

· 技术方法 ·

# 南瓜未受精胚珠的离体培养及植株再生

孙守如, 章鹏, 胡建斌\*, 孙利萍, 张曼, 孙治强

河南农业大学园艺学院, 郑州 450002

**摘要** 以南瓜(*Cucurbita moschata*)品种试验1号为材料, 以未受精胚珠为外植体, 研究了激素种类、外植体发育时期、高温预处理时间和 $\text{AgNO}_3$ 浓度对胚状体诱导的影响。结果表明, 2,4-D、NAA和6-BA组合有利于胚状体的形成, 出胚效果最好的培养基为 $\text{MS}+1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{2,4-D}+0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ , 出胚率达31.1%; 雌花开放当天的胚珠出胚率最高(26.7%), 且愈伤组织形成频率低(<5%); 外植体在黑暗、高温(35℃)条件下处理5天有利于胚状体的形成, 出胚率为32.2%。培养基中添加 $\text{AgNO}_3$ 对胚状体形成的抑制作用明显。胚状体转移至成苗培养基后可形成正常小苗, 出苗率最高可达64.3%, 植株再生过程经历了典型的胚胎发育途径。细胞学观察结果表明, 胚状体极有可能起源于胚囊珠孔端的细胞, 即卵细胞或助细胞。

**关键词** 胚状体, 离体培养, 植株再生, 南瓜, 未受精胚珠

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.

花粉(药)培养技术在十字花科、禾本科和茄科等植物中已广泛应用, 并已成功获得单倍体或双单倍体植株, 但在葫芦科植物上的成功应用报道较少(张伶俐等, 2009; Basu et al., 2011)。通过对一些植物的未受精胚珠或子房进行离体培养, 可促进其雌核发育, 进而获得单倍体及双单倍体植株, 这是植物花粉(药)培养技术的重要补充。由于葫芦科植物的花粉(药)培养不易成功, 离体雌核培养技术已成为获得葫芦科单倍体的重要途径(雷春和陈劲枫, 2006; Chen et al., 2011)。目前, 人们已经对西葫芦(*Cucurbita pepo*)(陈学军等, 2000; 谢冰等, 2006; 徐静, 2007)、甜瓜(*Cucumis melo*)(Lotfi et al., 2003; 韩丽华等, 2005)和黄瓜(*Cucumis sativus*)(Gémes-Juhász et al., 2002; 刁卫平等, 2008)等葫芦科植物的未受精胚珠或子房进行了离体培养, 尽管大多数研究已获得胚状体或愈伤组织, 但只有少数研究获得了胚囊植株。南瓜(*Cucurbita moschata*)是葫芦科重要的蔬菜作物之一, 具有“世界性蔬菜”的美称。尽管我国南瓜种质资源十分丰富, 但其杂交育种工作相对滞后, 原因之一相关的育种理论基础研究严重滞后。单倍体植株创制在多种植物中已有成功报道, 但在南瓜中的报道较少。前期研究中, 我们优化了南瓜未授粉子房的离

体培养条件, 并成功获得了子房胚, 但这些胚状体不易成苗(孙守如等, 2009)。直接培养未受精胚珠可以克服子房培养的不足, 更好地促进胚囊成员细胞的孤雌生殖。本研究中, 我们以南瓜未受精胚珠为外植体, 通过测试多种生理因素对培养效果的影响, 获得了大量胚状体及其再生植株, 为南瓜单倍体育种技术提供了基础性资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试材料为南瓜(*Cucurbita moschata* Duch. Ex Poir.)品种试验1号, 该品种为河南农业大学园艺学院配制的杂交一代种。于2011年3月下旬穴盘育苗, 4月下旬定植于河南农业大学教学实验基地。

### 1.2 外植体的获取

在盛花期18:00–19:00, 采摘生长健壮且无病虫害的植株上当天开放(前一天下午套袋以防止传粉)、开放前1天和开放前2天的雌花, 去花冠, 保留子房。将子房用自来水冲洗30分钟后, 在超净工作台上用70%乙醇浸泡30秒, 然后转入0.1%(w/v)升汞溶液

收稿日期: 2012-07-27; 接受日期: 2012-10-28

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(No.9210210016)

\* 通讯作者。E-mail: jbh220@yahoo.com.cn

中消毒10分钟,最后用无菌水浸洗6次。用解剖刀轻轻削去子房的子房壁组织,直至隐约看到胚珠为止,然后置于解剖镜下,用解剖针剥离出胚珠,作为外植体。

### 1.3 胚状体诱导培养基及影响因素

胚状体诱导是以MS为基本培养基,并添加不同浓度的生长素和细胞分裂素。生长素为2,4-D(1.0、1.5 mg·L<sup>-1</sup>)和NAA(0.25、0.5、1.0 mg·L<sup>-1</sup>),细胞分裂素为6-BA(0.5、1.0 mg·L<sup>-1</sup>)。待筛选出最佳胚状体诱导激素组合后,再测试以下3种因素对胚状体诱导的影响。(1) 外植体发育时期[雌花开放当天(0天)、前1天(-1天)、前2天(-2天)];(2) 外植体在黑暗、35℃高温条件下预处理时间(3、5、7天);(3) 培养基中AgNO<sub>3</sub>浓度(2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 mg·L<sup>-1</sup>)。所有培养基中均添加30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖,并以6 g·L<sup>-1</sup>琼脂固化,pH值在高温高压灭菌前调至5.8。

### 1.4 胚状体诱导及植株再生

将剥离出的胚珠平放在诱导培养基上,为了抑制愈伤组织形成,尽量不让伤口部位直接接触培养基。接种后的胚珠置于(25±1)℃、光周期为14小时光照/10小时黑暗及光强为40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>的培养箱中培养(除高温预处理实验外),以诱导胚状体形成。待胚状体发育至心形期或稍晚时,将其转移至装有成苗培养基的三角瓶中培养,使之形成完整植株。成苗培养基为不含任何激素的MS基本培养基,成苗培养条件与胚状体诱导培养条件一致。待胚状体发育成完整小苗后,将小苗从三角瓶中取出,洗去根部的培养基,移栽至含有蛭石、草炭和园土(体积比为1:1:1)的营养钵中,于日光温室中驯化、生长。

### 1.5 胚状体发育的细胞学观察

在胚状体诱导过程中,每间隔2–3天取材1次(每次30粒),以观察胚状体发育的细胞学途径。材料经FAA固定液[90 mL 50%乙醇+5 mL冰醋酸+5 mL福尔马林(37%–40%甲醛)]固定后,用爱氏苏木精染色24小时,系列乙醇(50%–100%)脱水,经二甲苯过渡到石蜡(52–54℃),并用石蜡包埋。采用LEICARM2015型切片机切片,切片厚度10 μm,二甲苯透明,中性树胶

封片,之后在DMXY型数码生物显微镜下观察并拍照。

### 1.6 数据统计

将外植体(剥离出的未受精胚珠)接种于添加有不同激素组合的培养基上,每处理接种3个培养皿,每皿接种约30粒胚珠,设3次重复,即每个处理所接种的外植体总数约为270个。定期观察每处理的出胚和成苗情况,并统计出胚率和成苗率。

出胚率=(单个培养皿中形成的胚状体数/接种外植体数)×100%

成苗率=(每种培养基或处理中正常植株数/所形成的胚状体总数)×100%

将出胚率转化为反正弦值后,进行方差分析和Duncan's多重比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胚状体诱导培养基的筛选

不同激素组合对南瓜未受精胚珠(雌花开放当天)诱导胚状体的影响见表1。由表1可知,培养基中仅添加NAA或NAA和6-BA组合均难以诱导胚状体的形成,出胚率几乎为0。而添加2,4-D后出胚率明显增加,说明2,4-D有利于离体南瓜未受精胚珠的发育。但在仅添加2,4-D的培养基上,平均每个培养皿中只出现1.0–1.3个胚状体,出胚率在5%以下,而且这些胚状体均不能转化成正常小苗。观察发现,不能转化为正常小苗的胚状体大多为水渍状或畸形胚,说明单一的生长素不能够促使胚状体的正常发育。2,4-D和6-BA组合可显著提高出胚率,平均每皿胚状体数为3.0–5.0个,出胚率介于10.0%–16.7%之间,显著高于仅添加NAA或2,4-D或NAA与6-BA组合的培养基的出胚率。将这些胚状体转移至不含任何激素的MS培养基上,约有33.3%–40.0%的胚状体转化为正常小苗。培养基中同时添加2,4-D、NAA和6-BA可进一步提高出胚率,不同培养基上平均每皿有3.7–9.3个胚状体,平均出胚率为12.2%–31.1%,出苗率为18.2%–64.3%。其中,出胚效果最好的培养基是MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+0.25 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA,接种的90个外植体共产生28个胚状体(单个培养皿中最

表1 不同培养基对南瓜未受精胚珠胚状体诱导的影响

Table 1 Effects of different media on embryoid induction from pumpkin unfertilized ovules

Media components (mg·L <sup>-1</sup> )			Number of embryoids per petri dish	Frequency of embryoid induction (%)	Frequency of plant regeneration (%)
2,4-D	NAA	6-BA			
	1.0		0 f	0 g	0
	1.0	0.5	0.7 e	2.2 f	0
	1.0	1.0	0 f	0 g	0
1.0			1.3 e	4.4 f	25.0
1.5			1.0 e	3.3 f	0
1.0		0.5	4.3 d	14.4 de	38.4
1.0		1.0	3.0	10.0 e	40.0
1.5		0.5	5.0 c	16.7 c	33.3
1.5		1.0	3.3 e	11.1 e	40.0
1.0	0.25	0.5	9.3 a	31.1 a	64.3
1.0	0.25	1.0	6.3 bc	21.1 b	42.1
1.0	0.5	0.5	7.7 b	25.6 b	30.4
1.0	0.5	1.0	5.6 c	18.7 c	29.4
1.5	0.25	0.5	6.6 bc	22.0 bc	30.0
1.5	0.25	1.0	4.7 c	15.6 cd	28.6
1.5	0.5	0.5	5.3 c	17.8 c	31.2
1.5	0.5	1.0	3.7 d	12.2 e	18.2

不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。Different small letters represent significant difference at  $P<0.05$  level.

多胚状体数达12个), 其中18个胚状体转化为正常小苗。上述各种培养基上愈伤组织的形成频率均在10%以下, 说明实验所用的激素浓度很好地抑制了愈伤组织的生长。

2.2 外植体发育时期对胚状体诱导的影响

将不同发育时期的未受精胚珠(0、-1、-2天)接种于经上述激素配比实验筛选出的培养基(MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+0.25 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA)上, 以探明胚珠发育时期对胚状体诱导的影响。由表2可知, 在3个不同发育时期的外植体中, 雌花开放当天的未受精胚珠出胚效果最好, 平均每皿胚状体数8.0个, 出胚率为26.7%, 40.2%的胚状体转化为正常小苗, 愈伤组织形成频率较低(<5%)。雌花开放前1天的未受精胚珠的出胚率较低, 每皿胚状体数2.7个, 出胚率仅为8.9%, 显著低于开花当天的胚珠的出胚率, 仅有1个胚状体转化为正常小苗, 约45%的未受精胚珠产生愈伤组织。开花前2天的胚珠较为黏稠, 不易剥离且不能产生胚状体, 大部分胚珠(约60%)转变为愈伤组织, 且伴随着严重的褐化现象。由此可知, 发育时期过早的胚珠容易形成愈伤组织, 而不易于胚状体的

形成。

2.3 外植体预处理对胚状体诱导的影响

外植体的高温处理是激发胚珠内雌核发育的有效因素之一。以室温25℃为对照, 将接种于胚状体诱导培养基上的未受精胚珠在35℃黑暗条件下分别处理3、5和7天后, 转移至正常条件((25±1)℃、14小时光照/10小时黑暗、40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>光强)下进行培养, 出胚情况见表3。高温处理3天的未受精胚珠的出胚数和出胚率均低于25℃及未经高温的处理, 但差异不显著, 其出苗率也相差不大。高温处理5天的效果最为明显, 平均每皿胚状体9.7个, 出胚率达32.2%, 显著高于其它处理, 出苗率也最高(44.8%)。进一步增加高温处理时间后, 未受精胚珠的平均出胚数和出胚率均最低, 说明高温处理5天能有效促进胚珠的发育。实验中还发现, 适当的高温处理能缩短胚状体的诱导时间, 高温处理5天的出胚时间约为22天(从转移至正常温度25℃算起), 比未经高温处理的提前2-5天。

2.4 培养基中AgNO<sub>3</sub>浓度对胚状体诱导的影响

从表4可以看出, 没有添加AgNO<sub>3</sub>的培养基的出胚数

表2 外植体发育时期对南瓜未受精胚珠胚状体诱导的影响

Table 2 Embryoid induction influenced by the growth periods of the explants from pumpkin unfertilized ovules

Days to flowering (d)	Number of embryos per petri dish	Frequency of embryo induction (%)	Frequency of conversion to plants (%)	Remarks
0	8.0 a	26.7 a	40.2	Ovules less than 5% in number produced calli
-1	2.7 b	8.9 b	12.5	About 45% ovules produced calli
-2	0 c	0 c	0	About 60% ovules produced calli; browning occurred frequently

不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。Different small letters represent significant difference at  $P<0.05$  level.

表3 不同高温处理时间对南瓜未受精胚珠胚状体诱导的影响

Table 3 Embryoid induction influenced by the different high-temperature treatment of the explants from pumpkin unfertilized ovules

Days for pretreatment (d)	Temperature for pretreatment ( $^{\circ}\text{C}$ )	Number of embryos per petri dish	Frequency of embryo induction (%)	Frequency of plant regeneration (%)
0	—	7.7 b	25.6 b	43.5
3	25	7.0 b	23.3 b	33.3
	35	6.3 b	21.1 b	42.1
5	25	5.0 c	16.7 c	26.7
	35	9.7 a	32.2 a	44.8
7	25	3.7 d	12.1 d	27.2
	35	2.7 d	8.9 d	37.5

—: 不经过黑暗、高温处理。不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

—: without the treatment of darkness and high temperature. Different small letters represent significant difference at  $P<0.05$  level.

表4 不同浓度 $\text{AgNO}_3$ 对南瓜未受精胚珠胚状体诱导的影响

Table 4 Embryoid induction influenced by the different concentrations of  $\text{AgNO}_3$  treatment of the explants from pumpkin unfertilized ovules

Concentration of $\text{AgNO}_3$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Number of embryos per petri dish	Frequency of embryo induction (%)	Frequency of plant regeneration (%)
0	8.3 a	27.8 a	48.0
2.0	3.0 b	10.8 b	33.3
4.0	0.7 c	2.2 c	0
8.0	0 d	0 d	0
16.0	0 d	0 d	0
32.0	0 d	0 d	0

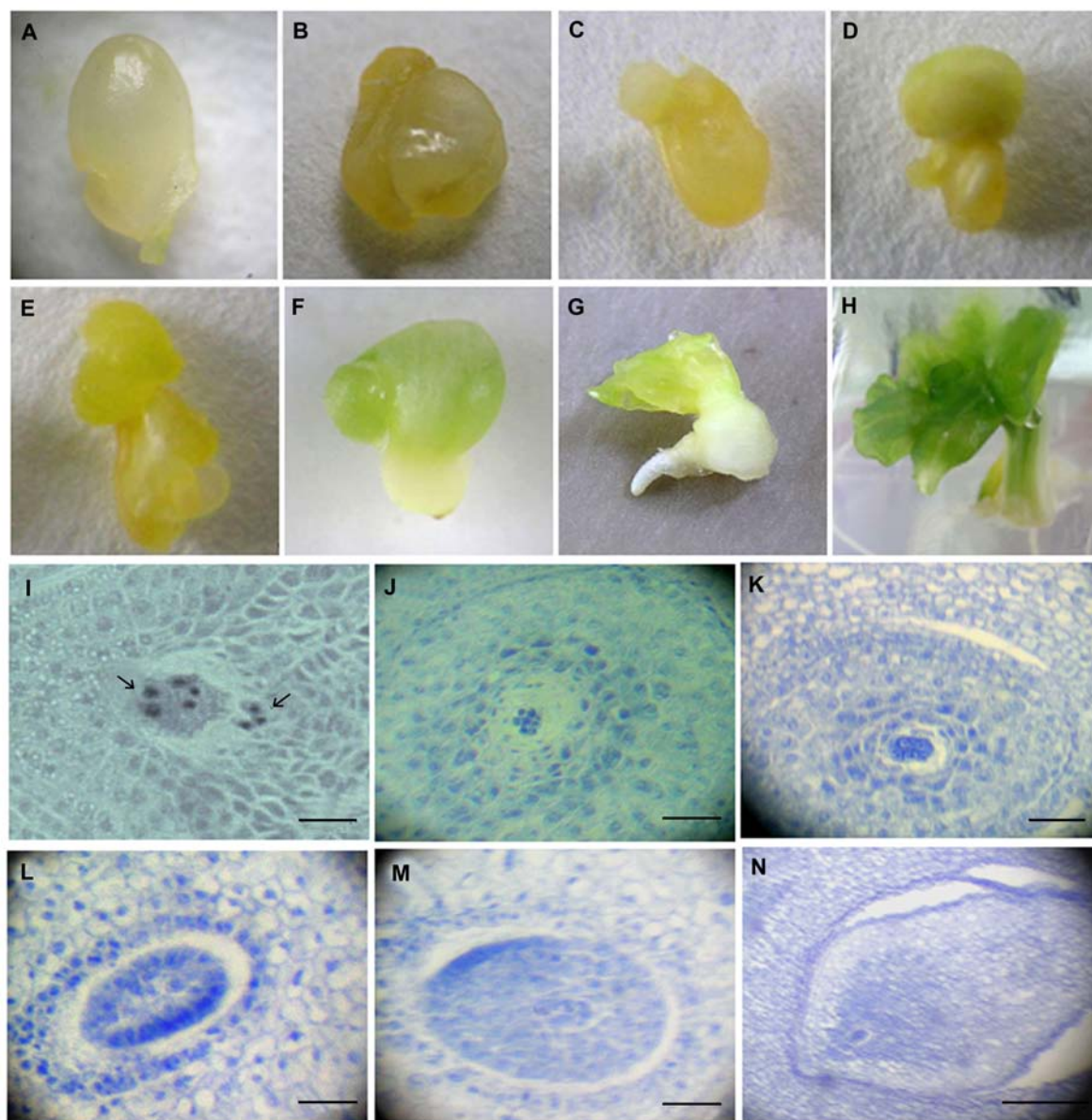
不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。Different small letters represent significant difference at  $P<0.05$  level.

和出胚率最高, 显著高于添加 $\text{AgNO}_3$ 的处理。随着培养基中 $\text{AgNO}_3$ 浓度的增加, 未受精胚珠的出胚数和出胚率急剧下降。当添加 $\text{AgNO}_3$ 浓度超过 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 出胚数和出胚率均为0。说明南瓜未受精胚珠对 $\text{AgNO}_3$ 极为敏感, 明显受到其抑制。

## 2.5 胚状体发育的形态和细胞学观察

从南瓜未授粉子房中剥离出的胚珠呈椭圆形、乳白

色、半透明, 大小约1 mm (图1A)。在诱导培养基( $\text{MS}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}2,4\text{-D}+0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}6\text{-BA}$ )上培养3天后, 胚珠明显膨大, 颜色变为黄白色 (图1B)。光照培养约10天后, 胚珠珠孔端逐渐膨大, 15天后在珠孔端形成明显的球状突起 (图1C)。球状结构不断增大, 约3天后, 形成浅绿色且具光泽的球形胚 (图1D)。大约在诱导培养的20天, 球形胚发育成典型的心形胚 (图1E), 并逐渐与母体胚珠组织分离。此



**图1** 南瓜未受精胚珠的胚状体诱导及植株再生

(A) 从未授粉子房剥离出的胚珠; (B) 在胚诱导培养基上培养3天的胚珠; (C) 胚珠珠孔端形成球状突起; (D) 球状突起发育成球形胚; (E) 球形胚转化为心形胚; (F) 胚状体分化出子叶; (G) 胚基部分化出胚根; (H) 由胚状体发育成完整的小苗; (I) 成熟胚囊纵切面, 右边箭头所指3个反足细胞, 左边箭头指示2个助细胞、2个极核(中间)和1个卵细胞(靠边); (J) 在珠孔端形成多细胞团; (K) 多细胞团发育成原胚; (L) 球形胚形成; (M) 球形胚充满整个胚囊腔; (N) 球形胚突破珠被。(I)–(N) Bar=50  $\mu$ m

**Figure 1** Embryoid induction from pumpkin unfertilized ovules and plant regeneration

(A) An ovule dissected from a unpollinated ovary; (B) An ovule cultured in embryoid induction medium for three days; (C) A protuberance occurred near to the micropyle; (D) The protuberance developed into a globular embryoid; (E) Formation of a heart-shape embryoid; (F) A cotyledon was differentiated from an embryoid; (G) Radicles occurred at the end of an embryoid; (H) A complete plant regenerated from an embryoid; (I) A longitudinal section of mature embryo sac that showed three antipodal cells (right arrow), two synergids (left arrow), two polar nuclei (middle), and one side ovum; (J) A multicellular mass occurred near to the micropyle; (K) A proembryo formed from the cell mass; (L) A globular embryoid occurred; (M) A cavity of embryo sac was filled with a globular embryoid; (N) A globular embryoid broke through the integuments. (I)–(N) Bar=50  $\mu$ m

时,将心形胚转移至没有添加任何激素的MS培养基上进行成苗培养,1周后转变为子叶胚(图1F)。随后,胚根逐渐生长(图1G),最终形成完整的植株(图1H)。由此可见,南瓜未受精胚珠经历了典型的胚胎发育过程。实验发现,从胚珠接种至形成完整植株(即一个培养周期)需要35–40天。尽管高温预处理5天能缩短外植体的出胚时间,但高温预处理和不经高温预处理的培养周期几乎相同。待再生植株根长至2–3 cm时,将其移栽至日光温室中,成活率在90%以上。

为了明确再生植株的起源,我们对胚状体发生过程进行了切片观察。在雌花开放当天,南瓜胚囊已经发育成熟,成为典型的8核胚囊,即合点端的3个反足细胞、珠孔端的2个助细胞、2个中央极核和旁边1个体积稍大的卵细胞(图1I)。在胚状体诱导培养基上培养2–3天后,珠孔端便形成了多细胞团(图1J),而合点端未发现细胞团,说明反足细胞已经退化,不具有胚胎发生能力。6天后原胚(多细胞球状体)形成(图1K)。从原胚所在的位置来看,它与合点端较远,而与珠孔端较近,极有可能由珠孔端的卵细胞或助细胞发育而来。原胚体积不断增大,在培养的第9天形成体积更大的球状体(球形胚),并与母体组织胎座分离(图1L)。12天后,球形胚几乎充满整个胚囊腔(图1M),15天后球形胚突破珠被(图1N),在珠孔端形成肉眼可见的球状突起。基于细胞学观察结果,本实验中获得的胚状体及其再生植株,很可能是由南瓜未受精胚珠中胚囊成员细胞(卵细胞或助细胞)发育而来,再生植株极有可能是胚囊植株。

## 2.6 讨论

南瓜未授粉子房和未受精胚珠均含有单倍体细胞,理论上,在适宜的培养条件下均可发育成单倍体植株。然而在前期研究中我们发现,尽管未授粉子房培养可诱导胚状体发生,但胚状体难以转变为正常植株(孙守如等,2009)。经观察发现,这些胚珠大多存在不同程度的畸形,这可能是子房胚难以吸收外源物质而发育不完全所致。而在本研究中,未受精胚珠的出胚率(最高为32.2%)不仅高于子房培养的出胚率(最高为20.6%),而且大部分胚状体可转变为正常植株。这可能是未受精胚珠没有子房壁的阻碍,更易吸收培养基中外源物质的缘故。

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(冯大领等,2007)。本研究中,不含2,4-D的培养基上出胚率几乎为0,证实了2,4-D的重要性。尽管在本实验中,2,4-D的作用不可替代,但仅添加2,4-D的培养基的出胚率并不高,2,4-D与NAA和6-BA组合可显著提高出胚率,最多可提高10倍。这与谢冰等(2006)在西葫芦未受精胚珠培养实验中的报道基本一致。而陈学军等(2000)则发现2,4-D与NAA和6-BA组合容易诱导西葫芦未受精胚珠形成愈伤组织。在不同植物种类中,2,4-D的使用浓度差异较大。谢冰等(2006)发现适宜于西葫芦未受精胚状体诱导的2,4-D浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。王文和等(2011a)发现 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D对草莓(*Fragaria ananassa*)未受精胚珠培养的效果最好。本实验中,在添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D的培养基上南瓜未受精胚珠的出胚率最高,且较好地抑制了愈伤组织的生长。这可能是不同植物种类,其外植体的内源激素不同,对外源激素的要求也不一致的缘故。在蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis*)未受精胚珠的离体培养中,适宜的NAA和6-BA组合即可高频率地诱导胚状体的形成(伍成厚等,2006)。

影响植物未受精胚珠孤雌生殖的因素众多,除了激素种类及其配比外,外植体发育时间和预处理方式也是重要的影响因素。多数研究发现,成熟期胚囊或接近成熟的胚囊的细胞容易启动分裂,进而导致孤雌生殖(张伶俐等,2009)。Gémes-Juhász等(2002)对6种不同基因型的黄瓜进行了取材时期研究,发现雌花开放前6小时的胚囊刚好成熟,胚的诱导率最高。谢冰等(2006)的研究结果表明,成熟期或接近成熟的西葫芦胚囊对人工诱导条件较为敏感,而成熟后的胚囊细胞则较难启动分裂。本实验中,雌花开放当天的胚囊已经发育成典型的7细胞8核胚囊,在培养的第3天便发现胚囊腔内有细胞团形成,且出胚率最高,而其它时期的胚珠出胚率极低,说明成熟的胚囊更适宜于胚状体的诱导。高温或低温预处理外植体可提高其孤雌生殖频率,这已在一些植物的离体雌核培养中得到证实。例如,阎华等(1988)将向日葵(*Helianthus annuus*)花序置于 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下培养2天,显著提高了孤雌生殖的频率并抑制了愈伤组织的形成。但在葫芦科植物中,35–40 $^{\circ}\text{C}$ 高温预处理比低温处理更为有效。Gémes-Juhász等(2002)发现28–35 $^{\circ}\text{C}$ 高温预处理黄瓜,其未授粉子房的出胚率和植株再生频率几乎与预



处理温度呈直线正相关。徐静(2007)发现35–40°C高温预处理3–5天对西葫芦的大多数基因型材料有效, 35°C处理5天的出胚率最高。本研究中, 35°C高温预处理5天显著提高了南瓜未受精胚珠的出胚率, 且缩短了胚状体的诱导时间。高温预处理可能从生理生化水平上改变了细胞的分裂方式和发育途径, 有利于单倍体植株的形成, 但具体机理目前尚不清楚。植物组织培养中产生的乙烯可能抑制离体形态发生, 在培养基中添加 $\text{AgNO}_3$ 可降低乙烯的活性, 提高胚胎的生长发育能力(Fei et al., 2000)。韩丽华等(2005)发现5–80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$ 有利于提高甜瓜胚囊的出胚率。刁卫平等(2008)发现20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{AgNO}_3$ 对黄瓜未授粉子房诱导胚状体的效果最好。然而, 我们在培养基中添加 $\text{AgNO}_3$ 后, 南瓜未受精胚珠的出胚率急剧下降,  $\text{AgNO}_3$ 浓度高于4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时胚状体不能形成, 说明其严重抑制了胚状体的形成, 这可能是离体条件下南瓜未受精胚珠对 $\text{AgNO}_3$ 毒害作用极为敏感的缘故。

在离体雌核培养中, 胚状体及其再生植株的来源值得探讨, 因为只有起源于胚囊成员细胞的植株才具育种价值。理论上, 胚囊成员细胞都有可能发育成胚状体或再生植株。然而大量细胞学研究表明, 离体雌核发育中的胚状体大多由卵细胞孤雌生殖发育而来, 少数则来源于助细胞或二者兼而有之, 离体雌核培养中的反足细胞和助细胞则容易退化(阎华等, 1988; 潘莉和杨铁钊, 2000; 杨江义和李旭峰, 2002; 王文和等, 2011b)。此外, 伍成厚等(2006)在蝴蝶兰未受精胚珠离体培养中发现, 单倍体植株来源于大孢子母细胞。无论再生植株来源于胚囊成员细胞还是大孢子母细胞, 它们属于单倍体或双单倍体, 均具育种价值。本实验形态学观察表明, 离体条件下南瓜未受精胚珠通过胚状体途径形成小苗, 经历了与合子胚形态发生相似的阶段。细胞学观察表明, 胚状体形成于胚囊珠孔端的细胞团, 而这些细胞团很有可能是珠孔端细胞(卵细胞或助细胞)分裂的结果。尽管我们缩短了取样间隔时间(最少为1天)并增加了组织切片制作数量, 但仍未获得卵细胞或助细胞启动分裂的证据, 卵细胞或助细胞很可能在极短的时间内就开始分裂。本实验也一直未发现合点端形成多细胞团的现象, 合点端的反足细胞和珠心细胞大多在第1次取样观察时就已经退化、消失。因此推测, 胚状体起源于卵细胞或助细胞, 再生植株即为胚囊植株。在下一步的研究工

作中, 我们将通过根尖染色体计数和细胞流式仪检测方法, 并结合田间自交后代性状观察, 深入分析再生植株的倍性。

## 参考文献

- 陈学军, 刑国民, 陈竹君 (2000). 西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生. 浙江农业学报 12, 165–167.
- 刁卫平, 陈劲枫, 雷春, 宋慧, 张晓青 (2008). 影响黄瓜未授粉子房培养胚发生因素的研究. 南京农业大学学报 31, 137–140.
- 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.
- 韩丽华, 王建设, 陈贵林 (2005).  $\text{AgNO}_3$ 对甜瓜离体胚囊发育的影响. 河北农业大学学报 28(2), 48–50.
- 雷春, 陈劲枫 (2006). 葫芦科蔬菜作物单倍体材料创制的研究进展. 中国蔬菜 (1), 33–36.
- 潘莉, 杨铁钊 (2000). 烟草未授粉子房胚状体诱导的研究. 西北植物学报 20, 59–63.
- 孙守如, 翟庆慧, 胡建斌, 陈解放, 章鹏 (2009). 几种生理因素对子房未授粉南瓜胚形成的影响. 植物生理学通讯 45, 977–980.
- 王文和, 吴禄平, 赵玉萍 (2011a). 草莓未受精子房的离体培养. 中国农学通报 27(13), 177–182.
- 王文和, 吴禄平, 赵玉萍, 王超 (2011b). 草莓未受精子房离体雌核发育的研究. 园艺学报 38, 1455–1461.
- 伍成厚, 潘一山, 罗开梅, 叶秀彝, 梁承邨 (2006). 蝴蝶兰未受精胚珠离体培养的研究. 园艺学报 33, 891–894.
- 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. 博士论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学. pp. 23–42.
- 阎华, 周嫦, 杨弘远 (1988). 向日葵未受精胚珠培养中各种影响因素的实验研究. 武汉植物学研究 6, 319–327.
- 杨江义, 李旭峰 (2002). 植物雌性单倍体的离体诱导. 植物学通报 19, 552–559, 574.
- 张伶俐, 崔崇士, 屈淑平 (2009). 植物离体雌核发育的研究进展. 东北农业大学学报 40(11), 133–136.
- Basu SK, Datta M, Sharma M, Kumar A (2011). Haploid production technology in wheat and some selected higher plants. Aust J Crop Sci 5, 1087–1093.
- Chen JF, Cui L, Malik AA, Mbira KG (2011). In vitro haploid

and dihaploid production via unfertilized ovule culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* **104**, 311–319.

**Fei SZ, Read PE, Riordan TP** (2000). Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalograss by silver nitrate. *Plant Cell Tiss Org Cult* **60**, 197–203.

**Gémes-Juhász A, Balogh P, Ferenczy A, Kristof Z** (2002).

Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Rep* **21**, 105–111.

**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.

## ***In Vitro* Culture of Pumpkin Unfertilized Ovules and Plant Regeneration**

Shouru Sun, Peng Zhang, Jianbin Hu\*, Liping Sun, Man Zhang, Zhiqiang Sun

*College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China*

**Abstract** We used unfertilized ovules of the pumpkin cultivar ‘Experiment 1’ as explants to examine the effect of combinations and concentrations of growth regulators, different developmental periods, high-temperature pretreatment, and AgNO<sub>3</sub> concentrations on embryoid induction. The combination of 2,4-D, NAA, and 6-BA favoured embryoid induction; the medium with the best effect was Murishige and Skoog (MS)+1.0 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+0.25 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA, for 31.1% embryoid induction. The flowering ovules for the day showed the highest frequency of embryoid induction (26.7%) and the lowest frequency of callus formation (<5%). The explants treated with darkness and high temperature (35°C) for 5 days showed the best embryoid induction, 32.2%. However, the addition of AgNO<sub>3</sub> remarkably inhibited embryoid induction. Transfer of embryoids to plant-regeneration medium led to the highest regeneration frequency, 64.3%. Plant regeneration expressed a typical pathway as for embryogenesis. Cytologic observations revealed that embryoids probably derived from cells close to the micropyle (i.e., ovums or synergids).

**Key words** embryoid, *in vitro* culture, plant regeneration, pumpkin, unfertilized ovules

**Sun SR, Zhang P, Hu JB, Sun LP, Zhang M, Sun ZQ** (2013). *In Vitro* culture of pumpkin unfertilized ovules and plant regeneration. *Chin Bull Bot* **48**, 79–86.

---

\* Author for correspondence. E-mail: jbh220@yahoo.com.cn