

张玉园,鲁晓晓,周俊国,等.南瓜子叶节离体再生体系构建[J].江苏农业科学,2015,43(12):26-29.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.007

# 南瓜子叶节离体再生体系构建

张玉园,鲁晓晓,周俊国,李新峥,朱自果

(河南科技学院园艺园林学院,河南新乡 453003)

**摘要:**以印度南瓜种(*Cucubita maxima* Duch.)“北观”自交系为试材,研究“北观”南瓜子叶节高效快速离体再生体系的构建。结果表明,剥壳种子用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  溶液消毒 9 min,无菌催芽后选取子叶微展、绿色的苗态制作子叶节,接种到添加 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上诱导不定芽,诱导率达 64.5%,子叶节平均再生不定芽 3.06 个。生长健壮的不定芽转接到 MS+NAA 1.0 mg/L+活性炭 2.0 g/L 培养基上生根培养,主根达 2~3 条时驯化移栽,发育成完整植株。

**关键词:**南瓜;子叶节;再生体系;组织培养

**中图分类号:** S642.104<sup>+</sup>.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0026-03

南瓜为葫芦科(*Cucurbitaceae*)南瓜属(*Cucurbita*)一年生草本植物,是人类最早栽培的蔬菜作物之一,在世界各地广泛栽培<sup>[1]</sup>。南瓜属主要有 5 个栽培种,分别是美洲南瓜(*C. pepo* L.,别称西葫芦)、印度南瓜(*C. maxima* Duch.,别称笋瓜)、中国南瓜(*C. moschata* Duch.,别称倭瓜)、黑籽南瓜(*C. ficifolia*)和灰籽南瓜(*C. mixta*)<sup>[2-3]</sup>。南瓜种质资源丰富,在生产上除作为蔬菜食用外,因其根系发达、生长势强健,抗病抗逆性强,也作为瓜类砧木使用<sup>[4]</sup>。不同资源间抗病抗逆性差异较大,筛选特异抗逆性强的砧木资源较为困难。我国土地复种指数很高,生态环境日益恶化,现有的瓜类砧木难以适应不同条件下嫁接生产的需求<sup>[5-8]</sup>。为解决这一问题,通过基因工程进行种质创新和品种改良成为提高南瓜抗病抗逆性的一个重要途径。建立高效稳定的南瓜再生体系是成功开展基因工程的前提,目前国内外相继开展了南瓜属植物不同资源离体再生方面的研究,多以南瓜子叶节为外植体,通过器官直接分化途径诱导产生丛生芽,从而建立再生体系<sup>[9-13]</sup>。但存在着不同资源再生难易差异大、再生频率低的问题<sup>[14-16]</sup>。本试验以印度南瓜“北观”自交系为材料,研究其再生过程中无菌催芽、不定芽诱导的影响因素,旨在建立其高效再生体系,为进一步开展遗传转化及育种等相关工作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

印度南瓜“北观”自交系,为多年单株自交纯化的自交系,生长势强,抗病抗逆性强。种子由河南科技学院园艺园林学院南瓜科研团队提供。试验于 2014 年在河南科技学院园艺植物组织培养实验室进行。

### 1.2 试验方法

收稿日期:2014-12-24

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2013GB2D000301)。

作者简介:张玉园(1988—),男,河南淮滨人,硕士研究生,研究方向为蔬菜学。E-mail:kuaijie316@163.com。

通信作者:周俊国(1967—),男,河南内乡人,教授,主要从事园艺植物育种和蔬菜栽培生理研究。E-mail:Junguo1020@163.com。

1.2.1 0.1%  $\text{HgCl}_2$  不同消毒时间处理对种子萌发及幼苗生长影响 挑选籽粒饱满的种子 180 粒,分成 3 份,每份 60 粒,剥去种壳,在超净工作台上用 25℃ 的无菌水浸种 5 h 后用 75% 乙醇消毒 30 s,再用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  分别消毒 5、9、13 min,用无菌水冲洗 3~4 次,在置有滤纸桥含有少量无菌水的 150 mL 广口瓶中黑暗培养。待胚根 0.5 cm 左右时,将发芽种子转接到含 30 mL MS 培养基的 150 mL 三角瓶中进行光照培养,光周期 16 h/d,光照强度 2 000~3 000 lx,整个培养期间温度为(26±1)℃。培养期间调查病菌污染的种子数、每天子叶展开数,统计种子污染率和子叶展开速度。培养 20 d 后,将幼苗从培养瓶中取出,测量幼苗下胚轴长度,称量幼苗鲜质量。

1.2.2 种子不同预处理方式对无菌苗获得的影响 挑选饱满的种子,剥去种壳,对种子采用 3 种不同的预处理方式,0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒 9 min,接种在 MS 培养基(pH 值为 5.8)上。待无菌苗稳定生长 20 d 时,分别调查采用不同预处理所获得的无菌苗个数,统计无菌幼苗获得率(无菌苗获得率=无菌苗个数/接种种子数×100%)、无菌苗获得速度(无菌苗获得速度=无菌苗个数/培养天数)、获得 50% 无菌苗所需天数。

种子的 3 种预处理方法分别为:

直接接种法:将消毒处理后的种子尖端朝下,垂直插入培养基中,插入深度约为种子长度的 1/3~1/2。

无菌催芽后接种:将消毒后的种子先在置有滤纸桥含有少量无菌水的 150 mL 广口瓶中黑暗、恒温(26±1)℃催芽,待胚根 0.5 cm 后,将胚根尖端朝下,垂直插入培养基中。

温汤浸种后接种:先将种子在 55~60℃ 无菌水中浸种 15 min,期间不断搅拌。种子消毒后,将种子尖端朝下,垂直插入培养基中,插入深度约为种子长度的 1/3~1/2。

1.2.3 外植体不同苗态和不同浓度 6-BA 对不定芽诱导影响的处理 为筛选出适合的外植体苗态,采用无菌催芽后接种获得的无菌苗,切取不同苗态的无菌苗子叶节为外植体,接种于添加 1.0 mg/L 6-BA 的不定芽诱导 MS 培养基上进行培养。子叶节的制作方法是先切取带 2 mm 下胚轴的子叶,沿轴线纵切一分为二,切去子叶上部的 1/2,用刀片刮去顶芽,切除叶缘,余下部分称为子叶节。外植体的不同苗态分为

4 类:A(子叶抱合,颜色浅绿)、B(子叶微展,颜色绿色)、C(子叶水平展开,稍见心叶)、D(子叶展平,真叶长出)<sup>[17]</sup>。

为研究不同浓度 6-BA 对不定芽诱导的影响,取外植体苗态呈阶段 B 时的子叶节为外植体接种。将子叶节按生物学体位平放到添加不同浓度 6-BA (0、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L)处理的 MS 培养基中。

不定芽诱导试验中每瓶接种 4 个子叶节,每个处理共接种 10 瓶。试验设 3 次重复,培养条件为(26±1)℃,光照 16 h/d,光照强度 2 000~3 000 lx。接种 20 d 后调查不同处理产生不定芽的子叶节数,观察不定芽发生状况,调查每个子叶节上再生的不定芽数,统计不定芽诱导率。

1.2.4 不定芽的生根培养 不定芽的生根培养参照任桂红等的方法<sup>[18]</sup>并略加修改。当不定芽高 2 cm 左右时,将其从外植体基部切下转接到 MS+NAA 1.0 mg/L+活性炭 2.0 g/L 培养基上,诱导不定芽生根从而形成完整植株。

1.2.5 再生植株的驯化移栽 待再生植株具有 2~3 条根时,进行驯化移栽。先将膜绳解开 2 d,再将瓶膜打开炼苗 5 d 左右取出,洗净琼脂,移栽到盛有灭菌土的营养钵中,浇透水,用 1 一次性杯盖住保湿,试管苗恢复生长后逐渐降低湿度,待新叶长出后,去掉杯子,放到温室进行管理。

2 结果与分析

2.1 0.1% HgCl<sub>2</sub> 不同处理时间对种子萌发、幼苗生长的影响

种子无菌萌发是获得无菌外植体前提。种子消毒所采用

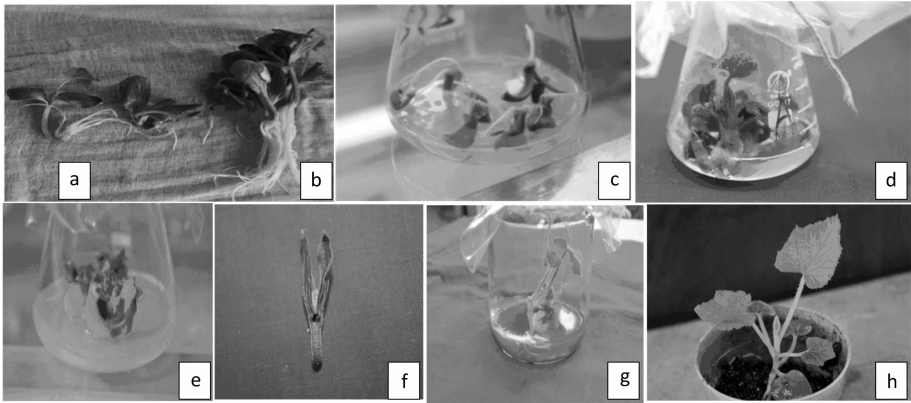
的消毒剂 HgCl<sub>2</sub> 不仅对病菌具有杀灭效果,对种子的生长也有一定影响。消毒时间短,对病菌杀灭效果差;消毒时间长,对病菌杀灭效果好,但种子内残留较多消毒剂,对以后种子萌发和幼苗生长会有很大影响。

由表 1 可见,0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒时间长短对种子的萌发、幼苗生长有密切关系。在消毒 5~13 min 时间内不同处理间的种子污染率和种子萌发中子叶展开速度的差异达显著水平,随着消毒时间的延长污染率逐渐降低,但 HgCl<sub>2</sub> 对幼苗的毒害作用越来越明显,子叶展开速度变慢。在幼苗生长方面,在消毒 5~13 min 时间内,随着处理时间的延长,HgCl<sub>2</sub> 对幼苗的生长抑制效果愈明显,下胚轴伸长短,鲜质量降低,5 min 和 9 min 的处理间无显著差异,但与 13 min 间差异显著,13 min 的处理下胚轴仅有 1.6 cm 长,单株幼苗鲜质量仅有 1.7 g,同时畸形苗出现较多,下胚轴不伸长、弯曲或成扁平状,子叶不平展(图 1-a)。在 3 个处理中,种子用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 9 min,种子污染率较低,子叶展开速度较快,幼苗生长正常,是较适宜的消毒处理时间。

表 1 0.1% HgCl<sub>2</sub> 不同消毒时间对种子萌发、幼苗生长的影响

处理时间(min)	种子污染率(%)	子叶展开速度(d)	下胚轴长度(cm)	幼苗鲜质量(g)	幼苗生长状况
5	26.9a	2.7a	2.4a	2.2a	正常
9	4.1b	2.4b	2.2a	2.0a	正常
13	2.8c	1.3c	1.6b	1.7b	畸形

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。



a—畸形苗;b—正常苗;c—培养基中未添加6-BA处理子叶节中长出 不定根;d—正常丛生芽;  
e—丛生芽短簇;f—适宜的外植体苗态;g—不定芽诱导出不定根;h—驯化移栽苗

图1 “北观”南瓜外植体再生体系

2.2 种子预处理对获得无菌苗的影响

种子萌发过程中,在一定的温度下吸收一定的水分,经过一系列的生理过程而发芽,对种子采用不同的预处理可提高种子的发芽率。由表 2 可见,对种子采用 3 种预处理方法,无菌苗获得率、无菌苗获得速度、获得 50% 无菌苗所需天数不同,差异显著,其中无菌催芽后接种无菌苗获得率最高,达到 96.7%,无菌苗获得速度最快,获得 50% 无菌苗所需天数最短,是高效快速获得无菌苗的最佳方法。

2.3 6-BA 不同浓度处理对不定芽诱导的影响

由表 3 可见,在诱导子叶节产生不定芽的 MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA 会产生不同的效果,其子叶节不定芽

表 2 种子不同预处理对获得无菌苗的影响

种子预处理方法	无菌苗获得率(%)	无菌苗获得速度(个/d)	获得 50% 无菌苗所需时间(d)
直接接种	72.4c	5.2c	11.3b
无菌催芽后接种	96.7a	11.4a	7.3c
温汤浸种后接种	90.8b	8.1b	13.0a

注:同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

诱导率和子叶节上再生的不定芽数存在显著差异。未添加 6-BA 的处理不能诱导出不定芽,只会在子叶节的叶柄处产生不定根(如图 1-c)。添加不同浓度 6-BA 的处理均能诱导出不定芽,但随着 6-BA 浓度梯度的增加,不定芽诱导率

逐渐降低,以添加 1.0 mg/L 6-BA 处理的不定芽诱导率最高,达到 64.5%,其次是 2.0 mg/L 6-BA 处理。每个子叶节上再生的不定芽数在不同处理间也存在显著差异,以添加 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 6-BA 处理的不定芽数最多,在 3 个以上,诱导的不定芽正常伸长,生长健壮(图 1-d),而高浓度 6-BA 处理诱导出的不定芽数短簇丛生,不易伸长(图 1-e)。因此,在 MS 培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA 是诱导“北观”南瓜子叶节形成不定芽的适宜培养基。

表 3 不同 6-BA 浓度对不定芽诱导的影响			
6-BA 浓度 (mg/L)	不定芽诱导 率(%)	不定芽数 (个)	生长状况
0	0e	0d	无不定芽再生,子叶基部产生不定根
1.0	64.5a	3.06a	不定芽正常伸长,生长健壮
2.0	58.9b	3.27a	不定芽正常伸长,生长健壮
3.0	43.9c	2.20b	不定芽短簇丛生
4.0	35.7d	1.90c	不定芽短簇密集丛生

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

2.4 不同苗态的子叶节对不定芽诱导的影响

无菌苗的不同苗态展示了幼苗的不同发育阶段,子叶内细胞的分化和激素累积达到不同水平。将子叶节接种于 MS + 6-BA 1.0 mg/L 的芽诱导培养基上后,2~3 d 内子叶节块迅速膨大,随后呈卷曲状,培养 7 d 左右,在切口边缘处长出愈伤组织,并在子叶基部靠近下胚轴处的愈伤组织上产生不定芽。由表 4 可见,4 类不同苗态子叶节的不定芽诱导率有显著差异,B 类苗态(图 1-f)的子叶节不定芽诱导率最高,达到 71.0%,而其他 3 类苗态的子叶节诱导率较低。处于 B 类苗态的子叶微展、绿色,是选取制作子叶节的最佳时机。

表 4 不同苗态的子叶节对不定芽诱导的影响		
苗态代号	无菌苗状态	分化率 (%)
A	子叶抱合,颜色浅绿	31.5c
B	子叶微展,颜色绿色	71.0a
C	子叶水平展开,稍见心叶	36.6b
D	子叶展平,真叶长出	21.9d

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

2.5 不定芽的生根培养

将生长健壮、容易区分的不定芽从基部切下,转接到 MS + NAA 1.0 mg/L + 活性炭 2 g/L 的生根培养基上,培养 10 d 后出现白色的根系,生根率达到 97%,根毛较多,根系生长健壮(图 1-g)。

2.6 再生植株的驯化移栽

待再生植株具备 2~3 条根后,进行驯化移栽。在营养钵上用一次性透明塑料杯罩住幼苗保湿,待幼苗恢复生长后逐渐通风降低湿度。幼苗新叶长出后,去掉塑料杯,放到温室进行正常管理(图 1-h)。

3 结论与讨论

以“北观”南瓜子叶节为外植体,构建了“北观”南瓜再生体系。本试验中,将“北观”南瓜种子去壳,用 75% 乙醇消毒 30 s,0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 9 min,无菌水冲洗 3~4 次,无菌催芽,

待胚根长至 0.5 cm 左右、子叶呈绿色、微展时切取带下胚轴为 2 mm 长的子叶制作成子叶节。将子叶节接种到添加 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上诱导形成不定芽,待芽长至 2 cm 左右时转接到 MS + NAA 1.0 mg/L + 活性炭 2.0 g/L 培养基上诱导不定芽生根,最后对获得的完整植株进行驯化移栽。

本试验中添加不同浓度 6-BA 的培养基均可诱导子叶节形成不定芽,添加 1.0 mg/L 6-BA 是诱导不定芽的适宜浓度,浓度高于 1.0 mg/L 时,不定芽诱导率下降,芽丛生不易伸长。这与白婧<sup>[17]</sup>对“金辉一号”南瓜再生体系的研究、耿新丽等<sup>[19]</sup>对金童南瓜的离体繁殖的研究结果一致。尽管单一使用 6-BA 便可较好地诱导外植体获得不定芽<sup>[11,15]</sup>,但在试验中出现玻璃化苗、密生的丛生芽之间互相抑制不易伸长现象,切成单芽后转接培养容易死亡,这可能与遗传因素、芽体内源激素水平不平衡有关,进一步探究结合其他激素或添加其他试剂会获得更好的效果。

在进行南瓜离体诱导培养时,多数研究以苗龄为依据来选取外植体,认为最佳苗龄为 2~8 d<sup>[10,20-21]</sup>。一般情况下南瓜种子因在母体的发育不一致导致发芽势不一致,同样苗龄的外植体生理状态也不尽相同,所以本试验依据苗态状况,选取子叶微展、呈绿色时制作子叶节,取得了较好的效果。

本试验中建立的“北观”南瓜子叶节再生体系采用器官直接发生途径,不经脱分化和再分化的过程,再生频率较高,缩短了再生周期,在短期内即可获得大量的再生植株,可作为南瓜进一步遗传转化的再生体系。

参考文献:

[1] 林德佩. 南瓜植物的起源和分类[J]. 中国西瓜甜瓜,2000(1): 36-38.

[2] 李丙东,刘宜生,王长林. 南瓜属蔬菜生物学基础研究概况及育种进展[J]. 中国蔬菜,1996(6):50-52.

[3] 郭文忠,李 锋,秦 昱,等. 南瓜的价值及抗逆栽培生理研究进展[J]. 长江蔬菜,2002(9):30-32.

[4] 王 鸣. 南瓜属——多样性(diversity)之最[J]. 中国西瓜甜瓜,2002(3):47-50.

[5] 余海英,李廷轩,周健民. 设施栽培中逆境对园艺作物生长发育及其病害的影响[J]. 土壤通报,2006,37(5):1027-1032.

[6] 项玉英,杨祥田,张光华. 设施栽培土壤次生盐渍化的调查及防治对策[J]. 浙江农业科学,2006(1):17-19.

[7] 王广印,韩世栋,赵一鹏,等. NaCl 胁迫及 Ca<sup>2+</sup> 和 GA<sub>3</sub> 对南瓜属 3 种蔬菜种子发芽的影响[J]. 植物资源与环境学报,2005,14(1): 26-30.

[8] 周俊国,朱月林,刘正鲁,等. NaCl 胁迫对中国杂交南瓜和黑籽南瓜幼苗生长的影响[J]. 农业工程学报,2007,23(7):202-205.

[9] 徐恒骥. 南瓜属作物分子育种研究进展[J]. 中国种业,2006(10):17-19.

[10] 邹 建,宋 明,汤青林,等. 观赏南瓜子叶离体培养的初步研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2003,25(4):297-299.

[11] Lee Y K, Chung W L, Ezura H. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbitra maxima* Duch.) [J]. Plant Science,2003,164:413-418.

[12] 李贞霞,李新峥,董卫华. 南瓜组织培养体系建立研究[J]. 北方园艺,2005(3):75-76.

李静婷,王健胜,杨凤岭. 小麦 MITE 转座子对 *sHSP* 基因的表达调控研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):29-32.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.008

# 小麦 MITE 转座子对 *sHSP* 基因的表达调控研究

李静婷<sup>1</sup>, 王健胜<sup>2</sup>, 杨凤岭<sup>2</sup>

(1. 平顶山学院化学与环境工程学院, 河南平顶山 467000; 2. 平顶山学院低山丘陵区生态修建重点实验室, 河南平顶山 467000)

**摘要:** MITE(miniature inverted-repeat transposable elements)是一类特殊的 DNA 介导的转座子,经常插入基因的编码区、内含子、启动子、非翻译区(UTR)而与基因紧密相关。探讨插入小麦 16.9 ku *sHSP* 基因(*sHSP16.9*)3'-UTR 中 MITE 对基因表达调控的影响,实时定量结果显示:在高温、低温处理时,具有 MITE 插入的基因型中 *sHSP16.9* 基因转录水平较无 MITE 插入的基因型显著提高;构建 2 种不同的植物表达载体 pCambia Super-1300 + *sHSP16.9*、pCambia Super-1300 + *sHSP16.9* + MITE 转化拟南芥,半定量结果显示,*sHSP16.9* + MITE 超表达的转基因拟南芥中 *sHSP16.9* 基因表达量较 *sHSP16.9* 超表达的转基因拟南芥中显著提高,推测 *sHSP16.9* 基因 3'-UTR 中 MITE 插入增强该基因的转录水平。

**关键词:** MITE 转座子; *sHSP* 基因; 基因表达; 基因调控; 小麦; 植物二元表达载体; 构建

**中图分类号:** Q786; S512.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0029-04

热胁迫时,生物体内大部分蛋白质合成被抑制,分子量为 8~110 ku 的热激蛋白(heat shock protein, HSP)迅速被诱导合成。在高等植物中最丰富的 HSP 为小分子热激蛋白(small HSP, sHSP)。根据细胞内定位、相似性,植物 sHSP 分为六类,前三类位于细胞质或细胞核内,其他三类位于质体、内质网、线粒体内<sup>[1-3]</sup>。小麦小分子热激蛋白 HSP16.9(TaHSP16.9)属于第一类小分子热激蛋白,也是第一个被报道具有高分辨率结构的真核小分子热激蛋白<sup>[4]</sup>。研究发现,高等植物中的 sHSP 可在高温和其他胁迫环境诱导合成,在正常生长环境条件下表达量很低,表明 sHSP 可能在植物耐胁迫性方面发挥重要作用<sup>[2-3]</sup>。转座因子(transposon)是 DNA 重复序列,可通过切割和重新整合等一系列过程从基因组的一个位置转移到另一个位置,并经常在转移过程中复制。根据转移的方式,转座因子可分为两类:反转座子、DNA 转座子。MITE(miniature inverted-repeat transposable elements)是一类特殊的 DNA

介导的转座子,其具有 DNA 转座子典型的结构,即靶位点重复(TSD)和末端反向重复(TIR)<sup>[5-6]</sup>。但是,它们长度短(经常少于 500 bp)与多拷贝(经常成百上千)的特点使之区别于传统的 DNA 转座子,DNA 转座子具有几千个碱基大小,但是仅以几个拷贝存在。长度短、多拷贝的特点使 MITE 经常插入到基因的编码区、内含子、启动子、非翻译区(UTR),预测 MITE 在基因表达调控方面发挥一定的作用,但是目前人们对于 MITE 插入与基因表达两者之间本质关系了解非常少<sup>[7-11]</sup>。研究发现,水稻 *ubiquitin2*(*rubq2*)基因存在 2 种类型启动子,在 IR24 系中 *ubiquitin2* 基因启动子区有 2 个 MITE(*MDMI* 与 *Kiddo*)插入,T309 系中仅有 1 个 MITE(*MDMI*)插入<sup>[8]</sup>。*Kiddo* 插入增加了 *rubq2* 基因转录水平,但是 *Kiddo* 的增强效应被甲基化所中和<sup>[12]</sup>。花生 *ahFAD2B* 基因编码区有 1 个 205 bp MITE 插入,导致 *ahFAD2B* 基因转录水平降低,并产生高油含量的表型<sup>[9]</sup>。高粱耐铝基因 *sbMATE* 上游有 MITE 插入,且不同亲本间 MITE 插入区域具有多态性,MITE 插入片段的大小与耐铝性存在明显正相关,推测 MITE 作为顺式作用元件显著增强了 *sbMATE* 基因在根尖的表达<sup>[13]</sup>。对油菜进行单倍体分析发现,*BnFLC. A10* 基因上游存在 MITE 插入/缺失的多态性差异,大部分冬性品种具有 MITE 插入,大部分春性品种无 MITE 插入。对 2 种类型品种进行关联分析发现,MITE 插入与品种的春化需求性存在显著相关性。

收稿日期:2015-01-05

基金项目:河南省教育厅自然科学基金基础研究计划(编号:12B180020);平顶山学院高层次人才科研启动基金(编号:2011015G)。

作者简介:李静婷(1983—),女,内蒙古包头人,博士,讲师,主要从事小麦遗传育种学研究。E-mail:jingting\_lee@163.com。

[13] 余义和,李桂荣,王新娟,等. 南瓜离体培养及植株再生的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(20):5180-5181.

[14] 赵建萍. '艾西丝'南瓜子叶的离体培养[J]. 园艺学报,1999,26(3):58-59.

[15] Ananthakrishnan G, Xia X, Elman C, et al. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(8):739-746.

[16] 褚剑峰,郑琪,黄伟忠. 日本迷你南瓜的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(6):711.

[17] 白婧. 农杆菌介导  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(BG2)基因转化南瓜的

研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.

[18] 任桂红,林荣,杨东. 南瓜子叶再生体系的建立[J]. 北方园艺,2010(23):133-135.

[19] 耿新丽,赵一鹏,秦勇. 金童观赏南瓜离体繁殖技术研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(7):1338-1339.

[20] 李伟,程永安,张思慧,等. 双单倍体南瓜后代子叶离体再生植株研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(3):141-146.

[21] 李长生,赵传志,李爱芹,等. 黑籽南瓜离体再生体系与转基因技术研究[J]. 山东农业科学,2009(7):8-11.