓜产业技术研究与示范(No.201303112)

* 通讯作者。E-mail: sunxiaowu2007@126.com

氯酸钠溶液消毒5分钟, 无菌水冲洗6次。用无菌滤纸吸干子房片表面水分后, 进行接种培养。

2.2 胚状体的诱导与主要影响因素

以MS为基本培养基, 添加不同浓度的2,4-D、NAA、6-BA或添加不同浓度的TDZ, 共15个处理, 3次重复, 每重复接种20个子房片(5瓶, 每瓶4片)进行胚状体诱导效果的比较。在此基础上比较不同基因型、不同胚囊发育时期、不同消毒方法和不同热激时间对胚状体诱导的影响, 此4种影响因素均在MS+0.04 mg·L⁻¹ TDZ培养基上进行。以上所有培养基均添加30 g·L⁻¹蔗糖和7 g·L⁻¹琼脂粉, pH5.8。

2.3 胚状体的获得及植株再生

接种后的试材35℃黑暗下热激5天(置于东南仪器RDN-800B-4型人工气候箱中), 然后置于光照16小时/天, 光照度2 500 Lx及25℃的培养室中培养以诱导胚状体。胚状体发育到具有明显的根端和芽端后, 转移至含不同激素组合的MS培养基上以比较诱导成苗的效果, 成苗培养条件与胚状体培养条件一致。胚状体发育成完整小苗后开始炼苗并移栽, 成活后定植于温室内。

2.4 再生植株的倍性鉴定

再生植株的倍性鉴定采用形态学、根尖染色体计数及气孔保卫细胞叶绿体计数方法, 其中根尖染色体计数法参照陈解放(2010)的方法, 气孔保卫细胞叶绿体计数法参照袁素霞等(2009)的方法。

2.5 数据分析

热激完成后记录膨大胚珠数; 25℃光下培养7天后统计胚珠转绿率; 培养35天后统计胚状体诱导率; 完整植株形成后统计成苗率。采用SPSS软件对以上各数据进行方差分析和Duncan's多重比较。

胚珠转绿率=(转绿胚珠数/膨大胚珠总数) × 100%;

胚状体诱导率=(形成胚状体总数/转绿胚珠总数) × 100%;

成苗率=(形成完整植株数/接种胚状体总数) × 100%。

3 结果与结论

3.1 不同激素对胚状体诱导培养的影响

不同激素对胚状体的诱导结果见表1。将外植体接种至不同浓度2,4-D、NAA和6-BA的MS培养基上, 结果发现MS+4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA培养基上的胚状体诱导率较高, 可达19.8%。但实验发现, 如果外植体一直在含有2,4-D的培养基上诱导培养, 绿色的胚珠生长缓慢, 逐渐变成淡黄而后变白, 最后退色成水渍状腐烂。而在诱导14天左右时转至MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA培养基继续诱导胚状体(即将组合中的2,4-D去除), 在MS诱导成苗时才能形成正常的再生植株。MS+0.04 mg·L⁻¹ TDZ培养基对胚状体的诱导率最高达20.1%。虽与2,4-D组合诱导效果差异不显著, 但是MS单独附加TDZ, 胚珠的愈伤化程度较低, 且外植体可以一直处于该诱导培养基中, 直至35天左右子叶胚出现, 因此诱导步骤相对简单, 且形成正常的胚状体较多, 有利于成苗。

3.2 不同基因型对胚状体诱导率的影响

不同基因型供体材料在相同诱导条件下对培养的反应不一致, 胚状体的诱导率差异显著。由表2可知, 诱导率最高的是雪峰蜜本(20.7%), 其次是鱧鱼南瓜(19.5%)。红栗2号虽然胚珠膨大最多, 但转绿与胚状体诱导率都不高, 说明只有膨大并转绿的胚珠才能形成胚状体, 但膨大和转绿率与胚状体诱导率不成正比。黄金2号对诱导培养的反应非常迟钝, 只有部分胚珠膨大, 且诱导率为0。反映出未授粉子房胚状体的诱导率存在明显的基因型依赖性(裴晓利等, 2011)。本实验发现, 胚状体诱导率较高的雪峰蜜本和鱧鱼南瓜都是中国南瓜杂交一代品种, 且它们的生长势都很强, 细胞分裂比较活跃, 植株的生理状态较好, 在本实验条件下比较适合作为胚状体诱导的实验材料。

3.3 胚囊的发育时期对胚状体诱导的影响

雌花取样时间不同, 胚囊的发育阶段不同。从表3可以看出, 不同的胚囊发育阶段胚状体的诱导率差异很大。开花当天的子房胚状体诱导率高达20%, 与开花

表1 不同激素配比对胚状体诱导的影响**Table 1** Effects of different hormones proportions on embryoid induction

Hormone components of medium (mg·L ⁻¹)				Number of explants	Number of enlargement ovules	Frequency of ovules turning green (%)	Frequency of embryoid induction (%)
2,4-D	NAA	6-BA	TDZ				
0.0	0.5	1.0	0.0	20	10.0 h	13.7 h	0 i
1.0	0.5	1.0	0.0	20	17.0 g	19.8 g	2.1 h
2.0	0.5	1.0	0.0	20	22.0 f	42.5 d	5.5 g
3.0	0.5	1.0	0.0	20	53.3 d	55.7 bc	12.2 d
4.0	0.5	1.0	0.0	20	100.7 ab	61.5 a	19.8 a
5.0	0.5	1.0	0.0	20	102.0 a	51.7 c	15.2 b
0.0	1.0	1.0	0.0	20	10.3 h	34.3 e	0 i
1.0	1.0	1.0	0.0	20	18.0 g	25.9 f	2.3 h
2.0	1.0	1.0	0.0	20	23.3 f	54.3 c	5.4 g
3.0	1.0	1.0	0.0	20	56.3 c	59.1 ab	11.9 d
4.0	1.0	1.0	0.0	20	101.7 ab	62.0 a	15.5 b
5.0	1.0	1.0	0.0	20	102.7 a	52.0 c	14.2 c
0.0	0.0	0.0	0.02	20	42.0 e	35.7 e	7.4 f
0.0	0.0	0.0	0.04	20	99.0 b	62.3 a	20.1 a
0.0	0.0	0.0	0.06	20	102.0 a	54.3 c	11.2 e

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

Different lowercase letters in the same column represent significant difference at $P < 0.05$ level.

表2 不同基因型对胚状体诱导的影响**Table 2** Effects of different genotypes on embryoid induction

Variety	Growth potential	Number of explants	Number of enlargement ovules	Frequency of ovules turning green (%)	Frequency of embryoid induction (%)
Xue feng mi ben	Strong	20	93.3 b	60.4 c	20.7 a
Ji zao shu mi ben	Weak	20	83.7 c	66.5 ab	10.2 b
Zhong za 1	Weak	20	82.0 c	65.4 bc	8.7 b
Hong li 2	Moderate	20	104.0 a	63.5 bc	10.6 b
E yu nan gua	Strong	20	102.7 a	71.8 a	19.5 a
Huang jin 2	Moderate	20	72.0 d	43.1 d	0 c

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

Different lowercase letters in the same column represent significant difference at $P < 0.05$ level.

表3 胚囊发育时期对胚状体诱导的影响**Table 3** Effects of different development stages of embryo sac on embryoid induction

Sampling time (hours before flower)	Number of explants	Number of enlargement ovules	Frequency of ovules turning green (%)	Frequency of embryoid induction (%)
24	20	83.3 c	55.8 b	11.4 c
12	20	132.0 b	59.5 b	15.3 b
0	20	140.0 a	66.1 a	20.0 a

诱导培养基为MS+0.04 mg·L⁻¹ TDZ。同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

Induction medium was MS+0.04 mg·L⁻¹ TDZ. Different lowercase letters in the same column represent significant difference at $P < 0.05$ level.

前24和12小时的胚状体诱导率存在显著差异。开花前24小时的子房在培养过程中胚珠愈伤化程度较高，

不利于胚状体的形成。由此说明，成熟的胚囊母细胞有利于诱导形成胚状体。

3.4 不同消毒方式对胚状体诱导率的影响

本实验发现, 先消毒后切片, 在培养过程中胎座组织与胚珠一起膨大, 但是胎座组织的膨大速度明显大于胚珠。培养3天左右, 膨大的胎座组织便将胚珠完全包裹, 使胚珠很难直接接触到培养基(图1A), 因此干扰了胚珠的生长与分化, 很难得到正常的胚状体。先切片后消毒则避免了上述情况的发生(图1B), 有效提高了胚状体的诱导率。

3.5 不同热激时间对胚状体诱导率的影响

不同热激时间对胚状体的诱导率影响显著。35°C黑暗热激5天, 胚珠的膨大率、转绿率和胚状体诱导率(19.6%)都显著高于其它处理, 平均每瓶出胚数达4.1个(图1C); 热激7天, 胚珠膨大率较高但转绿率和胚状体个数都有所降低, 平均每瓶胚状体个数2.0个(图1D), 可能是由于高温热激时间过长导致胚珠内部的生理活性受到影响, 转绿和胚状体的诱导受到一定抑制; 热激时间为0 (即处于25°C黑暗)时, 各项指标都显著低于其它处理, 平均每瓶胚状体个数接近于0 (图1E), 说明热激对诱导胚状体的形成是一个必要条件。同时发现, 35°C热激5天胚状体的形成比未热激提早2-4天, 说明热激能够缩短诱导胚状体的时间, 加快胚状体的诱导形成。

3.6 胚状体的发育过程及诱导成苗

转绿后的胚珠培养20天左右历经球形胚(图2A)、心形胚(图2B)和子叶形胚(图2C)发育阶段后, 形成具有明显根端和芽端的胚状体(图2D)。将胚状体转移到诱导成苗培养基中继续培养, 成苗诱导率如表4所示。

从表4可以看出, 实验选用的9种培养基均能诱导出再生植株, 但成苗率存在显著差异。不添加任何激素的MS培养基诱导成苗率最高为69.4%, 子叶胚培养25天左右即可形成完整的植株(图2E), 随后移栽成活(图2F)。说明MS培养基有利于体细胞的增生。MS+1.0 mg·L⁻¹ GA₃可直接诱导成苗, 但效果不理想。该培养基有壮苗作用, 将生长较弱的胚状体转移到其中培养15天左右, 胚状体长势会明显好转, 再转移到不含激素的MS培养基中可提高胚状体的成苗率。

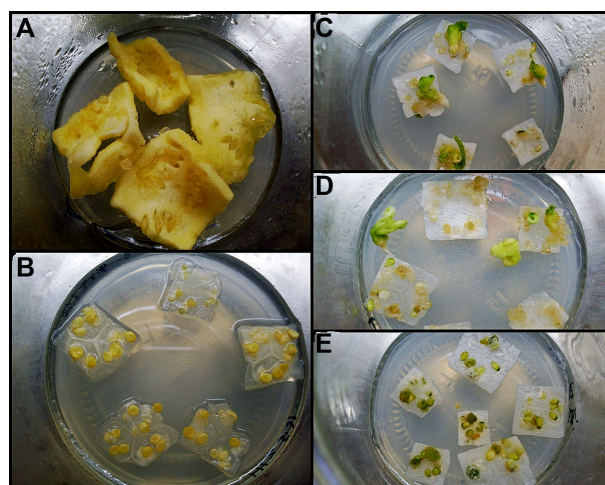


图1 不同消毒方式和热激时间对胚状体诱导的影响

(A) 先消毒后切片培养3天的子房片; (B) 先切片后消毒培养3天的子房片; (C) 35°C黑暗处理5天的出胚情况; (D) 35°C黑暗处理7天的出胚情况; (E) 25°C黑暗处理5天的出胚情况

Figure 1 Effects of different disinfection methods and high-temperature pretreatment time on the frequency of embryoid induction

(A) The ovary disinfected before sliced was cultured for 3 days; (B) The ovary sliced before disinfected was cultured for 3 days; (C) Embryoid induction was treated at 35°C in dark for 5 days; (D) Embryoid induction was treated at 35°C in dark for 7 days; (E) Embryoid induction was treated at 25°C in dark for 5 days

表4 不同培养基对胚状体成苗的影响

Table 4 Effects of different media on seedling induction

	Medium hormone components (mg·L ⁻¹)			Number of embryoids	Seedling rate (%)
	NAA	6-BA	GA ₃		
0	0	0	0	12	69.4 a
0	0.5	0	0	12	19.4 cde
0	1	0	0	12	13.9 e
0.5	0	0	0	12	27.8 b
0.5	0.5	0	0	12	22.2 bcd
0.5	1	0	0	12	16.7 de
0	0	0.5	0	12	13.9 e
0	0	1.0	0	12	25.0 bc
0	0	1.5	0	12	19.5 cde

同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

Different lowercase letters in the same column represent significant difference at $P < 0.05$ level.

3.7 再生植株的倍性鉴定

本实验共得到46株再生植株, 移栽成活35株(以长出新叶为准), 其 R_0 代再生植株的田间性状正在观察中。利用形态学、根尖染色体计数和气孔保卫细胞叶绿体计数3种方法对移栽成活的35棵植株进行倍性鉴定, 结果发现有28棵再生植株为二倍体或双单倍体, 7株为单倍体。

形态学观察发现, 单倍体再生植株生长势弱、茎秆细长且侧枝少, 叶片细长、变薄稍透明且叶脉不明显(图3A), 与正常二倍体组培苗(图3B)有明显区别。

对再生植株采用根尖染色体计数法进行倍性鉴定, 发现有7棵再生植株的染色体数目 $n=x=22$ (图3C), 是正常南瓜染色体($2n=2x=44$)数目的一半(图3D)。

对再生植株采用气孔保卫细胞叶绿体计数法进行鉴定, 结果发现单倍体再生植株的平均叶绿体数目为4.28个(图3E), 而正常二倍体组培苗保卫细胞的平均叶绿体数目为8.37个(图3F)。

3.8 结论

众所周知, 2,4-D是诱导植物细胞胚性化并促进胚状体形成的重要因素之一。许多植物离体胚状体诱导均使用不同浓度的2,4-D (De Jong et al., 1993; 苏华等, 2006; 冯大领等, 2007), 但胚状体形成前后, 外植体在含2,4-D培养基上诱导时间的长短却因不同物种而异(崔凯荣等, 1998; 徐静, 2007)。谢冰等(2006)认为西葫芦(*Cucurbita pepo*)胚状体形成1周后转接, 发根受阻, 且转接时间越延后, 胚状体的发育异常越严重。本实验中南瓜子房片在含2,4-D的培养基上诱导14天左右就必须转至去除2,4-D的培养基中继续培养, 否则不能形成正常的胚状体。说明2,4-D的浓度和作用时间对诱导胚形成与正常发育有一定影响。

对于南瓜未授粉子房的离体培养, 2,4-D是诱导胚状体发生的重要因素, 但不是必须的。本实验使用 $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ对南瓜未授粉子房进行处理, 胚状体诱导效果也很好, 诱导率较高且胚珠愈伤化程度较低。说明TDZ对南瓜胚状体的形态建成及后续成苗有利。本实验中筛选出的2种培养基都能有效地刺激离体雌核的发育, 说明南瓜未授粉子房的离体雌核发育需要外源激素的刺激, 但对激素的种类并不专一。

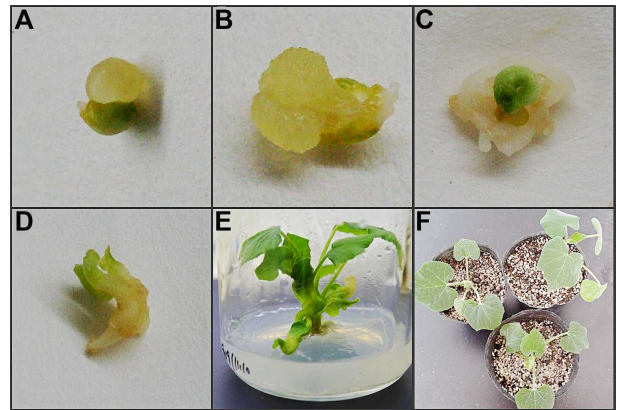


图2 再生植株的诱导形成过程及移栽

(A) 球形胚; (B) 心形胚; (C) 子叶形胚; (D) 具有明显根端和芽端的幼株; (E) 完整再生植株; (F) 移栽16天后成活的再生植株

Figure 2 The induction and transplanting of the regenerated plants

(A) Globular embryo; (B) Heart-shape embryo; (C) Cotyledon embryo; (D) Small plants with obvious root end and shoot end; (E) Regenerated plantlet; (F) The survival plants after transplanted for 16 days

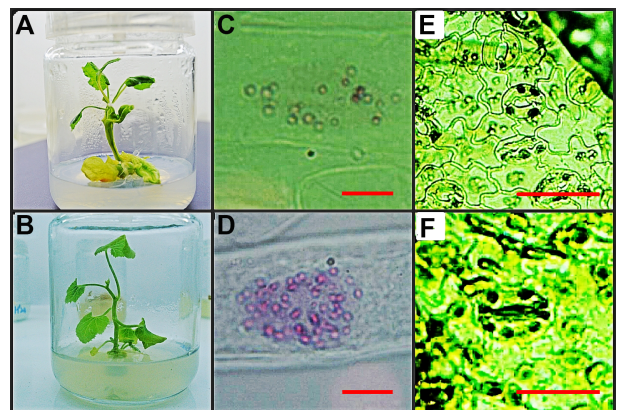


图3 再生植株的倍性鉴定

(A) 单倍体再生植株; (B) 正常二倍体组培苗; (C) 单倍体再生植株染色体数目; (D) 二倍体南瓜根尖的染色体数目; (E) 单倍体再生植株气孔保卫细胞的叶绿体数目; (F) 二倍体南瓜气孔保卫细胞的叶绿体数目。Bar=100 μm

Figure 3 The ploidy identification of the regenerated plants (A) The haploid regenerated plants; (B) Diploid pumpkin tissue culture seedling; (C) The number of chromosome of the regenerated haploid plantlet; (D) The number of chromosome in the root tip cell of the diploid pumpkin; (E) Number of chloroplasts in stomatal guard cell of the regenerated haploid plantlet; (F) Number of chloroplasts in stomatal guard cell of the diploid pumpkin. Bar=100 μm

本实验以南瓜未授粉子房为外植体进行离体培养, 获得最高出胚率20.7%, 成苗率69.4%, 与孙守如等(2013)以南瓜未受精胚珠离体培养的最高出胚率32.2%, 成苗率64.3%相比, 出胚率低于后者, 成苗率略高于后者。说明除基因型的影响外, 实验方法也有要改进的地方。南瓜胚珠培养的效果虽然不错, 但其胚珠较小, 剥离比较费时, 需要在倒置显微镜下进行, 对设备和操作技术要求较高; 而采用子房培养, 尤其是子房先切片后消毒的方法诱导胚状体, 操作比较简便且成本低, 可以作为离体雌核诱导胚状体的一个重要补充方法。本实验条件下, 先切片后消毒与先消毒后切片相比, 前者显然有效提高了胚状体的诱导率, 这可能是较薄的子房片与消毒液接触的表面积大, 消毒液杀死了部分包裹着胚珠的胎座组织, 使胚珠易于膨大突出, 进而较易接触到培养基中的外源物质, 大大提高了实验效率及胚状体的诱导率。

本实验未对再生植株的发育来源进行胚胎学观察, 但结合胚状体的发育过程和染色体鉴定结果, 推测所获单倍体植株有可能源于南瓜未授粉胚珠的胚囊成员细胞, 尚需经过田间自交观察验证, 才能最终确定其倍性与发育来源。

本实验移栽成活的再生植株群体中有7株单倍体(H)和28株二倍体或双单倍体(DH), 这种再生植株以二倍体居多的结果与黄瓜(*Cucumis sativus*)未受精子房的离体培养结果(杜胜利, 2002)类似。对于植物遗传与育种研究来说, 此两种类型的个体都可能有很高的利用价值。

本实验发现, 并不是所有的胚状体都能发育成具有生活力的再生植株, 仅有60%左右正常、典型且生长状态良好的胚状体才可较快地发育, 经过成苗诱导后叶片伸展, 白根增多, 移栽成活。而胚状体转接后大部分生长缓慢、叶少皱卷且根少细弱, 会在驯化移栽前黄化死亡; 或者胚状体的发育受阻, 有芽无根或有根无芽的畸形细胞胚很难形成再生植株。因此, 在离体雌核发育过程中, 控制胚状体的形态发生过程, 深入研究其形成的分子机理, 使之形成正常且具再生能力的胚状体是值得重视的问题(关春梅和张宪省, 2006)。

参考文献

陈解放 (2010). 南瓜未受精胚珠离体培养体系的优化. 硕士

- 论文. 郑州: 河南农业大学. pp. 19–20.
- 崔凯荣, 任红旭, 邢更妹, 王亚馥 (1998). 枸杞组织培养中抗氧化酶活性与体细胞胚发生相关性研究. 兰州大学学报(自然科学版) **34**, 93–99.
- 杜胜利 (2002). 黄瓜雌核发育及染色体倍性鉴定与加倍研究. 博士论文. 天津: 南开大学. pp. 43.
- 冯大领, 孟祥书, 王艳辉, 刘霞, 李明, 赵锦, 白志英 (2007). 植物生长调节剂在植物体细胞胚发生中的应用. 核农学报 **21**, 256–260.
- 关春梅, 张宪省 (2006). 植物离体器官发生控制机理研究进展. 植物学通报 **23**, 595–602.
- 李竞雄, 宋天明 (1993). 植物细胞遗传学. 北京: 科学出版社. pp. 307–344.
- 裴晓利, 杨颖, 李胜, 王建设 (2011). 黄瓜离体雌核发育诱导单倍体的研究. 甘肃农业大学学报 **46**, 52–56.
- 苏华, 金宝燕, 任华中 (2006). 黄瓜花药培养中若干影响因素的研究. 沈阳农业大学学报 **37**, 470–472.
- 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.
- 王璐, 陈小燕, 张力, 陈怀动, 任华中 (2008). 不同因素对黄瓜未受精子房胚状体诱导的影响. 西北农业学报 **17**, 267–270.
- 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.
- 徐静 (2007). 西葫芦雌核离体高效培养体系的建立. 硕士论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学. pp. 25–35.
- 杨江义, 李旭锋 (2002). 植物雌性单倍体的离体诱导. 植物学通报 **19**, 552–559.
- 袁素霞, 刘玉梅, 方智远, 杨丽梅, 庄木, 张扬勇, 孙培田 (2009). 甘蓝类蔬菜小孢子再生植株染色体倍性与气孔保卫细胞叶绿体数的相关性. 中国农业科学 **42**, 189–197.
- 曾爱松, 高兵, 宋立晓, 张云霞, 李健琦, 李英, 侯喜林, 严继勇 (2014). 结球甘蓝小孢子胚胎发生的细胞学研究. 南京农业大学学报 **37**, 47–54.
- Adams GG, Imran S, Wang S, Mohammad A, Kok MS, Gray DA, Channell GA, Harding SE (2014). The hypoglycemic effect of pumpkin seeds, trigonelline (TRG), nicotinic acid (NA), and D-chiro-inositol (DCI) in controlling glycemic levels in diabetes mellitus. *Food Sci Nutr* **54**, 1322–1329.
- De Jong AJ, Schmidt Ed DL, De Vries SC (1993). Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol Biol* **22**, 367–377.

Lotfi M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED (2003).
Production of haploid and doubled haploid plants of melon

(*Cucumis melo* L) for use in breeding for multiple virus
resistance. *Plant Cell Rep* **21**, 1121–1128.

Studies of *in Vitro* Culture and Plant Regeneration of Unfertilized Ovary of Pumpkin

Ziyang Min^{1,3}, Han Li¹, Tian Zou¹, Long Tong¹, Juan Cheng¹, Xiaowu Sun^{1,2*}

¹College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²Hunan Province Melon Research Institute, Shaoyang 422001, China; ³Hunan Watermelon and Muskmelon Institute, Changsha 410125, China

Abstract Using unfertilized ovaries of pumpkin as explants, we determined the effect of different combinations and concentrations of growth regulators, genotypes, embryo sac development stages, disinfection methods and duration of high-temperature pretreatments on embryoid induction via *in vitro* culture to establish a regeneration system of unfertilized ovaries of pumpkin. The media MS+4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and MS+0.04 mg·L⁻¹ TDZ achieved higher induction rates, 19.8% and 20.1%, respectively, as compared to other media examined, with the TDZ-induced method easier to operate. Among the 6 pumpkin varieties tested, two (Xue feng mi ben and E yu nan gua), with stronger growth, had higher embryoid induction rates and were more suitable to be used as experiment materials. The operation of slicing and then sterilizing the ovaries picked on bloom day decreased the cavernous callus formation effectively and increased the embryoid induction rate. Treatments with darkness and heat shock (35°C) for 5 days could help ovaries turn green and induce embryoids. When moved to hormone-free MS medium, the cotyledon embryos developed to regenerated seedlings and survived after transplantation. Seven regenerated plantlets had chromosome number n=x=22 and an average number of chloroplasts in stomatal guard cells of 4.28, so they were haploid plants.

Key words embryoid, pumpkin, regenerated seedling, unfertilized ovary

Min ZY, Li H, Zou T, Tong L, Cheng J, Sun XW (2016). Studies of *in vitro* culture and plant regeneration of unfertilized ovary of pumpkin. *Chin Bull Bot* **51**, 74–80.

* Author for correspondence. E-mail: sunxiaowu2007@126.com